UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉTUDE DE L'ÉTAPE DE CROISSANCE DE CELLULES DE *Vitis vinifera* CULTIVÉES EN BIORÉACTEUR POUR LA PRODUCTION D'ANTHOCYANES

MARIE-FRANCE PÉPIN
DÉPARTEMENT DE GÉNIE CHIMIQUE
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

THÈSE PRÉSENTÉE EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLÔME DE PHILOSOPHIAE DOCTOR (Ph.D.)
(GÉNIE CHIMIQUE)
JUILLET 1996

© Marie-France Pépin, 1996.

National Library of Canada
Acquisitions and Bibliographic Services
395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque nationale du Canada
Acquisitions et services bibliographiques
395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

Our file Notre référence

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

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

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

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

0-612-33019-2

Canada

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Cette thèse intitulée:

ÉTUDE DE L'ÉTAPE DE CROISSANCE DE CELLULES DE *Vitis vinifera* CULTIVÉES EN BIORÉACTEUR POUR LA PRODUCTION D'ANTHOCYANES

présentée par : PÉPIN, Marie-France

en vue de l'obtention du diplôme de: Philosophiae Doctor

le jury d'examen est constitué de:

M. KLVANA, Danilo, Ph.D., président

M. CHAVARIE, Claude, Ph.D., membre et directeur de recherche

M. ARCHAMBAULT, Jean, Ph.D., membre et co-directeur de recherche

M. THOMAS, Daniel, Doctorat d'État, membre

M. KAMEN, Amine A., Ph.D., membre

RÉSUMÉ

Cette thèse cerne les conditions de culture en bioréacteur qui favorisent une croissance accrue des cultures de Vitis vinifera, afin de contribuer à augmenter la productivité de ce système de production d'anthocyanes. Les travaux rapportés sont principalement concentrés sur l'étude et l'amélioration de l'étape croissance de la biomasse dans un bioréacteur à double ruban hélicoïdal (HRI) opéré en mode cuvée ou avec une alimentation programmée. Ils visent à déterminer les conditions de culture qui permettent de maximiser le nombre de cellules disponibles pour l'étape de production en délimitant les conditions d'oxygénation les plus favorables à la croissance et en identifiant les sources de limitation nutritionnelle de la croissance de la biomasse.

Des cultures en cuvée effectuées dans des bioréacteurs avec contrôle de la concentration d'oxygène dissous (OD) dans un milieu de croissance standard ont permis d'établir que les taux spécifiques de croissance et d'assimilation d'oxygène augmentent entre 10 % et 50 % d'oxygène dissous (OD), alors que des concentrations de 70 % à 90 % ont un effet négatif. Les indices de croissance de la biomasse sèche obtenus en bioréacteur sont toujours comparables ou meilleurs que ceux observés dans des cultures témoins en flacons agités. Les taux spécifiques d'assimilation d'oxygène affichent une augmentation graduelle suivie d'un plafonnement et d'une diminution vers ce qui semble être un taux minimum, assimilable à un taux de maintenance sur l'oxygène, autour de 0,04 mmole O_2 $(g_{MS}\ h)^{-1}$ ou 0,2 µmole O_2 $(10^6$ cellules $h)^{-1}$. Une hausse de la concentration d'oxygène dissous provoque donc une augmentation du taux spécifique d'assimilation d'oxygène, vraisemblablement reliée à une augmentation de l'activité métabolique, et une augmentation de la quantité maximale de biomasse sèche (MS) produite.

Des mesures de concentration d'OD, de taux volumiques et spécifiques d'assimilation d'O_2 (obtenus sur la base de la caractérisation des flacons agités en termes de transfert d'O_2), de croissance de la biomasse sèche et de prolifération cellulaire faites dans des cultures en

flacons agités ont fourni des informations cruciales et inédites dans la littérature sur le comportement des cultures. Ainsi, dans le milieu de croissance, la prolifération cellulaire cesse après 6 à 7 jours alors que la concentration de biomasse continue de progresser pendant encore 7 jours de culture. Ce résultat implique qu'il est essentiel de baser la caractérisation du comportement des cellules végétales et l'optimisation des conditions de culture sur des comptes cellulaires plutôt que sur la biomasse sèche. Il s'agit d'un changement d'approche important dans la mise au point de procédés impliquant des cellules végétales, essentiellement basée jusqu'à maintenant sur une optimisation de la biomasse sèche.

De plus, ces cultures en flacons agités ont aussi permis de constater que l'arrêt de la prolifération cellulaire coïncide avec l'observation d'un maximum dans les courbes de taux volumique (OUR) et spécifiques ($(q_{O_2})_{MS}$ et $(q_{O_2})_{cell}$) d'assimilation d'O_2. Ainsi, le plafonnement des mesures d'OUR aussi observé en bioréacteur serait relié à une diminution importante du taux de division cellulaire et à une inflexion du taux de croissance de la biomasse.

Cette incidence sur le taux volumique d'assimilation d'O_2 du ralentissement de la prolifération cellulaire a permis d'utiliser le plafonnement des mesures d'assimilation d'O_2 comme repère de la manifestation d'une limitation nutritionnelle à la division cellulaire et comme signal pour l'alimentation d'un supplément de nutriments. Trois nutriments potentiellement limitants ont été testés dans des cultures en bioréacteur effectuées à 50 % d'OD : PO_4, Mg et NH_4. Chez *V. vinifera*, cette stratégie a permis d'identifier l'ion ammonium comme étant le premier élément nutritif responsable de la limitation de la prolifération cellulaire. L'alimentation programmée d'une solution concentrée de $(NH_4)_2SO_4$ et de glucose au moment où l'OUR plafonne a permis de soutenir le taux volumique d'assimilation d'O_2 et d'obtenir une concentration cellulaire atteignant $6{,}8 \cdot 10^6$ cellules mL^{-1} comparativement à $2{,}3 \cdot 10^6$ cellules mL^{-1} dans le milieu de croissance usuel, ce qui représente une amélioration appréciable de la productivité de l'étape de croissance. L'utilisation faite de la mesure en ligne

d'assimilation d'oxygène s'est donc avérée un outil important d'interprétation des résultats de cultures en cuvée et de développement de bioprocédés impliquant des cellules végétales.

ABSTRACT

This thesis presents the work done to determine the bioreactor culture conditions that stimulate an increased growth of *Vitis vinifera* cell cultures in order to contribute to an increased productivity of this anthocianin production system. This work is primarily focused on the characterization and improvement of the growth phase of batch and fed batch suspensions cultures grown in an helical ribbon impeller bioreactor (HRI). The main objective was to determine culture conditions allowing the maximum cell availability for subsequent production phase in temrs of dissolved oxygen concentration and growth limiting nutrient identification.

Batch cultures performed in helical ribbon impeller reactors allowed to establish that the specific rates for growth and oxygen uptake increase for dissolved oxygen (DO) concentrations between 10 % and 50 % while concentrations of 70 % to 90 % have a negative effect. The growth indexes for dry biomass production in bioreactor were always comparable or better than those observed in control shake flask. The specific oxygen uptake rates show a gradual increase followed subsequently by a plateau and a decrease toward a minimum value that could be associated to an oxygen maintenance rate of about 0.04 mmol O_2 $(g_{dw}\ h)^{-1}$ or 0.2 μmol O_2 $(10^6$ cells $h)^{-1}$. An increase in oxygen concentration thus cause an increase of the specific oxygen uptake rate, likely associated to an increased metabolic activity, and increased dry weight (dw) production.

Crucial and original data was obtained from the measurement of DO concentration, volumic and specific rates for oxygen uptake (obtained from the oxygen transfer characteristics of the shake flasks), dry biomass growth, and cell proliferation. While cell proliferation stopped after 6 to 7 days in the growth medium, biomass concentration continued to increase for approximately 7 additional days of culture. It is thus essential to use cell counts as a basis for

the characterization of plant cell behavior and the optimization of culture conditions. This is an important modification for bioprocess development involving plant cell cultures that was formerly essentially done by optimizing dry biomass.

Moreover, shake flask cultures also allowed to identify that cell proliferation ceased when maxima in the volumic (OUR) and specific ($(q_{O2})_{dw}$ and $(q_{O2})_{cell}$) oxygen uptake rate curves were observed. Thus, the leveling off in OUR could be associated to a drastic decrease in the cell division rate and to an inflection in the biomass growth rate.

The repercussions of the decrease of the cell proliferation rate on the volumic oxygen uptake rate allowed to use the leveling off of the oxygen uptake curve as an indication of nutriment limitation for cell division and as a signal for the addition of supplemental nutriments. Three potentially limiting nutriments (PO_4, Mg and NH_4) were tested in bioreactor cultures at 50% DO. This strategy permitted to identify that the ammonium ion was the main nutriment for cell proliferation limitation during batch cultures of *V. vinifera*. Addition of a concentrated of $(NH_4)_2SO_4$ and glucose when OUR reaches its plateau allowed to sustain the volumic oxygen assimilation rate and to obtain a cell concentration in the medium of $6.8 \cdot 10^6$ cells mL^{-1} in comparison with $2.3 \cdot 10^6$ cells mL^{-1} in the standard growth medium. This represents a significant increase in productivity for the growth phase. On-line measurement of oxygen uptake is therefore an important tool for the interpretation of batch culture data and for the development of processes involving plant cells.

REMERCIEMENTS

Les dernières années ont été nourries par moultes personnes et événements, jalonnées de sérieuses remises en question qui ont bien failli compromettre l'aboutissement de ce doctorat.

Me restreignant au plan scientifique, je dois d'abord souligner l'apport de Patrick Desjardins, candidat au Ph. D. au département de génie physique, pour sa contribution à la discussion de mes résultats, à leur organisation, à la lecture critique et constructive de plusieurs sections de la thèse. Nos nombreuses discussions sur la recherche et sur la formation à la recherche ont été des plus enrichissantes et m'ont permis de maturer comme chercheur bien plus que toutes les autres interventions ou situations auxquelles j'ai été soumise ou confrontée au cours de mon doctorat.

Je dois aussi remercier mon directeur, le professeur Claude Chavarie, pour son soutien indéfectible et pour ses offres répétées de support. C'est un homme généreux et un bon scientifique, qui a malheureusement pour ses étudiants été appelé vers d'autres activités depuis quelques années.

Mon co-directeur, le professeur Jean Archambault, est un entrepreneur tenace et ambitieux, et un excellent ingénieur. Je le remercie pour l'opportunité qu'il m'a donnée de travailler avec lui au développement de la technologie de la culture de cellules végétales. Je crains que nous en sortions tous les deux aigris et je soupçonne que nous ne nous donnerons pas l'occasion d'en discuter. Les textes portant sur la formation au doctorat ne manquent jamais de conseiller aux candidats de veiller à entretenir une bonne relation avec leur directeur de recherche. Disons que de ce point de vue, cette thèse n'est pas une réussite et que cet aspect constitue l'une des multiples choses que je tenterais de faire autrement.

Je remercie le professeur Jean-Noël Barbotin de m'avoir accueilli dans son laboratoire à l'Université de technologie de Compiègne. Le stage en culture d'embryons somatiques que j'y

ai effectué m'a permis de me familiariser avec un autre laboratoire, d'autres façons de faire, et d'apprivoiser une autre facette de la culture des cellules et tissus végétaux.

Parmi les personnes que j'ai côtoyées dans le laboratoire, je veux remercier pour leur présence et leur support Céline Allard, Johanne Bussières, Luc Lavoie et Robert Williams. Les techniciens du département ont été d'une aide précieuse pour la construction du système d'alimentation gazeuse.

Le contexte contractuel dans lequel s'inscrivait le projet de recherche m'a certainement confirmé à quel point les problèmes scientifiques sont souvent peu de choses devant les problèmes de financement, de formation, d'organisation et de relations interpersonnelles, et jusqu'à quel point les intervenants comme leurs organisations y sont peu préparés.

En terminant, il me faut souligner les sources de financement de cette recherche et de ma formation au doctorat : le Centre québécois de valorisation de la biomasse et Botanical Phytotech Inc. (pour un complément de bourse et le budget de fonctionnement du projet), le Conseil de recherche en sciences naturelles et en génie (pour ma bourse d'études supérieures et les subventions de fonctionnement du professeur Claude Chavarie et du professeur Jean Archambault qui ont été en partie affectées au projet), l'Association canadienne pour les technologies de pointe et le Département de génie chimique pour les bourses d'excellence qu'ils m'ont accordées, le Fonds pour la formation de chercheurs et l'aide à la recherche pour son soutien partiel à un stage en France, les départements de génie chimique de l'École Polytechnique et de l'Université du Québec à Trois-Rivières pour m'avoir accordé leur confiance et permis d'enseigner deux cours, les fonds de recherche du professeur Raymond Mayer sur lesquels ont été puisés une partie de mon support financier. Je remercie également le professeur Jean Paris, pour m'avoir permis de travailler dans son groupe de recherche et avoir ainsi supporté financièrement la fin de ce doctorat.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ ____ iv

ABSTRACT ____ vii

REMERCIEMENTS ____ ix

TABLE DES MATIÈRES ____ xi

LISTE DES TABLEAUX ____ xvi

LISTE DES FIGURES ____ xviii

LISTE DES ANNEXES ____ xxxviii

LISTE DES SYMBOLES ET ABBRÉVIATIONS ____ xxxix

1. INTRODUCTION ____ 1

1.1 Contexte et travaux préliminaires ____ 2

1.1.1 La production d'anthocyanes ____ 2

1.1.1.1 Les anthocyanes comme source de colorants alimentaires ____ 2

1.1.1.2 L'intérêt économique de la production d'anthocyanes ____ 3

1.1.2 La culture de cellules de plante ____ 6

1.1.2.1 Historique et applications ____ 6

1.1.2.2 Les cellules végétales ____ 9

1.1.2.2.1 Caractéristiques des cellules végétales cultivées in vitro ____ 11

1.1.2.2.2 Aspects nutritionnels ____ 20

1.1.2.2.2.1 Azote ____ 22

1.1.2.2.2.2 Phosphate ____ 25

1.1.2.2.2.3 Hydrates de carbones ____ 27

1.1.2.2.2.4 Oxygène et métabolites gazeux ____ 33

1.1.2.2.2.5 Régulateurs de croissance ____ 36

1.1.3 La production d'anthocyanes et la culture de cellules ____ 39

1.2 Problématique et état des connaissances ____ 46

1.2.1 Mélange et transfert de masse ____ 48

1.2.1.1 Agitation et résistance au cisaillement ____ 48

1.2.1.2 Transfert d'oxygène 51
1.2.2 Conditions d'oxygénation 53
1.2.3 Mise au point de procédés 56
1.3 Objectifs 59
1.4 Présentation du travail 61
2. APPROCHE EXPÉRIMENTALE : STRATÉGIE DE RECHERCHE ET CHOIX MÉTHODOLOGIQUES 63
2.1 Choix du bioréacteur de culture en suspension 63
2.2 Étude de l'effet de la concentration d'oxygène dissous 64
2.2.1 Plan expérimental des cultures en cuvée en bioréacteurs 65
2.3 Croissance et consommation de nutriments 68
2.3.1 Études complémentaires en flacons agités 68
2.3.2 Cultures complémentaires en bioréacteurs opérés en cuvée alimentée 68
2.4 Organisation de l'analyse des résultats 71
3. MÉTHODES, PROCÉDURES ANALYTIQUES ET CALCULS 73
3.1 Méthodes 73
3.1.1 Lignées cellulaires et milieux de culture 73
3.1.2 Entretien des lignées cellulaires 74
3.1.3 Montages expérimentaux 75
3.1.3.1 Bioréacteurs à double ruban hélicoïdal 75
3.1.3.1.1 Cultures en bioréacteur 76
3.1.3.1.2 Conditions particulières aux cultures en cuvées alimentées 78
3.1.3.2 Contrôle et acquisition de données 79
3.1.3.3 Cultures en flacons agités 81
3.1.4 Mesures des coefficients de transfert et des taux de consommation d'oxygène 82
3.1.4.1 Coefficients volumétriques de transfert dans les flacons agités 82
3.1.4.2 Coefficients volumétriques de transfert dans les bioréacteurs 86
3.1.4.3 Taux volumique d'assimilation d'oxygène dans les bioréacteurs HRI 87
3.1.4.4 Taux d'assimilation d'oxygène dans les flacons agités 88
3.2 Procédures et calculs 89

3.2.1 Méthodes analytiques 89
3.2.1.1 Suivi de la croissance de la biomasse et de la production d'anthocyanes 89
3.2.1.1.1 Volume de la biomasse, masse humide et masse sèche 89
3.2.1.1.2 Dénombrement cellulaire et viabilité 90
3.2.1.1.3 Anthocyanes intracellulaires 90
3.2.1.2 Mesures en lignes 91
3.2.1.2.1 Oxygène dissous 91
3.2.1.2.2 pH, Conductivité 91
3.2.1.3 Analyses physico-chimiques 93
3.2.1.3.1 Hydrates de carbone 93
3.2.1.3.2 Ions NH_4, NO_3, PO_4 93
3.2.1.3.3 pH, Conductivité 93
3.2.2 Calculs 94
3.2.2.1 Calculs relatifs à la présentation des données 94
3.2.2.2 Rendements 96
3.2.2.3 Taux spécifiques de croissance 99
3.2.2.4 Taux spécifique d'assimilation d'oxygène 100
3.2.2.5 Estimés des concentrations de CO_2 dans le milieu 102
3.2.2.5.1 Estimés du contenu en carbone de la biomasse 106
3.2.2.5.2 Estimés de RQ moyen sans mesures de CTR 106

4. CULTURES EN SUSPENSION EN FLACONS AGITÉS DE CELLULES DE *Vitis vinifera* 108

4.1 Sommaire 110

4.2 Abstract 111

4.3 Introdution 112

4.4 Material and methods 114
4.4.1 Plant Cell Line and Suspension Cultures 114
4.4.2 Dissolved Oxygen Concentration and Gas Transfer Coefficient Measurements 115
4.4.3 Analytical 116

4.5 Results and discussion 117
4.5.1 Growth in Shake Flask 117

4.5.2 Dissolved Oxygen Pattern of Shake Flask Culture 121

4.6 Conclusion 124

5. CULTURES EN BIORÉACTEURS : EFFET DE LA CONCENTRATION D'OXYGÈNE DISSOUS SUR LA CROISSANCE DE LA BIOMASSE, LE TAUX D'ASSIMILATION D'OXYGÈNE ET LA PRODUCTION D'ANTHOCYANES 127

5.1 Introduction 128

5.2 Méthodologie et techniques expérimentales 132

5.2.1 Lignée cellulaire et cultures en suspension 132

5.2.2 Cultures en bioréacteurs 132

5.2.2.1 Mesure du taux d'assimilation d'oxygène 134

5.2.2.2 Estimé des concentrations de CO_2 dans le milieu 135

5.2.3 Méthodes analytiques 136

5.3 Résultats et discussion 137

5.3.1 Croissance et consommation de nutriments 137

5.3.2 Taux spécifique de croissance et performance comparée 141

5.3.2.1 Taux spécifique de croissance et concentration d'OD 143

5.3.2.2 Performance comparée des cultures en bioréacteur et en flacons agités 151

5.3.3 Concentration d'oxygène dissous et assimilation d'oxygène 153

5.3.4 Rendements 161

5.3.4.1 Hydrates de carbone 165

5.3.4.2 Ions ammonium, nitrate et phosphate 169

5.3.5 Analyse préliminaire de la production d'anthocyanes 171

5.4 Conclusion 177

6. IDENTIFICATION DES SOURCES DE LIMITATION NUTRITIONELLE DE LA PROLIFERATION CELLULAIRE. 178

6.1 Introduction 178

6.1.1 Parallèle entre les courbes de croissance en cuvée et d'assimilation d'O_2 180

6.2 Méthodologie et techniques expérimentales 184

6.2.1 Cultures en bioréacteurs 184

6.2.2 Lignée cellulaire et cultures en suspension 185
6.2.3 Méthodes analytiques et calculs 186
6.3 Résultats et discussion 186
6.3.1 Influence des ions phosphate 186
6.3.2 Influence des ions magnésium et sulfate 189
6.3.3 Influence de l'ion ammonium 191
6.4 Conclusion 198
7. DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSIONS 199
7.1 Croissance en bioréacteur et concentration d'oxygène dissous 199
7.2 Cultures en flacons agités 202
7.3 Identification de la source de limitation de la prolifération cellulaire 204
7.4 Perspectives 205
7.5 Considérations techniques 206
8. RÉFÉRENCES 208
ANNEXES 222

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1 Ventes annuelles américaines de pigments rouges non-homologués ____ 4

Tableau 2.2 Événements importants du développement de la culture de cellules et de tissus végétaux ____ 7

Tableau 1.3 Impact des caractéristiques spécifiques aux cellules végétales sur les cultures *in vitro* et incidence sur le développement des bioprocédés ____ 19

Tableau 1.4 Concentration typique d'éléments chimiques dans les feuilles de végétaux ____ 21

Tableau 1.5 Croissance de *V. vinifera* et production d'anthocyanes dans des bioréacteurs à cellules immobilisées ____ 44

Tableau 1.6 Schéma classique de développement de procédé ____ 58

Tableau 2.1 Conditions expérimentales des cultures en bioréacteur visant l'étude de l'effet de la concentration d'OD sur la croissance cellulaire ____ 67

Tableau 2.2 Conditions expérimentales des cultures en bioréacteur visant l'étude de la source de limitation nutritionnelle la croissance cellulaire ____ 70

Tableau 3.1 Coefficients de transfert (k_La et $\mathbf{K}_{O_2}$) d'un flacon agité de 500mL ____ 85

Table 4.1 Anthocyanin yield on dry biomass ____ 121

Tableau 5.1 Rendements globaux des cultures en cuvée en bioréacteurs ____ 163

Tableau 5.2 Production de biomasse sèche par unité de nutriment consommé des cultures en cuvée en bioréacteurs, évaluée au moment où OUR est maximal ____ 164

Tableau 5.3 Variation de la proportion d'hydrates de carbone utilisés pour la production de composés extracellulaires et du ratio de ces composés par rapport à la biomasse sèche produite en fonction de la concentration d'OD, au moment où OUR atteint son maximum et en fin de culture ____ 168

Tableau 5.4 Relation entre la concentration d'OD, le rendement en anthocyanes sur les hydrates de carbone consommés et la productivité d'anthocyanes de cuvées effectuées dans le milieu B5DN ____ 172

Tableau A2.1 Identification des indicateurs graphiques des courbes de croissance 243

Tableau A2.2 Taux d'augmentation du rapport biomasse humide sur biomasse sèche et masse sèche spécifique des cellules 244

Tableau A2.3 Rendements en anthocyanes sur la biomasse sèche et humide 246

Tableau A3.1 Index des figures représentants les résultats des cultures en cuvée en bioréacteurs 278

Tableau A3.2 Viabilité des cultures en cuvée en bioréacteurs 280

Tableau A3.3 Taux spécifiques d'hydrolyse du saccharose 281

Tableau A3.4 Diamètre limite et efficacité des cultures à 10% et 90% d'OD 288

Tableau A4.1 Conditions expérimentales des cultures en bioréacteur visant l'étude de la source de limitation nutritionnelle la croissance cellulaire 370

Tableau A4.2 Index des figures représentant les résultats des cultures en cuvée en bioréacteurs 371

Tableau A4.3 Viabilité des cultures en cuvée alimentée en bioréacteurs 373

Tableau A5.1 Contenu en cendres, en carbone (C), en hydrogène (H) et en azote total (N) décrits dans la littérature pour différentes espèces 402

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 Schéma de processus de culture de cellules végétales in vitro ____ 10

Figure 1.2 Représentation schématique d'une coupe de cellule végétale ____ 12

Figure 1.3 Illustrations de divers états de turgescence et de plasmolyse cellulaire ____ 13

Figure 1.4 Représentation schématique de l'expansion cellulaire ____ 14

Figure 1.5 Représentation schématique de la formation de la plaque cellulaire lors de la division des cellules végétales ____ 15

Figure 1.6 Connexions cytoplasmiques à travers les plasmodesmes des parois cellulaires des cellules végétales ____ 16

Figure 1.7 Représentation schématique des voies d'assimilation du nitrate ____ 23

Figure 1.8 Principales voies de la catabolyse du glucose, incluant la glycolyse et la génération de l'acétyl CoA et de malate, le cycle de l'acide citrique et la voie des penthose phosphate ____ 30

Figure 1.9 Réactions de phosphorylation oxydatives couplées avec les principales voies cataboliques ____ 31

Figure 1.10 Métabolites des voies de dégradation du glucose et leurs dérivés utilisés dans la biosynthèse ____ 32

Figure 1.11 Effets des régulateurs de croissance sur l'évolution des tissus végétaux ____ 37

Figure 1.12 Schéma du procédé envisagé de production d'anthocyanes ____ 42

Figure 1.13 Progression des concentrations de nutriments dans le milieu de culture, de la croissance de la biomasse et de la production d'anthocyanes de cultures en flacons agités effectuées en deux étapes ____ 45

Figure 2.2 Schéma organisationnel reliant les diverses étapes de l'approche expérimentale aux objectifs spécifiques poursuivis à travers le contenu de la thèse ____ 72

Figure 3.1 Configuration des bioréacteurs (a) Bioréacteur 5-L (b) Biréacteur 2-L ____ 77

Figure 3.2 Schéma du système d'aération et de contrôle d'OD des bioréacteurs HRI 5-L et 2-L ____ 80

Figure 3.3 Variation du coefficient de transfert d'oxygène, kLa, avec la vitesse d'agitation et la hauteur submergée des chicanes de surface ____ 86

Figure 3.4 Exemple de mesure de l'OUR dans le réacteur HRI-5L ____ 87

Figure 3.5 Comparaison des mesures de pH in situ et hors ligne de deux cultures effectuées dans le bioréacteur ____ 92

Figure 3.6 Courbes typiques de consommation des nutriments et de croissance de la biomasse d'une culture en cuvée effectuée dans le bioréacteur HRI-5L à 50% d'OD. ____ 98

Figure 3.7 Représentation d'une courbe typique de croissance de la biomasse sèche par un modèle logistique où le point d'inflexion correspond à t_{OURmax} ____ 102

Figure 4.1 Growth of V. vinifera in shake flask. ____ 118

Figure 4.2 Sucrose hydrolysis and monosaccharides uptake (A), conductivity (B), pH (C) and nutrient uptake (D) of V. vinifera cell suspension culture grown in shake flask ____ 119

Figure 4.3 Time course of DO concentration and OUR (A) and estimated specific oxygen uptake rate (B) of V. vinifera cell culture grown in shake flask ____ 120

Figure 4.4 Anthocyanin production and yield on biomass dry weight in shake flasks. ____ 120

Figure 4.5 Estimated specific oxygen uptake rates (A) and cell growth curve (B) ____ 123

Figure 4.6 Relation between the biomass PCV, ww/dw ratio, and the medium osmotic pressure of V. vinifera cell cultures ____ 125

Figure 5.1 Courbes de croissance et de consommation de nutriment typiques d'une culture en bioréacteur avec contrôle de l'oxygène dissous à 50% ____ 138

Figure 5.2 Consommation des ions ammonium, phosphate et nitrate de cultures de diverses lignées cellulaires, effectuées en bioréacteurs à 50% d'oxygène dissous ____ 139

Figure 5.3 Concentration d'oxygène dissous, taux volumiques d'assimilation d'oxygène et courbes de croissance d'une culture en bioréacteur et de sa culture contrôle en flacon agité 142

Figure 5.4 Taux de croissance spécifique moyen, $\bar{\mu}_{MS}$, en fonction de la concentration d'oxygène dissous de cultures en bioréacteur 144

Figure 5.5 Limite de diamètre des amas cellulaires pour une oxygénation adéquate selon la concentration d'OD 146

Figure 5.6 Concentrations calculées de CO_2 d'une culture en cuvée en bioréacteur et de sa culture contrôle en flacon agité et incidence de la variation du k_La dans le bioréacteur 149

Figure 5.7 Comparaison des estimés des concentrations de CO_2 dans les phases gazeuse et liquide de cultures en bioréacteur et de cultures témoins en flacons agités 150

Figure 5.8 Comparaison des indices de croissance des cultures en bioréacteur avec leur cultures témoins en flacon agité 152

Figure 5.9 Progression des taux volumiques d'assimilation d'oxygène dans le temps selon la concentration d'oxygène dissous de cultures en cuvée effectuées avec les lignées VVG12 et VVG105 153

Figure 5.10 Comparaison des taux spécifiques d'assimilation d'oxygène d'une culture en bioréacteur et de sa culture contrôle en flacon agité 154

Figure 5.11 Progression des taux spécifiques d'assimilation d'oxygène dans le temps selon la concentration d'oxygène dissous de cultures en cuvée de cellules des lignées VVG12 et VVG105 dans le milieu B5 155

Figure 5.12 Progression des aux spécifiques d'assimilation d'oxygène dans le temps selon l'histoire des inocula de cultures en cuvée de cellules de la lignée VVG12 158

Figure 5.13 Variation des taux spécifiques d'assimilation d'O_2 avec la concentration d'O2 avant la manifestation d'une limitation nutritionnelle 158

Figure 5.14 Progression des taux volumiques d'assimilation d'oxygène dans le temps selon la concentration d'oxygène dissous de cultures de N. tabacum en bioréacteur agité mécaniquement à quatre vitesses d'agitation (Ho et coll.) 159

Figure 5.15 Variation des taux spécifiques d'assimilation d'O_2 avec la concentration d'O_2 avant l'observation de OUR_{max} de cultures de N. tabacum en bioréacteur agité mécaniquement à quatre vitesses d'agitation (HO et *coll.)* 159

Figure 5.16 Estimés des concentrations de CO_2 dans les phases gazeuse et liquide des cultures en bioréacteur effectuées à diverses concentrations d'OD avec la lignée VVG12 160

Figure 5.17 Production de biomasse par unité de nutriment consommé à OURmax de cinq cultures en bioréacteur contrôlées à 50% d'OD, effectuées avec la lignée VVG111 162

Figure 5.18 Production de biomasse par unité de nutriment consommé en fonction des conditions d'oxygénation du milieu de culture pour la lignée VVG105. 165

Figure 5.19 Production de biomasse en fonction de la concentration d'hydrates de carbone pour des cultures effectuées à 10, 30 et 50% d'oxygène dissous avec la lignée VVG105. 166

Figure 5.20 Rendements apparents en biomasse sèche sur l'ions NO_3 en fonction des conditions d'oxygénation et de la composition du milieu de culture pour les lignées VVG105 et VVG12 170

Figure 5.21 Production spécifique d'anthocyanes en fonction du temps pour des cultures en cuvée à différentes concentrations d'OD 174

Figure 5.22 Estimés des taux spécifiques de production d'anthocyanes selon les conditions d'oxygénation 176

Figure 5.23 Production d'anthocyanes selon les conditions d'oxygénation 176

Figure 6.1 Parallèle entre croissance de la biomasse et assimilation d'oxygène pour trois cultures en cuvée en bioréacteurs à 10, 30 et 50% d'OD 180

Figure 6.2 Parallèle entre croissance de la biomasse, prolifération cellulaire et taux volumique et spécifique d'assimilation d'oxygène 182

Figure 6.3 Progression de la composition du milieu de culture et taux volumique et spécifique d'assimilation d'oxygène ____ 183

Figure 6.4 Indices d'augmentation de la fraction viable de la concentration de cellules et de biomasse sèche d'une culture en milieu B5 supplémenté rapidement avec une solution concentrée de KH_2PO_4 et de glucose ____ 187

Figure 6.5 Concentration extracellulaire et taux spécifique de consommation des ions phosphates d'une culture en milieu B5 supplémenté rapidement avec une solution concentrée de NAH_2PO_4 et de glucose ____ 189

Figure 6.6 Taux spécifiques d'assimilation d'oxygène d'une culture en milieu B5 supplémenté rapidement avec une solution concentrée de KH_2PO_4 et de glucose ____ 189

Figure 6.7 Indices d'augmentation de la fraction viable de la concentration de cellules et de biomasse sèche d'une culture en milieu B5 supplémenté rapidement avec une solution concentrée de $MgSO_4$ et de glucose ____ 191

Figure 6.8 Indices d'augmentation de la fraction viable de la concentration de cellules et de biomasse sèche d'une culture en milieu B5 supplémenté rapidement avec une solution concentrée de $(NH_4)_2SO_4$ et de glucose ____ 191

Figure 6.9 Concentration de cellules viables de la culture en milieu B5 supplémenté en NH_4 ____ 192

Figure 6.10 Courbes de concentration des hydrates de carbones, des ions nitrate, ammonium et phosphate et de pH de la culture en milieu B5 supplémenté en NH_4 ____ 194

Figure 6.11 Taux volumique (A) et spécifiques d'assimilation d'O_2 (B) de la culture en milieu B5 supplémenté en NH_4 ____ 194

Figure 6.12 Masse spécifique des cellules (A) et ratio MS/MH (B) de la culture en milieu B5 supplémenté en NH_4 ____ 195

Figure 6.13 Rendement apparent en biomasse sèche sur les hydrates de carbone des cultures effectuées avec la lignée VVG111 ____ 196

Figure 6.14 Rendement apparent en biomasse sèche sur l'azote (A) des toutes les cultures effectuées avec la lignée VVG111 et (B) de la culture en milieu B5 supplémenté en NH4 ____ 197

Figure A2.1 Consommation de nutriments, croissance de la biomasse et production d'anthocyanes de cultures en cuvée et en flacons agités de cellules VVG105 sc53 ____ 250

Figure A2.2 Croissance de la biomasse, prolifération cellulaire et viabilité, production d'anthocyanes, masse des cellules et ratio masse humide sur masse sèche de cultures en cuvée et en flacons agités de cellules VVG105 sc53. ____ 251

Figure A2.3 Croissance de la biomasse, prolifération cellulaire et viabilité, production d'anthocyanes, masse des cellules et ratio masse humide sur masse sèche de cultures en cuvée et en flacons agités de cellules VVG105 sc58. ____ 252

Figure A2.4 Consommation de nutriments, croissance de la biomasse et production d'anthocyanes de cultures en cuvée et en flacons agités de cellules VVG105 sc58 ____ 253

Figure A2.5 Croissance de la biomasse, prolifération cellulaire et viabilité, production d'anthocyanes, masse des cellules et ratio masse humide sur masse sèche de cultures en cuvée et en flacons agités de cellules VVG105 sc64 ____ 254

Figure A2.6 Consommation de nutriments, croissance de la biomasse et production d'anthocyanes de cultures en cuvée et en flacons agités de cellules VVG105 sc64 ____ 255

Figure A2.7 Croissance de la biomasse, prolifération cellulaire, production d'anthocyanes, masse des cellules et ratio masse humide sur masse sèche de cultures en cuvée et en flacons agités de cellules VVG111 sc20. ____ 256

Figure A2.8 Consommation de nutriments, assimilation d'oxygène, croissance de la biomasse et prolifération cellulaire de cultures en cuvée et en flacons agités de cellules VVG111 sc20 ____ 257

Figure A2.9 Suivi du pH, de la conductivité, de l'OD et du volume de cultures en cuvée et en flacons agités de cellules VVG111 sc20 ____ 258

Figure A2.10 Suivi de l'OD et représentation exponentielle des courbe de croissance de cultures en cuvée et en flacons agités de cellules VVG111 sc20 ____ 259

Figure A2.11 Taux spécifique de croissance et d'assimilation d'O_2 évalués sur la base de la biomasse sèche de cultures en cuvée et en flacons agités de cellules VVG111 sc20 ____ 260

Figure A2.12 Taux spécifique de croissance et d'assimilation d'O_2 évalués sur la base du compte cellulaire de cultures en cuvée et en flacons agités de cellules VVG111 sc20 ____ 261

Figure A2.13 Croissance de la biomasse, prolifération cellulaire, production d'anthocyanes, masse des cellules et ratio masse humide sur masse sèche de cultures en cuvée et en flacons agités de cellules VVG111 sc27(D6) ___ 262

Figure A2.14 Consommation de nutriments, assimilation d'oxygène, croissance de la biomasse et prolifération cellulaire de cultures en cuvée et en flacons agités de cellules VVG111 sc27(D6) ____ 263

Figure A2.15 Suivi du pH, de la conductivité, de l'OD et du volume de cultures en cuvée et en flacons agités de cellules VVG111 sc27(D6) ____ 264

Figure A2.16 Relation entre le PCV, la biomasse humide, le rapport MH/MS et l'osmosité du milieu pour la culture VVG111 sc27(D6) ____ 265

Figure A2.17 Suivi de l'OD et représentation exponentielle des courbe de croissance de cultures en cuvée et en flacons agités de cellules VVG111 sc27(D6) ____ 266

Figure A2.18 Taux spécifique de croissance et d'assimilation d'O_2 évalués sur la base de la biomasse sèche de cultures en cuvée et en flacons agités de cellules VVG111 sc27(D6) ____ 267

Figure A2.19 Taux spécifique de croissance et d'assimilation d'O_2 évalués sur la base du compte cellulaire de cultures en cuvée et en flacons agités de cellules VVG111 sc27(D6) ____ 268

Figure A2.20 Croissance de la biomasse, prolifération cellulaire, production d'anthocyanes, masse des cellules et ratio masse humide sur masse sèche de cultures en cuvée et en flacons agités de cellules VVG111 sc31(D10) __ 269

Figure A2.21 Consommation de nutriments, assimilation d'oxygène, croissance de la biomasse et prolifération cellulaire de cultures en cuvée et en flacons agités de cellules VVG111 sc31(D10) 270

Figure A2.22 Suivi du pH, de la conductivité, de l'OD et du volume de cultures en cuvée et en flacons agités de cellules VVG111 sc31(D10) 271

Figure A2.23 Relation entre le PCV, la biomasse humide, le rapport MH/MS et l'osmosité du milieu pour la culture VVG111 sc31(D10) 272

Figure A2.24 Suivi de l'OD et représentation exponentielle des courbe de croissance de cultures en cuvée et en flacons agités de cellules VVG111 sc31(D10) 273

Figure A2.25 Taux spécifique de croissance et d'assimilation d'O_2 évalués sur la base de la biomasse sèche de cultures en cuvée et en flacons agités de cellules VVG111 sc27(D6) 274

Figure A2.26 Taux spécifique de croissance et d'assimilation d'O_2 évalués sur la base du compte cellulaire de cultures en cuvée et en flacons agités de cellules VVG111 sc27(D6) 275

Figure A3.1 Profil de concentration d'OD autour d'un amas cellulaire 282

Figure A3.2 Amas cellulaires typiques de V. vinifera VVG111 285

Figure A3.3 Proportion aérée des amas cellulaires de divers diamètres en fonction de la concentration d'OD et du taux spécifique d'assimilation d'O_2 286

Figure A3.4 Diamètre limite pour une oxygénation adéquate des amas cellulaire pour chaque concentration d'OD testée en bioréacteur en fonction des taux spécifiques d'assimilation d'O_2 maximal mesurés 287

Figure A3.5 Comparaison des indices d'augmentation de la biomasse sèche d'une culture en cuvée contrôlée à 10% d'OD avec ses cultures témoins en flacons agités. Milieu de culture: B5, lignée VVG105 sc58 290

Figure A3.6 Indicateurs de croissance, production d'anthocyanes, masse spécifique des cellules et ratio de la biomasse humide sur la biomasse sèche d'une culture en cuvée contrôlée à 10% d'OD Milieu de culture B5, lignée VVG105 sc58 291

Figure A3.7 Vitesse d'agitation, concentration d'OD, taux volumique d'assimilation d'oxygène, conductivité du milieu de culture et volume de culture d'une cuvée contrôlée à 10% d'OD Milieu de culture B5, lignée VVG105 sc58 __ 292

Figure A3.8 Consommation de nutriments et croissance de la biomasse d'une cuvée contrôlée à 10% d'OD Milieu de culture B5, lignée VVG105 sc58 _____ 293

Figure A3.9 Taux spécifique d'assimilation d'O_2 et croissance de la biomasse d'une cuvée contrôlée à 10% d'OD Milieu de culture B5, lignée VVG105 sc58 __ 294

Figure A3.10 Comparaison des indices d'augmentation de la biomasse sèche d'une culture en cuvée contrôlée à 30% d'OD avec ses cultures témoins en flacons agités. Milieu de culture: B5, lignée VVG105 sc53 _____ 295

Figure A3.11 Indicateurs de croissance, production d'anthocyanes, masse spécifique des cellules et ratio de la biomasse humide sur la biomasse sèche d'une culture en cuvée contrôlée à 30% d'OD Milieu de culture: B5, lignée VVG105 sc53 _____ 296

Figure A3.12 Vitesse d'agitation, concentration d'OD, taux volumique d'assimilation d'oxygène, conductivité du milieu de culture et volume de culture d'une cuvée contrôlée à 30% d'OD Milieu de culture B5, lignée VVG105 sc53 __ 297

Figure A3.13 Consommation de nutriments et croissance de la biomasse d'une cuvée contrôlée à 30% d'OD Milieu de culture B5, lignée VVG105 sc53 _____ 298

Figure A3.14 Taux spécifique d'assimilation d'O_2, prolifération cellulaire et croissance de la biomasse d'une cuvée contrôlée à 30% d'OD Milieu de culture B5, lignée VVG105 sc53 _____ 299

Figure A3.15 Comparaison des indices d'augmentation de la biomasse sèche d'une culture en cuvée contrôlée à 50% d'OD avec ses cultures témoins en flacons agités. Milieu de culture: B5, lignée VVG105 sc64 _____ 300

Figure A3.16 Indicateurs de croissance, production d'anthocyanes, masse spécifique des cellules et ratio de la biomasse humide sur la biomasse sèche d'une culture en cuvée contrôlée à50% d'OD Milieu de culture B5, lignée VVG105 sc64 301

Figure A3.17 Vitesse d'agitation, concentration d'OD, taux volumique d'assimilation d'oxygène, conductivité du milieu de culture et volume de culture d'une cuvée contrôlée à 50% d'OD Milieu de culture B5, lignée VVG105 sc64 __ 302

Figure A3.18 Consommation de nutriments et croissance de la biomasse d'une cuvée contrôlée à 50% d'OD Milieu de culture B5, lignée VVG105 sc64 _____ 303

Figure A3.19 Taux spécifique d'assimilation d'O_2, croissance de la biomasse et prolifération cellulaire d'une cuvée contrôlée à 50% d'OD Milieu de culture B5, lignée VVG105 sc64 _____ 304

Figure A3.20 Indicateurs de croissance, production d'anthocyanes, masse spécifique des cellules et ratio de la biomasse humide sur la biomasse sèche d'une culture en cuvée contrôlée à 10% d'OD. Milieu de culture: B5DN, lignée VVG12 sc58 _____ 305

Figure A3.21 Vitesse d'agitation, concentration d'OD, taux volumique d'assimilation d'oxygène, conductivité du milieu de culture et volume de culture d'une cuvée contrôlée à 10% d'OD Milieu de culture: B5DN, lignée VVG12 sc58 _____ 306

Figure A3.22 Consommation de nutriments et croissance de la biomasse d'une cuvée contrôlée à 10% d'OD Milieu de culture: B5DN, lignée VVG12 sc58 _____ 307

Figure A3.23 Taux spécifique d'assimilation d'O_2 et croissance de la biomasse d'une cuvée contrôlée à 10% d'OD Milieu de culture B5, lignée VVG12 sc58 ___ 308

Figure A3.24 Consommation de nutriments, croissance de la biomasse et production d'anthocyanes de cultures en cuvée en flacons agités. Milieu de culture B5DN, lignée VVG12 sc60, cultures témoins des cuvées en bioréacteur H16, H17 et H18 _____ 309

Figure A3.25 Croissance de la biomasse, prolifération cellulaire et viabilité, production d'anthocyanes, masse des cellules et ratio masse humide sur masse sèche de cultures en cuvée et en flacons agités de cellules VVG12 sc60. Milieu de culture B5DN, culture témoin des cuvées en bioréacteurs H16, H17 et H28 _____ 310

Figure A3.26 Comparaison des indices d'augmentation de la biomasse sèche d'une culture en cuvée contrôlée à 30% d'OD avec ses cultures témoins en flacons agités. Milieu de culture: B5DN, lignée VVG12 sc60 ____ 311

Figure A3.27 Indicateurs de croissance, production d'anthocyanes, masse spécifique des cellules et ratio de la biomasse humide sur la biomasse sèche d'une culture en cuvée contrôlée à 30% d'OD. Milieu de culture: B5DN, lignée VVG12 sc60 ____ 312

Figure A3.28 Vitesse d'agitation, concentration d'OD, taux volumique d'assimilation d'oxygène, conductivité du milieu de culture et volume de culture d'une cuvée contrôlée à 30% d'OD Milieu de culture: B5DN, lignée VVG12 sc60 ____ 313

Figure A3.29 Consommation de nutriments et croissance de la biomasse d'une cuvée contrôlée à 30% d'OD Milieu de culture: B5DN, lignée VVG12 sc60 ____ 314

Figure A3.30 Taux spécifique d'assimilation d'O_2 et croissance de la biomasse d'une cuvée contrôlée à 30% d'OD Milieu de culture B5, lignée VVG12 sc60 ____ 315

Figure A3.31 Indicateurs de croissance, production d'anthocyanes, masse spécifique des cellules et ratio de la biomasse humide sur la biomasse sèche d'une culture en cuvée contrôlée entre 40 et 70% d'OD. Milieu de culture: B5DN, lignée VVG12 sc58 ____ 316

Figure A3.32 Vitesse d'agitation, concentration d'OD, taux volumique d'assimilation d'oxygène, conductivité du milieu de culture et volume de culture d'une cuvée contrôlée entre 40 et 70% d'OD Milieu de culture: B5DN, lignée VVG12 sc58 ____ 317

Figure A3.33 Consommation de nutriments et croissance de la biomasse d'une cuvée contrôlée entre 40 et 70% d'OD Milieu de culture: B5DN, lignée VVG12 sc58 ____ 318

Figure A3.34 Taux spécifique d'assimilation d'O_2 et croissance de la biomasse d'une cuvée contrôlée entre 40 et 70% d'OD Milieu de culture B5, lignée VVG12 sc60 ____ 319

Figure A3.35 Comparaison des indices d'augmentation de la biomasse sèche d'une culture en cuvée contrôlée à 42% d'OD avec ses cultures témoins en flacons agités. Milieu de culture: B5DN, lignée VVG12 sc60 _____ 320

Figure A3.36 Indicateurs de croissance, production d'anthocyanes, masse spécifique des cellules et ratio de la biomasse humide sur la biomasse sèche d'une culture en cuvée contrôlée à 42% d'OD. Milieu de culture: B5DN, lignée VVG12 sc60 _____ 321

Figure A3.37 Vitesse d'agitation, concentration d'OD, taux volumique d'assimilation d'oxygène, conductivité du milieu de culture et volume de culture d'une cuvée contrôlée à 42% d'OD Milieu de culture: B5DN, lignée VVG12 sc60 _____ 322

Figure A3.38 Consommation de nutriments et croissance de la biomasse d'une cuvée contrôlée à 42% d'OD Milieu de culture: B5DN, lignée VVG12 sc60 _____ 323

Figure A3.39 Taux spécifique d'assimilation d'O_2 et croissance de la biomasse d'une cuvée contrôlée à 42% d'OD Milieu de culture B5, lignée VVG12 sc60 ___ 324

Figure A3.40 Comparaison des indices d'augmentation de la biomasse sèche d'une culture en cuvée contrôlée à 50% d'OD avec ses cultures témoins en flacons agités. Milieu de culture: B5DN, lignée VVG12 sc60 _____ 325

Figure A3.41 Indicateurs de croissance, production d'anthocyanes, masse spécifique des cellules et ratio de la biomasse humide sur la biomasse sèche d'une culture en cuvée contrôlée à 50% d'OD. Milieu de culture: B5DN, lignée VVG12 sc60 _____ 326

Figure A3.42 Vitesse d'agitation, concentration d'OD, taux volumique d'assimilation d'oxygène, conductivité du milieu de culture et volume de culture d'une cuvée contrôlée à 50% d'OD Milieu de culture: B5DN, lignée VVG12 sc60 _____ 327

Figure A3.43 Taux spécifique d'assimilation d'O_2 et croissance de la biomasse d'une cuvée contrôlée à 50% d'OD Milieu de culture B5, lignée VVG12 sc60 ___ 328

Figure A3.44 Consommation de nutriments et croissance de la biomasse d'une cuvée contrôlée à 50% d'OD Milieu de culture: B5DN, lignée VVG12 sc60 _____ 329

Figure A3.45 Croissance de la biomasse, prolifération cellulaire et viabilité, production d'anthocyanes, masse des cellules et ratio masse humide sur masse sèche de cultures en cuvée et en flacons agités de cellules VVG12 sc57. Milieu de culture B5DN, culture témoin de la cuvée en bioréacteurs H12 330

Figure A3.46 Croissance de la biomasse, prolifération cellulaire et viabilité, production d'anthocyanes, masse des cellules et ratio masse humide sur masse sèche de cultures en cuvée et en flacons agités de cellules VVG12 sc57. Milieu de culture B5DN, culture témoin de la cuvée en bioréacteurs H12 331

Figure A3.47 Comparaison des indices d'augmentation de la biomasse sèche d'une culture en cuvée contrôlée à 90% d'OD avec ses cultures témoins en flacons agités. Milieu de culture: B5DN, lignée VVG12 sc57 332

Figure A3.48 Indicateurs de croissance, production d'anthocyanes, masse spécifique des cellules et ratio de la biomasse humide sur la biomasse sèche d'une culture en cuvée contrôlée à 90% d'OD. Milieu de culture: B5DN, lignée VVG12 sc57 333

Figure A3.49 Vitesse d'agitation, concentration d'OD, taux volumique d'assimilation d'oxygène, conductivité du milieu de culture et volume de culture d'une cuvée contrôlée à 90% d'OD Milieu de culture: B5DN, lignée VVG12 sc57 334

Figure A3.50. Consommation de nutriments et croissance de la biomasse d'une cuvée contrôlée à 90% d'OD Milieu de culture: B5DN, lignée VVG12 sc57 335

Figure A3.51 Taux spécifique d'assimilation d'O_2 et croissance de la biomasse d'une cuvée contrôlée à 90% d'OD Milieu de culture B5, lignée VVG12 sc57 336

Figure A3.52 Consommation de nutriments, croissance de la biomasse et production d'anthocyanes de cultures en cuvée en flacons agités. Milieu de culture B5, lignée VVG12 sc64, cultures témoins des cuvées en bioréacteur H20, H21 et H22 337

Figure A3.53 Croissance de la biomasse, prolifération cellulaire et viabilité, production d'anthocyanes, masse des cellules et ratio masse humide sur masse sèche

de cultures en cuvée et en flacons agités de cellules VVG12 sc64. Milieu de culture B5, culture témoin des cuvées en bioréacteurs H16, H17 et H28 338

Figure A3.54 Comparaison des indices d'augmentation de la biomasse sèche d'une culture en cuvée contrôlée à 20% d'OD avec ses cultures témoins en flacons agités. Milieu de culture: B5, lignée VVG12 sc64 339

Figure A3.55 Indicateurs de croissance, production d'anthocyanes, masse spécifique des cellules et ratio de la biomasse humide sur la biomasse sèche d'une culture en cuvée contrôlée à 20% d'OD. Milieu de culture: B5, lignée VVG12 sc64 340

Figure A3.56 Vitesse d'agitation, concentration d'OD, taux volumique d'assimilation d'oxygène, conductivité du milieu de culture et volume de culture d'une cuvée contrôlée à 20% d'OD Milieu de culture: B5, lignée VVG12 sc64 341

Figure A3.57 Consommation de nutriments et croissance de la biomasse d'une cuvée contrôlée à 20% d'OD Milieu de culture: B5, lignée VVG12 sc64 342

Figure A3.58 Taux spécifique d'assimilation d'O_2 et croissance de la biomasse d'une cuvée contrôlée à 20% d'OD Milieu de culture B5, lignée VVG12 sc64 343

Figure A3.59 Comparaison des indices d'augmentation de la biomasse sèche d'une culture en cuvée contrôlée à 50% d'OD avec ses cultures témoins en flacons agités. Milieu de culture: B5, lignée VVG12 sc64 344

Figure A3.60 Indicateurs de croissance, production d'anthocyanes, masse spécifique des cellules et ratio de la biomasse humide sur la biomasse sèche d'une culture en cuvée contrôlée à 50% d'OD. Milieu de culture: B5, lignée VVG12 sc64 345

Figure A3.61 Vitesse d'agitation, concentration d'OD, taux volumique d'assimilation d'oxygène, conductivité du milieu de culture et volume de culture d'une cuvée contrôlée à 50% d'OD Milieu de culture: B5, lignée VVG12 sc64 346

Figure A3.62 Consommation de nutriments et croissance de la biomasse d'une cuvée contrôlée à 50% d'OD Milieu de culture: B5, lignée VVG12 sc64 347

Figure A3.63 Taux spécifique d'assimilation d'O_2 et croissance de la biomasse d'une cuvée contrôlée à 50% d'OD Milieu de culture B5, lignée VVG12 sc64 348

Figure A3.64 Comparaison des indices d'augmentation de la biomasse sèche d'une culture en cuvée contrôlée à 70% d'OD avec ses cultures témoins en flacons agités. Milieu de culture: B5, lignée VVG12 sc64 ____ 349

Figure A3.65 Indicateurs de croissance, production d'anthocyanes, masse spécifique des cellules et ratio de la biomasse humide sur la biomasse sèche d'une culture en cuvée contrôlée à 70% d'OD. Milieu de culture: B5, lignée VVG12 sc64 ____ 350

Figure A3.66 Vitesse d'agitation, concentration d'OD, taux volumique d'assimilation d'oxygène, conductivité du milieu de culture et volume de culture d'une cuvée contrôlée à 70% d'OD Milieu de culture: B5, lignée VVG12 sc64 ____ 351

Figure A3.67 Consommation de nutriments et croissance de la biomasse d'une cuvée contrôlée à 70% d'OD Milieu de culture: B5, lignée VVG12 sc64 ____ 352

Figure A3.68 Taux spécifique d'assimilation d'O_2 et croissance de la biomasse d'une cuvée contrôlée à 70% d'OD Milieu de culture B5, lignée VVG12 sc64 ____ 353

Figure A3.69 Consommation de nutriments, croissance de la biomasse et production d'anthocyanes de cultures en cuvée en flacons agités. Milieu de culture B5, lignée VVG109 sc37, cultures témoins des cuvées en bioréacteur H24, H25 et H26 ____ 354

Figure A3.70 Croissance de la biomasse, prolifération cellulaire et viabilité, production d'anthocyanes, masse des cellules et ratio masse humide sur masse sèche de cultures en cuvée et en flacons agités de cellules VVG109 sc37. Milieu de culture B5, culture témoin des cuvées en bioréacteurs H24, H25 et H26 355

Figure A3.71 Indicateurs de croissance, production d'anthocyanes, masse spécifique des cellules et ratio de la biomasse humide sur la biomasse sèche d'une culture en cuvée contrôlée à 54% d'OD. Milieu de culture: B5QN, lignée VVG109 sc37 ____ 356

Figure A3.72 Vitesse d'agitation, concentration d'OD, taux volumique d'assimilation d'oxygène, conductivité du milieu de culture et volume de culture d'une cuvée contrôlée à 54% d'OD Milieu de culture: B5QN, lignée VVG109 sc37 ____ 357

Figure A3.73 Consommation de nutriments et croissance de la biomasse d'une cuvée contrôlée à 54% d'OD Milieu de culture: B5QN, lignée VVG109 sc37 ____ 358

Figure A3.74 Taux spécifique d'assimilation d'O_2 et croissance de la biomasse d'une cuvée contrôlée à 54% d'OD Milieu de culture B5, lignée VVG109 sc37 __ 359

Figure A3.75 Indicateurs de croissance, production d'anthocyanes, masse spécifique des cellules et ratio de la biomasse humide sur la biomasse sèche d'une culture en cuvée contrôlée à 60% d'OD. Milieu de culture: B5QN, lignée VVG109 sc37 _____ 360

Figure A3.76 Vitesse d'agitation, concentration d'OD, taux volumique d'assimilation d'oxygène, conductivité du milieu de culture et volume de culture d'une cuvée contrôlée à 60% d'OD Milieu de culture: B5QN, lignée VVG109 sc37 _____ 361

Figure A3.77 Consommation de nutriments et croissance de la biomasse d'une cuvée contrôlée à 60% d'OD Milieu de culture: B5QN, lignée VVG109 sc37 ____ 362

Figure A3.78 Taux spécifique d'assimilation d'O_2 et croissance de la biomasse d'une cuvée contrôlée à 60% d'OD Milieu de culture B5, lignée VVG109 sc37 __ 363

Figure A3.79 Indicateurs de croissance, production d'anthocyanes, masse spécifique des cellules et ratio de la biomasse humide sur la biomasse sèche d'une culture en cuvée sans contrôle d'OD. Milieu de culture: B5QN, lignée VVG109 sc37 _____ 364

Figure A3.80 Vitesse d'agitation, concentration d'OD, taux volumique d'assimilation d'oxygène, conductivité du milieu de culture et volume de culture d'une cuvée sans contrôle d'OD Milieu de culture: B5QN, lignée VVG109 sc37 _ 365

Figure A3.81 Consommation de nutriments et croissance de la biomasse d'une cuvée sans contrôle d'OD Milieu de culture: B5QN, lignée VVG109 sc37 _____ 366

Figure A3.82 Taux spécifique d'assimilation d'O_2 et croissance de la biomasse d'une cuvée sans contrôle d'OD Milieu de culture B5, lignée VVG109 sc37 ____ 367

Figure A4.1 Ajout de NaH_2PO_4 : Comparaison des indices d'augmentation de la biomasse sèche d'une culture en cuvée alimentée contrôlée à 50% d'OD avec ses cultures témoins en flacons agités. Milieu de culture: B5, lignée

VVG111 sc20, alimentation ponctuelle d'un supplément concentré de glucose et de NaH_2PO_4 à OUR_{max} 374

Figure A4.2 Ajout de NaH_2PO_4 : Indicateurs de croissance, production d'anthocyanes, masse spécifique des cellules et ratios de la biomasse humide sur la biomasse sèche d'une culture en cuvée contrôlée à 50% d'OD. Milieu de culture: B5, lignée VVG111 sc20, alimentation ponctuelle d'un supplément concentré de glucose et de NaH_2PO_4 à OUR_{max} 375

Figure A4.3 Ajout de NaH_2PO_4 : Vitesse d'agitation, concentration d'OD, taux volumique d'assimilation d'oxygène, conductivité du milieu de culture et volume de culture d'une cuvée contrôlée à 50% d'OD Milieu de culture: B5, lignée VVG111 sc20, alimentation ponctuelle d'un supplément concentré de glucose et de NaH_2PO_4 à OUR_{max} 376

Figure A4.4 Ajout de NaH_2PO_4 : Consommation de nutriments et croissance de la biomasse d'une cuvée contrôlée à 50% d'OD Milieu de culture: B5, lignée VVG111 sc20, alimentation ponctuelle d'un supplément concentré de glucose et de NaH_2PO_4 à OUR_{max} 377

Figure A4.5 Ajout de NaH_2PO_4 : Taux spécifique d'assimilation d'O_2, prolifération cellulaire et croissance de la biomasse d'une cuvée contrôlée à 50% d'OD Milieu de culture B5, lignée VVG111 sc20, alimentation ponctuelle d'un supplément concentré de glucose et de NaH_2PO_4 à OUR_{max} 378

Figure A4.6 Comparaison des indices d'augmentation de la biomasse sèche d'une culture en cuvée contrôlée à 50% d'OD avec ses cultures témoins en flacons agités. Milieu de culture: B5, lignée VVG111 sc20 379

Figure A4.7 Indicateurs de croissance, production d'anthocyanes, masse spécifique des cellules et ratios de la biomasse humide sur la biomasse sèche d'une culture en cuvée contrôlée à 50% d'OD. Milieu de culture: B5, lignée VVG111 sc20 380

Figure A4.8 Vitesse d'agitation, concentration d'OD, taux volumique d'assimilation d'oxygène, conductivité du milieu de culture et volume de culture d'une cuvée contrôlée à 50% d'OD Milieu de culture: B5, lignée VVG111 sc20 381

Figure A4.9 Consommation de nutriments et croissance de la biomasse d'une cuvée contrôlée à 50% d'OD Milieu de culture: B5, lignée VVG111 sc20 _____ 382

Figure A4.10 Taux spécifique d'assimilation d'O_2, prolifération cellulaire et croissance de la biomasse d'une cuvée contrôlée à 50% d'OD Milieu de culture B5, lignée VVG111 sc20 _____ 383

Figure A4.11 Comparaison des indices d'augmentation de la biomasse sèche d'une culture en cuvée alimentée contrôlée à 50% d'OD avec ses cultures témoins en flacons agités. Milieu de culture: B5, lignée VVG111 sc27(D6), alimentation ponctuelle d'un supplément concentré de glucose et de NaH_2PO_4 à OUR_{max} _____ 384

Figure A4.12 Ajout de NaH_2PO_4 : Indicateurs de croissance, production d'anthocyanes, masse spécifique des cellules et ratios de la biomasse humide sur la biomasse sèche d'une culture en cuvée contrôlée à 50% d'OD. Milieu de culture: B5, lignée VVG111 sc27(D6), alimentation ponctuelle d'un supplément concentré de glucose et de NaH_2PO_4 à OUR_{max} _____ 385

Figure A4.13 Ajout de NaH_2PO_4 : Vitesse d'agitation, concentration d'OD, taux volumique d'assimilation d'oxygène, conductivité du milieu de culture et volume de culture d'une cuvée contrôlée à 50% d'OD Milieu de culture: B5, lignée VVG111 sc27(D6), alimentation ponctuelle d'un supplément concentré de glucose et de NaH_2PO_4 à OUR_{max} _____ 386

Figure A4.14 Ajout de NaH_2PO_4 : Consommation de nutriments et croissance de la biomasse d'une cuvée contrôlée à 50% d'OD Milieu de culture: B5, lignée VVG111 sc27(d6), alimentation ponctuelle d'un supplément concentré de glucose et de NaH_2PO_4 à OUR_{max} _____ 387

Figure A4.15 Ajout de NaH_2PO_4 : Taux spécifique d'assimilation d'O_2, prolifération cellulaire et croissance de la biomasse d'une cuvée alimentée contrôlée à 50% d'OD Milieu de culture B5, lignée VVG111 sc27(D6), alimentation ponctuelle d'un supplément concentré de glucose et de NaH_2PO_4 à OUR_{max} 388

Figure A4.16 Ajout de $MgSO_4$: Comparaison des indices d'augmentation de la biomasse sèche d'une culture en cuvée alimentée contrôlée à 50% d'OD avec ses cultures témoins en flacons agités. Milieu de culture: B5, lignée VVG111

sc31(D10), alimentation ponctuelle d'un supplément concentré de glucose et de $MgSO_4$ à OUR_{max} 389

Figure A4.17 Ajout de $MgSO_4$: Indicateurs de croissance, production d'anthocyanes, masse spécifique des cellules et ratios de la biomasse humide sur la biomasse sèche d'une culture en cuvée contrôlée à 50% d'OD. Milieu de culture: B5, lignée VVG111 sc31(D10), alimentation ponctuelle d'un supplément concentré de glucose et de $MgSO_4$ à OUR_{max} 390

Figure A4.18 Ajout de $MgSO_4$: Vitesse d'agitation, concentration d'OD, taux volumique d'assimilation d'oxygène, conductivité du milieu de culture et volume de culture d'une cuvée contrôlée à 50% d'OD Milieu de culture: B5, lignée VVG111 sc31(D10), alimentation ponctuelle d'un supplément concentré de glucose et de $MgSO_4$ à OUR_{max} 391

Figure A4.19 Ajout de $MgSO_4$: Consommation de nutriments et croissance de la biomasse d'une cuvée contrôlée à 50% d'OD Milieu de culture: B5, lignée VVG111 sc31(D10), alimentation ponctuelle d'un supplément concentré de glucose et de NaH_2PO_4 à OUR_{max} 392

Figure A4.20 Ajout de $MgSO_4$: Taux spécifique d'assimilation d'O_2, prolifération cellulaire et croissance de la biomasse d'une cuvée contrôlée à 50% d'OD Milieu de culture B5, lignée VVG111 sc31(D10), alimentation ponctuelle d'un supplément concentré de glucose et de $MgSO_4$ à OUR_{max} 393

Figure A4.21 Ajout de $(NH_4)_2SO_4$: Comparaison des indices d'augmentation de la biomasse sèche d'une culture en cuvée alimentée contrôlée à 50% d'OD avec ses cultures témoins en flacons agités. Milieu de culture: B5, lignée VVG111 sc31(D10), alimentation graduelle d'un supplément concentré de glucose et de $(NH_4)_2SO_4$ à OUR_{max} 394

Figure A4.22 Ajout de $(NH_4)_2SO_4$: Indicateurs de croissance, production d'anthocyanes, masse spécifique des cellules et ratios de la biomasse humide sur la biomasse sèche d'une culture en cuvée contrôlée à 50% d'OD. Milieu de culture: B5, lignée VVG111 sc20, alimentation graduelle d'un supplément concentré de glucose et de $(NH_4)_2SO_4$ à OUR_{max} 395

Figure A4.23 Ajout de $(NH_4)_2SO_4$: Taux spécifique d'assimilation d'O_2, prolifération cellulaire et croissance de la biomasse d'une cuvée contrôlée à 50% d'OD Milieu de culture B5, lignée VVG111 sc31(D10), alimentation graduelle d'un supplément concentré de glucose et de $(NH_4)_2SO_4$ à OUR_{max} 396

Figure A4.24 Ajout de $(NH_4)_2SO_4$: Vitesse d'agitation, concentration d'OD, taux volumique d'assimilation d'oxygène, conductivité du milieu de culture et volume de culture d'une cuvée contrôlée à 50% d'OD Milieu de culture: B5, lignée VVG111 sc31(D10), alimentation graduelle d'un supplément concentré de glucose et de $(NH_4)_2SO_4$ à OUR_{max} 397

Figure A4.25 Ajout de $(NH_4)_2SO_4$: Consommation de nutriments et croissance de la biomasse d'une cuvée contrôlée à 50% d'OD Milieu de culture: B5, lignée VVG111 sc31(D10), alimentation graduelle d'un supplément concentré de glucose et de $(NH_4)_2SO_4$ à OUR_{max} 398

LISTE DES ANNEXES

A1. PROCÉDURES EXPÉRIMENTALES 222

A2. CULTURES EN FLACONS AGITÉS 242

A2.1 Conditions expérimentales et présentation des résultats 242

A2.2 Résultats et calculs 243

A2.2.1 Courbes et indicateurs de croissance 243

A2.2.2 Consommation de nutriments 245

A2.2.3 Production d'anthocyanes 245

A2.2.4 Assimilation d'oxygène 246

A3. CULTURES EN BIORÉACTEURS AVEC CONTRÔLE DE LA CONCENTRATION D'OXYGÈNE DISSOUS 276

A3.1 Conditions expérimentales et présentation des résultats 276

A3.2 Résultats et calculs 279

A3.2.1 Viabilité 279

A3.2.2 Hydrolyse du saccharose 280

A3.2.3 Oxygénation des amas cellulaires 281

A4. CULTURES EN CUVÉES ALIMENTÉES 368

A4.1 Conditions expérimentales et présentation des résultats 368

A4.2 Complément aux courbes de croissance et de consommation de nutriments 372

A4.2.1 Viabilité 372

A5. ÉTUDE PRÉLIMINAIRE DES PARAMÈTRES DÉRIVÉS DES MESURES DE CO_2 399

A5.1 Composition de la biomasse 399

A5.2 Estimés des concentrations de CO_2 dans le milieu 403

A5.3 Estimés du contenu en carbone de la biomasse 407

LISTE DES SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS

Lignée cellulaire

VVG x.x dénomination de la souche

SC x nombre de sous-cultures

Abréviations

Acy anthocyanes

ADP : adénosine di-phosphate;

ATP : adénosine tri-phosphate;

B5 formulation du milieu de culture mis au point par Gamborg et al. (1968)

CA hydrolysat de caséine (enzymatique): source d'azote organique du milieu de culture

CH_2O hydrates de carbone

DO oxygène dissous

G glucose

HRI réacteur à ruban hélicoïdal

K kinétine : composant hormonal du milieu de culture

MH masse humide (wet weight)

MS masse sèche (dry weight)

NA acide α-naphthalèneacétique: composant hormonal du milieu de culture

NAD^+, NADH : formes oxydée et réduite de la nicotinamide adénine dinucléotide

PCV proportion du volume de la culture occupé par les cellules (centrifugées) (PCV)

QN concentration en nitrate correspondant au quart de sa concentration dans le milieu B5 standard

S saccharose (sucrose)

Variables

A surface d'écoulement [m^2]

DO Dissolved oxygen (concentration)

$\mathcal{D}_g$ diffusivité effective d'un gaz à travers le bouchon des flacons agités [$m^2\ sec^{-1}$]

$\mathcal{D}_{eff}$ diffusivité effective d'un soluté A dans une phase B

$\mathcal{D}_{liq}$ diffusivité de l'oxygène dans le milieu [$cm^2\ sec^{-1}$]

g accélération gravitationnelle

k_La coefficient volumique de transfert gaz-liquide [h^{-1}]
oxygen transfer coefficient, [h^{-1}]

K_c	coefficient de transfert de gaz à travers le bouchon de coton des flacons agités [L s^{-1}]
m	taux spécifique de maintenance [g CH_2O h^{-1} cm^{-3}]
OD	oxygène dissous (concentration d')
OTR	taux volumique de transfert d'oxygène, [mM O_2 L^{-1} h^{-1}] oxygen transfer rate, [mM O_2 L^{-1} h^{-1}]
OUR	taux volumique d'assimilation d'oxygène, [mM O_2 L^{-1} h^{-1}] oxygen uptake rate, [mM O_2 L^{-1} h^{-1}]
p_{amb}	pression partielle de gaz dans l'air ambiant entourant un flacon agité [atm]
p_g	pression partielle de gaz [atm]
q	taux spécifique [=(1/x).(dS ou d[Acy]/dt)]
$(q_{O_2})_{cell}$	Specific oxygen uptake rate, cell count basis [mmole O_2 (10^6 cells • h)$^{-1}$]
$(q_{O_2})_{dw}$	Specific oxygen uptake rate, dry biomass basis [mmole O_2 (g dw • h)$^{-1}$]
r	taux volumique [=dS ou d[Acy]/dt]
R	rayon moyen des particules d'adsorbant
Re	Nombre de Reynolds
S	masse d'hydrates de carbone dans le milieu [g CHO]
s	concentration d'hydrates de carbone dans le milieu [g CHO L^{-1}]
t	temps [h ou d]
t_d	période de latence [d]
V_g	volume de gaz dans le bioréacteur [L]
V_{liq0}	volume initial utile du bioréacteur [L]
V_{liq}	volume de liquide dans le bioréacteur [L]
V_x	volume de la biomasse [cm^3]
W/D ratio	Biomass wet-to-dry weight ratio, [g g^{-1}]
X	quantité de biomasse
x	concentration de biomasse [(g ou cellules) L^{-1}]
x	biomass concentration [g L^{-1}]
μ	taux spécifique de croissance moyen [d^{-1}]
ρ	masse volumique de la biomasse [g MS L^{-1}]
Γ	osmosité [mol NaCl L^{-1}]

Indices

b	masse du liquide (bulk)
cr	critique critical (oxygen concentration)

cell.	cellules
dw	biomass dry weight
f	valeur finale final value
g	gazeux
l	liquide
MH	masse humide (de la biomasse)
MS	masse sèche (de la biomasse)
s	référence générale au substrat(s)
ww	Biomass wet weight
0	valeur initiale initial value

Exposant

*	équilibre gaz-liquide

1. INTRODUCTION

Le travail présenté dans cette thèse a été réalisé dans le cadre d'un projet de partenariat université-gouvernement-industrie visant le développement à l'échelle laboratoire d'un bioprocédé utilisant la culture de cellules végétales pour la production d'anthocyanes, un colorant alimentaire naturel substitut aux colorants chimiques. Les partenaires scientifiques dans ce projet étaient le Centre de recherche et de développement sur les aliments (CRDA, Agriculture Canada) et l'École Polytechnique de Montréal à travers BIOPRO, son Centre de recherche et de développement en génie des procédés en environnement et en biotechnologies. Le projet a été complété pour le maître-d'oeuvre, Phytotech Botanical Ltd., et pour le Centre québécois de valorisation de la biomasse (Gouvernement du Québec).

La lignée cellulaire exploitée provient de l'espèce *Vitis vinifera*. Globalement, le procédé envisagé comporte deux étapes : l'une de croissance de la biomasse et l'autre d'induction de la production d'anthocyanes. Cette thèse couvre les travaux effectués pour étudier et améliorer l'étape de croissance du bioprocédé.

Nous avons plus spécifiquement étudié l'étape de croissance de la biomasse en mode cuvée et avec alimentation programmée. Le travail vise à identifier les conditions de cultures qui permettent de maximiser le nombre de cellules disponibles pour l'étape subséquente de production en explorant notamment l'effet de la concentration d'OD et des principaux nutriments sur la croissance.

La section 1.1 introduit d'abord le contexte de travail ainsi que les bases de la problématique entourant la culture de cellules végétales en bioréacteur. La section 1.2 présente les problématiques autour desquelles les travaux de cette thèse sont articulés. Les sections 1.3 et 1.4 présentent finalement les objectifs spécifiques que nous avons poursuivis et le plan général de la thèse.

1.1 CONTEXTE ET TRAVAUX PRÉLIMINAIRES

1.1.1 La production d'anthocyanes

1.1.1.1 Les anthocyanes comme source de colorants alimentaires

Les changements législatifs et réglementaires relatifs aux colorants alimentaires et l'évolution des attitudes des consommateurs font évoluer le marché des produits alimentaires vers des formulations contenant plus d'ingrédients dits 'naturels'. Parmi les colorants non-homologués, les anthocyanes, métabolites secondaires des cellules de la peau des raisins, possèdent le plus grand potentiel dans les industries de l'alimentation, des boissons et des cosmétiques.[152]

Ces vingt-cinq dernières années, le nombre de colorants alimentaires synthétiques autorisés a progressivement diminué suite aux résultats d'études toxicologiques. Ainsi pour les colorants rouges possédant des applications alimentaires, seuls les colorants FD&C Rouge no. 3 (érythrosine) et no. 40 (Allura) sont encore permis aux États-Unis. En 1990, les laques rouges no. 3, solubles dans les gras et utilisées dans la boulangerie, les produits laitiers et la confiserie, ont été retirées du marché. Le colorant FD&C Rouge no. 3 a été inscrit sur une liste provisoire et est sujet à des études toxicologiques.[104] Son utilisation a été restreinte en janvier 1990. Les produits de boulangerie, de confiserie ainsi que les jus de fruits et les fruits en conserve doivent maintenant être exempts d'érythrosine. De plus, l'Allura est soupçonnée être la cause de lymphomes chez les souris et a été mis sur une liste provisoire d'interdiction.

Les sources actuelles de colorants rouges non-homologués sont des extraits naturels de raisins (anthocyanes) ainsi que des extraits de betteraves, de canneberges et de paprika. Ces derniers possèdent cependant un goût et une odeur prononcés qui en limitent les applications.

Les concentrés d'anthocyanes sont actuellement obtenus par extraction du marc de raisin. L'aspect saisonnier des récoltes et la dégradation rapide des pigments sur les fruits vendangés nécessitent d'importantes installations d'extraction et limitent la disponibilité de ces colorants sur

le marché. Les anthocyanes peuvent aussi être produits par l'entremise de la culture de cellules végétales. C'est ce système de production que ce projet de recherche vise à exploiter.

Bien qu'ils constituent la pigmentation d'une grande variété de fruits et de fleurs, les anthocyanes issus des cellules de raisins sont les plus susceptibles d'être commercialisés rapidement. Il est en effet peu plausible que la mise en marché de nouveaux extraits soit permise sans que des études toxicologiques poussées et extrêmement onéreuses soient exigées. Dans ce contexte, la culture de cellules végétales n'est une technologie envisageable que pour les espèces visées par les réglementations actuellement en vigueur. À l'heure actuelle, seule la production d'anthocyanes par des cellules de raisins atteint des rendements acceptables.

1.1.1.2 L'intérêt économique de la production d'anthocyanes

En 1982, le marché de l'érythrosine représentait des ventes de 12,2 M$US correspondant à un volume de vente de 355 tonnes métriques.[93] Pour la même année, les ventes américaines des pigments rouges extraits de végétaux autorisés aux États-Unis sont présentées au tableau 1.1. Malgré le fait qu'il soit restreint au marché des breuvages, on observe que le marché des anthocyanes est en expansion.

Le marché des colorants alimentaires a connu une progression constante d'environ 5 % au cours des deux dernières décennies.[70] Si l'on considère que le prix de remplacement de colorants chimiques sera dicté par la comparaison de son pouvoir colorant avec celui de l'érythrosine, le marché potentiel pour les anthocyanes serait d'environ 45 M$US (1990) (~47 M$US 1995)[a]. Il s'agit donc d'un marché important, pour lequel la culture de cellules végétales et la biotechnologie peuvent représenter une alternative de production viable.

---

[a] Évalué en utilisant les indices de prix de gros des produits chimiques du Chemical Engineering Index de décembre 1990 et 1995.

Tableau 1.1 Ventes annuelles américaines de pigments rouges non-homologués

	1972	1976	1982
Betterave	ND	0,9[1]	1,8
Enociana (Anthocyanes)	ND	2,0	6,0
Canneberge	ND	0,7	1,0
Paprika	20,3	26,0	30,0

[1] M$US
Adapté de Legault et coll.[93]

Le secteur des colorants alimentaires est toutefois hautement compétitif. Les fournisseurs sont peu nombreux et l'on peut s'attendre à ce que tout changement de réglementation soit une occasion pour les compétiteurs de s'accaparer un marché qui demeure plus ou moins captif. De plus, il ne faut surtout pas négliger la compétitivité des sources agricoles de colorants. Le resserrement de la réglementation environnementale oblige les producteurs de produits vinicoles à valoriser leurs résidus.[58] Le domaine des additifs alimentaires fait donc l'objet de recherche interne intensive, notamment sur l'extraction,[100] la préservation des pigments avant l'extraction, leur stabilisation chimique pour des fins d'entreposage, et la formulation des concentrés.[104,168]

Quel que soit le procédé utilisé, dans le contexte législatif et commercial actuel le prix de vente d'un concentré d'anthocyanes est de 5$US (1990) par kg de concentré (1%) équivalant à 500$US/kg Acy. Les anthocyanes purifiés se vendent entre 1250 et 2000 $US par kg Acy (1992).[50] L'un des rares bioprocédés basé sur la culture de cellules végétales exploité commercialement produit de la shikonine, un pigment destiné aux industries cosmétique et pharmaceutique.[70] Prenant le prix de la shikonine sur le marché et les productivités déclarées de ce procédé comme référence, les recettes escomptées pour un tel bioprocédé doivent être au

minimum de 0,67 $US(1990) L^{-1} d^{-1} (volume utile de réacteur) (~0,70 $US 1995) pour lui assurer une rentabilité minimale. À partir de cette comparaison, l'objectif de production minimal d'un bioprocédé de production d'anthocyanes est d'atteindre un taux de production minimal de 335 mg Acy L^{-1} d^{-1}.

À ce jour seulement trois procédés basés sur la culture de cellules ou de tissus végétaux sont ou ont été exploités à grande échelle : la production de shikonine, comme nous l'avons déjà évoqué plus haut, à partir de cultures de *Lithospermum erythrorhizon* (Mitsui Petrochemical Ind. Ltd.); de ginseng avec des racines de *Panax ginseng* (Nitto Denko Corp.); de purpurine avec *Rubia akane* (Mitsui Petrochemical Ind. Ltd.).[119] Les applications médicales de ces métabolites secondaires doivent cependant recevoir l'approbation des agences gouvernementales concernées pour que leur potentiel économique puisse se réaliser. Ainsi dans les exemples cités plus haut, ce sont les réglementations régissant leur mise en marché qui constitueraient une barrière au développement plus que tout autre facteur.[113] En Amérique du Nord, trois bioprocédés étaient en développement en 1991 pour la production de vanille par Escagenetics, de sanguinarine par Vipont Research Laboratories, et de taxol par Phyton Catalytic.[113] Dans une revue des aspects économiques entourant le développement de bioprocédés de culture de cellules végétales sur une base commerciale, Payne et ses collaborateurs[113] ont fait ressortir les quelques balises suivantes pour juger du potentiel de projets impliquant les cellules végétales :

- la productivité du système in vitro devrait avoir une productivité de l'ordre de 800 à 1000 fois plus grande que la source agricole correspondante;[43]
- l'avantage économique doit être certain avec par exemple des coûts réduits de moitié si une autre source du produit d'intérêt est établie (synthèse chimique ou microbienne);
- faisant référence à une analyse économique conduite par Cooney dont ils rapportent les résultats, Payne et coll.[113] établissent le coût minimal à atteindre pour pouvoir envisager la rentabilité à 0,15 $US(1989) L^{-1} d^{-1}, avec un écart de 0,07 à 0,23 $ L^{-1} d^{-1} similairement à tous les produits issus des biotechnologies, en particulier celles utilisant un système microbien;

- et finalement, un marché potentiel d'un minimum de $10 M$US(1991) par an pour un développement basé sur un seul produit.

1.1.2 La culture de cellules de plante

1.1.2.1 Historique et applications

La culture de cellules végétales in vitro est née de travaux effectués au début du siècle. L'identification des premières phytohormones au début des années trente a permis l'établissement de cultures de cals de végétaux sur un milieu synthétique mais non défini par White en 1934. En 1955, Miller identifie un groupe d'hormones important dans l'induction de la division cellulaire, les cytokinines, qui remplacera l'addition d'extraits de levures ou de plantes. Les cytokinines utilisés conjointement avec les auxines permettront d'établir des lignées cellulaires sur un milieu gélifié totalement défini et de pouvoir reconstituer une plante entière à partir d'un cal indifférencié. Les premiers rapports de cultures de cellules en milieu liquide datent de 1954.[139] En 1962, Murashige et Skoog[106] ont publié leur important travail sur la formulation d'un milieu de culture contenant des minéraux essentiels, des vitamines, des phytohormones et une source d'hydrates de carbone. Ce milieu, ainsi que celui formulé quelques années plus tard par Gamborg et coll.,[55] a permis d'établir des cultures de cellules d'une grande variété de plantes et constituent la base de la formulation de nouveaux milieux adaptés aux espèces.

Le tableau 1.2 résume le tracé historique des avancées scientifiques importantes dans le domaine. Ainsi sur un horizon d'environ 80 années, des cultures de cellules indifférenciées ont été établies chez les dicotylédones comme, plus difficilement, chez les monocotylédones ouvrant le champ à la production en masse de métabolites secondaires. En parallèle, des cultures de racines et de tiges ont mené à la propagation in vitro, et celle-ci avec la régénération de plantes à partir de protoplastes ou de cellules haploïdes constitue un nouvel outil pour les phytogénéticiens.

L'application aux cellules végétales des techniques du génie génétique est prometteuse. Des questions reliées à l'éthique et à la sécurité ralentissent cependant l'utilisation sur le terrain et la

Tableau 1.2 Événements importants du développement de la culture de cellules et de tissus végétaux

Date	Crédits	Réalisations
1902	Haberlandt	Premières expériences de culture de cellules végétales: obtention de croissance cellulaire mais pas de division
1934	Kogl et coll.	Identification du rôle important des auxines dans la croissance cellulaire
1934	White	Première culture établie de racines
1937 1939	Gautheret, Nobecourt White	Premières cultures établies de cals
1954 1956	Muir et coll. Nickell	Première culture en suspension de cellules ou d'agrégats cellulaires
1955	Miller	Identification du rôle important des citokynines dans la division cellulaire
1958 1964	Reinert Stewart et coll., Halperin et Wetherell	Obtention d'embryons somatique à partir de tissus végétaux
1960	Cocking	Mise au point d'une méthode pour la préparation de protoplastes à partir de tissus végétaux
1962	Murashigue et Skoog	Formulation du milieu de culture le plus largement utilisé
1963	Morel	Multiplication de clones de plantes horticoles par culture de tissus végétaux
1964 1967	Guha et Maheshwari Bourgin et Nitsch	Reproduction de plantes haploïdes à partir de grains de pollen en développement
1971	Nagata et Takebe	Régénération de plantes à partir de protoplastes
1972	Carlson et coll.	Premières plantes hybrides d'une même espèce obtenue à partir de protoplastes
1977	Chilton et coll.	Observation de l'intégration d'un plasmide dans des cellules de tabac à partir d'une infection bactérienne: début de l'ingénierie génétique
1978	Melchers et coll.	Premières plantes hybrides transgéniques obtenues à partir de protoplastes
1982	Mitsui Petrochemical Ind. Ltd.	Première production industrielle de métabolites secondaires (dérivés de la shikonine)

Adapté de Schmauder et Doebel [139]

mise en marché de matériel manipulé génétiquement. Les progrès réalisés s'appliquent surtout à l'agriculture par l'ajout de résistances aux herbicides ou la tolérance aux insectes,[175] à partir du transfert d'ADN spécifique en utilisant *Agrobacterium* comme vecteur et ont donné lieu à la mise en marché de semences améliorées.[175] L'implantation récente d'une variété de banane résistante au principal pathogène de cette espèce ainsi que la mise en marché de tomates manipulées génétiquement (Flavr-Savr™ Tomato, Calgene Inc.)[175] sont quelques exemples connus du public d'application commerciale de ces techniques. Le recours extensif au génie génétique pour augmenter le niveau d'expression de gènes codant pour la production de produits d'intérêt ou pour stimuler la résistance à des insectes, des herbicides ou des pathogènes viraux, nécessitera cependant une meilleure connaissance des voies métaboliques et des enzymes impliqués et ne semble pas pouvoir être véritablement mis en oeuvre à court terme. Le monde végétal possède un patrimoine génétique extrêmement vaste comme en fait foi le grand nombre de molécules d'origine végétales que l'on ne cesse d'isoler. Étant donné la multitude de gènes et d'enzymes impliqués dans la production des molécules d'intérêt, il est difficile de cibler les éléments limitant la production. Toutefois, la recherche fondamentale en ce domaine profite des progrès immenses de la microbiologie, de la biologie moléculaire et de la biologie des cellules animales et progresse rapidement.

En plus de fournir du matériel biologique intéressant pour la recherche fondamentale en biologie végétale, les champs d'application qui peuvent mener à une exploitation commerciale de la culture de cellules et de tissus végétaux sont aujourd'hui l'agriculture et l'horticulture (développement d'espèces, intégration de résistances, propagation in vitro), et la production de molécules destinées à des applications alimentaires (couleurs, saveurs, édulcorants, épices et huiles) ou pharmacologique (avec principalement les alkaloïdes, les stéroïdes et les glycosides).[92] Ainsi, par exemple,

- la propagation in vitro permet le développement, l'entretien et la distribution éventuelle de clones exempts de pathogènes viraux, la multiplication de clones possédant des caractères

d'intérêt pour l'horticulture, et la réduction du temps requis pour l'amélioration des espèces agricoles; [173]

- l'embryogenèse somatique, permettant d'obtenir des embryons à partir d'une culture de cellules, offre la possibilité de produire des semis artificiels de plantes pour lesquelles la présence de certains caractères désirables est assurée; [113,124]

- les techniques de l'ingénierie génétique permettent d'introduire certaines propriétés, principalement reliées à des résistances, mais aussi certaines qualités reliées à l'amélioration de la durée de vie des produits frais sur les tablettes ou encore à la possibilité de pousser la mécanisation des récoltes; [110,170]

- les produits d'intérêts en pharmacologie sont généralement des molécules produites uniquement dans le règne végétal, le plus souvent en quantités infimes. Lorsque ces molécules sont issues de plantes dont la niche écologique est très spécifique, géographiquement réduite ou difficilement exploitable, la culture de cellules végétales peut représenter une alternative viable à l'agriculture et à la sylviculture pour la production de ces métabolites secondaires. Ces produits ont en effet une haute valeur ajoutée qui permet d'envisager la rentabilité de bioprocédés basés sur cette technologie.

Les étapes importantes du processus de culture de cellules et de tissus impliquées dans ces trois champs d'application sont illustrés à la figure 1.1.

1.1.2.2 Les cellules végétales

Par rapport aux micro-organismes et aux autres cellules eucariotes, les cellules végétales présentent des particularités qui ont des implications importantes sur le développement d'un bioprocédé. Il est intéressant de les souligner ici afin d'introduire la problématique reliée à la culture en bioréacteur de ce système biologique. De plus, nous couvrirons brièvement les aspects nutritionnels reliés aux cultures de cellules végétales, lesquels influencent à travers des

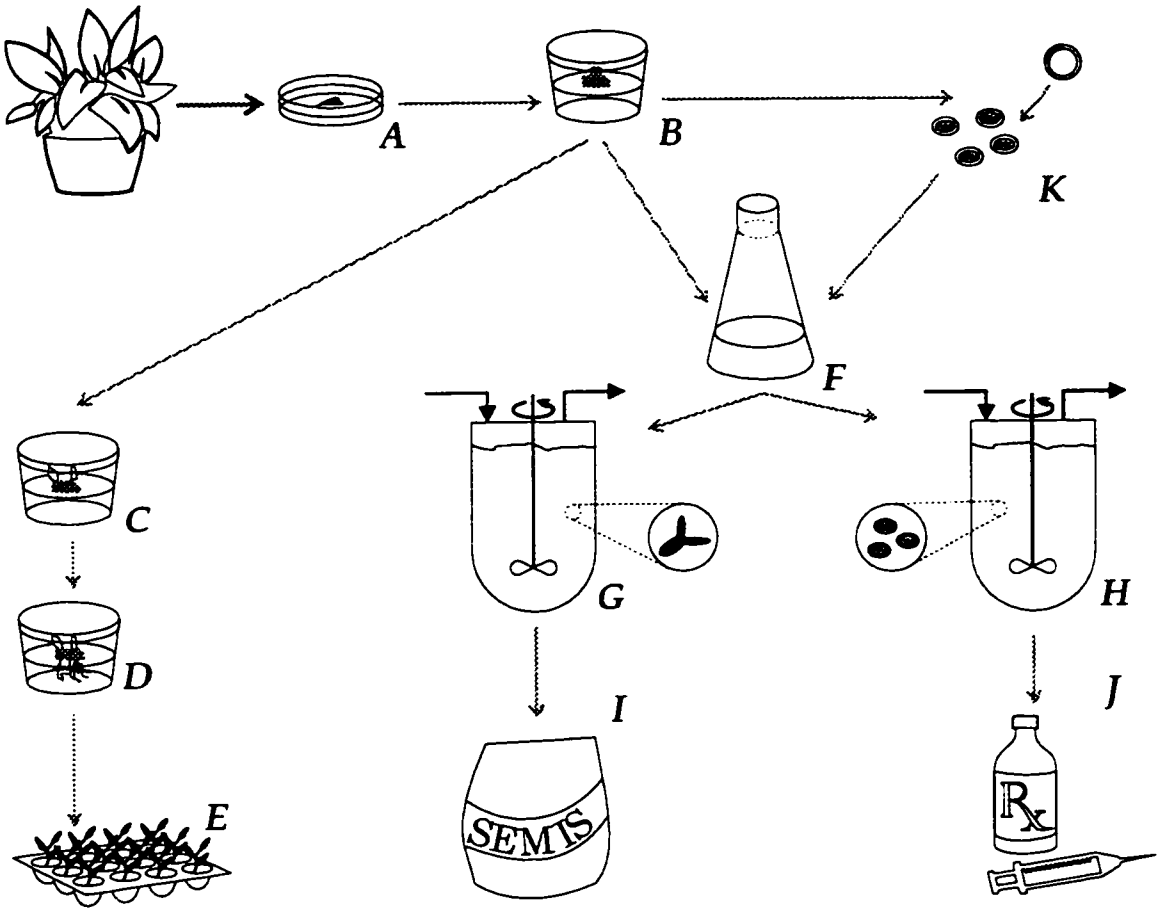


Figure 1.1 Schéma de processus de culture de cellules végétales in vitro.

Les cultures de tissus sont amorcées à partir de n'importe quelle section d'une plante contenant des cellules en division, stérilisée chimiquement (A). Les tissus sont cultivés sur des milieux gélifiés constitués essentiellement d'eau, de minéraux, d'hydrates de carbone, de vitamines et de régulateurs de croissance. Ils se propagent en amas de cellules de plusieurs types nommés cals (B).

Une modification du contenu hormonal du milieu de culture induit la production de tiges (C) ou de racines (D). Ainsi des plantules autonomes peuvent être régénérés et utilisés pour la propagation horticole (E).

Les cellules des cals peuvent croître individuellement. Ainsi on peut généralement obtenir des cultures de cellules en mettant en suspension des cals friables (ou d'amas de cellules)(F). Encore ici, il est possible de forcer l'organisation des cellules en tissus pour obtenir des embryons (G) ou des métabolites secondaires (H). On peut alors envisager des applications industrielles comme la production de semis pour l'agriculture (I), la production de molécules biologiquement actives pour les applications pharmaceutiques ou de molécules intéressantes pour l'industrie alimentaire (J).

La croissance des cellules, comme éventuellement la différenciation et éventuellement la production de métabolites secondaires, est influencée par de nombreux facteurs:

- le potentiel génétique de la plante;
- les nutriments: eau, macro et micronutriments, hydrates de carbones...
- certaines molécules organiques
- l'environnement physique: lumière, température, pH, pO_2, pCO_2, pC_2H_4, osmolarité...

La culture de cellules végétales est aussi utilisée en recherche fondamentale (K). Les développements fulgurants de la biologie moléculaire a donné lieu comme dans d'autres domaine, à plusieurs travaux: répression de caractères, nouveaux caractères, résistance aux maladies, amplification de la production de métabolites.

interactions complexes les conditions de culture que nous voulons améliorer. C'est ce que nous nous attarderons à faire dans les deux prochaines sections.

1.1.2.2.1 Caractéristiques des cellules végétales cultivées in vitro

Les cultures en suspension de cellules végétales sont généralement entretenues dans des flacons Erlenmeyer agités entre 100 et 125 rpm à des températures de 25 à 28°C. Les cellules végétales ont une taille relativement importante; leur diamètre varie généralement de 10 à 40 μm et comme leur expansion est le plus souvent unidirectionnelle, leur longueur peut atteindre 40 à 200 μm. Les cellules végétales se distinguent des cellules eucariotes typiques (i) par la formation d'une paroi cellulaire externe constituée de polysaccharides qui leur confère une certaine rigidité (Figure 1.2); (ii) par la présence d'une ou plusieurs vacuoles dans lesquelles sont entreposées des réserves de protéines, d'acides organiques et de métabolites secondaires; (iii) et par la capacité d'utiliser le CO_2 par photosynthèse par l'entremise des chloroplastes, lorsqu'ils sont présents. [169]

Certaines lignées cellulaires requièrent une illumination, constante ou séquentielle, pour que les réactions induites par la lumière puissent se produire. Toutefois, même lorsque des chloroplastes sont présents, la plupart des cellules végétales cultivées in vitro le sont en présence d'hydrates de carbone. Or l'activité respiratoire associée à l'utilisation des hydrates de carbone nécessite un apport d'oxygène pour alimenter les réactions d'oxydo-réduction. Cependant la faible activité métabolique des cellules végétales implique des taux d'assimilation d'O_2 relativement faibles comparativement à ceux des micro-organismes. Ainsi, les taux spécifiques d'assimilation d'O_2 sont de l'ordre de 0,5 mmol O_2 par gramme de matière sèche par heure, ce qui représente 5 à 10% des taux spécifiques de respiration de *E. coli*, un système microbien typique. Pour des biomasses sèches finales de 15 à 20 g par litre de culture, les taux de transfert d'oxygène (k_La) des systèmes de culture utilisés doivent donc être de l'ordre de 7,5 à 10 mmol O_2 L^{-1} h^{-1} pour suffire à la demande en oxygène. [142]

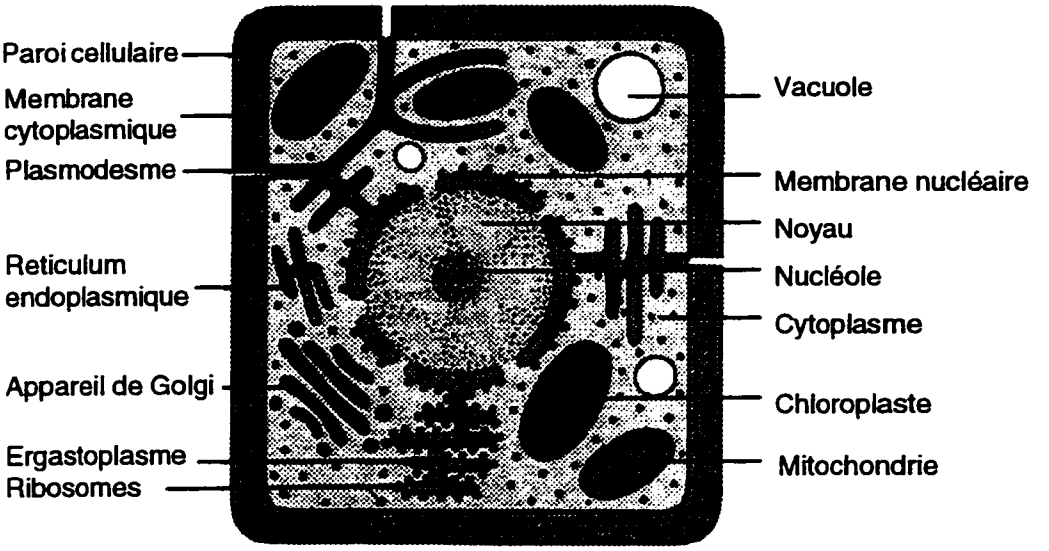


Figure 1.2 **Représentation schématique d'une coupe de cellule végétale** (D'après Ricard et coll. [128])

Les cellules végétales sont constituées de 90 à 95% d'eau. Comparativement aux bactéries, qui en contiennent environ 80%, le contenu en eau des cellules végétales est donc important. Une vacuole centrale volumineuse, ou d'une série de vacuoles, contenue par une membrane, le tonoplaste, est à l'origine de ce phénomène.

La présence de la paroi cellulaire permet de contenir la pression hydrostatique interne qui donne lieu au phénomène de la turgescence. Le contenu du cytoplasme en composés osmotiquement actifs est régulé par un apport de l'extérieur, généralement des ions K^+, ou par leur génération à partir des réserves de polymères, lorsqu'elles existent.[3] Une expansion cellulaire accompagne l'accumulation de l'eau associée à ce processus dans la vacuole. Ainsi, baignant dans un milieu de faible pression osmotique, les cellules végétales gonflent suite à l'augmentation de leur pression de turgescence. Inversement, dans un milieu isotonique ou hypertonique, les cellules se contractent donnant lieu à la plasmolyse (Figure 1.3).

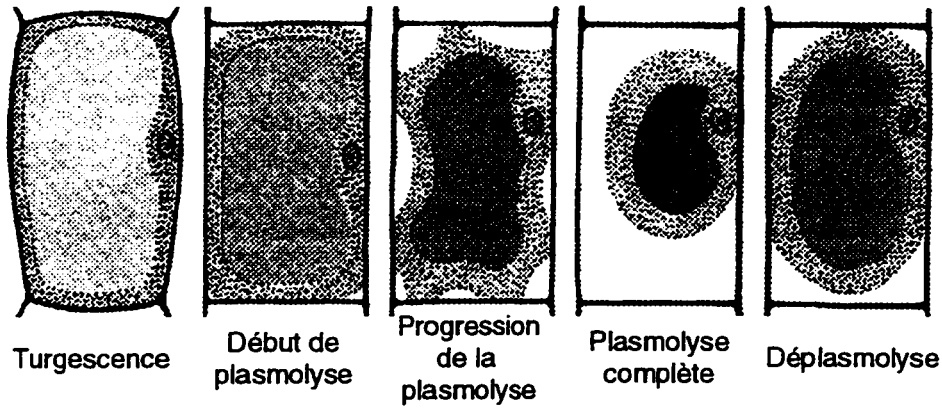


Figure 1.3 **Illustration de divers états de turgescence et de plasmolyse cellulaire.** (D'après Ricard et coll. [128])

Durant la croissance de la biomasse le volume du cytoplasme varie peu et la turgescence est la force motrice de l'expansion cellulaire (Figure 1.4). [128] Les cellules ayant un fort potentiel pour une éventuelle différenciation sont petites (ca. 20 μm), possèdent un faible volume de vacuoles et se présentent généralement en amas denses. Par affinité avec le comportement de certaines cellules de tissus végétaux, ces cellules sont généralement considérées comme des cellules mérismatiques. L'expansion cellulaire au cours de laquelle la vacuole grossit et le rapport surface/volume du cytoplasme augmente, est associée à la différenciation cellulaire. Celle-ci permettra éventuellement à la cellule de contribuer à l'activité spécifique du tissu dont elle fait partie. La formation de certains métabolites secondaires serait reliée à cette différenciation cellulaire ou à l'organisation des cellules en amas structurés, ces deux phénomènes se produisant simultanément.

Les taux spécifiques de croissance des cultures in vitro de cellules végétales varient entre 0,15 et 0,85 d^{-1}, correspondant à des temps de doublement de 1 à 5 jours. Conséquemment, les cultures en cuvées durent de 1 à 2 semaines et requièrent des conditions de stérilité très strictes. Parallèlement, les taux volumiques de production sont faibles et les coûts associés à la

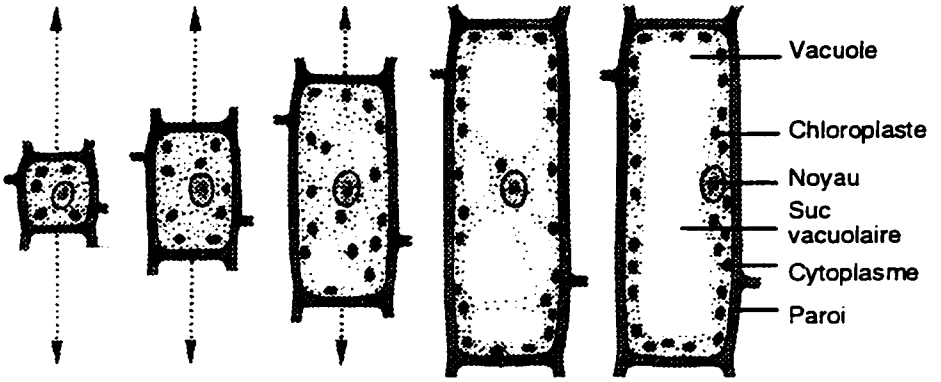


Figure 1.4 Représentation schématique de l'expansion cellulaire.
(D'après Ricard et coll. [128])

récupération des faibles quantités de produits sont élevés; l'intérêt économique de ces bioprocédés est ainsi généralement restreint aux produits de haute valeur ajoutée.

Pour obtenir un bon taux de croissance, les cultures de cellules végétales requièrent une concentration cellulaire minimale lors de l'inoculation d'environ 10^4 cellules mL^{-1}, correspondant à environ 1 g MS L^{-1}. Ainsi, les inocula représentent un volume important ce qui réduit les écarts d'échelle entre les unités et a une incidence sur les coûts associés à la mise à l'échelle du bioprocédé.

Le mécanisme de reproduction des cellules végétales implique la formation d'une plaque cellulaire (Figure 1.5). La difficulté des cellules à se séparer le long de cette plaque fait en sorte que, même pour les cultures de cellules en suspension, la croissance de la biomasse s'effectue souvent en agrégats ou en amas. De plus, les conditions de cultures peuvent favoriser la formation de polysaccharides extracellulaires, notamment en fin de culture ou sous l'effet d'un stress mécanique intense, et concourir à la consolidation d'amas cellulaires. Ainsi, toutes les suspensions cellulaires sont en fait constituées d'agrégats plus ou moins compacts, certains pouvant atteindre des diamètres de 4 à 5 mm. La grosseur des cellules et leur tendance à croître

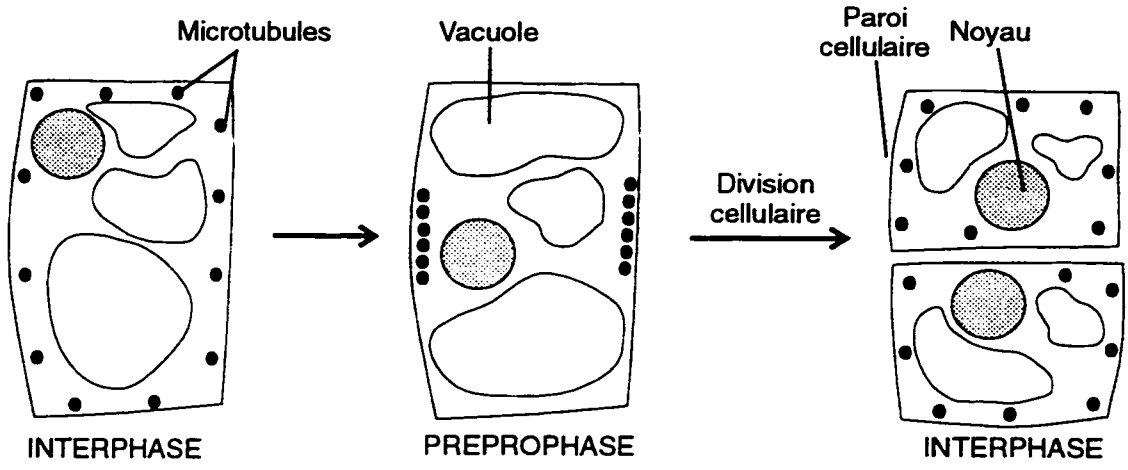


Figure 1.5 **Représentation schématique de la formation de la plaque cellulaire lors de la division des cellules végétales.** (Adapté de Alberts et coll. [3])

en amas font en sorte que la vitesse de sédimentation est rapide et que les cultures en suspension requièrent une agitation constante et efficace. Au prix d'une augmentation du nombre de manipulations, il est cependant possible de sélectionner des suspensions fines en ne retenant que les fractions de faible diamètre après filtration. [41]

Pour certaines cultures en suspension, cette croissance en agrégats semble prérequise à la formation des métabolites secondaires. Certains auteurs attribuent ce comportement à la nécessité d'atteindre un certain niveau de différenciation cellulaire pour que les cellules puissent produire des métabolites secondaires en quantités appréciables. [95] D'autres relient plutôt cette observation à la présence de limitation en nutriments essentiels au centre des amas. Ces limitations locales induiraient une réduction notable du métabolisme primaire, qui favoriserait la stabilisation des activités cellulaires et la production de métabolites secondaires. [69] Ce comportement des cellules végétales a suscité de nombreux travaux sur la culture de cellules immobilisées, revus, entre autres, par Williams et Mavituna [174], et la conception de réacteurs adaptés à ce type de culture. [8,19,47,78,87]

Dans les tissus végétaux, il existe un réseau plus ou moins structuré de communication intercellulaire par le biais des plasmodesmes (Figure 1.6). [3] Les connexions cytoplasmiques à

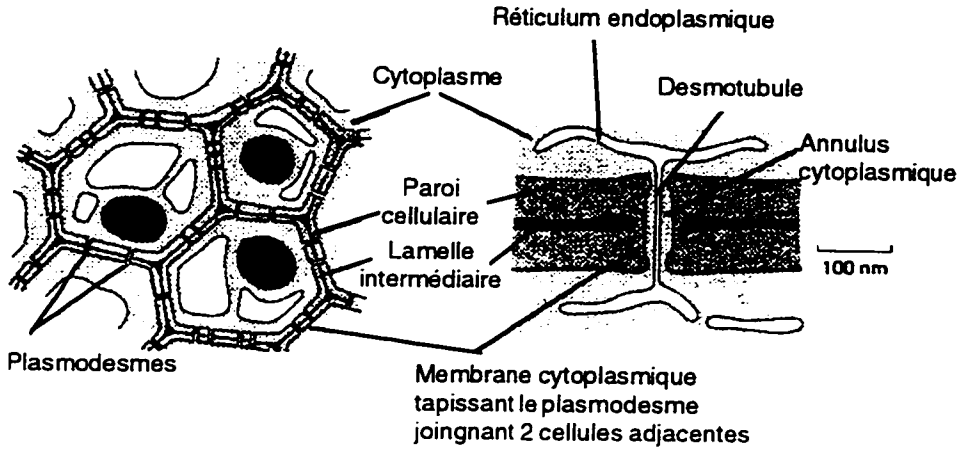


Figure 1.6 **Connexions cytoplasmiques à travers les plasmodesmes des parois cellulaires des cellules végétales** (D'après de Alberts et coll. [3])

travers les plasmodesmes des parois cellulaires permettent un échange de substances de faibles poids moléculaires (<800 u) entre les cellules. Ce réseau présent dans les agrégats et dans les cellules immobilisées permet aux cellules de partager certaines ressources nutritionnelles et aux amas de posséder une certaine structure, semblable à celle des tissus végétaux. Dans ce contexte, il peut être approprié de sélectionner les agrégats cellulaires afin de favoriser la production de métabolites secondaires. Cela aura cependant des incidences sur les protocoles de repiquages et d'inoculation des cultures en suspension, et sur le design des ports d'échantillonnage. [169]

La production des métabolites secondaires est par définition non-associée au métabolisme primaire dédié aux activités métaboliques reliées à la production de biomasse. Il existe en fait une relation inverse entre les conditions favorisant les phases de croissance et de production. [95,139] La production des métabolites secondaires nécessite une spécialisation de la cellule. L'activité des hormones présentes dans le milieu de culture, la concentration en nutriments, la pression partielle de certains gaz, la température, le pH, la pression osmotique agissent sur le degré de spécialisation. La manipulation de ces facteurs est la base de l'optimisation des conditions de culture pour la croissance ou la production. Ainsi, les bioprocédés basés sur les cellules végétales sont-ils

généralement conçus en deux étapes distinctes qui se succèdent généralement dans le temps : une étape de propagation de la biomasse et une étape de production proprement dite. [145]

En parallèle, la sélection des lignées cellulaires permet, elle, d'améliorer et de préserver le niveau d'expression de l'activité cellulaire désirée. [34,131] La dichotomie entre la prolifération cellulaire et la production de métabolites secondaires complique cette sélection. Les faibles quantités de métabolites secondaires produites requièrent l'utilisation de techniques sophistiquées capables de détecter des concentrations de l'ordre du nanogramme. Dans ce contexte, les lignées cellulaires productrices de composés chromogènes, tels les anthocyanes, sont plus faciles à sélectionner, leur productivité peut être suivie constamment et elles constituent des systèmes biologiques de choix pour la recherche et le développement de bioprocédés. [139] Quel que soit le système de production, les deux activités de mise au point de procédé et de sélection de lignées sont importantes et doivent être menées en parallèle afin d'établir un système biologique productif. [129]

Les métabolites secondaires sont impliqués dans les mécanismes de défense contre les invasions de champignons pathogènes, de bactéries ou de virus. Certains de ces mécanismes de défense et la production de métabolites secondaires qui y est associée, peuvent ainsi être induits dans les cultures de cellules végétales par la présence de molécules issues de la paroi cellulaire de ces organismes pathogènes. L'introduction de ces éliciteurs dans les cultures de cellules végétales a dans plusieurs cas contribué à augmenter l'accumulation des métabolites secondaires et, pour certains systèmes, à induire la sécrétion des métabolites dans le milieu de culture. [13] L'utilisation de cette technique a permis des gains de productivité volumique intéressants dans les bioréacteurs. [145]

La production et l'accumulation des métabolites secondaires peuvent aussi être provoquées par un stress imposé à la culture. Celui-ci peut agir comme un éliciteur abiotique; c'est le cas de l'exposition à la lumière ultraviolette, aux ions de métaux lourds, aux détergents, à la chaleur et au froid. [13] Dans certains cas, une limitation nutritionnelle ou des conditions de culture peu

propices peut aussi entraver la prolifération et la croissance cellulaire et favoriser la production de métabolites secondaires. C'est le cas de l'accumulation des anthocyanes dont la production chez le raisin est naturellement reliée à la constitution de réserves d'hydrates de carbones et pour laquelle une hausse de productivité et une diminution de la croissance de la biomasse est observée dans les milieux à forte osmolarité.

Les liens existant entre les caractéristiques spécifiques des cultures de cellules végétales énoncées plus haut et leurs incidences sur l'environnement global des cultures et sur divers aspects relevant de l'ingénierie des bioprocédés sont établis au tableau 1.3. Globalement, on y constate qu'outre la sélection de souche, la problématique entourant le développement d'un bioprocédé basé sur la culture de cellules végétales s'articule autour des problèmes de mélange et de transfert de masse, notamment en ce qui concerne l'approvisionnement de la culture en oxygène, et l'environnement physico-chimique et nutritionnel.

En termes pratiques, l'augmentation de la productivité (mg de produit L^{-1} d^{-1}) découlera d'une augmentation du taux de croissance (généralement exprimé en g de biomasse L^{-1} d^{-1}) ou du rendement en produit (mg de produit par g de biomasse). L'un et l'autre sont influencés par l'environnement physico-chimique, parfois dans un sens antagoniste. Les approches disponibles pour augmenter la productivité des systèmes de culture de cellules végétales font appel à la modification de cet environnement et, plus marginalement, aux manipulations génétiques, pour lesquelles les diverses stratégies envisageables dans un avenir plus ou moins rapproché sont bien résumées par Fowler et Stafford.[49] L'approche naturelle de l'ingénieur de procédé, celle d'ailleurs où il peut être le plus utile, est d'étudier les effets (macroscopiques) de divers paramètres de procédé sur la croissance et la production de ces systèmes biologiques.

Tableau 1.3 Impact des caractéristiques spécifiques aux cellules végétales sur les cultures *in vitro* et incidence sur le développement des bioprocédés

Caractéristiques des cellules végétales	Impact général sur les cultures	Aspects touchés du bioprocédé
Diamètre : 10 à 40 µm Longueur : 10 à 200 µm	- sédimentation rapide - sensibilité au cisaillement, de tolérant à sensible	- mélange - vitesse agitation
Croissance en amas ou en agrégats, Diamètre : ~ 1-5 mm	- sédimentation rapide - formation de micro-environnements - port d'échantillonnage de large diamètre requis - croissance cellulaire sur les parois du vaisseau	- mélange - configuration et dimensionnement de l'unité - possiblement le mode d'opération
Production favorisée par la différenciation accompagnant la croissance en agrégats	- intérêt pour les cultures immobilisées et des cultures de racines	- configuration du bioréacteur - intérêt d'une opération en semi-continu
Taux de croissance faible	- productivité faible	- sélection d'espèces - programme de sélection et d'entretien de souches - mode d'opération,
Concentration minimale à l'inoculation d'environ 10^4 cellules par mL	- volume important requis pour l'inoculum, correspondant à 5-20% v/v	- grand volume des bioréacteurs de production de l'inoculum - réduction des possibilités de mise à l'échelle
Faibles besoins en oxygène (relativement aux bactéries)	- apport d'O_2 moins critique que pour les microorganismes - k_La plus faibles requis	- vitesse d'agitation - configuration des agitateurs
Métabolites secondaires intracellulaires, quelques fois extracellulaires	- emphase sur la sélection et/ou la mise au point de protocoles d'élicitation	- a priori, impossibilité de réutiliser la biomasse
Production de métabolites sujette à des mécanismes régulateurs complexes	- impact de la qualité de la biomasse sur la productivité - influence notable des facteurs physico-chimiques	- modification des conditions physico-chimiques des cultures - choix du mode et des séquences opératoires en fonction des besoins nutritionnels spécifiques

adapté de Leathers et coll.,[88] de Petersen et Alferman [119] et de Scragg [142]

1.1.2.2.2 Aspects nutritionnels

La mise au point d'un bioprocédé est subordonnée à la compréhension du comportement du système biologique utilisé dans un contexte d'interactions multiples entretenues avec l'environnement physico-chimique. En cuvée, cet environnement est d'abord conditionné par la présence des nutriments et modifié au fil des cultures par les interactions chimiques et biochimiques entre les cellules et le milieu.

Les milieux de croissance conçus pour la culture in vitro de cellules de plantes sont le plus souvent chimiquement bien définis. Ils contiennent cinq groupes de composants :

- des macro-éléments, sources d'azote, de phosphore, de potassium, de calcium, de magnésium et de soufre, essentiels aux végétaux;
- des micro-éléments, globalement des sels de métaux fourni en quantité minime parmi lesquels figurent les huit autres minéraux essentiels aux végétaux;
- des régulateurs de croissance ; molécules organiques plus ou moins complexes impliqués dans la régulation des activités cellulaires;
- des vitamines, surtout le myo-inositol, l'acide nicotinique, la thiamine et la pyridoxine, pour lesquels deux "familles" de concentrations, celles des deux milieux standard les plus utilisés (MS [106] et B5 [55]), sont le plus souvent utilisées, généralement sans être testées indépendamment des macro-nutriments, et
- une source d'hydrates de carbone, généralement du saccharose.

Afin d'illustrer l'importance relative de certains de ces éléments nutritifs, le tableau 1.4 présente l'ordre de grandeur des concentrations des principaux éléments des feuilles de végétaux.

Tableau 1.4 Concentration typique d'éléments chimiques dans les feuilles de végétaux.

Élément	Concentration
Micro-nutriments	$\mu g\ g^{-1}$
Mo	0,1
Ni	0,1
Co	3
Zn	20
Ma	20
B	10
Fe	100
Cl	100
Macro-nutriments	% ($g\ 10^{-2}\ g$)
S	0,1
Ca	0,2
P	0,2
Mg	0,2
K	1,0
N	2,5
Autres	% ($g\ 10^{-2}\ g$)
O	45
C	45
H	6

d'après Epstein [46]

Il arrive qu'un mélange non défini de molécules organiques, tels le lait de coco ou les extraits de plantes, soit ajouté à ces composés comme source d'azote réduit et de régulateurs de croissance non identifiés. [120] Ces additifs sont surtout utilisés pour faciliter l'initiation des cultures. De plus, le recours à cette pratique semble relié aux habitudes des laboratoires.

Les activités métaboliques associées à la culture de cellules de plantes chez lesquelles les activités de photosynthèse n'ont pas été préservées, requièrent un apport constant d'oxygène pour la réduction des sources de carbone organique. Cette respiration cellulaire donne lieu à la production de CO_2. De plus, dans les procédés opérés en cuvée, les conditions physico-chimiques du milieu extracellulaire évoluent constamment en réponse aux échanges constants entre les cellules et leur environnement. Ainsi le pH et l'osmolarité changent avec les concentrations des différents ions et molécules organiques présents dans le milieu de culture.

Pour les cultures en cuvée, la croissance de la biomasse est intimement reliée aux concentrations initiales de nutriments. La plupart des études portant sur l'effet des nutriments sur la croissance de la biomasse ou la production de métabolites posent implicitement que les micro-nutriments et les vitamines sont bien choisis et fournis en quantité adéquate pour soutenir la croissance et la production de métabolites secondaires. Ainsi, ces études sont le plus souvent restreintes aux régulateurs de croissance, aux hydrates de carbone et à certains macro-nutriments, qui, rappelons le, constituent les constituants des cellules les plus importants en masse (Tableau 1.4). Outre l'action des régulateurs de croissance, nous reverrons sommairement dans les sections suivantes le rôle des sources d'azote, de phosphore, de carbone ainsi que les interactions entre leur utilisation dans le métabolisme cellulaire et la présence d'oxygène et de dioxyde de carbone.

1.1.2.2.2.1 Azote

L'azote est impliqué dans la synthèse des acides aminés, des protéines, des enzymes et des acides nucléiques. Il est le plus souvent fourni aux cultures sous forme de sels d'ammonium et de nitrate. Dans les deux formulations de milieu les plus utilisées, les concentrations initiales sont de 2 mM NH_4 et 25 mM NO_3 pour le milieu B5,[55] et de 40 mM NH_4 et 40 mM NO_3 pour le milieu MS.[106]

L'ion ammonium est assimilé par l'entremise de deux systèmes enzymatiques (glutamate déhydrogénase et glutamate synthétase-glutamate synthétase) conduisant à la formation de glutamate. Une fois assimilés sous cette forme, les groupes azotés peuvent être transférés sur des molécules constituant les squelettes carbonés des acides aminés par des réactions de transamination.

L'ion nitrate, lui, doit être réduit sous l'action de la nitrate réductase et la nitrite réductase, avant de pouvoir être utilisé, sous forme d'ion ammonium, dans la synthèse des acides aminés puis des protéines (Figure 1.7). C'est ainsi qu'en cours de culture, il est possible d'observer une hausse importante d'ions NH_4 dans le milieu lorsqu'il y a une lyse cellulaire. Pour plusieurs

lignées cellulaires, la présence de NH_4 supprime ou inhibe l'activité des enzymes nitrite réductase. [132]

En présence de limitation nutritionnelle de la prolifération cellulaire, l'incorporation dans la biomasse des ions nitrate encore présents dans le milieu de culture se fait par la constitution de réserves de NO_3 libre ou d'acides aminés dans la vacuole. [14] La remobilisation des réserves vacuolaires de NO_3 libre ne pourrait se faire qu'avec l'induction de l'activité du système de nitrate réductase par l'ajout de NH_4. [125]

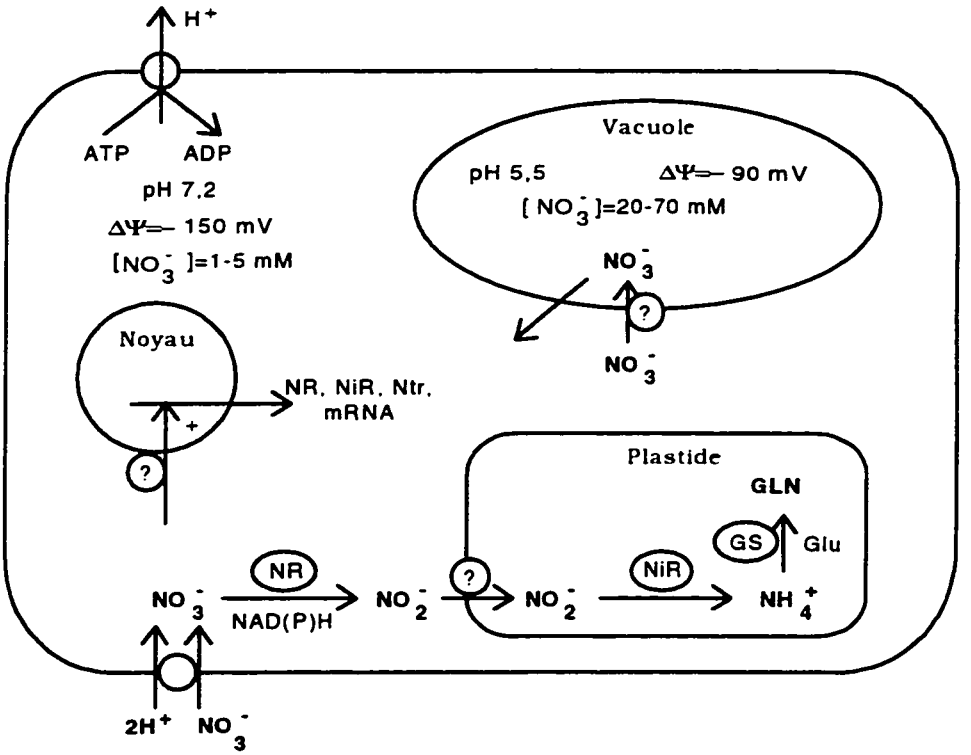


Figure 1.7 Représentation schématique des voies d'assimilation du nitrate.

Les enzymes H^+-ATPases localisés dans la membrane cytoplasmique pompent les protons hors de la cellule induisant des gradients électriques ($\Delta\Psi$) et de pH. Le nitrate est transporté dans la cellule par un mécanisme de cotransport (Ntr) qui introduit simultanément un ou deux protons à l'intérieur de la cellule. Les ions nitrate peuvent ensuite être transportés à travers le tonoplaste et entreposé dans la vacuole. Dans le cytoplasme, le nitrate est réduit en nitrite sous l'action de l'enzyme nitrate réductase (NR) pour ensuite pénétrer sous cette forme dans les plastides et être réduit en ammonium sous l'action de l'enzyme nitrite réductase (NiR). L'ion ammonium est fixé en glutamate pour ensuite produire de la glutamine sous l'action de la glutamine synthase (GS). L'ion nitrate agit aussi comme signal pour régir l'expression de NR, de NiR et des transporteurs (Ntr). (Adapté de Crawford) [32]

Le mécanisme de transport des ions NH_4 implique l'échange d'un ion H^+.[146] Cet échange ionique est accompagnée d'une chute de pH étant donné la faible capacité tampon des cultures au-dessus de pH 4.[135] Après l'inoculation dans du milieu frais où le ratio $[NH_4]/[NO_3]$ est faible, ce qui est a priori typique du milieu B5, la baisse de pH observée est typiquement de 5,5 à 4,5 pour ensuite remonter graduellement vers pH 5,5 ou 6. Cette remontée coïncide avec le début de la disparition des ions nitrate du milieu de culture. De plus, la littérature rapporte que la consommation du NO_3 peut être reportée après l'épuisement des ressources initiales de NH_4.[14,132] mais la consommation de NO_3 n'est pas toujours inhibée par l'ajout de NH_4 dans le milieu de culture pendant la phase de croissance.[132]

Outre l'incidence de la consommation des ions NH_4 et NO_3 sur le pH des cultures qui, lui, se répercute négativement sur le maintien de la viabilité et le transport des nutriments, la proportion des ions NH_4 et NO_3 fournis aux cultures est aussi importante à l'égard des taux de croissance spécifiques de la biomasse et des taux de production de métabolites secondaires pour plusieurs espèces et lignées.[38,39,72,176] Les études de formulation de milieu comparent généralement le comportement des cultures en termes d'augmentation de la biomasse ou de la quantité de produit après 7 ou 14 jours et sont rarement appuyés de courbes de pH extracellulaire qui permettraient d'établir (ou d'infirmer) que l'optimum du taux de croissance est aussi relié au pH résultant de la consommation des ions NH_4.

Bien que les cultures in vitro nécessitent habituellement la présence de ces deux ions, dans certains cas, la croissance de la biomasse peut être supportée par l'ion nitrate ou par l'ion ammonium utilisé seul après une période d'acclimatation. L'utilisation de sources d'azote réduit, comme par exemple la glutamine ou les hydrolysats de protéines, a généralement un effet positif sur la croissance. Payne et ses collaborateurs[113] suggèrent d'ailleurs que l'utilisation d'une source d'azote organique, similairement aux cultures microbiennes, pourrait améliorer significativement les productivités en biomasse et en métabolites secondaires.

Les interactions qu'on imagine complexes entre la présence d'ions NH_4, NO_3 et la croissance de la biomasse font en sorte qu'il n'est pas facile d'étudier leur effet sur la croissance de la biomasse ni sur la qualité de biomasse, un concept plus vague qu'on pourrait définir comme étant la capacité de production des cellules dans un état donné.

1.1.2.2.2.2 Phosphate

Le phosphate est requis dans la synthèse des acides nucléiques, des phospholipides, des nucléotides. Il participe aux échanges énergétiques à travers la synthèse de l'adénosine triphosphate (ATP). Il est aussi incorporé à diverses structures cellulaires notamment les membranes.

La présence de phosphore influence nettement le métabolisme cellulaire. Ainsi, l'ajout de phosphate a pour effet d'augmenter la disponibilité d'ATP intracellulaire, d'augmenter le taux de production de protéine en faisant baisser les réserves d'acides aminés, et de provoquer la diminution des niveaux de protéases,[113] ce à quoi devrait correspondre une augmentation des taux d'assimilation d'oxygène. Dans plusieurs cas il a été montré que la présence du phosphate réduit la production de métabolites secondaires.[19,84,98,166]

Le phosphate est aussi fourni aux cultures sous forme de sels. De façon générale, la concentration initiale de phosphate dans les milieux de culture de cellules végétales varie de 0,5 à 3 mM. Elle affecte toujours significativement la croissance et la production de métabolites secondaires.[111] Les taux de consommation des ions phosphates varient d'une espèce à l'autre. On rencontre deux patrons typiques de disparition des ions phosphate du milieu de culture: l'un où la consommation est lente et (hypothétiquement) appariée aux besoins, l'autre où la consommation est rapide et à taux constant.[21] Chez les espèces où la consommation est rapide, les ions phosphate sont entreposés dans la vacuole, majoritairement sous forme d'orthophosphate alors que la concentration d'ion phosphate inorganique dans le cytoplasme est constante. Le phosphate est alors redistribué par l'entremise de la division cellulaire.

Il existe une quantité minimale de phosphate intracellulaire sous laquelle la croissance de la biomasse ne peut être soutenue. Pour une variété d'espèces de cellules végétales, Curtis et ses collaborateurs [33] ont pu vérifier que le contenu en phosphate de la biomasse en phase stationnaire est de l'ordre de 100 à 150 µmol P $(g\ MS)^{-1}$. Ces chercheurs ont d'ailleurs montré que les taux spécifiques de croissance de la biomasse et la quantité de biomasse finale dépend de la concentration initiale de PO_4 dans le milieu de culture ainsi que de la disponibilité du PO_4 intracellulaire de l'inoculum. Étant donné la faible quantité de PO_4 fournie dans le milieu de culture, il est donc important de ne pas sous-estimer l'importance de la quantité de PO_4 introduite dans une culture par l'inoculum lui-même. Les travaux de Amino et de ses collaborateurs [4] montrent qu'en termes de concentration cellulaire, cette concentration minimale d'ion phosphate représenterait 0,38 mmol P $(10^6\ cellules)^{-1}$ chez *C. roseus*. Hirose et ses collaborateurs [63] ont d'ailleurs constaté une inhibition de la division cellulaire provoquée par une réduction de la concentration initiale de phosphate chez *Vitis vinifera*. Cette inhibition de la prolifération était accompagnée d'une accumulation marquée d'anthocyanes coïncidant avec l'arrêt de la prolifération cellulaire. Dans ce contexte, l'ion phosphate constitue la première source de limitation de la prolifération à investiguer.

Du point de vue de la production de métabolites secondaires, dans plusieurs cas (*Caffea arabica*, [19] *Lithospernum erythrohizon*, [51] *Nicotiana tabacum*, [84,98] *Catharanthus roseeus*, [85] *Vitis vinifera* [57,176]) une réduction de la concentration initiale de phosphate favorise la production de métabolites secondaires. L'étude de Knobloch et de ses collaborateurs [84] ont montré que la croissance de la biomasse de *N. tabacum* dans un milieu de culture exempt de phosphate était reliée linéairement à la concentration intracellulaire d'orthophosphate, alors que la production de métabolites y était inversement reliée. Résultat des plus intéressant, toujours avec *N. tabacum*, Schiel et ses collaborateurs ont obtenu une augmentation de production de métabolites secondaires en mettant en oeuvre un culture en flacon dans laquelle ils ont maintenu une concentration de phosphate intracellulaire minimale au moyen d'une alimentation programmée de ce nutriment. Des études sur l'élicitation du métabolisme secondaire montrent

aussi que le moment propice pour l'induction du métabolisme secondaire par élicitation est relié au moment de la disparition des ions phosphate du milieu de culture. [108]

Ces résultats laissent poindre la possibilité de privilégier la croissance de la biomasse en s'assurant d'une alimentation suffisante mais contrôlée de phosphate durant la phase de croissance afin de pouvoir induire la production de métabolites secondaires sur des cellules maintenues dans des conditions de contenu minimal de phosphate lors de l'étape de production.

1.1.2.2.2.3 Hydrates de carbones

Le saccharose et, dans une moindre mesure, le glucose sont les deux principaux hydrates de carbones utilisés en culture de cellules végétales. Le saccharose doit être hydrolysé avant d'être transporté dans les cellules. Selon la localisation des enzymes responsables de l'hydrolyse, celle-ci pourra avoir lieu dans le milieu de culture ou simultanément avec leur introduction dans le cytoplasme. [154]

En masse, la source d'hydrate de carbone constitue le principal constituant des milieux de culture. D'ailleurs comme l'indique le tableau 1.4, l'oxygène et le carbone issus de ces hydrates de carbone représentent près de 90% de la masse des cellules. Les rendements en biomasse, mesurés en terme de masse sèche, sur les divers éléments nutritifs seront donc biaisés par le rendement en biomasse sur les hydrates de carbone. De plus, certaines espèces ont tendance à entreposer les sucres sous forme d'amidon ce qui se reflète sur les mesures de masse sèche et de masse humide sans toutefois participer à la prolifération cellulaire. [154] L'interprétation des données recueillies sur les rendements sur certains nutriments doit donc être prudente, notamment en ce qui concerne les nutriments rapidement consommés.

Les hydrates de carbone ont une fonction double : ils sont utilisés comme source d'énergie dans le processus catabolique et comme source de précurseurs pour la synthèse organique dans le processus anabolique.

Les voies cataboliques utilisées par les cellules végétales sont similaires à celles utilisées par toutes les cellules hétérotrophes. Ce sont principalement la glycolyse et le cycle de l'acide carbocylique (TCA cycle), et, dans une moindre mesure, la voie alternative et la voie des penthoses phosphates. Ces voies cataboliques et leurs interactions principales sont illustrées à la figure 1.8.

Les réactions enzymatiques de la glycolyse produisent deux molécules de pyruvate et deux molécules d'adénoside tri-phosphate (ATP) par molécule de glucose (Figure 1.9) et sont localisées dans le cytoplasme (Figure 1.8). Dans les conditions aérobies des cultures de cellules végétales *in vitro*, la disponibilité de l'oxygène permet d'oxyder rapidement le NADH en NAD^+ par une réaction de phosphorylation oxydative faisant en sorte que la disponibilité du NAD^+ ne limite pas la poursuite des réaction cataboliques.[a]

L'oxydation du pyruvate généré par la glycolyse se poursuit dans les mitochondries. Le pyruvate est d'abord transformé en acétyl-CoA avant d'être introduit dans le cycle tricarboxylique (Figure 1.8). Les réactions de ce cycle sont les plus efficaces du point de vue énergétique. Si le glucose subit une oxydation complète à travers la glycolyse, la transformation en acétyl CoA, le cycle tricarboxylique et la chaîne respiratoire de transport d'électrons (phosphorylation oxydative), et qu'aucune molécule n'est soutirée du cycle pour la biosynthèse, 38 molécules d'ATP peuvent être produites (avec 6 molécules d'ATP produites par molécule d'O_2 au niveau de la chaîne de transport d'électrons reliée aux cytochromes) (Figure 1.9).[123] Lorsque les besoins énergétiques sont élevés, le transport du pyruvate dans les mitochondrie peut devenir limitant. Dans ses conditions, le phosphoénol pyruvate est transformé en oxaloacétate par une réaction de fixation nonphotosynthétique du CO_2 sous l'action de l'enzyme phosphoénol pyruvate

---

a

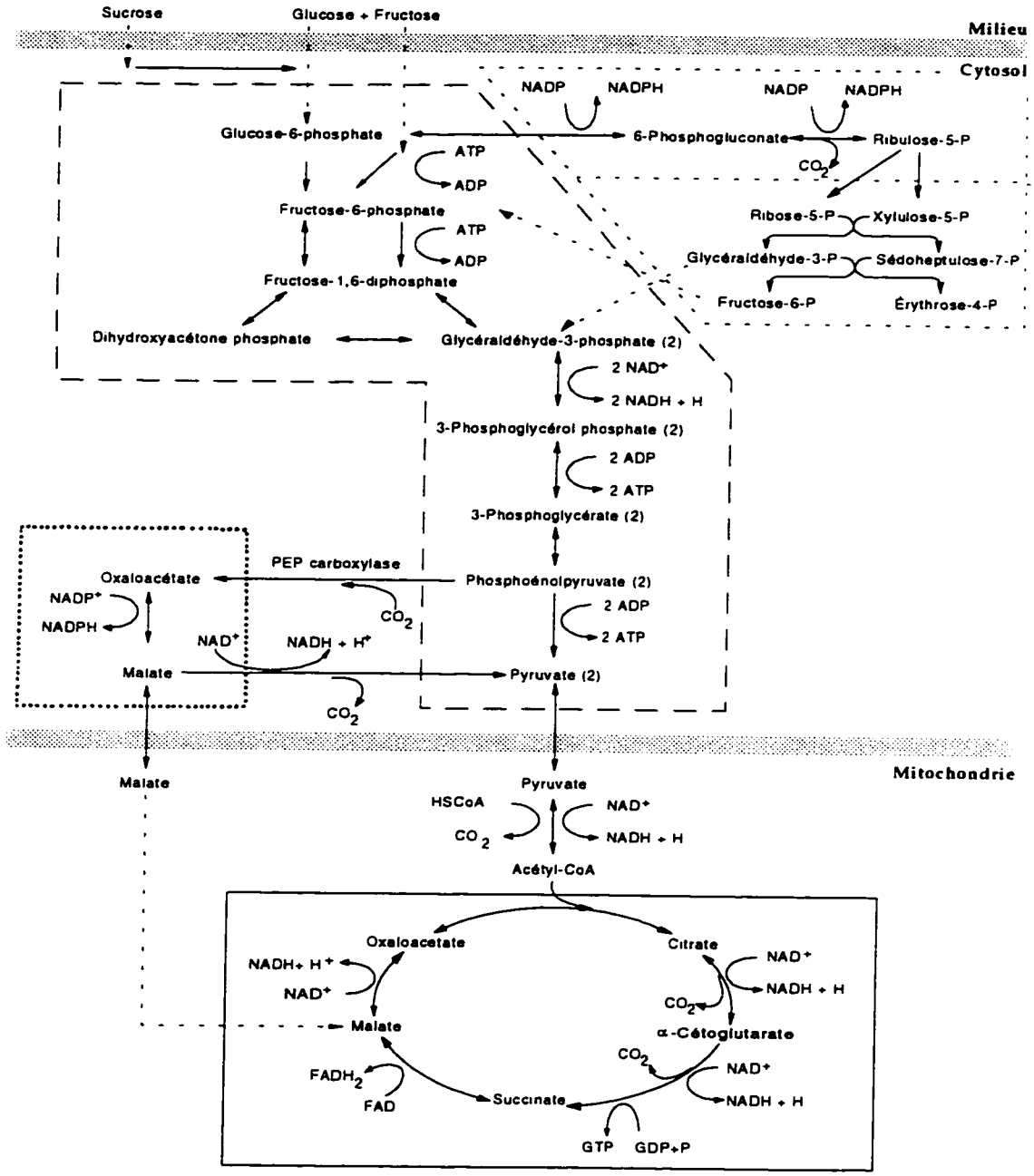
ADP : adénosine di-phosphate;
ATP : adénosine tri-phosphate;
NAD^+, NADH : formes oxydée et réduite de la nicotinamide adénine dinucléotide.

carboxylase (PEPcarboxylase). L'oxaloacétate est ensuite transformé en malate sous l'action de l'enzyme malate déhydrogénase (Figure 1.8). Le transport du malate à travers la paroi des mitochondries étant plus rapide que celui du pyruvate, ces réactions sont de nature à accélérer l'apport de réactifs au cycle tricarboxylique. Lors de l'assimilation rapide du NH_4 en début de culture, un quantité importante de molécules est drainée du cycle carboxylique pour la formation d'acides aminés. Elles doivent être remplacées rapidement et il s'agit d'une situation où la fixation anaplérotique du CO_2 serait importante bien que globalement limitée à 3% du carbone assimilé. [113]

Une voie dite alternative spécifique aux végétaux est aussi localisée dans les mitochondries et produit 12 molécules d'ATP (2 molécules d'ATP par molécule d'O_2). Il ne semble toutefois pas que la voie alternative soit importante dans les cultures *in vitro*. [35]

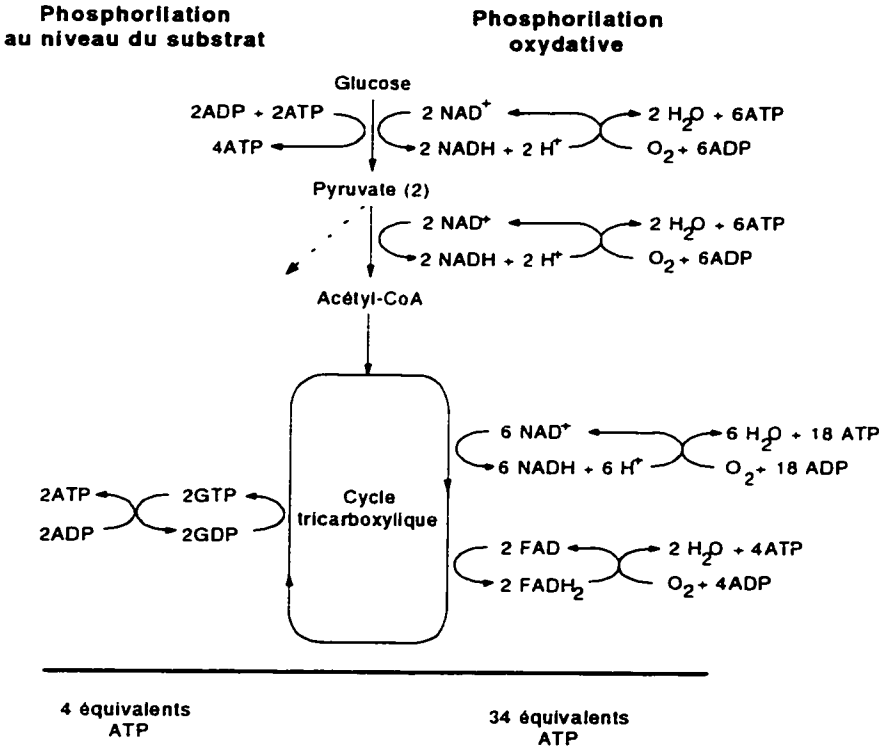
Finalement, la voie des penthoses phosphates dont les activités sont localisées dans le cytoplasme ne mène pas à la production d'ATP (Figure 1.8). Elle produit des nucléotides nécessaires à certaines réactions de biosynthèse ainsi que divers précurseurs phosphatés. Son importance relative est donc associée aux activités métaboliques de la cellule. Selon les travaux de De Gucht [35] effectuées avec *Catharanthus roseus* dans des conditions de limitation en hydrates de carbone ou en azote, la voie des penthoses phosphates contribue pour environ 20% de la consommation d'O_2.

Ces voies métaboliques participent au métabolisme primaire. Comme l'illustre la figure 1.10, elles produisent les molécules de bases conduisant à la formation de multiples molécules qui sont la base des activités de biosynthèse. Elles produisent entre autres les précurseurs requis pour la synthèse des molécules d'ATP essentielles à la chaîne respiratoire de transport d'électron dont les interactions avec les voies cataboliques étaient illustrées à la figure 1.9.



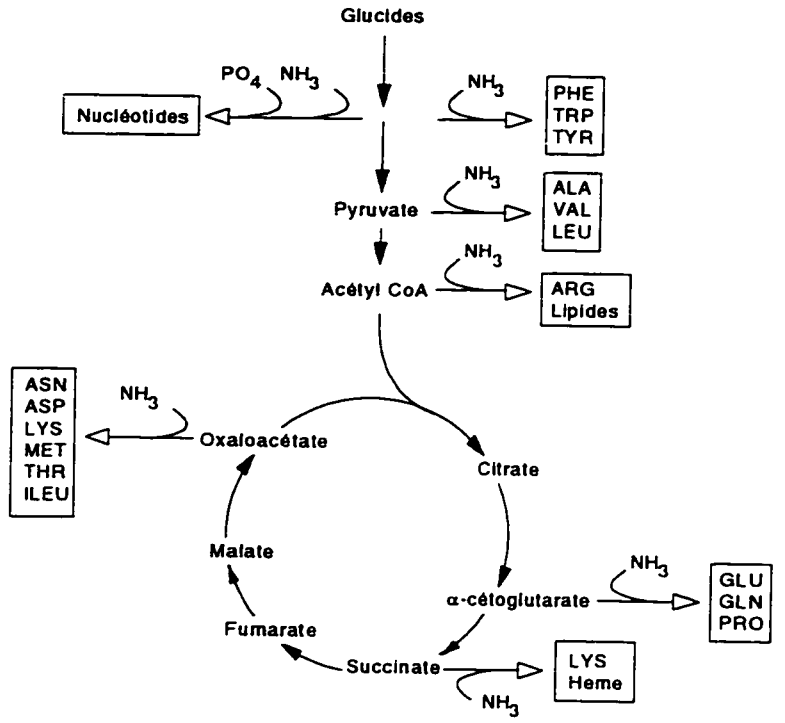
Adapté principalement de Lehninger [94] et de Payne et coll. [113]

Figure 1.8 **Principales voies de la catabolyse du glucose, incluant la glycolyse (— —) et la génération de l'acétyl CoA et de malate (·····), le cycle de l'acide citrique (——) et la voie des penthose phosphate (- - -).**



D'après Rawn [123]

Figure 1.9 **Réactions de phosphorylation oxydative couplées avec les principales voies cataboliques**
Adapté de Rawn [123]



Adapté de Krämer et Sprenger,[86] et de Payne et coll.[113]

Figure 1.10 Métabolites des voies de dégradation du glucose et leurs dérivés utilisés dans la biosynthèse

Les voies cataboliques de l'assimilation du glucose fournissent donc les précurseurs qui permettent aux cellules d'assimiler les éléments inorganiques, particulièrement les ions ammonium, phosphate et sulfate, pour produire les molécules organiques (acides aminés, nucléotides, vitamines et acides gras) nécessaires à la biosynthèse de macromolécules plus complexes. L'épuisement des ressources d'hydrates de carbone dans le milieu de culture ou des réserves constituées sous forme de grains d'amidon provoquera un arrêt de la croissance.

1.1.2.2.2.4 Oxygène et métabolites gazeux

On l'a vu plus haut, l'apport d'oxygène aux cultures est crucial pour soutenir le processus de respiration à travers lequel les molécules organiques sont oxydées et du dioxyde de carbone est produit. Comme l'illustre la figure 1.9, l'oxydation des substrats est couplée à la synthèse de molécules riche en énergie, tel l'adénosine-5'-triphosphate (ATP), qui permettront de supporter des réactions énergétiquement non favorables mais essentielles au métabolisme. Les réactions enzymatiques associées à la respiration sont localisées dans les mitochondries.

Une faible concentration d'oxygène dissous, OD, résulte en une disponibilité réduite d'ATP et conséquemment en une réduction de l'énergie disponible. En culture de cellules et de tissus végétaux, plusieurs changements métaboliques et morphologiques sont associés à cette diminution. Ainsi, Kessel et ses collaborateurs [79,80] dans des articles qui font encore école, ont rapporté qu'il existe une concentration critique d'OD, OD_{cr}, égale à 16 % d'OD (par rapport à la saturation de l'eau dans l'air) sous laquelle les taux spécifiques d'assimilation d'O_2 de leurs cultures de cellules de carotte sont constants à 0,29 μmole (mg h)$^{-1}$. L'embryogénèse somatique survient lorsque la concentration d'OD est plus faible que OD_{cr} alors que la différenciation apparaît à des concentrations d'OD plus grande que OD_{cr}. Selon l'hypothèse développée par ces deux chercheurs, l'apparition de ces changements morphologiques seraient reliés à l'augmentation de la disponibilité de l'ATP intracellulaire observée sous OD_{cr} qui induirait une suppression des enzymes permettant la régénération de l'ATP et stimulerait l'expression de gènes nécessitant une dépense d'ATP.

L'oxygène peut aussi être impliqué dans d'autres activités métaboliques puisque des oxygénases, qui utilisent l'oxygène moléculaire, sont impliquées dans plusieurs voies métaboliques secondaires. Ainsi, une concentration d'OD faible inhibe la formation de l'enzyme phénylalanine ammonia lyase (PAL). [113] Or, cet enzyme constitue le premier maillon de la voie métabolique menant à la formation des composés de la famille des flavanoïdes à laquelle appartiennent les anthocyanes, le produit visé par le présent projet de recherche. [119]

L'oxygène est capital dans les réactions métaboliques comme accepteur d'électron dans la phosphorylation oxydative, par contre sa faible solubilité rend critique son approvisionnement aux cultures. Il constitue donc un objet d'étude important. Même s'il est établi que les cultures de cellules de plantes requièrent des taux de transfert d'oxygène dans le milieu de culture plus faible que les microorganismes, il semble qu'il existe des conditions de culture optimales pour la croissance de la biomasse et la formation de produits.[119] Ces conditions sont généralement rapportées en terme de vitesse d'agitation, de coefficient de transfert d'OD (k_La), ou de débit gazeux; chacun affectant la concentration d'OD dans le milieu de culture. La concentration d'OD, les taux spécifiques d'assimilation d'O_2 et leur relation avec la croissance de la biomasse occupent donc une place importante dans la problématique reliée à notre projet.

Du CO_2 est produit et consommé par les cellules. Ceci peut compliquer l'analyse de l'effet de la concentration de CO_2 dissous sur divers paramètres de culture, notamment lorsque l'on peut soupçonner une limitation au transfert du gaz entre les agrégats et la masse du liquide. De plus, en phase aqueuse le CO_2 peut se trouver sous la forme d'ions bicarbonate et carbonate dans le milieu de culture selon les conditions de pH,[65] et il est difficile d'établir sous quelle forme le CO_2 participe aux réactions métaboliques.

Payne et ses collaborateurs[114,113] ont publié des revues brèves mais pertinentes des impacts potentiels du CO_2 sur la croissance des cellules végétales. Résumons en disant que chez les cellules hétérotrophes, la carboxylation du phosphoénol pyruvate déjà décrite plus haut (Figure 1.8) est la voie la plus importante de fixation du CO_2. Elle est particulièrement importante au début des cultures en cuvée au moment où des intermédiaires du cycle carboxylique sont soutirés du cycle pour permettre l'assimilation rapide du NH_4 sous forme de glutamate. Comme en début de culture la concentration cellulaire et, conséquemment, la concentration de CO_2 provenant des activités respiratoires sont faibles, il est possible qu'un apport de CO_2 soit important en début de culture. À ce chapitre, Haigh a pu montrer que l'ampleur de la production (extracellulaire) de CO_2 en début de culture est reliée à l'âge de l'inoculum, qu'on ne peut dissocier des réserves internes des intermédiaires du cycle carboxylique. Le CO_2 affecte aussi les

cultures par le biais de son implication dans la production d'éthylène et dans l'inhibition ou le retardement de l'action de celle-ci sur les cultures. [15,83,114]

Les cellules et tissus végétaux produisent un autre métabolite gazeux important : l'éthylène (C_2H_4). La production de C_2H_4 varie en intensité et dans le temps selon les espèces et affecte à des degrés divers la physiologie des cellules. Comme la présence du C_2H_4 et du CO_2 est intimement lié aux taux de production de ces deux métabolites gazeux et aux conditions de transfert de masse caractéristiques du système de culture, les rapports sur l'effet de l'éthylène sur les cultures de cellules végétales recèlent plusieurs contradictions apparentes. Souvent, l'éthylène inhibe la croissance de la biomasse bien que ce ne soit pas toujours le cas. [81] Elle stimule dans plusieurs cas la production de métabolites secondaires [81] alors qu'elle serait sans effet dans d'autres, [91,137,151] et est souvent associée au brunissement des cultures. [83] Les expériences de cultures en bioréacteurs avec recirculation des gaz d'aération montrent que certains composés gazeux produits par les cultures sont essentiels à la survie des cellules et à la production de métabolites secondaires en milieu à forte osmolarité. [138]

Comme l'oxygène, le CO_2 et le C_2H_4 produits peuvent être échangés entre les cellules, le milieu de culture et la phase gazeuse. À 25°C et à l'équilibre avec l'air (qui contient 0,039 % de CO_2), la concentration d'OD dans l'eau est de 0,25 mM alors que la concentration de CO_2 est de 0,01 mM. L'utilisation d'une configuration de bioréacteur possédant un k_La élevé pour combler les besoins en oxygène des culture aura pour effet de provoquer l'enlèvement du CO_2 et des autres métabolites gazeux produits, et ainsi priver les cellules de constituants potentiellement importants du milieu. Dans des cultures en flacons agités, les concentrations moyennes de CO_2 et de C_2H_4 dans la phase gazeuse de cultures de cellules de *Thalictrum rugosum* mesurées par Kim et ses collaborateurs [81] sont de 2 % (par rapport à la saturation complète en CO_2) et de 21 ppm, respectivement, ce qui donne un aperçu des différences de conditions de culture que les cellules peuvent subir entre les flacons agités et les bioréacteurs à haut coefficient de transfert de masse.

1.1.2.2.2.5 Régulateurs de croissance

Plusieurs classes de molécules sont utilisées par les plantes pour coordonner certaines activités cellulaires, orienter leur développement ou répondre à un stimuli environnemental. Ces régulateurs de croissance sont de petites molécules qui diffusent facilement à travers la membrane cellulaire et dans les tissus végétaux. La réponse induite peut donc être localisée loin du site de synthèse. C'est à cause de ce phénomène que la littérature fait l'analogie avec un processus régulateur de type hormonal et utilise souvent le vocable phytohormone. Trois principales classes de régulateurs de croissance qui sont globalement des promoteurs de croissance, [113] ont été identifiées chez les végétaux.

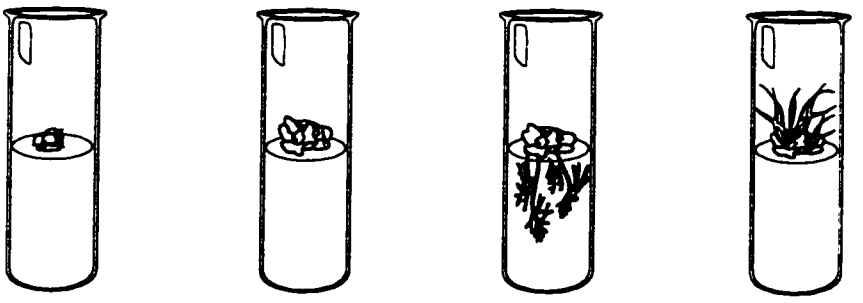
- Les auxines répriment la formation de tiges et d'embryons somatiques, mais favorisent le grossissement et l'élongation des cellules et l'initiation du système racinaire. Elles sont responsables de la dominance apicale et jouent un rôle dans l'abscission. Elles sont critiques pour l'étape d'initiation des cultures à partir du matériel végétal initial. La vigueur de leur action varie selon l'auxine produite ou utilisée. Les auxines utilisées ne sont pas toutes d'origine naturelle. C'est le cas d'une des auxines les plus utilisées, l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D).

- Les cytokinines favorisent la division cellulaire et la formation d'organe, retardent la sénescence et jouerait un rôle dans le transport des nutriments. Leur action s'oppose à celle des auxines en ce qui a trait à la dominance apicale. Elles sont souvent requises pour initier les cultures lorsqu'une auxine à action modérée est utilisée.

- Les gibberellines sont surtout impliquées dans le processus de germination des graines et dans la croissance rapide des tissus méristémiques. Les gibberellines n'ont pas d'effet important en culture de cellules et de tissus végétaux et ne sont pas ajoutées aux milieux de culture.

En plus de ces composés, l'acide abscissique (ABA), impliqué dans la dormance et la sénescence, et l'éthylène (C_2H_4),[15,178] qui inhibe la floraison et hâte le mûrissement de végétaux, sont aussi reconnus pour leur rôle régulateur,[169] ici en tant qu'inhibiteurs de croissance.[113] Comme nous l'avons vu plus haut, l'éthylène est un métabolite gazeux produit par les cellules et ne figure pas parmi les suppléments ajoutés aux milieux de culture. L'ABA est surtout utilisé dans les cultures d'embryons somatiques où l'on cherche à reproduire les conditions de dormance.

Dans les cultures de cellules et de tissus végétaux, les régulateurs de croissance utilisés sont surtout les auxines et les cytokinines. Celles-ci contrôlent la division et la croissance cellulaire, la morphologie des cellules et des agrégats, et orientent la production de métabolites secondaires. La propagation *in vitro* de plantules fournit des exemples marquants, illustrés à la figure 1.11, de l'effet de la présence de régulateurs de croissance et de leur importance relative. Même si les effets sont moins spectaculaires dans la cultures de cellules en suspension, la présence de régulateurs de croissance est aussi importante. Elle influence les taux d'assimilation des hydrates de carbone, les rendements en biomasse et le degré d'agrégation des cultures. Pour contrer la trop faible disponibilité interne de ces régulateurs, permettre d'initier les cultures ou supporter leur croissance à faible densité cellulaire, des régulateurs doivent être ajoutés au milieu de culture



D'après Atkinson et Mavituna[9]

Figure 1.11 Effets des régulateurs de croissance sur la morphogénèse des tissus végétaux.

dans des concentrations et des proportions variant selon les espèces et l'objectif de production de métabolites secondaires. Il n'y a pas de règle quand au choix des régulateurs de croissance et à leur concentration, ceux-ci sont établis expérimentalement.

Dans une brève revue sur le sujet, Warren [169] résume les implications du type de cinétique impliquée ainsi que des plages de concentration mises en cause. Il aborde les difficultés reliée à l'isolement et à l'identification du régulateur de croissance responsable d'un comportement observé. Il traite aussi de la disponibilité réelle de ces molécules suite à l'établissement d'un lien chimique avec des sucres ou des acides aminés.

Retenons que la division cellulaire requiert la présence d'auxine(s) et de cytokinine(s) et que le ratio auxine/cytokinine doit être optimisé pour supporter la croissance de la biomasse ou la production de métabolites. Ainsi, les premiers jalons de formulation de milieu incluent généralement une série d'expériences ciblant l'effet de diverses concentrations de ces deux catégories de régulateurs de croissance. Par contre, il n'y a pas de relation simple entre la concentration de régulateurs de croissance inclus dans le milieu de culture et les concentrations intracellulaires, ce qui pourrait expliquer en partie les contradictions apparentes dans la littérature traitant de la relation entre régulateurs de croissance, croissance de la biomasse et production de métabolites secondaires. [169]

Les cellules de plantes peuvent en effet modifier ces molécules avec des conséquences positives ou négatives, selon la modification. L'ajout de régulateurs de croissance dans le milieu de culture peut donner lieu à une inhibition, par rétroaction négative, de la production de ces molécules par les cellules, et diminuer dans les faits leur disponibilité sous une forme active. De plus, malgré toutes les précautions expérimentales, il n'est pas assuré qu'une procédure extensive de lavage des cellules élimine l'entraînement des facteurs de croissance présents dans l'inoculum si les molécules ont une mobilité restreinte suite à leur conjugaison avec des acides aminés, par exemple, biaisant possiblement les résultats des expériences. Finalement, des micro-environnements peuvent exister dans les agrégats cellulaires donnant lieu à des différences

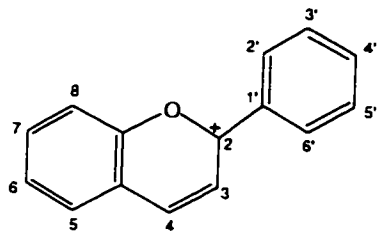
notables entre les concentrations en hormones du milieu et celles dans lesquelles baignent les cellules.

Il est noté dans la littérature que la capacité des cultures à synthétiser leurs régulateurs de croissance augmente avec le temps. Malheureusement, une baisse de la productivité des métabolites secondaires est souvent associée à ce phénomène. On serait ici en présence d'un processus de sélection des cellules à croissance rapide au détriment des cellules productrices.

Les régulateurs de croissance représentent un élément important dans la formulation des milieux de culture. Comme nous l'avons dit plus haut, les concentrations de ces composés sont établies expérimentalement, généralement au début du processus de mise au point du bioprocédé. À l'échelle laboratoire, le développement de bioprocédé basé sur la culture de cellules végétales laisse actuellement peu de place à la manipulation de ces composants du milieu de culture ; les concentrations initiales d'hydrates de carbone et de macro-nutriments, les incidences des concentrations d'O_2 et de CO_2 dissous sur les cultures ou les possibilités encore peu exploitées de l'utilisation d'une alimentation programmée de nutriments représentent toujours un vaste domaine de recherche pour la culture en suspension des cellules végétales. Il ne faudrait cependant pas oublier que les régulateurs de croissance peuvent être la clé d'une augmentation supplémentaire de productivité.

1.1.3 La production d'anthocyanes et la culture de cellules

Les anthocyanes sont des molécules chromogènes faisant partie de la famille des flavanoïdes, qui regroupe des molécules aromatiques constituées d'anneaux benzéniques hydroxylés lié à un hétérocycle contenant de l'oxygène. Les flavanoïdes différent entre eux par le niveau d'oxydation ou les substitutions présentes sur l'hétérocycle. Les anthocyanidines constituent un sous-groupe important des flavanoïdes dont la forme la plus commune et la plus simple, le cyanidine, est la suivante :



Les formes glycosilées de cette molécule, les anthocyanes, sont largement répandues chez les végétaux.

Les anthocyanes diffèrent entre eux par le nombre de groupes hydroxyles ou le degré de méthylation, et par la nature des sucres et des acides aromatiques qui sont substitués (généralement aux sites hydroxyles 3, ou 3 et 5 ou 7). La localisation et l'identité des groupes glycosilés intégrés aux molécules d'anthocyanes déterminent leur solubilité et leur stabilité.

Les voies de synthèse des anthocyanes sont bien établies.[66] Les anthocyanes sont accumulés dans la vacuole mais sont synthétisés dans le cytoplasme, par contre certains complexes enzymatiques responsables des dernières étapes de la synthèse seraient intégrées au tonoplaste ou à la membrane d'anthocyanoplastes. À terme, ces anthocyanoplastes sont intégrés à la vacuole. La coloration dépend de la nature du (des) groupe(s) glycosylé(s), de la concentration d'anthocyanes et du pH de la vacuole.

Il existe une littérature abondante sur la chimie des anthocyanes, y compris sur différentes facettes de leur utilisation comme colorant alimentaire. On pourra entre autres consulter les revues de Francis[50] et de Jackman et Yada,[71] ainsi que la monographie de Markakis.[99]

Dans les cultures de cellules de raisins, les anthocyanes s'accumulent surtout à la fin de la culture[63] alors que la croissance de la biomasse fléchit. En présence de lumière ou non, de nombreuses études ont montré que les conditions nutritionnelles propices à la croissance des cellules et à la production d'anthocyanes diffèrent, notamment en ce qui a trait aux concentrations d'ions phosphates, nitrates,[39,62] ammonium,[38] aux concentrations relatives de ces ions,[177]

aux concentrations d'agent osmotiquement actifs[31,62] et au type d'hydrates de carbone fourni.[24,107] De plus, les structures chimiques prédominantes des anthocyanes produits varient avec les conditions de culture,[36] ce qui aura un impact sur la qualité (coloration et stabilité chimique) du produit.[50,71]

L'équipe du Dr. François Cormier du Centre de recherche et de développement sur les aliments (CRDA) est impliquée dans un programme de recherche visant la production d'anthocyanes par la culture de cellules de raisins depuis 1987. Au début du projet de recherche, l'équipe du Dr. Cormier avait déjà:

- sélectionné et stabilisé des cellules de raisins productrices d'anthocyanes;
- cerné les conditions nutritionnelles et environnementales qui permettent d'améliorer l'accumulation d'anthocyanes;
- mis au point des méthodes d'analyses spectroscopiques (FAB-MS et NMR) et chromatographique (HPLC) qui permettent d'identifier et de quantifier les anthocyanes produits;
- déterminé l'effet marqué de la pression osmotique exercée par les sources d'hydrate de carbone, des ions nitrate et ammonium sur la composition des anthocyanes.

Les résultats de ces travaux qui ont pour la plupart fait l'objet de communications scientifiques, permettent d'envisager pouvoir favoriser la production des formes les plus stables d'anthocyanes.[109,30,31,36,37,38,39]

La production des anthocyanes est habituellement stimulée par la lumière. Afin de s'affranchir du besoin d'un apport de lumière et de permettre l'utilisation éventuelle de bioréacteurs conventionnels de grand volume, une partie des travaux de l'équipe du Dr. Cormier (CRDA) a été axée sur la sélection et l'établissement de lignées cellulaires hautement productives dans l'obscurité. Au début du projet les lignées disponibles produisaient 390 mg Acy L^{-1} avec un apport lumineux. Le taux de production correspondant était de 27 mg Acy L^{-1} d^{-1}. À la fin du projet les lignées produisaient la même quantité dans l'obscurité, une dizaine de repiquages après

leur sélection au stade de microcals.[12] Les lignées cellulaires disponibles ont donc évolué en cours de route, ce qui a eu des incidences sur le plan expérimental.

Les cellules de *Vitis vinifera* sélectionnées par le CRDA sont cultivées dans un milieu standard, le milieu B5 de Gamborg.[55] Les concentrations de régulateurs de croissance ont été établies à 0,1 mg L^{-1} d'acide α-naphthaleneacétiqueet à 0,2 mg L^{-1} de kinétine. Des études préliminaires effectuées par le CRDA avaient permis de confirmer que chez *V. vinifera* la prolifération cellulaire et la production d'anthocyanes sont antagonistes.[36,39,117] Ainsi une diminution du ratio ion nitrate/ion ammonium permet de limiter la prolifération cellulaire et d'augmenter la productivité des cellules en anthocyanes.[38,39] Une augmentation de l'osmolarité du milieu de culture a des effets similaires.[31,36] Le bioprocédé envisagé comporte donc deux étapes distinctes : une étape de prolifération ou de mise à l'échelle, et une étape de production d'anthocyanes. Comme l'illustre schématiquement la figure 1.12, il s'agit, dans un premier temps, de produire une grande quantité de biomasse avec un bon taux de croissance et, dans un

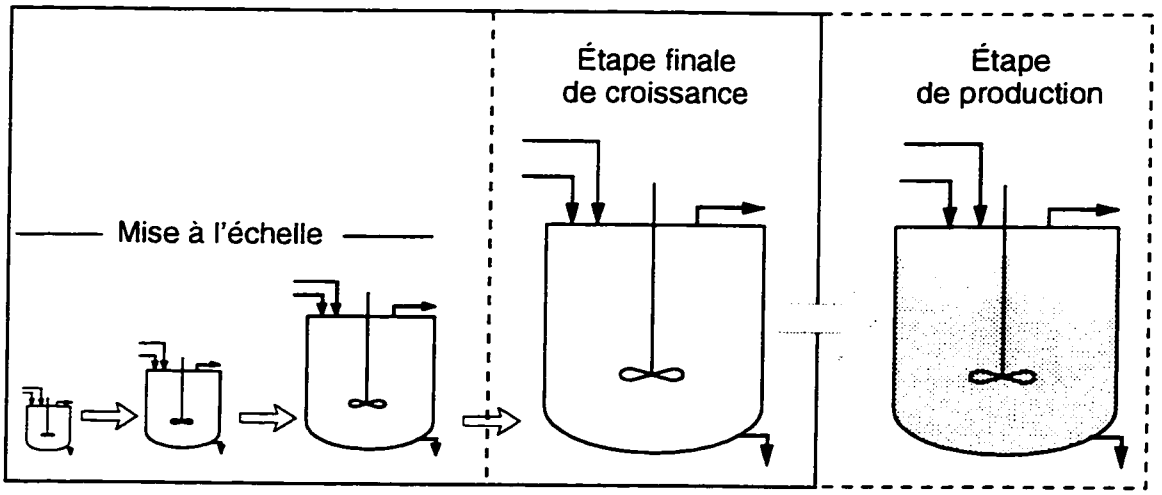


Figure 1.12 **Schéma du procédé envisagé de production d'anthocyanes.**
A: Mise à l'échelle dans un milieu de prolifération;
B: Induction de l'accumulation d'anthocyanes dans un milieu de production.

deuxième temps, d'enrichir cette biomasse en anthocyanes en favorisant leur production. La détermination des conditions favorisant la meilleure croissance de la biomasse était l'un des aspects du mandat de l'École Polytechnique dans ce projet.

Dans une étude préliminaire, il a d'abord été vérifié dans une culture séquentielle prolifération-production effectuée dans des flacons agités que l'induction de la production sur une biomasse importante permet d'augmenter la productivité du procédé comparativement aux cultures inoculées à faible concentration dans les milieux de prolifération ou de production (Figure 1.13).[117] La substitution, effectuée au huitième jour de culture, du milieu production au milieu de prolifération après décantation des cellules a résulté en une augmentation de l'osmolarité et un apport d'ions NH_4 et PO_4 dans le milieu. Ces additions de nutriments ont permis d'induire une accumulation d'anthocyanes dans une biomasse six fois plus importante, en termes de biomasse sèche, que celle de la série de cultures en flacons effectuée dans le milieu de production seulement. Au moment correspondant à la concentration maximale d'anthocyanes accumulés, les productivités volumiques de cette lignée étaient de 9,3 mg Acy L^{-1} d^{-1} pour la culture inoculée dans le milieu de production et de 15 mg Acy L^{-1} d^{-1} pour celle effectuée en deux étapes successives de prolifération et de production sans dilution. Cette culture séquentielle a donc donné lieu à une augmentation de 60% de la productivité spécifique, supportant bien l'hypothèse qu'une croissance rapide permet d'induire la production d'anthocyanes sur une biomasse plus importante et de profiter ainsi d'une production accrue sur une période de temps plus restreinte.

Ce résultat renforce notre dessein de concentrer d'abord nos efforts sur la période de croissance afin d'obtenir une augmentation rapide de la quantité de biomasse.

La culture immobilisée des cellules de *V. vinifera* avait été envisagée comme système de culture. Dans ce contexte, une étude préliminaire, effectuée dans des bioréacteurs à cellules immobilisées,[8] a montré que les concentrations d'oxygène dissous (OD) de 30, 60 et 90% ont un effet marqué sur la production de biomasse après 14 jours comparativement à une expérience

similaire menée sans contrôle ni suivi de la concentration d'OD (Tableau 1.5).[121] Dans la dernière culture, une limitation en oxygène est probablement survenue dans la culture sans contrôle d'OD empêchant la croissance de la biomasse. Les résultats obtenus montrent aussi que la concentration d'OD maintenue dans le milieu de culture a affecté la production et la productivité en anthocyanes.

La quantité d'oxygène disponible pour les cellules semble donc avoir un impact sur la croissance de la biomasse et la production d'anthocyanes et constitue l'une des facettes de la problématique à résoudre pour comprendre et éventuellement influencer le comportement des cultures de cellules de V. vinifera.

Tableau 1.5 Croissance de *V. vinifera* et production d'anthocyanes dans des bioréacteurs à cellules immobilisées

	Point de consigne OD [% de saturation]			
	30	60	90	sans contrôle
x_0 [g MS L^{-1}]	1,8	2,1	1,4	1,2
x_f [g MS L^{-1}]	25,8	18,9	23,1	8,3
Acy [mg L^{-1}]	117	236	114	88
r_{ACY} [mg L^{-1} h^{-1}]	8,5	17,1	8,2	7,1

Milieu de Production: $K_{0,1}$ B5QN $NA_{0,2}CA_{250}$ (4,5% S)

Lignée cellulaire VVG5.4

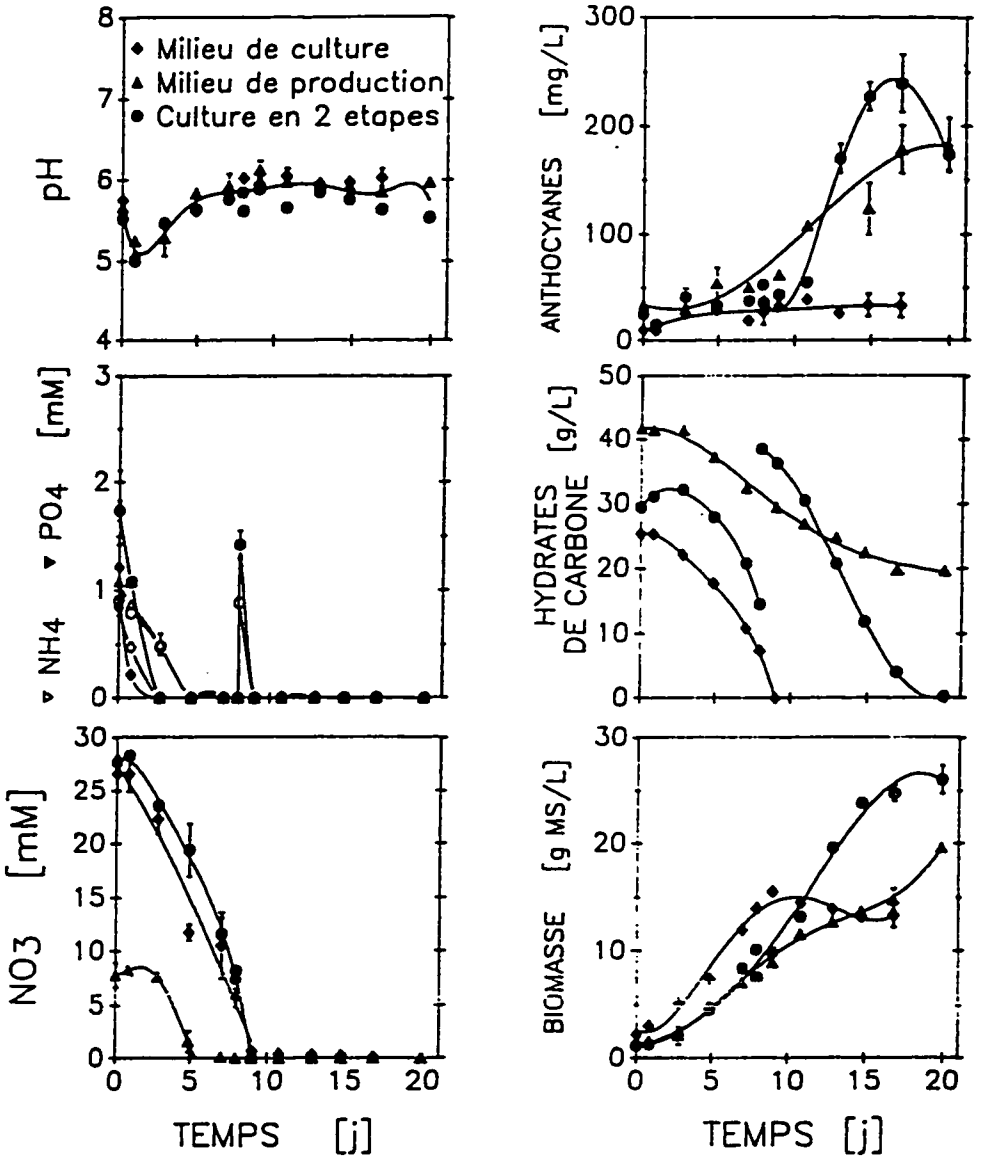


Figure 1.13. **Progression des concentrations de nutriments dans le milieu de culture, de la croissance de la biomasse et de la production d'anthocyanes de cultures en flacons agités effectuées en deux étapes. Changement du milieu de croissance au milieu de production au jour 7 après décantation des cellules et drainage du surplus de milieu de croissance.**

Les anthocyanes sont des métabolites secondaires accumulés par les cellules dans les vacuoles. Le relargage des anthocyanes dans le milieu de culture est essentiel à l'utilisation de la culture de cellules immobilisée et, de ce fait, déterminant pour le choix du bioprocédé. En dehors des manipulations génétiques qui pourraient à moyen terme offrir des solutions avantageuses, les techniques envisageables pour provoquer le relargage font appel à la perméabilisation des membranes cytoplasmiques et tonoplamiques et à l'application d'un gradient de concentration entre le milieu extracellulaire et le cytoplasme où semblent être produits les anthocyanes. Les résultats des travaux effectués par l'équipe du CRDA et par Fatima Chaouki dans le cadre d'un M.Sc.A. dans le but de récupérer le produit sans détruire la biomasse n'ont pas donné de résultats positifs. [27,116]

> ***Le bioprocédé à mettre au point devait donc être entièrement basé sur une culture en suspension.***

D'ailleurs, nonobstant ces résultats, quel que soit le type de bioréacteur utilisé pour la phase finale du bioprocédé (en suspension ou à cellules immobilisées), la mise à l'échelle doit être effectuée en bioréacteur à cellules en suspension. Ainsi la mise au point du bioprocédé à l'échelle laboratoire doit reposer sur une bonne connaissance de l'étape de croissance en suspension.

1.2 PROBLÉMATIQUE ET ÉTAT DES CONNAISSANCES

Les implications sur le développement du bioprocédé des caractéristiques des cellules végétales ont déjà été dépeintes au tableau 1.3, page 19. Les principaux éléments directement reliés à la problématique entourant le développement d'un bioprocédé sont les suivants :

- mélange et transfert de masse;
- interactions fortes entre le métabolisme et la morphologie cellulaire et les conditions physico-chimiques des cultures, et

- mode et séquences d'opération du bioprocédé suivant les besoins nutritionnels et les contraintes reliées à la localisation du produit d'intérêt.

De plus, on a pu entrevoir à la section 'Aspects nutritionnels' à quel point l'amélioration du procédé pour l'étape de croissance comme pour l'étape de production est intimement lié à la disponibilité des nutriments, y compris les gaz dissous dans le milieu de culture. La consommation et l'assimilation des nutriments se répercutera sur la croissance de la biomasse, sur sa qualité et sur sa capacité de production. L'environnement changeant des cultures en cuvée accentue l'impact des interactions entre la croissance des cellules et les différentes composantes de leur environnement chimique : la disparition du milieu des hydrates de carbone a un impact direct sur l'osmolarité des cultures; le mécanisme de transport des ions ammonium aura pour effet de provoquer une baisse de pH; la disparition des ions ammonium du milieu impose un changement dans la dynamique d'assimilation de l'azote par les cellules; la consommation des ions NO_3 et PO_4 n'est pas nécessairement reliée à leur assimilation; la pression partielle d'oxygène peut influencer les cinétiques d'assimilation et de croissance; la pression partielle de CO_2 peut influencer le temps de latence, la qualité de la biomasse ou la capacité de production de métabolites secondaires. Le paramètre à maximiser, le taux spécifique de croissance, μ, peut être influencé par chacune des variables influençant le milieu de culture.

Finalement, nos travaux préliminaires ont montré :

- la nécessité d'utiliser une culture en suspension;
- l'intérêt d'une séquence d'opération en deux étapes, une étape de croissance de la biomasse et de mise à l'échelle, suivie d'une étape d'induction de la production d'anthocyanes, et
- l'impact de la disponibilité de l'oxygène sur la croissance de la biomasse et la production d'anthocyanes.

Les éléments reliés aux caractéristiques des cellules végétales, à leurs besoins nutritionnels et aux cinétiques impliquées ainsi que les particularités des cellules de *V. vinifera* définissent la problématique de base dans laquelle s'inscrivent les travaux présentés ici. Les prochaines

sections détailleront les aspects du mélange et du transfert de masse dans les bioréacteurs, des conditions d'aération et de la mise au point de bioprocédés basé sur les cellules végétales dans une brève revue de l'état des connaissances complétant le contexte général déjà décrit et appelée à supporter et à situer les objectifs que nous poursuivons et à orienter le développement d'une démarche expérimentale.

1.2.1 Mélange et transfert de masse

Le type de bioréacteur utilisé et l'environnement physique qu'il fournit influencent grandement le comportement des cultures de cellules. Ces facteurs sont déterminants dans le développement des lignées cellulaires et des bioprocédés, et sont grandement mésestimés dans la plupart des études publiées. [114,143]

1.2.1.1 Agitation et résistance au cisaillement

Dans les bioréacteurs, l'agitation assure la double fonction de briser les bulles d'oxygène pour contribuer à augmenter le transfert de masse, et de mélanger pour assurer l'homogénéité de la culture. La faiblesse relative des taux de transfert d'oxygène requis par les cellules végétales par rapport à ceux des microorganismes pour lesquels les bioréacteurs conventionnels ont été conçus, augmente l'importance relative de la fonction de mélange. D'ailleurs la viscosité élevée des cultures à haute concentration de biomasse [74] et la possibilité d'un comportement non-newtonien affectent la qualité du mélange.

La problématique reliée au mélange dans les bioréacteurs utilisés pour la culture de cellules végétales origine de trois caractéristiques de ces cultures.

- La taille des cellules et des agrégats implique des vitesses de sédimentation élevées qui peuvent résulter en des zones mortes dans lesquelles des limitations de nutriments essentiels, notamment d'oxygène dissous peuvent apparaître;

- Les faibles taux de croissance poussent à opérer les bioréacteurs à haute concentration de biomasse afin d'augmenter la productivité. Bien qu'à des concentrations de biomasse de 50 % PCV (Volume de cellules centrifugées, Packed Cell Volume), correspondant à environ 12 g MS L^{-1}, le mélange ne pose généralement pas de problèmes, [113] un mélange imparfait peut apparaître à des concentrations plus élevées; [42]
- L'adhésion des cellules aux surfaces des bioréacteurs et la tendance à former une mousse cohérente dans les réacteurs gazo-siphons et dans les réacteurs munis d'agitateurs conventionnels opérés à grande vitesse fait aussi partie des préoccupations reliées au mélange.

Par ailleurs, le volume des cellules végétales, leur tendance à croître en amas et la rigidité de leur paroi porte à croire qu'elles devraient être sensibles au stress mécanique. Longtemps les forces de cisaillement induites par les agitateurs mécaniques ont été identifiées comme étant la cause des difficultés rencontrées dans les cultures en suspension. Pourtant les cultures à grande échelle d'un volume supérieur à 1000 L décrites dans la littérature sont effectuées dans des bioréacteurs agités mécaniquement. [142]

En fait jusqu'à récemment, peu de données expérimentales sur la nature et le degré de sensibilité des cultures au cisaillement étaient disponibles. Parmi celles-ci, l'étude de Hooker et ses collaborateurs [67] montre à partir d'expériences de résistance au cisaillement effectuées dans un appareil similaire dans son principe à un viscosimètre à écoulement Couette, qu'une augmentation du cisaillement appliqué sur une période de 12 heures provoque une baisse de la viabilité, pouvant aller jusqu'à une perte totale de viabilité, ainsi qu'une lyse cellulaire. Récemment, l'étude complémentaire menée par Zhong et ses collaborateurs dans un dispositif similaire complète ces résultats en montrant que lorsque les dommages décrits sont observés, ils apparaissent dès les vingt premières minutes de l'expérience. [181]

Scragg et ses collaborateurs [141] ont cependant démontré que le niveau de sensibilité au cisaillement des cellules varie selon l'espèce. [143] Il arrive aussi que les cultures développent une tolérance au cisaillement suite à l'amélioration de la croissance. [142] Dans une revue de littérature

sur le sujet, Meijer et coll. [102] suggèrent que l'habilité des cellules à réparer les petites lésions de la paroi cellulaire occasionnées lors de la déformation des cellules par la production et l'incorporation ou la déposition de polysaccharides puisse être à l'origine de ces différences de comportement. De plus, les cellules cultivées à faible concentration cellulaire devraient être plus susceptibles aux dommages causés par des phénomènes hydrodynamiques qu'à haute concentration où les effets de turbulence sont modifiés par la plus faible proportion de liquide et les interactions plus nombreuses entre les cellules ou les amas.

L'équipe de Zhong [181] a complété son étude de l'effet du cisaillement sur les cellules végétales en soumettant des cultures en bioréacteur agité au moyen d'une hélice marine à divers taux moyens de cisaillement. Contrairement à d'autres études similaires qui ne prêtent pas attention à la concentration d'oxygène dissous, [64,68] la concentration d'oxygène dissous était maintenue à 80% en ajustant la composition du gaz alimenté. Ainsi, les différences de comportement observées ne peuvent être causées par une variation de la disponibilité d'oxygène dans le milieu de culture. Il appert que dans ces conditions de culture, l'augmentation du taux moyen de cisaillement avec la vitesse d'agitation a un effet négatif sur le taux spécifique moyen d'augmentation de la biomasse sèche mais que la quantité de biomasse sèche finale produite augmente sur une portion de la plage de vitesse d'agitation. Comme l'un des effets de l'augmentation des vitesses d'agitation ou d'aération est de réduire la taille des amas cellulaires, [12,145] cette prolongation de la durée de la phase de croissance de la biomasse pourrait être une conséquence de la prédominance d'une disponibilité accrue de nutriments à l'intérieur des amas cellulaires sur l'effet négatif du cisaillement sur la viabilité ou l'intégrité des cellules elles-mêmes.

Les effets du cisaillement sur les paramètres représentant la croissance de la biomasse ne sont donc pas facile à intégrer à l'analyse des résultats de croissance obtenus. Inversement, les modifications des conditions d'opération du bioréacteur peuvent influencer la croissance de la biomasse.

1.2.1.2 Transfert d'oxygène

Les taux spécifiques d'assimilation d'oxygène des cellules végétales varient typiquement de 0,1 à 0,45 mmol O_2 g^{-1} masse sèche h^{-1}. Ces taux correspondent à un taux d'assimilation (OUR) maximal de l'ordre de 2,5 mmol O_2 L^{-1} h^{-1}.[127,150] La concentration à l'équilibre d'oxygène dans l'eau à 27°C est de 8,07 mg O_2 L^{-1} (0,25 mmol L^{-1}). Or la variation de la concentration d'oxygène dissous (OD) dans le milieu varie avec le taux de transfert d'oxygène (OTR, oxygen transfer rate) et le taux d'assimilation d'oxygène par la relation :

$$\frac{dOD}{dt} = OTR - OUR, \qquad (1)$$

dans laquelle l'OTR relie la concentration d'OD dans le milieu à la concentration d'OD à l'équilibre avec la phase gazeuse (OD^*) par le coefficient de transfert d'oxygène, k_La, selon la relation

$$OTR = k_La\left(OD^* - OD\right). \qquad (2)$$

Si les cultures de cellules végétales ne sont pas soumises à un stress, la dynamique est suffisamment lente pour considérer un régime pseudo-permanent et pouvoir réécrire l'équation 1 comme suit :

$$\frac{dOD}{dt} = OTR - OUR \approx 0, \qquad (3)$$

Faisant l'hypothèse optimiste selon laquelle la concentration minimale d'OD avoisine 0 %, les équations 2 et 3 deviennent

$$OUR \approx k_La \cdot OD^* \text{ lorsque } OD \rightarrow 0. \qquad (4)$$

Dans ces conditions et pour les OUR généralement observés, le coefficient de transfert d'oxygène, k_La, doit être au minimum de 10 h^{-1} pour éviter une limitation en oxygène en fin de culture. L'augmentation du transfert d'oxygène (OTR) peut être obtenue en augmentant le coefficient de transfert de masse du système, k_La, ou en modifiant la concentration d'oxygène alimenté de façon à améliorer la capacité de transfert.

L'augmentation de la vitesse d'agitation ou du débit de gaz augmentera le k_La. Ce sera généralement au prix d'une augmentation notable du cisaillement imposé aux cultures et, dans certains cas, d'un problème de production de mousse. De plus, l'effet positif de taux d'aération élevés est contrecarré par la désorption du CO_2 du milieu de culture qui peut avoir un effet négatif sur le taux de croissance, notamment en début de culture.[45,114] Les bioréacteurs gazo-siphons, certains bioréacteurs agités mécaniquement et les bioréacteurs à cellules immobilisées sont des technologies qui offrent des réponses à ces problèmes.

L'opération des réacteurs gazo-siphons à haute densité cellulaire nécessite des débits gazeux élevés pour assurer un mélange adéquat, provoquant la formation de mousse et d'écume qui résulte finalement en la flottation de la biomasse au-dessus de la masse du liquide.[142] L'utilisation de l'immobilisation permet de contourner le problème du transfert de masse dans le liquide, mais engendre un problème important de transfert de masse dans la biomasse elle-même.[113] Les réacteurs agités mécaniquement requièrent un agitateur dont la conception permette un bon mélange tout en minimisant le cisaillement appliqué aux cellules. Parmi ceux-ci, le bioréacteur à ruban hélicoïdal (HRI), développé à l'École Polytechnique,[74] permet d'obtenir un mélange uniforme et un cisaillement faible et d'éviter les problèmes de production de mousse.

La composition du gaz alimenté peut être modulée et contrôlée de façon à maintenir des conditions d'oxygénation favorables, à utiliser un bioréacteur de faible k_La et à minimiser les effets négatifs potentiels du cisaillement.

On réalise ici que l'étude de l'effet du cisaillement ou de l'oxygène dissous tout comme le choix d'une configuration de bioréacteur et de conditions d'agitation adéquate recèlent quelques paradoxes. Dans tous les cas les choix technologiques effectués sont accompagnées d'effets potentiellement négatifs sur les cultures. Ainsi, la sélection d'une configuration de bioréacteur pour la culture doit tendre à minimiser le cisaillement, permettre le contrôle de l'OD et minimiser l'enlèvement du CO_2.

1.2.2 Conditions d'oxygénation

L'oxygène est un élément crucial des cultures de cellules végétales. Nous avons jusqu'à présent traité de la problématique entourant la disponibilité de l'oxygène dissous en termes de transfert de masse : la perspective adoptée visait à minimiser les répercussions sur les cultures des moyens employés pour fournir l'oxygène dissous. Or, la concentration d'OD peut être importante en soi et le seuil de limitation de la croissance par l'oxygène doit être déterminé. De plus, la concentration d'OD dans le milieu de culture est une variable mesurable en ligne et un des paramètres contrôlables du bioprocédé qu'il faut investiguer et exploiter. De plus, les taux d'assimilation d'O_2 qui sont reliés à la dynamique de la culture peuvent aussi être accessibles.

La revue du sujet la plus pertinente est de loin celle effectuée par Payne et ses collaborateurs.[114,113] La consommation d'oxygène est traditionnellement décrite par une équation décrivant une cinétique de saturation :

$$q_{O_2} = q_{O_2 max} \frac{OD}{K_{O_2 app} + OD} + m_{O_2}, \qquad (5)$$

quelquefois extrapolée à

$$q_{O_2} = \frac{\mu}{Y_{X/O_2}} + m_{O_2} = \frac{\mu_{max}}{Y_{X/O_2}} \frac{OD}{K_{O_2 app} + OD} + m_{O_2} \qquad (6)$$

où $q_{O_2 max}$ représente le taux spécifique d'assimilation d'O_2 maximum; $K_{O_2 app}$, l'affinité intrinsèque des cellules pour l'oxygène incluant les manifestations diverses reliées au transfert de l'oxygène de la masse du liquide vers les cellules à travers les agrégats, m_{O_2}, le coefficient de maintenance et Y_{X/O_2}, le rendement en biomasse sur l'oxygène. Les caractéristiques des systèmes de culture en termes de transfert de masse (incluant le degré d'agrégation des cellules) et les différences entre la réponse en croissance et en assimilation d'O_2 selon la concentration d'OD se reflètent dans les variations observées des quelques valeurs de $K_{O_2 app}$ disponibles.[113]

Chez les plantes, les coefficients de maintenance sont beaucoup plus faibles que ceux observés chez les micro-organismes; par contre, relativement aux taux spécifiques d'assimilation d'O_2 observés la proportion d'énergie dévolue aux activités de maintenance est importante. Conséquemment, les taux de transfert d'O_2 (OTR) doivent en tout temps compenser des taux volumiques d'assimilation d'O_2 qui demeureront relativement élevés même durant les étapes de faible prolifération cellulaire ou de croissance réduite de la biomasse. [113]

Un consensus existe dans la littérature pour dire qu'il existe une concentration d'OD minimale sous laquelle l'activité métabolique est compromise. [174] Une concentration maximale, OD_{max}, est aussi utilisée pour caractériser le besoin en OD.[a] Cette concentration maximale correspond à la concentration d'OD au-dessus de laquelle aucun effet positif n'est observable sur la croissance ou les rendements en biomasse sur les hydrates de carbone suite à une augmentation de la concentration d'OD. Payne et ses collaborateurs [113] rapportent que cette concentration maximale devrait être de 2 à 4 fois plus élevée que la constante d'affinité de l'oxygène pour l'enzyme cytochrome oxydase généralement estimée être au voisinage de 15 % d'OD. Selon une étude menée en flacon agités avec *C. roseus*, la concentration maximale d'OD requise serait de 15 % d'O_2 dans le gaz d'aération, ce qui équivaudrait à 0,18 mmol O_2 L^{-1} ou 70 % d'OD (sur une base de saturation d'air dans l'eau) si l'on pose que le taux de transfert du système de culture utilisé est suffisamment élevé pour que la concentration d'OD soit en équilibre avec l'air.

Comme le font remarquer Payne et ses collaborateurs, [113] il est plausible que l'affinité de l'oxygène pour les oxydases varient, notamment par rapport aux enzymes impliqués dans la phosphorylation oxydative. Dans ce contexte, il ne serait pas étonnant que la concentration d'OD requise pour bien supporter la croissance et les activités de maintenance diffèrent considérablement de celle requise pour la production de métabolites secondaires puisque de façon générale

---

[a] En fait, Tate et ses collaborateurs [157] ainsi que Payne et ses collaborateurs [113] utilisent plutôt l'expression 'concentration critique d'oxygène dissous'. Celle-ci n'a pas été retenue ici pour ne pas confondre le concept qu'ils expriment avec celui présenté par Kessel et Carr [79] qui fait référence à une concentration d'OD critique autour de laquelle l'orientation du développement morphologique des cellules serait affecté et qui a été résumé à la page 33.

tout le processus de synthèse de nouvelles molécules représente pour la cellule des besoins énergétiques et biosynthétiques importants.

La littérature présente peu d'études portant spécifiquement sur l'effet de la concentration d'OD. Plusieurs chercheurs, conscients de l'influence de ce paramètre sur leurs résultats, ont mesuré le coefficient de transfert d'oxygène (k_La) de leur système pour diverses conditions opératoires. En absence de mesure d'OD en ligne, ils relient la croissance, la production de métabolites secondaires et les taux spécifiques d'assimilation d'oxygène avec le k_La initial.[90,150] Kobayashi et ses collaborateurs[82] ont montré la différence dans les taux spécifiques d'assimilation d'oxygène observés selon que la culture ait lieu dans un milieu conçu pour favoriser la croissance ou la production. Robins et coll.[130] ont observé une diminution du taux d'assimilation d'oxygène (OUR) avec une diminution de la concentration d'oxygène dans le milieu. Peu d'auteurs mettent en relation le taux spécifique d'assimilation d'oxygène ou le taux spécifique de croissance avec la concentration d'oxygène dissous. Parmi ceux-ci, Tate et ses collaborateurs[157] rapportent observer une cinétique de saturation entre le taux spécifique de croissance de la biomasse (*C. roseus*) et la pression partielle d'O_2 dans le gaz alimenté à des flacons agités avec *C. roseus* alors que Haigh[56] a plutôt observé une relation linéaire entre le taux spécifique initial d'assimilation d'O_2 (avec *Artemisia annua*) et la pression partielle d'O_2.

Le projet étant à l'origine orientée sur un bioprocédé utilisant la technologie des bioréacteurs à cellules immobilisées pour les étapes finales de croissance de la biomasse et de production d'anthocyanes, une meilleure connaissance des liens reliant les taux spécifiques d'assimilation d'O_2 et de croissance de la biomasse aux concentrations d'OD dans la masse du milieu de culture s'imposait afin de pouvoir intégrer une expression décrivant la cinétique d'assimilation de l'oxygène dans un modèle intégrant la dimension spaciale du développement du biofilm végétal.[6,116] Dans l'optique plus élémentaire de la mise à l'échelle du bioprocédé dans des cultures en suspension et d'un besoin d'une documentation du comportement en bioréacteur des lignées cellulaires de *V. vinifera* développées, l'étude de l'effet de la concentration d'OD conserve sa pertinence.

1.2.3 Mise au point de procédés

Du point de vue industriel, les diminutions progressives de productivité des lignées cellulaires, le risque élevé d'arrêt de la production suite à une contamination et les installations qui doivent de toute façon être disponibles pour bâtir les inocula font en sorte que le mode d'opération privilégié pour les bioprocédés impliquant des cellules végétales est, et demeurera, la cuvée ou la cuvée alimentée. Le projet visant globalement à déterminer pour le partenaire industriel les meilleures conditions de croissance et de production en termes de productivité (g d'anthocyanes par m^3 par jour) afin de lui permettre de documenter une étude de faisabilité économique, il nous apparaissait évident que le mode cuvée était le seul mode opératoire envisageable.

Déterminer les conditions d'opération les plus propices à la croissance en assurant un apport suffisant d'oxygène dissous aux cultures requiert l'utilisation de bioréacteurs adéquatement instrumentés. Par ailleurs, les changements multiples de l'environnement des cultures que sont susceptibles d'induire, par exemple, une augmentation du taux de croissance et des taux de consommation de nutriments inclinent à limiter les études en flacons agités, pas nécessairement directement transposables, et à passer rapidement au développement du procédé en bioréacteur.

La mise au point de bioprocédés requiert l'obtention d'information rapidement interprétables. Ce besoin ne découle pas uniquement du contexte contractuel du projet qui est le nôtre mais embrasse tout le développement de bioprocédé utilisant la culture de cellules végétales. En effet, la diversité génétique des végétaux se manifeste, par exemple, dans les résultats contradictoires obtenus sur la meilleure source d'azote, ou encore dans l'observation, ou non, d'une dépendance directe du rendement en biomasse sur la concentration initiale d'ions phosphate. Ce contexte nécessite une méthodologie efficace de formulation de milieu, entendue ici dans le sens le plus large et incluant éventuellement les stratégies d'alimentation, et de détermination des séquences opératoires. Il requiert aussi l'exploitation de données disponibles en ligne : pH, concentration d'OD, consommation d'O_2, transfert de CO_2 au gaz d'aération, conductivité, afin de documenter

le comportement du système biologique cultivé en bioréacteur et de relier les indicateurs de croissance et de production à des paramètres mesurables pour éventuellement faire du diagnostic et du suivi en ligne.

En culture de cellules végétales, le schéma méthodologique de développement de procédé, schématisés au tableau 1.6, est habituellement linéaire et compartimenté. Les approches de design de milieu sont le plus souvent systématiques et mettent en oeuvre des méthodes de design orthogonal d'expérience ou l'analyse de surface de réponse. Elles sont cependant toujours basées sur la culture en flacons agités en mode cuvée et sans contrôle de la concentration d'OD étant donné l'effort expérimental exhaustif découlant des besoins nutritionnels complexes des cultures. Les variables considérées sont les concentrations initiales de nutriments (s_0) et en biomasse (x_0), et les concentrations finales en produit et en biomasse (x_f), généralement évalués à intervalles fixes, après 7 ou 14 jours de culture. Bien que difficilement quantifiable, l'état physiologique des cellules utilisées à l'inoculation influe sur les résultats. Ceux-ci dépendent aussi de la procédure d'entretien des lignées cellulaires (i.e. de la fréquence des repiquages, de la formulation du milieu utilisé ainsi que de la capacité de transfert d'oxygène des flacons) qui détermine la qualité des inocula.

Toutefois, en bioréacteur, les possibilités de contrôle de la température, du pH et, surtout, de la concentration de l'OD comme éventuellement de celle du CO_2 font que pour une opération en cuvée la possibilité d'éviter une limitation en oxygène fait que le milieu de culture mis au point à l'étape précédente peut s'avérer inadéquat. La littérature regorge d'ailleurs d'exemples où les rendements observés en bioréacteurs sont moindres qu'en flacons agités. Il est indéniable que le stress mécanique imposé aux cellules peut provoquer ou accélérer la lyse cellulaire, retarder l'augmentation de la biomasse et diminuer la productivité du système. De plus, les changements de conditions d'oxygénation et l'enlèvement de métabolites gazeux peut avoir un impact important. Toutefois, l'accélération du métabolisme induisant une limitation en un ou plusieurs nutriments pourrait possiblement expliquer certains résultats négatifs. Le bioréacteur est donc un système de culture pour lequel les milieux devront possiblement être adaptés. L'effort et

l'investissement requis limitent le nombre de conditions pouvant être testées et imposent que l'on exploite au maximum les informations disponibles pour les cultures en bioréacteurs comme pour les cultures en flacons agités, qui demeurent le système de référence.

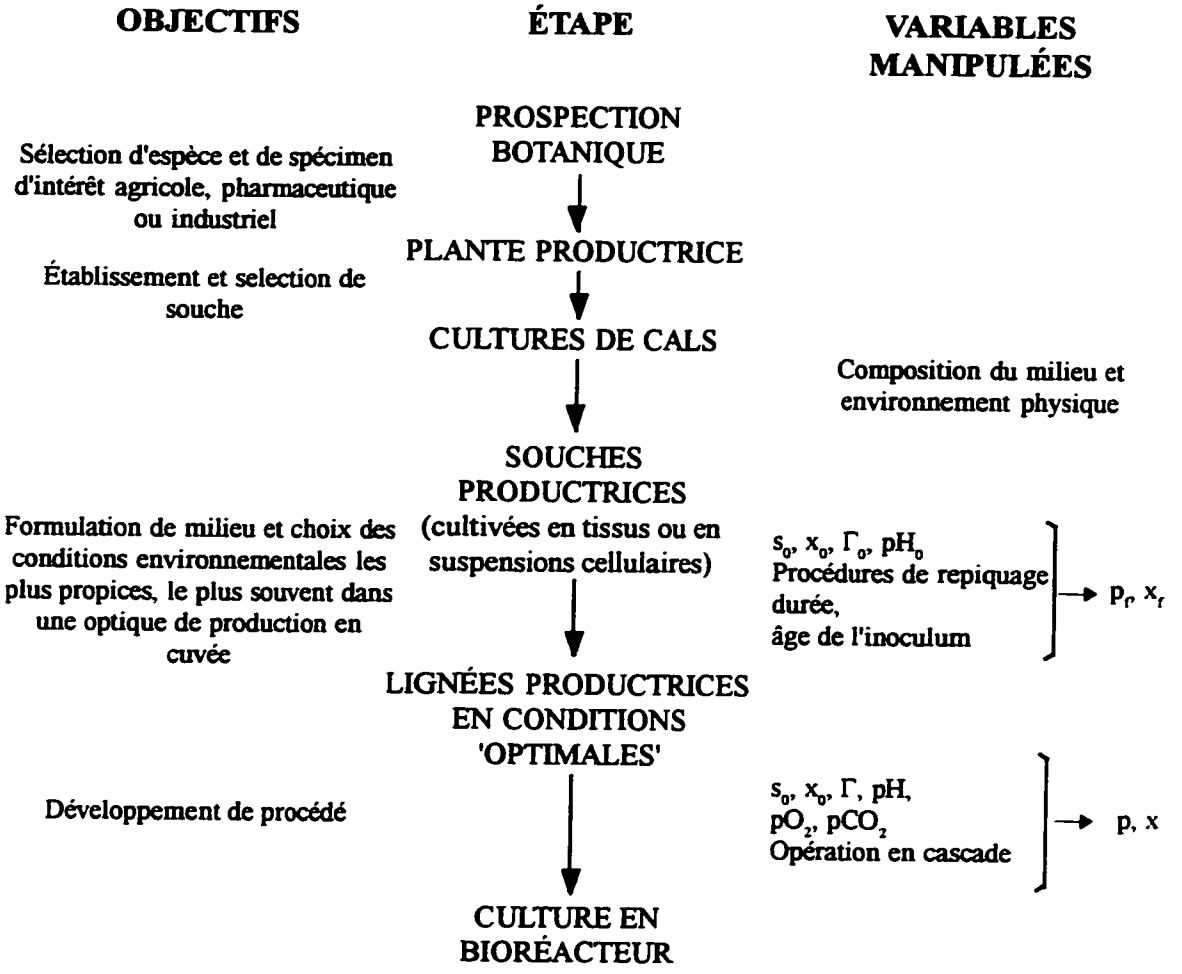


Tableau 1.6 Schéma classique de développement de procédé.

1.3 OBJECTIFS

La direction principale des travaux couverts par cette thèse s'est imposée à travers des préoccupations de développement de bioprocédé tout en incluant des questions de recherche pertinentes quant à la caractérisation des cultures en cuvée de cellules végétales et à la systématisation de la démarche de mise au point de procédés impliquant ces cellules comme système de production. Les travaux visaient globalement à augmenter la quantité de biomasse produite dans des cultures en suspension en bioréacteur, notamment en évaluant l'effet de la concentration d'oxygène dissous.

Cet énoncé recoupe plusieurs réalités plus ou moins bien maîtrisées en culture de cellules végétales. Ainsi, *augmenter la quantité de biomasse* implique tout autant augmenter le taux de croissance de la biomasse ou le rendement sur les nutriments qu'amener le bioprocédé de l'échelle du flacon agité à celle du bioréacteur de petit volume (1 à 10 L). Au *bioréacteur* choisi et aux *conditions d'opération* fixées correspondent des conditions de mélange et de transfert de gaz qui influencent les conditions physico-chimiques dans lesquelles baignent les cellules. Le choix du bioréacteur et des conditions d'opération est donc crucial. En ce qui concerne spécifiquement l'effet de la concentration d'OD sur la croissance, si celle-ci apparaît à plusieurs comme étant un paramètre important, nous verrons que dans les faits peu d'études l'explorent directement. Cela est en partie dû à la complexité des phénomènes mis en cause, à l'interaction entre transfert de masse, mélange et cisaillement par exemple, à la difficulté d'obtenir une réponse nette et répétée sur le taux de croissance spécifique observé, et aussi au nombre restreint d'équipes de recherche en culture de cellules végétales qui bénéficient à la fois des équipements de mesure et de contrôle nécessaire et de l'expertise du génie chimique. Par ailleurs, les différences importantes entre les conditions de culture fournies par les flacons agités et les bioréacteurs en termes de disponibilité d'oxygène par exemple, ou encore d'énergie dépensée pour contrer l'effet du cisaillement, se reflètent sur la progression des cultures et sur les cinétiques impliquées. Nous avions donc la conviction que les résultats des travaux effectués en flacons agités ne sont pas toujours directement transposables et que ce sont dans des conditions

de culture en bioréacteur que nous devons documenter la croissance des cellules de *Vitis vinifera* et tenter d'améliorer la production de biomasse. Notre démarche était aussi mue par le désir d'arriver à exploiter les données de croissance et de consommation de nutriments des cultures en cuvées pour établir les relations les plus importantes entre croissance et nutriments.

L'objectif global de ce travail est de déterminer les conditions de culture qui favorisent une croissance accrue des cultures de *V. vinifera* afin de contribuer à l'augmentation de la productivité de ce système biologique de production d'anthocyanes. Pour ce faire, nous avons élaboré un plan expérimental qui visait à répondre aux objectifs spécifiques suivants :

1. Cerner les conditions d'opération les plus propices à la croissance en bioréacteur.

2. Documenter le comportement des cultures en cuvée de *V. vinifera* en bioréacteur sous contrôle d'oxygène dissous pour
   - Obtenir des courbes de croissance, de consommation de nutriments et de production d'anthocyanes, et
   - Établir des liens entre les données disponibles en ligne, les données recueillies en différé et les divers indicateurs de croissance de la biomasse et de la qualité des cultures.

3. Évaluer la nature des limitations nutritionnelles de la croissance afin d'ajuster la composition du milieu en vue d'obtenir un nombre maximal de cellules viables au terme de l'étape de croissance du procédé.

> *Le défi de ce doctorat réside principalement dans le développement d'un outil d'interprétation pratique des cultures en cuvée de cellules végétales et par extension des cellules eucariotes en général. Son originalité tient de l'utilisation de la mesure en ligne du taux spécifique d'assimilation d'O_2 comme indice de la manifestation d'une limitation nutritionnelle.*

1.4 PRÉSENTATION DU TRAVAIL

Les trois chapitres qui constituent le corps de la thèse répondent globalement aux objectifs spécifiques énoncés plus haut. Leur présentation est calquée sur celle des articles scientifiques. Ces chapitres comprennent donc en plus de la section résultats et discussion, une revue de la littérature pertinente au traitement des résultats, une section complète mais condensée des matériel et méthodes ainsi qu'une conclusion partielle. Le fil conducteur de ces trois chapitres diffère de celui de la démarche suivie: il tente d'intégrer les objectifs dans une séquence qui passe de la compréhension de la culture de *V. vinifera* en flacon agité à la culture en bioréacteur pour aboutir à l'amélioration des conditions de culture, alors que le contexte de développement d'un bioprocédé imposait la culture en bioréacteur et que les études plus poussées en flacons agités se sont imposées en cours de route devant la nécessité d'améliorer notre compréhension du système.

Le chapitre 2 présente la démarche expérimentale. Il fait le lien entre la stratégie de recherche adoptée et les objectifs spécifiques poursuivis. Le détail des méthodes qui en découlent et un résumé des procédures analytiques standards utilisées sont décrits au chapitre 3. Les procédures analytiques standards sont reproduites à l'annexe 1.

Le chapitre 4 introduit de façon détaillée le comportement des cultures de *V. vinifera* en flacons agités, qui constitue le système de culture standard en culture de cellules végétales. Il présente pour la première fois des mesures en ligne de la concentration d'oxygène dissous en flacon agité. Il reproduit le texte d'un article publié dans la revue 'Biotechnology and Bioengineering', **47** : 131-138.

Le chapitre 5 présente les cultures en cuvée en bioréacteur avec contrôle de l'oxygène dissous à plusieurs niveaux. En toile de fond, il compare les cultures en bioréacteur à celles effectuées dans le système témoin et relie la croissance de la biomasse ainsi que les taux de respiration et de production d'anthocyanes à la concentration d'OD maintenue dans les réacteurs. Des courbes de croissance, de concentration de nutriments et de production d'anthocyanes typiques y sont présentées et discutées.

Le chapitre 6 vise à cerner plus clairement les sources de limitation de la prolifération cellulaire. Il met à l'épreuve une méthode originale utilisant la progression de la mesure d'assimilation d'O_2 disponible en ligne pour déceler les changements métaboliques et tester les éléments nutritifs identifiés comme étant potentiellement limitants.

Finalement, une conclusion reprend les principaux résultats et les mets en perspective.

Chacun des chapitres du corps de la thèse est accompagné d'une annexe détaillant les résultats non présentés dans le corps des chapitres et contenant un condensé graphique volumineux de tous les résultats expérimentaux.

Les avis sont généralement partagés sur la pertinence de rapporter la majorité des résultats dans les thèses ou les mémoires. Dans notre domaine, ces résultats ne sont pas indépendants des conditions initiales ni de l'interaction entre divers paramètres, sans oublier la perte de productivité progressive des lignées cellulaires reliée au déclin du rendement des cellules productrices ou à la domination progressive des cellules non productives. Ces réalités incontournables entraînent des questions relatives à la représentativité et à la reproductibilité des résultats. Les courbes de croissance colligées en annexe constituent donc un appui aux courbes `typiques` présentées dans le corps de la thèse.

Je partage aussi l'avis de certains sur la pertinence d'introduire des 'bonnes pratiques de laboratoire`. Pas pour alourdir mais pour organiser des démarches expérimentales, suppléer à la quasi absence de supervision 'technique' des étudiants et permettre de transmettre systématiquement les savoir-faire, généraliser la validation et l'utilisation de procédures d'opération standardisées, et astreindre à la consignation des données et des résultats dans une forme qui impose à l'étudiant de terminer ce qu'il amorce et permette de rendre ces informations accessibles au groupe de recherche.

2. APPROCHE EXPÉRIMENTALE : STRATÉGIE DE RECHERCHE ET CHOIX MÉTHODOLOGIQUES

Dans la mesure où l'on dispose d'un bioréacteur dont la configuration permet de limiter les dommages causés par le cisaillement dû au mélange ainsi que l'enlèvement du CO_2, les objectifs spécifiques de ce doctorat peuvent être regroupés sous deux catégories de paramètres agissant sur la croissance des cellules en suspension : la concentration d'oxygène dissous et les contraintes nutritionnelles.

2.1 Choix du bioréacteur de culture en suspension

D'emblée, lors de la définition du projet, nous avions choisi d'utiliser pour les études en suspension un nouveau bioréacteur conçu par l'équipe du Prof. Jean Archambault, alors attaché à l'Institut de Recherche en Biotechnologie du Conseil National de Recherche du Canada, en étroite collaboration avec l'équipe du prof. Claude Chavarie, de l'École Polytechnique.[73] Ce bioréacteur agité mécaniquement se distingue des versions classiques par une agitation à faible taux de cisaillement fournie par un double ruban hélicoïdal, agitateur d'abord développé pour les fluides visqueux non-newtoniens, complétée d'une aération de surface avantagée par la présence de trois contre-pales installées à la hauteur de l'interface liquide. Cette approche a résolu les problèmes de mélange reliés au comportement pseudo-plastique des suspensions cellulaires à haute concentration (20-30 g MS L^{-1}).[74,162] Ce bioréacteur permet d'obtenir un mélange uniforme, tout en soumettant les cellules à des forces de cisaillement faibles, et d'éviter les problèmes de production de mousse.[73]

Bien instrumenté, le bioréacteur à double ruban hélicoïdal (Helical ribbon impeller, HRI) constitue un outil de travail intéressant pour la poursuite de travaux de recherche sur des cultu-

res en suspension. Malgré son faible taux volumique de transfert d'oxygène (k_La), [74,76] l'enrichissement de l'alimentation gazeuse en oxygène dans la tête du réacteur ou l'injection d'oxygène pur à faible débit dans le milieu permettrait d'envisager la mise à l'échelle de ce type de réacteur pour des volumes excédant 1000 L.[74]

À l'échelle laboratoire, l'utilisation de ce bioréacteur permet d'envisager des conditions expérimentales telles que :

a) la configuration du bioréacteur et les conditions d'opération permettent d'obtenir un bon mélange et un transfert de masse avantageux, [74,76] tout en minimisant le cisaillement subi par les cellules, [76,77] et que

b) la concentration d'oxygène dissous soit contrôlée par ajustement de la pression partielle d'O_2 dans le gaz d'aération alimenté à débit constant afin d'éviter l'introduction directe de bulles [74,76] et de limiter le dégazage du milieu de culture des gaz et composés volatils produits par les cultures, notamment le CO_2 et l'éthylène, compte tenu de l'effet conjugué du faible k_La et d'un taux unitaire d'aération faible de l'ordre de 0,1 vvm.

2.2 Étude de l'effet de la concentration d'oxygène dissous

L'étude de l'effet de la concentration d'oxygène dissous (OD) sur le comportement global des cultures de cellules végétales ne va pas de soi.

L'approche classique utilisée en microbiologie, applicable en fait pour l'étude de n'importe quel nutriment, consiste à effectuer des cultures alimentées en continu dans des conditions ne donnant pas lieu à des limitations nutritionnelles à diverses concentrations d'OD afin d'établir une relation entre le taux spécifique de croissance, μ (alors assimilable au taux de dilution, D), et la concentration d'OD maintenue dans le réacteur, et entre les taux spécifiques d'assimilation d'O_2, q_{O_2}, et le taux de dilution. Or, bien que réalisables, les cultures en continu de cellules végétales sont techniquement difficiles à opérer : les faibles taux de croissance de la biomasse

impliquent de longs temps de résidence, ce qui rend problématique le maintien à long terme de la stérilité. De plus, la capacité des cellules d'entreposer des éléments nutritifs et des réserves d'acides aminés dans leurs vacuoles peut provoquer des effets de mémoire qui influencent l'état stationnaire atteint. Les rapports d'études menées en continu avec des cellules végétales sont donc rares et ont surtout porté sur l'effet sur la croissance d'autres paramètres que l'oxygène. [35,164,165]

Les quelques études publiées qui abordent l'effet de l'oxygène dissous sur les cultures de cellules végétales ont donc pour la plupart été effectuées en cuvée. Elles tentent de relier les taux spécifiques d'assimilation d'O_2 (généralement mesurés hors ligne), q_{O_2}, à la croissance de la biomasse. [150,157,158,160] Plusieurs cependant rapportent simplement les taux volumiques d'assimilation d'O_2. [42,82,164] Une seule étude, celle de Tate et Payne, [157] explore directement la relation entre le taux de croissance de la biomasse et la disponibilité de l'oxygène, exprimée toutefois en termes de pression partielle d'O_2 maintenue dans la tête du bioréacteur.

Bien que nous ayons été conscients des difficultés que représente l'étude de l'effet de l'oxygène dissous dans un système opéré en cuvée, les informations obtenues devaient minimalement nous permettre de cerner les conditions de culture en bioréacteur les plus propices à l'obtention d'une biomasse de qualité en termes d'oxygénation, tout en permettant d'établir un protocole de culture en bioréacteur des cellules de *V. vinifera* et de circonscrire quelques stratégies d'action pour améliorer les taux de croissance. De plus, dans la perspective initiale de l'utilisation de la technologie de la culture de cellules végétales immobilisées sur un support, établir une relation entre le taux de croissance et le taux d'assimilation d'O_2 était primordial pour pouvoir établir les conditions d'oxygénation minimales.

2.2.1 Plan expérimental des cultures en cuvée en bioréacteurs

Le tableau 2.1 résume les conditions expérimentales dans lesquelles l'étude sur l'effet de la concentration d'OD a été faite. Elles font référence à l'utilisation de deux bioréacteurs HRI de

2-L et de 5-L décrits au chapitre suivant. Les milieux de cultures et les caractéristiques des lignées cellulaires utilisées y sont aussi détaillés. Les variables mesurées étaient :

- pour la croissance : la concentration de biomasse sèche (x_{MS}) ou humide (x_{MH}), le volume centrifugé des cellules (PCV, Packed Cell Volume);
- pour la consommation des nutriments : les concentrations de saccharose, glucose et fructose, et des ions nitrate, phosphate et ammonium;
- pour le suivi : la concentration d'OD, le pH et la conductivité des échantillons, la vitesse d'agitation et l'OUR (périodiquement).

Les courbes de croissance et de consommation de nutriments correspondantes sont présentées à l'annexe 3. Le plan expérimental inclut aussi le suivi de cultures témoins en flacons agités.

Les principaux outils d'analyse des résultats seront les taux spécifiques d'assimilation d'O_2, q_{O_2}, et les taux spécifiques moyens de croissance de la biomasse, $\bar{\mu}_{MS}$, déduits des mesures d'OUR et des courbes de croissance. Ils sont décrits au chapitre 3.

Les différentes phases de croissance in vitro des cellules végétales : prolifération, expansion et sénescence; se reflètent différemment dans les courbes de croissance selon que l'on utilise la biomasse sèche ou humide, le volume centrifugé des cellules, ou le nombre de cellules (x_{cell}) comme indicateur de croissance. Bien que la mesure de biomasse sèche soit la meilleure base de comparaison avec les résultats présentés dans la littérature, au terme de ce bloc d'expériences nous avons réalisé les limites de cet indicateur de croissance pour appuyer nos efforts d'amélioration de l'étape de croissance visant à maximiser le nombre de cellules. Des comptes cellulaires systématiques ont donc été ajoutés aux expériences subséquentes.

Tableau 2.1 ***Conditions expérimentales des cultures en bioréacteur visant l'étude de l'effet de la concentration d'OD sur la croissance cellulaire.***

Lignée cellulaire		OD [%]	Cuvée	Réacteur 5L	Réacteur 2L	Milieu de culture
VVG105	sc58	10	H10	✓		B5
	sc53	30	H09	✓		
	sc64	50	H11	✓		
VVG12	sc58	10	H13		✓	B5DN
	sc60	30	H16		✓	
	sc58	70(3d)-40	H15		✓	
	sc60	40	H18		✓	
	sc60	50	H17		✓	
	sc57	90	H12	✓		
	sc64	20	H20		✓	B5
	sc64	30	H21		✓	
	sc64	SC	H22		✓	
VVG109	sc37	54	H24		✓	B5QN
	sc37	60	H25		✓	
	sc37	SC	H26		✓	
VVG111	sc20	50	H28		✓	B5

B5 : $B5NA_{0,2}K_{0,1}$(3% Saccharose)

B5DN : B5(12,5 mM KNO_3)$NA_{0,2}K_{0,1}$(3% Saccharose)

B5QN : B5(6,25 mM KNO_3)$NA_{0,2}K_{0,1}$(3% Saccharose)

SC Sans contrôle d'oxygène dissous

2.3 Croissance et consommation de nutriments

2.3.1 Études complémentaires en flacons agités

Pour documenter les comparaisons entre les performances obtenues dans les flacons agités témoins et dans les bioréacteurs du point de vue de l'oxygène dissous disponible, trois séries de cultures témoins en flacons ont été effectuées en ajoutant un suivi en ligne de la concentration d'OD, dans l'un de ces flacons, ainsi que les comptes cellulaires aux variables mesurées.

La présentation de courbes évolutives de la concentration d'OD dans les flacons agités issues de cette étude est une première dans la littérature couvrant le domaine. L'ajout des courbes de prolifération cellulaire permettait d'établir des relations potentielles entre les courbes de croissance de la biomasse obtenues dans l'étude en bioréacteurs décrite plus haut et la progression des comptes cellulaires. De plus, l'estimation des taux d'assimilation d'oxygène sur la base des taux de transfert d'O_2 et des mesures d'OD permettait de comparer le comportement des deux systèmes de culture en termes d'assimilation d'O_2.

Pour éclairer la progression de notre démarche disons simplement ici que les informations issues de ces cultures ont permis de confirmer que dans le milieu de culture utilisé, l'arrêt de la prolifération cellulaire survient plusieurs jours avant l'observation d'un maximum de concentration en biomasse et que ce moment peut être identifié par l'analyse des courbes d'assimilation d'O_2.

2.3.2 Cultures complémentaires en bioréacteurs opérés en cuvée alimentée

L'étude sur l'effet de la concentration d'oxygène dissous sur la croissance de la biomasse a permis de circonscrire les conditions d'aération avantageant la croissance de la biomasse. En parallèle, il ressort de toutes les courbes de croissance et d'assimilation de nutriments que bien que la prolifération cellulaire soit vraisemblablement limitée par un composant du milieu, le

ralentissement de la prolifération n'est pas synchronisé avec la disparition d'un des éléments nutritifs mesurés du milieu de culture.

Parmi les nutriments rapidement assimilés et susceptibles d'être fournis en quantités trop faibles aux cultures figurent les sources d'ions NH_4, PO_4. De plus, les carences du milieu de croissance pourraient aussi être les ions Mg et SO_4 dont les concentrations n'ont pas été mesurées.

Pour éventuellement contourner cette limitation de la prolifération cellulaire et prolonger la période de croissance cellulaire, par la mise en oeuvre d'une alimentation programmée de certains nutriments ou par un ajustement des concentrations initiales du milieu de croissance, il est nécessaire d'identifier la source de la limitation nutritionnelle à la prolifération cellulaire. Pour ce faire, le lien établi entre l'observation d'un maximum de la mesure d'OUR_{max}, dérivée d'une mesure effectuée en ligne, et un ralentissement très net de la prolifération cellulaire a été utilisé pour identifier le moment où une limitation entrave la poursuite de la prolifération cellulaire et ainsi reconnaître le moment propice à l'ajout d'un des nutriments ciblés.

Ainsi une série de culture, impliquant l'alimentation de solutions concentrées d'ions NaH_2PO_4, $MgSO_4$ ou $(NH_4)_2SO_4$, a été planifiée. Les solutions ont été préparées de façon à obtenir une concentration résultante après l'ajout dans le bioréacteur, égale à la concentration spécifique du nutriment lors de l'inoculation, i.e. : 1 mmol PO_4 g^{-1} MS, 0,4 mmol $MgSO_4$ g^{-1} MS et 2 mmol NH_4 g^{-1} MS. Les solutions étaient complétées d'une certaine quantité de glucose visant à augmenter la concentration résiduelle de glucose dans le milieu de culture de 5 g L^{-1}, afin de suppléer à un éventuel épuisement des hydrates de carbone dans le milieu de culture advenant la poursuite de la croissance cellulaire.

Les conditions de culture réelle sont présentées au tableau 2.2. Aux variables mesurées déjà énumérées plus haut pour les cultures en cuvée en bioréacteur ont été ajoutés des comptes cellulaires pour tous les échantillons de biomasse. Les résultats de ces expériences sont traités au chapitre 6; la préparation des solutions de nutriments est détaillée au chapitre 3.

Tableau 2.2 Conditions expérimentales des cultures en bioréacteur visant l'étude de la source de limitation nutritionnelle de la croissance cellulaire.

Lignée cellulaire	Cuvée	Réacteur 5L	Réacteur 2L	Milieu de culture Événement ou Action	Temps
VVG11 sc20	H27	✓		B5 OUR_{max}	à 10,8 d;
				+ 5,5 g Glc L^{-1} + 1,05 mmol PO_4 g^{-1} MS	à 12,7 d;
				OUR_{max}	à 17,2 d;
				+ 5,3 g Glc L^{-1} + 2,06 mmol PO_4 g^{-1} MS	à 17,7 d
sc20	H28		✓	Cuvée en B5	
sc27(D6)	H30		✓	B5 OUR_{max}	à 7,6 d;
				+ 5,4 g Glc L^{-1} + 0,51 mmol PO_4 g^{-1} MS	à 8,6 d
sc31(D10)	H31	✓		B5 OUR_{max}	à 7,1 d;
				+ 5,0 g Glc L^{-1} + 0,39 mmol Mg g^{-1} MS	à 7,7 d
sc31(D10)	H32		✓	B5 OUR_{max}	à 6,4 d;
				+ 5,3 g Glc L^{-1} + 0,76 mmol NH_4 g^{-1} MS	alimentés sur deux jours à 7,9 d

Milieu de base B5 : $B5NA_{0,2}K_{0,1}$(3% Saccharose)
Concentration d'OD : 50%

Une approche plus classique aurait pu être mise en oeuvre avec un plan expérimental explorant l'effet de la modification des concentrations initiales du milieu sur la prolifération des cellules cultivées en cuvée en flacons agités, similairement aux expériences menées par le CRDA pour mettre au point la formulation du milieu de production. Toutefois, dans le contexte particulier de la culture des cellules végétales, la modification de la concentration initiale de NH_4 d'un ordre de grandeur altère le pH du milieu de culture suite aux échanges ioniques impliqués dans le transport. Certaines cultures supportent mal l'acidification graduelle du milieu de culture associée à la consommation massive d'ions NH_4, dans le milieu MS par exemple; on est alors en présence d'une inhibition indirecte causée par le substrat dont les effets négatifs peuvent être contournés par une alimentation graduelle. Dans ce contexte, la culture en bioréacteur avec contrôle de l'OD et en mode cuvée alimentée permet d'observer l'effet d'un apport supplémentaire de NH_4 dans des conditions où la culture pourra compenser la baisse de pH compensant les échanges d'ions H^+ par des ions K^+ rapidement. Contrairement aux expériences effectuées en flacons agités, le contrôle de l'oxygène dissous permet de s'assurer de conditions de culture comparables relativement à l'oxygénation pour toute la durée des cultures.

2.4 Organisation de l'analyse des résultats

La figure 2.1 schématise les relations entre les résultats issues des trois blocs d'expérimentation, l'organisation de l'analyse et les objectifs établis au chapitre précédent. L'analyse des résultats présente séquentiellement les cultures en flacons agités, les cultures en bioréacteur avec contrôle de la concentration d'OD et les cultures en cuvée alimentée. Cette organisation ne respecte pas la chronologie des événements mais reflète la direction que nous avons donné aux publications scientifiques issues de ce travail.

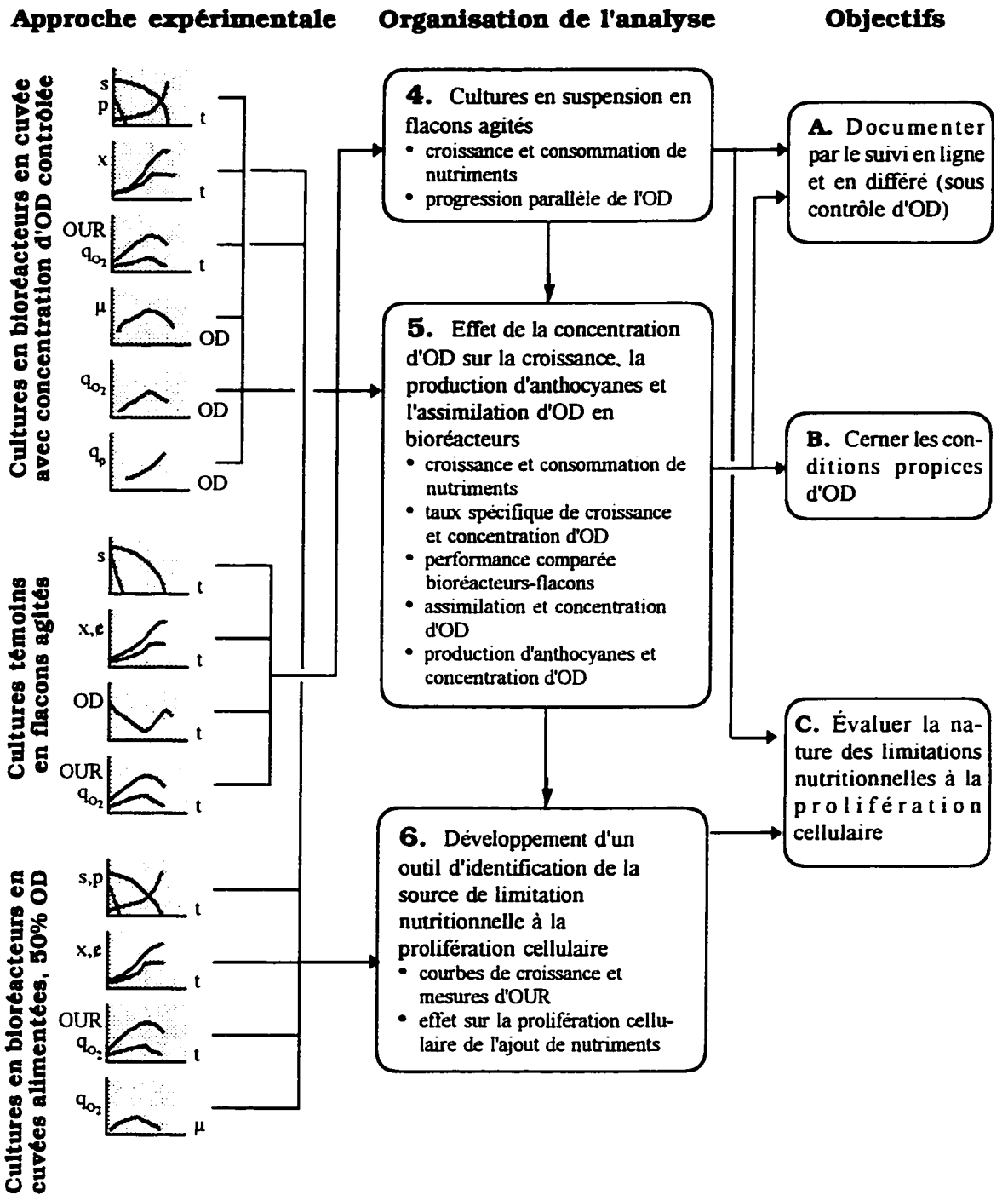


Figure 2.1 Schéma organisationnel reliant les diverses étapes de l'approche expérimentale aux objectifs spécifiques poursuivis à travers le contenu de la thèse.

3. MÉTHODES, PROCÉDURES ANALYTIQUES ET CALCULS

Ce chapitre présente le détail des méthodes et procédures utilisées au cours des travaux rapportés dans cette thèse. Une présentation succincte de ces méthodes est faite dans les sections 'Matériels et méthodes' des chapitres 4 à 6; ce chapitre n'est donc pas nécessaire à la compréhension des conditions particulières dans lesquelles ont été effectués les travaux mais il présente tous les détails pertinents à leur reproduction.

3.1 MÉTHODES

3.1.1 Lignées cellulaires et milieux de culture

Les cellules de raisins utilisées sont des cellules de *Vitis vinifera* (var. Gamay fréau) fournies par le Dr. François Cormier du Centre de recherche et de développement sur les aliments d'Agriculture Canada. Rappelons que le contexte de recherche impliquait que les lignées cellulaires, développées par le CRDA, évoluent au cours du projet. Nous avons veillé autant que possible à introduire les nouvelles lignées cellulaires aux moments charnières de notre effort expérimental. La stabilisation d'une lignée cellulaire cultivée dans l'obscurité par l'équipe du CRDA, prérequise à la mise au point du bioprocédé, a motivé le premier changement de lignée. La perte de productivité de cette lignée suite à l'entretien routinier de celle-ci suivant un protocole usuel de repiquage qui ne maintenait pas de pression à la production sur la lignée et favorisait la prolifération des cellules à haut taux de croissance et faible taux de production a justifié les deux autres changements.

Les lignées cultivées sous illumination sont identifiées VVGx; celles cultivées dans l'obscurité sont identifiées 10x, "x" désignant le numéro de la lignée associé au traitement de

sélection effectué. Au cours du projet, nous avons eu chronologiquement à notre disposition les lignées VVG105, VVG12, VVG109 et VVG111.

Les cellules sont repiquées dans un milieu de propagation dont la formulation de base est le milieu B5 établi par Gamborg et ses collaborateurs.[55] La concentration de saccharose (S) est de 30 g L^{-1}. Les concentrations de régulateurs de croissance sont de 0,2 mg d'acide α-naphthalèneacétique (NA) et de 0,1 mg de kinétine (K) par litre de milieu. Le milieu de propagation était initialement additionné de 250 mg d'hydrolysat de caséine (CA) par litre. La formulation du milieu est résumée dans l'appellation $B5K_{0,1}NA_{0,2}CA_{250}(3\%S)$.

Les lignées VVG12, VVG109 et VVG111 ont été sevrées de leur besoin en hydrolysat de caséine pour éliminer tout constituant non défini du milieu. Pour ces lignées, le milieu de culture est donc le suivant $B5K_{0,1}NA_{0,2}(3\%S)$. L'enlèvement de la caséine diminue la quantité d'azote disponible (sous forme d'acides aminés immédiatement assimilables) de 1,8 mmol N L^{-1} ; la quantité de phosphore disponible sous forme d'ion PO_4 de 0,05 mmol PO_4 L^{-1}, ce qui correspond à environ 5% du phosphate disponible dans le milieu de croissance original ; et la quantité de fer disponible de 1,25 mg L^{-1}, ce qui correspond à une diminution de 18%.[23]

Un milieu favorisant la production des anthocyanes avait déjà été formulé suite aux travaux effectués par l'équipe du Dr. Cormier.[116] Dans ce milieu de production, la quantité de NO_3 disponible est réduite au quart par rapport au milieu B5 standard ($B5QNK_{0,1}NA_{0,2}(5\%G)$), modifiant d'autant le ratio NH_4/NO_3. De plus, ce milieu exempt d'hydrolysat de caséine contient du glucose (50 g L^{-1}) en remplacement du saccharose afin d'augmenter l'ampleur du choc osmotique dès l'inoculation, sans que les cellules aient à hydrolyser le saccharose au préalable.

3.1.2 Entretien des lignées cellulaires

Les cellules ont été cultivées de façon routinière dans des flacons Erlenmeyer à large goulot de 250, 500 mL ou 1 L contenant 50, 100 ou 200 mL de milieu de culture. Les bouchons utilisés étaient fabriqués d'ouate de coton enroulée dans une bande de coton de fromager; la masse

volumique de ces bouchons était d'environ 0,6 g mL^{-1}. Le pH du milieu de culture était ajusté à 5,8 avec une solution 0,1 N de KOH immédiatement avant la stérilisation à l'autoclave (101 kPa, 121°C) pendant trente (30) minutes. Le milieu de culture destiné à l'entretien des lignées et à la préparation des inocula était préparé en lot jusqu'à 14 jours avant les repiquages. Il est probable que cette procédure ait donné lieu à une hydrolyse non enzymatique plus importante du saccharose[40] que celle de l'ordre de 5 % observée dans le milieu fraîchement stérilisé.

Les cultures en flacons étaient agitées à 115 rpm, à moins d'indication contraire, et maintenus à 25°C. Pour l'entretien des lignées cellulaires, les cellules ont été transférées tous les sept (7) jours dans du milieu frais à une concentration initiale de 8 à 15% de volume cellulaire centrifugé (packed cell volume : PCV).

Les cellules étaient repiquées de un à deux jours avant leur transport du CRDA à l'École Polytechnique. Les cellules transportées subissant une latence importante, elles ont généralement été repiquées dans le milieu $B5K_{0,1}NA_{0,2}CA_{250}$(3%S) après deux semaines de culture. Pour la lignée cellulaire VVG12 et les suivantes, les repiquages subséquents ont été fait dans le milieu $B5K_{0,1}NA_{0,2}$(3%S). Dans tous les cas, les repiquages ont été effectués de façon à avoir un PCV de 8 à 15% après l'inoculation tous les 7 jours. Jusqu'à ce que le taux de croissance soit rétabli et qu'il permette d'obtenir environ 40% de biomasse (PCV) après 7 jours pour un inoculum de 10% PCV, les inocula étaient concentrés en retirant stérilement une partie du milieu après décantation de la biomasse. Par la suite les repiquages étaient effectués par dilution.

3.1.3 Montages expérimentaux

3.1.3.1 Bioréacteurs à double ruban hélicoïdal

Les cultures en bioréacteurs ont été effectuées dans des réacteurs à double ruban hélicoïdal (HRI, Helical Ribbon Impeller) d'un volume nominal de 2 et 5-L. Le bioréacteur de 5-L

(BioExpert, Québec, Canada)[74] était instrumenté pour le suivi en ligne du pH (par une sonde Ingold à électrolyte en gel, insérée dans un port traversant la jaquette chauffante du bioréacteur), de la température (par une sonde RTD, pt100, insérée dans un port au fond du réacteur), de la conductivité du milieu de culture (par une sonde BioExpert, insérée dans un port au fond du réacteur), la concentration d'oxygène dissous (DO) (par une sonde Ingold insérée dans un port traversant la jaquette chauffante du bioréacteur) et la vitesse d'agitation (Figure 3.1a). L'enceinte des bioréacteurs HRI-2L était constituée d'un vaisseau de verre de 2-L (Corning Glassworks, Corning, NY) fermé par un couvercle d'acier inoxydable 316 (Figure 3.1b) retenu par une bride. La culture était agitée à l'aide d'une hélice à double ruban hélicoïdal conçu d'après Jolicoeur et coll.,[74] monté sur un joint mécanique stérile (Bellco, Vineland, NJ), et actionné à l'aide d'un moteur à vitesse variable (Cole Palmer, Chicago, Il). Trois contre-pales verticales installées à la surface du liquide et orientées à 10° améliorent l'efficacité de l'aération de surface. Les bioréacteurs HRI de 2-L étaient équipés d'une sonde d'OD polarographique (Ingold) et d'une sonde de conductivité de construction domestique. Cette dernière était constituée de deux tiges de SS316 de 2 mm de diamètre séparées de 4,5 mm. Les parties des tiges exposées au fluide étaient de 5 mm. Les tiges étaient insérées dans une gaine de PTFE elle-même insérée dans un tube d'acier. Les sondes étaient étalonnées avec des solutions standards de NaCl.

3.1.3.1.1 Cultures en bioréacteur

Plusieurs cultures en cuvée ont été effectuées à diverses concentrations d'OD (Tableau 2.1). Les résultats sont rapportés à l'annexe 3 et discutés au chapitre 5.

Les milieux de culture utilisés dans ces expériences étaient le milieu B5 standard décrit plus haut et contenant 25 mM NO_3 ainsi qu'un milieu B5 modifié contenant une quantité réduite de NO_3 : 12,5 mM NO_3 (B5DN) et 6,25 mM NO_3 (B5QN). Les milieux de culture des flacons témoins et des bioréacteurs HRI-2L étaient préparés et stérilisés une journée avant l'inoculation.

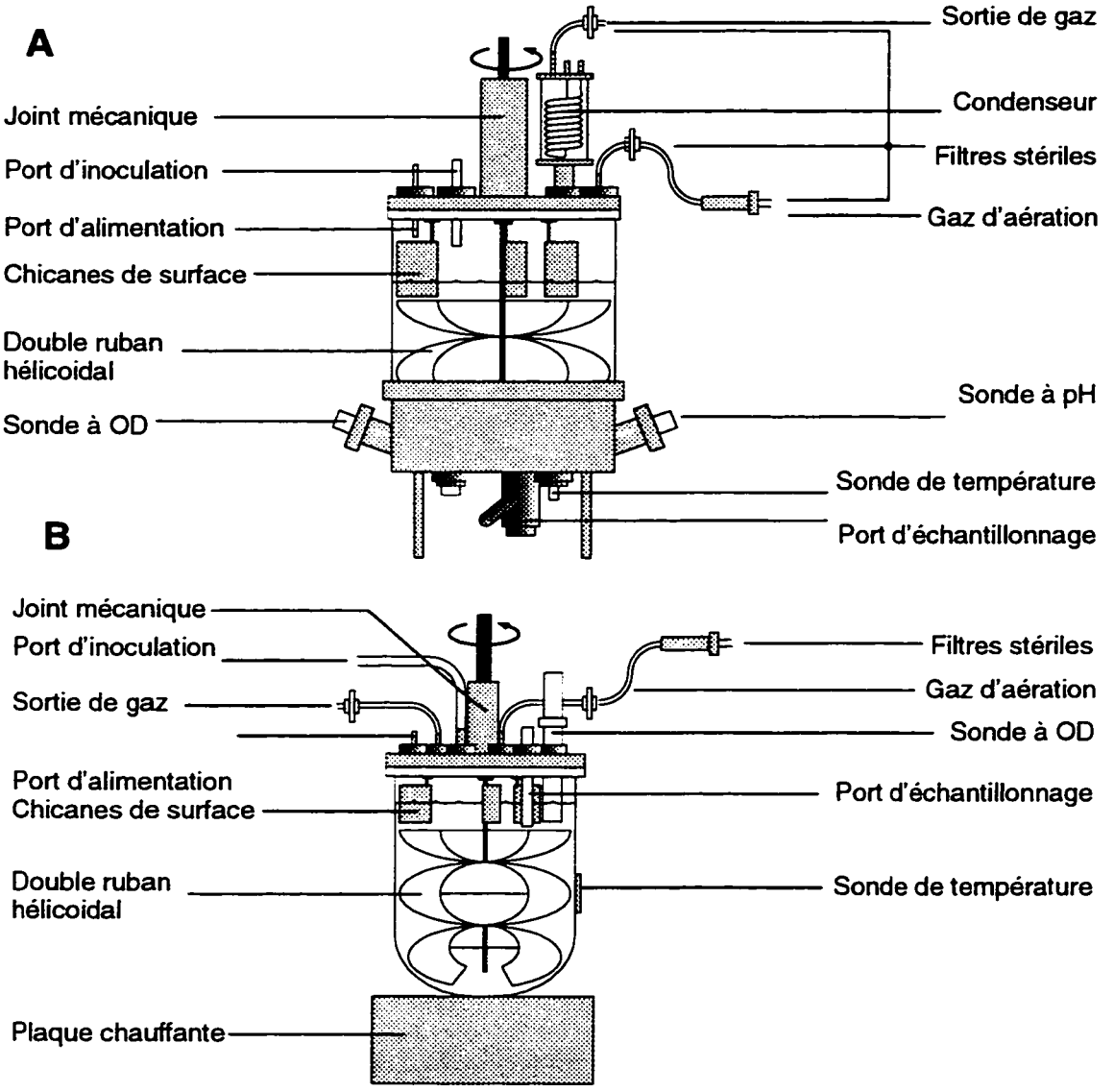


Figure 3.1 Configuration des bioréacteurs (a) Bioréacteur 5-L (b) Biréacteur 2-L.

Les milieux ainsi que les bioréacteurs HRI-2L eux-mêmes, étaient stérilisés à la vapeur (60 min., 121°C et 1 bar). Le réacteur HRI-5L ainsi que son milieu de culture était stérilisé sur place (20 min., 121°C et 1 bar) en suivant les prescriptions du manufacturier. La chaleur était fournie par de l'eau circulant sous pression dans la chemise du réacteur. Le temps requis pour atteindre 121°C dans le bioréacteur était de 60 à 90 minutes.[28] Cette plus longue exposition à des températures élevées a pu induire des différences dans la composition initiale après stérilisation des milieux de cultures du HRI-5L et ceux des HRI-2L et des flacons témoins, ce qui n'a pas été vérifié mais n'a pas non plus causé de biais systématique sur les résultats expérimentaux.

Des résultats antérieurs ayant montré une augmentation de la quantité de débris cellulaires présents en début de culture à des vitesses plus élevées,[116] la vitesse d'agitation initiale utilisée pour les cultures a été fixée à 60 rpm. La vitesse d'agitation a cependant été graduellement augmentée jusqu'à 100 rpm pour compenser la faiblesse du taux de transfert lorsque les contrôleurs atteignaient la saturation.

3.1.3.1.2 Conditions particulières aux cultures en cuvées alimentées

Quatre cultures en cuvée alimentées ont été effectuées à une concentration d'OD de 50% avec la lignée VVG111, cultivée à l'obscurité et sevrée de son besoin en hydrolysat de caséine. La progression de la démarche expérimentale nous a amené à tester l'effet d'un apport supplémentaire d'ions PO_4 (sous forme de NaH_2PO_4), d'ions Mg (sous forme de $MgSO_4$) et d'ions ammonium (sous forme de $(NH_4)_2SO_4$) en cours de culture. Pour éliminer la possibilité qu'une hausse du taux de croissance découlant de l'ajout de nutriments ne résulte en une limitation de la croissance suite à l'épuisement des hydrates de carbone (CH_2O), une solution concentrée de glucose a été ajoutée au milieu de culture simultanément avec les solutions aqueuses de sels. Les solutions de glucose et de sels étaient préparées et stérilisées séparément. Le pH des solutions de sels a été ajusté avec du KOH et du HCl 0,1 N avant la stérilisation.

Les conditions de culture ainsi que les formulations des suppléments sont décrites au chapitre 2, au tableau 2.2. Les solutions de PO_4 et de Mg ont été ajoutées aux cultures rapidement, par gravité. Le réservoir contenant la solution à alimenter était muni à sa base d'un embout connecté à un tube de silicone. Pour le réacteur HRI-5L, le tube de silicone était relié à une aiguille pouvant être insérée dans l'un des ports d'alimentation situé dans la tête du réacteur. Pour le réacteur HRI-2L, le tube de silicone était inséré sous la flamme dans un des connecteurs pour tube flexible de la tête du réacteur. L'ajout de la solution glucose-$(NH_4)_2SO_4$ a été faite selon une rampe à un débit linéaire de 8,48 L h^{-1}, correspondant à 0,22 mM NH_4 h^{-1}, afin d'éviter une augmentation trop rapide de la concentration de NH_4 dans le milieu de culture et une éventuelle chute du pH associée à l'assimilation rapide des ions NH_4 Cette série d'expérience a été complétée par une culture complète en cuvée en bioréacteur.

Les résultats sont rapportés à l'annexe 3 et discutés au chapitre 6. La culture en cuvée a aussi été discutée au chapitre 5. Les cultures témoins en flacons agités de ces cultures en bioréacteurs ont été effectuées dans le milieu B5 qui constitue le milieu de base des cuvées alimentées. Les courbes de croissance de ces cultures témoins sont présentées à l'annexe 2.

3.1.3.2 Contrôle et acquisition de données

Tous les bioréacteurs étaient reliés à un système de contrôle (BioExpert, Québec, Canada) pour l'acquisition de données et le contrôle de procédé. La température de tous les bioréacteurs était maintenue à 25°C par l'ajustement de la température de l'eau circulant dans la chemise du bioréacteur de 5-L par les boucles de contrôle du système BioExpert, ou par l'entremise de contrôleurs externes de température commandant la puissance de la plaque chauffante sur laquelle chaque bioréacteur de 2-L reposait.

La concentration d'OD était contrôlée au point de consigne en manipulant la pression partielle d'oxygène dans le mélange gazeux alimenté aux bioréacteurs. De l'air, enrichi d'oxygène ou d'azote, était alimenté au bioréacteur HRI 5-L par l'entremise de débitmètres massiques et aux bioréacteurs HRI 2-L en utilisant des rotamètres couplés à des vannes

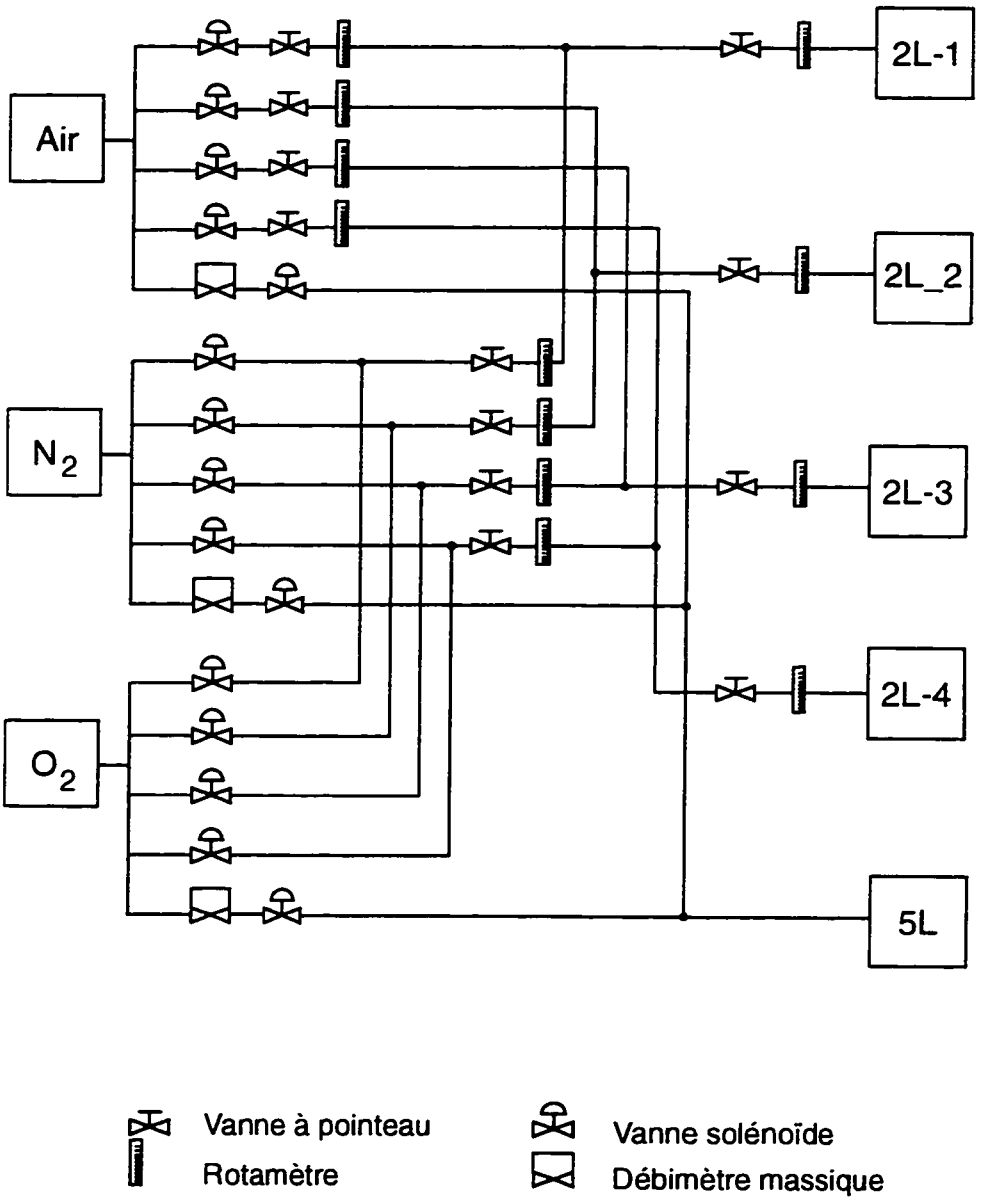


Figure 3.2 ***Schéma du système d'aération et de contrôle d'OD des bioréacteurs HRI 5-L et 2-L.***

solénoïdes (Figure 3.2). Des contrôleurs PID dont les paramètres ont été fixés par les méthode de Cohen-Coon [155] lors des premières cultures tests ont été utilisés.

Toutefois, typiquement, les concentrations d'OD ont fluctué de 14% (déviation standard) avec un intervalle de confiance à 95% de 1% (Culture dans HRI-2L, consigne d'OD fixée à 70%. Bien qu'une partie des problèmes de contrôle d'OD découlent de l'absence d'ajustement des paramètres des contrôleurs avec la progression des cultures, le design du système d'alimentation gazeuse a aussi engendré des problèmes, notamment pour les réacteurs HRI-2L. En effet, tous les bioréacteurs étaient alimentés à partir des mêmes bombonnes d'O_2 et de N_2. Dans ces conditions, l'apport supplémentaire en O_2 ou en N_2, contrôlé par des vannes solénoïdes situés en amont des débitmètres (tous munis d'une vanne à pointeau jumelée à un rotamètre), a entraîné des perturbations de pressions fréquentes dans tout le système d'alimentation gazeuse.

3.1.3.3 Cultures en flacons agités

Outre l'entretien des lignées cellulaires, les cultures en flacons agités ont servi de cultures témoins aux expériences en bioréacteurs. Dans ce contexte, de 4 à 8 flacons témoins de 500 mL contenant cette fois 120 mL de milieu de culture, étaient inoculés en transférant l'inoculum à l'aide d'une pipette stérile à large goulot. Ces flacons étaient échantillonnés en rotation tous les jours ou tous les deux jours. Les flacons étaient pesés avant et après l'échantillonnage de façon à pouvoir établir la perte de poids par évaporation.

Pour certaines cultures en flacons agités effectuées avec la lignée VVG111, une des cultures témoins était soumise à un suivi de la concentration d'OD. Pour ce faire, un bouchon de coton a été confectionné autour d'une sonde d'OD polarographique. Des tiges métalliques insérées dans le bouchon et encastrée sous une saillie de la sonde permettaient de maintenir le bouchon et la sonde en place en s'appuyant sur le rebord du goulot du flacon. Ainsi suspendue, la sonde se trouvait à environ 5 mm du fond du flacon. Après avoir été étalonnée dans de l'eau dégazée à l'azote et dans de l'eau saturée en air, la sonde était stérilisée à l'autoclave dans un

flacon contenant de l'eau. Le point d'étalonnage correspondant à 100% d'OD a été vérifié après la stérilisation. Lors de l'inoculation, le bouchon de ce flacon, ainsi que la sonde, était transféré sur un autre flacon contenant la culture. Pour ces cultures, l'échantillonnage a été réduit au jour 7 et à la fin de la culture afin de minimiser la manipulation du système.

3.1.4 Mesures des coefficients de transfert et des taux de consommation d'oxygène

3.1.4.1 Coefficients volumétriques de transfert dans les flacons agités

Les coefficients volumétriques de transfert d'oxygène, k_La, ont été estimés par la méthode dynamique[11] dans les flacons agités comme dans les bioréacteurs. Ainsi, les k_La des flacons agités ont été évalués à partir d'un suivi de l'augmentation de la concentration d'oxygène dissous (OD) dans l'eau provenant de l'air ambiant suite à un dégazage du liquide à l'azote. Dans ces conditions, on a :

$$\frac{dOD}{dt} = k_L a\,(OD^* - OD) \qquad (7)$$

où OD^* = 100% de saturation d'oxygène provenant de l'air dans l'eau et OD varie de 0 après le dégazage à l'azote à 100% après saturation. Ainsi

$$k_L a = \frac{\ln\left(\frac{OD}{OD^*} - 1\right)}{t} \qquad (8)$$

Un flacon de 500 mL contenant 125 mL d'eau a été utilisé. Les mesures d'oxygène dissous ont été effectuées à l'aide d'une sonde polarographique (Ingold) étalonnée dans de l'eau mise en contact prolongé avec de l'azote ou de l'air. Tel que décrit plus haut, la sonde était insérée dans un bouchon de coton et maintenue en place au centre du flacon, à environ 5 mm du fond du flacon, par des tiges métalliques. Lorsque nécessaire, l'air ou l'azote était alimenté dans le flacon par un tube, non immergé, inséré le long de la sonde d'oxygène.

Pour les mesures de k_La entre le gaz au-dessus de la nappe de liquide dans le flacon et le liquide, l'air était alimenté directement dans la tête du flacon, l'agitateur étant à l'arrêt avant le début de la prise de données. La fréquence de l'acquisition de données était de 10 s et le temps de réponse de la sonde est inférieur à 20 s.

Le coefficient volumique de transfert de CO_2 peut être relié au coefficient volumique d'O_2 par le biais des rapports de diffusivité. Selon que l'on utilise la théorie du film ou la théorie de la pénétration pour représenter le transfert de masse par absorption, le rapport des k_La est égal au rapport des diffusivités (=0,78) [17,29,134,148] ou de celui de la racine carrée du rapport des diffusivité (=0,88), [122,137,148] respectivement. Smith et coll. [148] ont montré que les valeurs de $k_L^{CO_2}a$ correspondaient à 0,75 à 0,89 fois les valeurs de k_La mesurés dans les mêmes conditions de transfert. Ces valeurs mesurées se situent dans une plage recouvrant les deux valeurs déduites du rapport des diffusivités et du rapport de leur racine carrée. Ainsi, dans tous les calculs effectués ici, le coefficient de transfert de CO_2 a été déduit des valeurs mesurées des k_La pour l'oxygène sur la base du rapport des diffusivités dans l'eau par la relation :[29,17]

$$k_L^{CO_2}a = k_La\left(\frac{\mathcal{D}_{CO_2}}{\mathcal{D}_{O_2}}\right)_{eau} \qquad (9)$$

avec

$(\mathcal{D}_{O_2})_{eau}$ $= 2.5\ 10^{-5}\ cm^2\ sec^{-1}$ [118]

$(\mathcal{D}_{CO_2})_{eau}$ $= 1.95\ 10^{-5}\ cm^2\ sec^{-1}$ [118].

Afin de compléter la caractérisation des flacons agités en termes de transfert gazeux, le coefficient de transfert d'oxygène à travers le bouchon a aussi été évalué. Pour cette mesure, contrairement à la procédure adoptée pour la mesure du k_La, aucun gaz n'a été forcé à travers le bouchon de coton après le dégazage à l'azote.

La résistance au transfert d'oxygène à travers le bouchon de coton scellant les flacons peut être découplée du transfert à l'interface liquide-gaz en utilisant les bilans de masse dans les phases gazeuse et liquide:

$$\frac{dp_{O_2}}{dt} = \frac{(K_{O_2})_{app}}{V_g}\left((p_0)_{O_2} - p_{O_2}\right) - k_L a \cdot \frac{V_L}{V_g}\left(\frac{p_{O_2}}{H_{O_2}} - OD \cdot R \cdot T\right) \tag{10}$$

$$\frac{dOD}{dt} = k_L a\left(\frac{p_{O_2}}{H_{O_2} \cdot R \cdot T} - OD\right) \tag{11}$$

en définissant $(K_{O_2})_{app}$ comme étant le coefficient de transfert d'oxygène à travers le bouchon du flacon et en assumant un régime établi dans la distribution des pressions partielles des différents gaz à travers le bouchon. Comme les données disponibles ont été obtenues sans que la distribution de gaz à travers le bouchon soit uniforme, le coefficient de transfert réel, K_{O_2}, est relié au coefficient apparent mesuré par la relation :[2]

$$K_{O_2} = (K_{O_2})_{app} \cdot \left[1 + 0{,}333\left(\frac{AL}{V_g}\right) + 0{,}022\left(\frac{AL}{V_g}\right)^2 - 0{,}0053\left(\frac{AL}{V_g}\right)^3\right] \tag{12}$$

où

$$K_{O_2} = \frac{A}{L}\mathcal{D}_{O_2} \tag{13}$$

avec A, L et $\mathcal{D}_{O_2}$ représentant la section d'écoulement du gaz à travers le bouchon, la longueur du bouchon et la diffusivité apparente de l'oxygène dans le bouchon, respectivement. La solution des équations (10) et (11) permet d'évaluer le paramètre $(K_{O_2})_{app}$ de façon à reproduire la courbe de concentration d'OD obtenue.

Les valeurs de $k_L a$ et de K_{O_2} estimées sont rapportées au tableau 3.1. Schultz[140] a évalué que la diffusivité de l'oxygène dans les bouchons de coton de diverses densités varie de 0,8 à 0,95 fois la diffusivité de l'oxygène dans l'air : $\mathcal{D}_{O_2-air} = 0{,}205$ cm sec^2 (selon l'équation de Chapman-Enskog)[16]. On peut donc vérifier à l'aide de l'équation (13) que pour la valeur calculée de $K_{O_2} = 1{,}64$ L h^{-1} pour un bouchon dont les dimensions correspondent à A=11,75 cm^2 et D=4 cm, la valeur de $\mathcal{D}_{O_2}$ calculée est de 0,16 cm sec^2, ce qui représente 78% de la diffusivité de l'oxygène dans l'air.

On pourrait montrer que considérer la diffusion à contre-courant du CO_2 produit lors de la respiration génère des écarts sur la concentration de CO_2 dans le liquide d'environ 10% seulement par rapport à une estimation de concentration basée sur une diffusion binaire où les flux d'O_2 et de CO_2 sont à toutes fins utiles égaux,[16] puisque le coefficient respiratoire, RQ, égal au ratio des taux d'assimilation d'O_2 et de production de CO_2, (RQ = OUR/CER), devrait typiquement varier entre 0,8 et 2.[127] Ainsi, le coefficient de transfert de gaz, K, est considéré être le même pour O_2 et pour CO_2,

$$K = K_{O_2} = K_{CO_2}, \tag{14}$$

et l'équation (10) décrivant le bilan de masse sur l'O_2 devient pour l'O_2 et le CO_2, respectivement :

$$\frac{dp_{O_2}}{dt} = \frac{K}{V_g}\left((p_0)_{O_2} - p_{O_2}\right) - k_L a \cdot \frac{V_L}{V_g}\left(\frac{p_{O_2}}{H_{O_2}} - OD \cdot R \cdot T\right) \quad \text{et} \tag{15}$$

$$\frac{dp_{CO_2}}{dt} = \frac{K}{V_g}\left((p_0)_{CO_2} - p_{CO_2}\right) - (k_L a)_{CO_2} \cdot \frac{V_L}{V_g}\left(\frac{p_{CO_2}}{H_{CO_2}} - [CO_2]_L \cdot R \cdot T\right). \tag{16}$$

Tableau 3.1 Coefficients de transfert ($k_L a$ et K_{O_2}) d'un flacon agité de 500mL

	Volume de liquide	$k_L a$
$k_L a$	100 mL	$18 \pm 0{,}3\ h^{-1}$ (n=3)
$k_L a$	125 mL	$14\ h^{-1}$
K_{O_2}	125 mL	$1{,}64\ L\ h^{-1}$ (n=2)

Erlenmeyer de 500ml; agitation: 115 rpm; course: 2,5 cm

3.1.4.2 Coefficients volumétriques de transfert dans les bioréacteurs

Tout comme dans les flacons agités, les coefficients volumétriques de transfert d'oxygène des bioréacteurs, k_La, ont été calculés à partir du profil de rétablissement de la concentration d'OD. L'aération était faite à travers la surface du liquide avec de l'air. Les mesures ont été effectuées après un dégazage prolongé de la masse de liquide à l'azote, assisté d'une agitation à 100 rpm, suivi d'un changement du gaz contenu dans la tête du réacteur sans agitation. Ce changement de l'azote par de l'air sans agitation et avant le début de la mesure de k_La permet d'appliquer l'équation 11 sans y apporter de correction pour considérer la dynamique de mélange de la phase gazeuse. [76]

La variation du k_La dans le bioréacteur HRI de 5L en fonction de la vitesse d'agitation et du niveau de liquide au-dessus des contre-pales est représentée à la figure 3.3. Les k_La mesurés varient en fonction du carré de la vitesse d'agitation et de la hauteur du niveau de liquide par rapport aux contre-pales de surface. Sur les plages de vitesses d'agitation, RPM, et de hauteur de liquide, H, testées le k_La du HRI-5L peut être représenté par la relation suivante :

$$k_La = 0{,}26 + (0{,}33 \cdot H - 1{,}6)^2 + 0{,}002 \cdot (RPM - 60)^2 . \qquad (17)$$

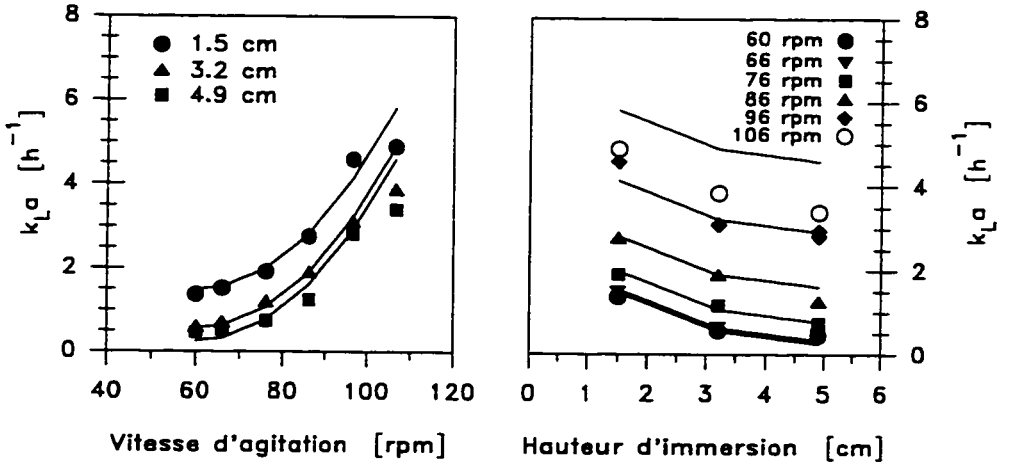


Figure 3.3 Variation du coefficient de transfert d'oxygène, k_La, avec la vitesse d'agitation et la hauteur submergée des contre-pales. Symboles : k_La mesurés; traits pleins : équation (17)

En négligeant la variation de k_La avec la concentration de la biomasse, cette relation peut être utilisée pour estimer la variation du k_La au cours de la culture. Dans le HRI-5L, le volume de culture est relié au niveau de liquide par rapport aux contre-pales par la relation:

$$V_L = 4{,}75 + 0{,}175 \cdot H \tag{18}$$

3.1.4.3 Taux volumique d'assimilation d'oxygène dans les bioréacteurs HRI

Le taux volumique d'assimilation d'oxygène (OUR) des cultures en bioréacteur était mesuré périodiquement. La vitesse d'agitation était réduite à 10 rpm afin de minimiser le taux de transfert d'oxygène (OTR). Le k_La du HRI-5L est de 0,36 h^{-1} à 30 rpm alors que le k_La des HRI-2L est de 0,23 h^{-1} à 12 rpm. Dans ces conditions expérimentales, l'OUR était calculé à partir du bilan de masse sur l'O_2 dans le liquide :

$$\frac{dOD}{dt} = OTR - OUR = k_La\left(OD^* - OD\right) - q_{O_2}x \tag{19}$$

où OD^* représente la concentration d'oxygène dissous à l'équilibre avec la phase gazeuse. Lorsque l'OTR est suffisamment petit relativement à l'OUR, l'équation (19) devient :

$$\frac{dOD}{dt} = OTR - OUR \approx OUR. \tag{20}$$

Étant donné l'ordre de grandeur des k_La et de l'OUR, négliger le temps de réponse n'infère pas d'erreur d'estimation appréciable pour notre système.[161] La variation de la concentration d'OD permet d'évaluer OUR par régression linéaire. Pour une mesure typique, la figure 3.4 illustre les résultats obtenus.

Pour les cultures effectuées dans le réacteur HRI-5L, le processus a été automatisé permettant ainsi des mesures régulières de l'OUR. À intervalle

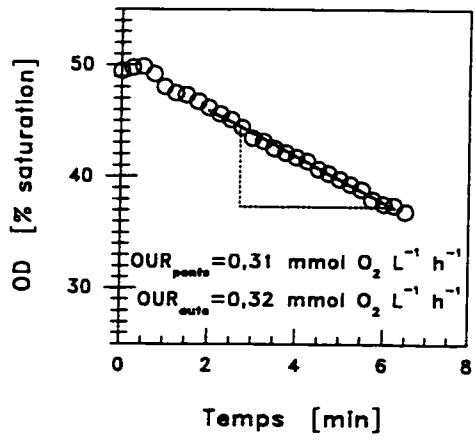


Figure 3.4 Exemple de mesure de l'OUR dans le réacteur HRI-5L. VVG111, 50% OD

régulier et simultanément, l'agitation était réduite à 12 rpm et l'action des contrôleurs était fixée dans leur position du moment. Après 30 secondes, les données de concentration d'OD étaient mémorisées dans une pile de 20 mesures et une régression linéaire était effectuée sur ces données. La durée des mesures d'OUR était fixée à quatre minutes mais la boucle de mesure protégeait la culture d'une réduction de la concentration d'OD sous 0,025 mmol O_2 L^{-1} (10%).

3.1.4.4 Taux d'assimilation d'oxygène dans les flacons agités

À cause de la sédimentation rapide des cellules en absence totale d'agitation, des mesures directes du taux volumique de respiration des cultures en flacons agités n'étaient pas possibles en mode dynamique. Ainsi, comme la croissance et les taux d'assimilation d'O_2 sont faibles pour les cultures de cellules végétales, l'OUR a été estimé à partir des mesures d'oxygène dissous en considérant un comportement pseudo-permanent entre l'air ambiant, le gaz contenu dans le flacon et la phase liquide. Sous ces hypothèses, le bilan de masse sur l'oxygène se réduit simplement aux équations 2 et 21.

$$\frac{dDO}{dt} \approx 0 \approx OTR - OUR. \tag{2}$$

$$OTR = k_L a\left(OD^* - OD\right) \approx q_{O_2} x = OUR \tag{21}$$

Les courbes d'assimilation d'oxygène des cultures en flacons agités (Annexe 2) ont permis de vérifier que la variation de la concentration d'OD demeurait plus faible que 1,7 µmol O_2 L^{-1} h^{-1} pour toute la durée des cultures. En contrepartie, les valeurs les plus faibles du taux de transfert d'O_2 sont de l'ordre de 0,4 mmol O_2 L^{-1} h^{-1} considérant un k_La de 18 h^{-1} et une force motrice, (OD^* - OD), minimale de 0,025 mmol O_2 L^{-1} en début de culture.

Dans ces conditions, la variation de la concentration d'OD est négligeable, l'OUR est égal à l'OTR. Dans les flacons agités, en absence de contrôle d'oxygène dissous et considérant k_La constant, OUR varie donc simplement avec la concentration d'OD mesurée.

3.2 PROCÉDURES ET CALCULS

3.2.1 Méthodes analytiques

L'échantillonnage périodique des flacons agités permettait d'obtenir des indices de croissance de la biomasse, le pH et la conductivité du milieu de culture, et d'effectuer des mesures du contenu du milieu extracellulaire en hydrates de carbone et en ions ammonium, nitrate et phosphate. La procédure de traitement des échantillons de culture est décrite à l'Annexe 1.

3.2.1.1 Suivi de la croissance de la biomasse et de la production d'anthocyanes

3.2.1.1.1 Volume de la biomasse, masse humide et masse sèche

Les indices de croissance de la biomasse mesurés étaient le volume relatif de la biomasse centrifugée (PCV, Packed Cell Volume) et les masses humide (MH) et sèche (MS) de la biomasse. Le PCV était obtenu en évaluant le volume relatif occupé par la biomasse après centrifugation d'un échantillon de culture de masse connue et d'environ 15 mL à 530 g pendant 5 minutes. La biomasse humide était évaluée en pesant la biomasse recueillie par filtration sur un filtre Whatman (pour les premiers jours de culture) ou sur une pellicule Miracloth™. Le filtrat était filtré une seconde fois sur un filtre de 0,45µm avant d'être congelé à -20°C (environ 1 mL) pour les mesures d'hydrates de carbone ou réfrigérées (environ 7 mL) pour les mesures d'anions. Environ 100 mg de l'échantillon de biomasse était utilisé pour mesurer les anthocyanes, la portion restante était asséchée dans une étuve à 100°C et pesée au moins 24 heures plus tard.

La procédure associée aux mesures de PCV, de biomasse humide et sèche et la préparation de l'échantillon pour les analyses de milieu est détaillée à l'Annexe 1, de même que les prélèvements effectués pour la détermination de la viabilité des cellules et pour les comptes cellulaires.

3.2.1.1.2 Dénombrement cellulaire et viabilité

La viabilité des cellules prélevées lors des échantillonnages a été déterminée immédiatement après l'échantillonnage. Les cellules viables ont été colorées avec une solution de 5 g de diacétate de fluorescine dissous dans 1 L d'acétone et la proportion de cellules viables déterminée par inspection visuelle avec un microscope à fluorescence.[75] Afin de pouvoir dénombrer les cellules mortes, un faisceau de lumière blanche de faible intensité était utilisé conjointement avec la source d'ultraviolet.

Pour effectuer le dénombrement cellulaire, les agrégats d'un échantillon des suspensions cellulaires ont été dissociés par oxydation en les macérant dans 2 mL d'une solution de trioxyde de chrome 10% (w/v) à 60°C, 60 min.[36] Le nombre de cellules a été évalué en comptant celles-ci sur un hémacytomètre Fusch-Rosenthal. Les cellules ont été introduites sous la lamelle de l'hémacytomètre par capillarité. Lorsque nécessaire, l'échantillon était dilué avec de l'eau pour pouvoir compter environ 100 à 300 cellules par fenêtre. Afin d'être assuré qu'une trop grande concentration de cellules ne crée pas une obstruction à l'entrée de la fenêtre, des comptes ont été effectués sur plusieurs aliquotes et à diverses dilutions.

Les procédures détaillées de dénombrement cellulaire et de détermination de la viabilité sont reproduites à l'annexe 1.

3.2.1.1.3 Anthocyanes intracellulaires

La quantité d'anthocyanes contenue dans la biomasse humide a été mesurée en réservant une portion de masse connue et d'environ 100 mg de la biomasse humide. Les anthocyanes ont été extraits de la biomasse avec 10 mL d'une solution d'éthanol acide (HCl 1% et éthanol dans une proportion de 15:85) dans laquelle les cellules ont macéré 24 heures à 4°C. La concentration d'anthocyanes extraits a été mesurée par densité optique à 535 nm. Les mesures d'absorbance ont été converties en concentration de cyanidine-3-monoglucoside (Poids moléculaire : 445,2) en

utilisant un coefficient d'extinction molaire, $\log \varepsilon_{1cm}$, de 4,47,[1] ce qui reflète bien celui correspondant à une solution commerciale d'anthocyanes.[25]

3.2.1.2 Mesures en lignes

3.2.1.2.1 Oxygène dissous

Après une période de polarisation sous tension, les sondes à oxygène dissous ont été étalonnées par dégazage à l'azote et à l'air avant chacune des expériences. Dans le réacteur HRI-5L, la sonde d'OD était étalonnée dans le milieu de culture après la stérilisation. Il s'est avéré que les fluctuations cycliques de température dans la jaquette du bioréacteur, grossièrement de 15 à 45°C, entraînaient des fluctuations de la concentration d'OD de l'ordre de 2 à 3 %. Pour les réacteurs HRI-2L, les sondes d'OD étaient étalonnées dans l'eau avant la stérilisation des bioréacteurs vides à l'autoclave (60 min, 100 kPa). Pour les flacons agités, les sondes d'OD étaient étalonnées dans l'eau après la stérilisation des flacons munis des sondes. Dans ce cas, après l'étalonnage, les sondes et les bouchons stériles auxquelles elles étaient attachées, étaient transférés sous la hotte à flux laminaire sur les flacons fraîchement inoculés. Pour les réacteurs HRI-2L ainsi que pour les flacons agités, la polarisation des sondes d'OD était maintenue pendant les procédures d'inoculation grâce à l'utilisation d'une pile.

3.2.1.2.2 pH, Conductivité

La comparaison des courbes de pH mesuré in situ et mesuré hors ligne après l'échantillonnage illustre les difficultés de mesures du pH dans le réacteur HRI-5L dans la configuration utilisée. La lecture de la sonde de pH, installée par l'entremise d'un port situé dans la jaquette chauffante, varie avec la température de l'eau circulant à travers la jaquette. De plus, la stérilisation du bioréacteur in situ par circulation d'eau surchauffée dans la même jaquette, provoque vraisemblablement un vieillissement prématuré des sondes de pH résultant en une dérive importante du signal par rapport à l'étalonnage. Pour cette raison, les mesures de pH in situ n'ont été faites que sur un nombre limité de cultures.

La figure 3.5 présente une comparaison des mesures in situ de pH et des mesures hors lignes du pH du surnageant des échantillons. Dans la plage de pH rencontrée, l'équilibre $CO2\text{-}H_2CO_3\text{-}HCO_3^-$ est tel qu'une évacuation du CO_2 dissous de l'échantillon peut provoquer de hausse importante du pH. Comme c'est typiquement le cas, on observe une différence significative entre le pH de la culture et celui du surnageant, causée par la polarisation des membranes cellulaires. [119]

Similairement aux mesures en ligne de pH, des problèmes de fonctionnement des sondes de conductivité n'ont pas toujours permis de relier le signal transmis avec l'étalonnage initial. Dans le HRI 5L, la température élevée dans la gaine du bioréacteur lors du processus de stérilisation sur place entraînait une dilatation des soudures connectant les éléments d'acier inoxydable de la sonde au fil de cuivre le reliant au système de contrôle, les rendant inutilisables pour certaines cuvées Toutefois, une fois ce problème résolu, des mesures hors ligne de la conductivité faites en parallèle sur les échantillons pris dans le bioréacteur ont confirmé que les mesures de conductivité demeuraient fiables pendant toute la durée des cultures. La pente des courbes

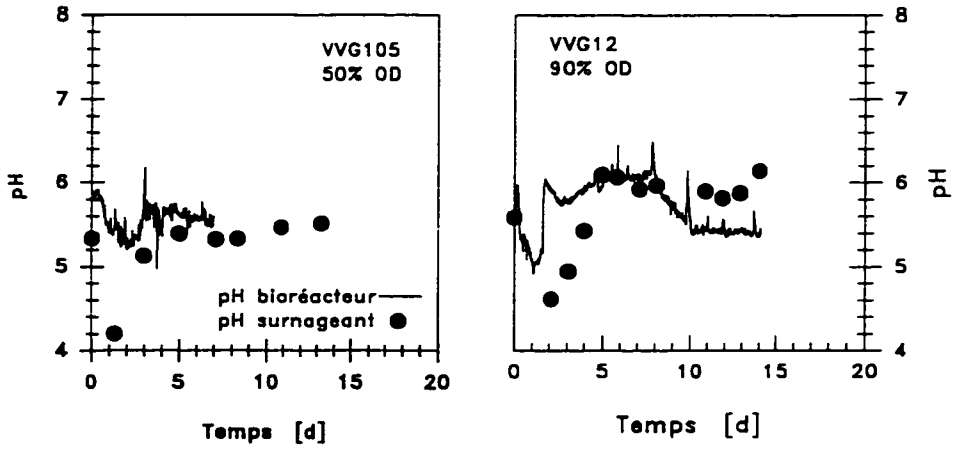


Figure 3.5. Comparaison des mesures de pH in situ et hors ligne de deux cultures effectuées dans le bioréacteur HRI-5L. Cuvées effectuées avec les lignées VVG105 sc64, 50% OD et VVG12 sc57, 90% OD

d'étalonnage des sondes de conductivité a donc été établie après l'inoculation des bioréacteurs en mesurant la conductivité du premier échantillon.

Les données de conductivité relevées par le système BioExpert ont été filtrées à l'aide d'un filtre exponentiel.

3.2.1.3 Analyses physico-chimiques

3.2.1.3.1 Hydrates de carbone

Les hydrates de carbone présents dans le milieu extracellulaire ont été mesurés par chromatographie en phase liquide à haute pression (HPLC) en utilisant une colonne d'adsorbant Biorad HPX87C maintenue à 80°C et de l'eau s'écoulant à 1,0 mL min^{-1} et à une pression de 6000 à 7500 kPa pour effectuer la séparation. Le système HPLC était composé d'une pompe Waters (modèle 6000A), d'un injecteur automatique Gilson (modèle 231/401), d'un réfractomètre Gilson (modèle 132), d'un système de chauffage Man-Tech (modèle 7980), complété d'un intégrateur Hewlett-Packard (modèle HP3394A). La procédure complète de mesures des hydrates de carbones est présentée à l'annexe 1.

3.2.1.3.2 Ions NH_4, NO_3, PO_4

La concentration extracellulaire d'ions NH_4 a été mesurée selon la méthode décrite par Weatherburn.[172] Les ions nitrates ont été mesurés à l'aide d'une électrode (Orion Nitrate Electrode, modèle 930700). La concentration de phosphate inorganique a été mesurée par la méthode à l'acide ascorbique décrite dans 'Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater'.[20] Les procédures de mesure complètes sont décrites à l'annexe 1.

3.2.1.3.3 pH, Conductivité

Après décantation des cellules, le pH du surnageant des échantillons de cultures a été mesuré au moyen d'une sonde de pH combinée à électrolyte en gel (Fisher Accumet 13-620-252) couplée à

un appareil Fisher Accumet 805MP. La conductivité du surnageant a été mesurée à l'aide d'une sonde de conductivité OAKTON.

3.2.2 Calculs

3.2.2.1 Calculs relatifs à la présentation des données

Les courbes représentant la progression de toutes les variables mesurées sont présentées en annexe : les cultures en flacons agités pour lesquelles des comptes cellulaires ont été effectués à l'annexe 2; les cultures en bioréacteur à diverses concentrations d'oxygène dissous à l'annexe 3; et les cultures en bioréacteur avec ajout de nutriment en cours de culture à l'annexe 4.

Tous les résultats présentés en termes de concentration ont été corrigés pour tenir compte du volume occupé par la biomasse et du changement de volume des cultures suite à l'échantillonnage, à l'évaporation et, pour certaines cultures, à l'ajout de milieu. Les concentrations extracellulaires de nutriments mesurées sont donc exprimées par rapport au volume initial, tout comme les indicateurs de croissance de la biomasse.

La correction apportée pour tenir compte du volume occupé par la biomasse est basée sur la mesure de biomasse humide et sur l'hypothèse d'une masse volumique équivalente à celle de l'eau. Ainsi ce facteur de correction, fl, applicable aux concentrations extracellulaires de nutriments mesurées est le suivant :

$$fl = \frac{V_L - \frac{g\,MH}{V_L}\frac{1}{\rho_{H_2O}}}{V_L} = 1 - \frac{g\,MH}{V_L \cdot \rho_{H_2O}}. \qquad (22)$$

On aurait pu utiliser comme les quelques auteurs qui prennent la précaution de faire cette correction un facteur de correction basé sur la mesure de PCV et sur l'hypothèse que 50% du volume du culot est occupé par la biomasse, ainsi fl=(1-0,5·PCV). Le facteur de correction ainsi calculé est de 1 à 7% plus faible que celui défini par l'équation 22.

La correction apportée pour tenir compte des changements de volume est basée sur l'évaluation des taux d'évaporation, sur les mesures des volumes d'échantillons prélevés et sur les volumes de suppléments ajoutés à certaines des cultures. Pour les bioréacteurs, un taux d'évaporation moyen a été utilisé. Ce taux moyen d'évaporation, r_{H_2O}, a été estimé en évaluant le volume perdu par évaporation sur la base du volume initial de la culture, de son volume final et du volume des échantillons prélevés au cours de la culture et en supposant un taux linéaire d'évaporation réparti sur toute la durée de la culture. Pour les flacons agités, les pertes par évaporations, Δ_{H_2O}, ont été mesurées directement en pesant systématiquement les flacons avant et après les prélèvements d'échantillons. Les corrections apportées à toutes les concentrations mesurées pour tenir compte des changements de volume sont les suivantes :

pour les cultures en flacons agités,

$$f2_i = f2_{i-1} \cdot \left(1 - \frac{\Delta_{H_2O}}{V_{L,i}}\right) \tag{23}$$

pour les cultures en bioréacteurs,

$$f2_i = \left(1 - \frac{r_{H_2O} \cdot t_i}{V_{L_0}}\right)\left(1 + \frac{V_{alimenté}\Big|_{t_{i-1}}^{t_i}}{V_{L,i-1}}\right) \tag{24}$$

où le volume des cultures correspond à

$$V_{L,i} = V_{L,i-1} - V_{\text{échantillon},i} + V_{alimenté}\Big|_{t_{i-1}}^{t_i} - r_{H_2O}\left(t_i - t_{i-1}\right). \tag{25}$$

Les courbes de suivi des cultures présentent le volume réel des cultures, décrit par l'équation 25, ainsi que la progression du volume de culture tel qu'il est subi par les cultures (en ne considérant pas les prélèvements d'échantillons homogènes) suivant la relation :

$$V_{L,i} = V_{L,i-1} + V_{alimenté}\Big|_{t_{i-1}}^{t_i} - r_{H_2O}\left(t_i - t_{i-1}\right), \tag{26}$$

Ainsi, toutes les courbes de croissance et d'assimilation de nutriments sont présentées en termes de concentrations par rapport au volume initial des cultures et les comparaisons entre les comportements des cultures peuvent être faites directement.

3.2.2.2 Rendements

Des courbes typiques de consommation des nutriments du milieu de culture et de croissance de la biomasse sèche sont présentées à la figure 3.6. Deux des constituants du milieu de culture, les ions phosphate et ammonium, sont rapidement consommés par la biomasse. Les taux volumiques d'assimilation de ces nutriments sont suffisamment grands relativement à la fréquence d'échantillonnage de la majorité des cultures pour que ceux-ci, ainsi que les taux spécifiques d'assimilation, puissent être évaluées avec une précision raisonnable. L'ion PO_4 est littéralement pompé vers la vacuole pour être éventuellement utilisé comme transporteur d'électron et distribué lors de la division cellulaire. L'ion NH_4 est une source d'azote inorganique rapidement assimilable pour la formation des squelettes d'acides aminés essentiels à la fabrication des enzymes et protéines requis pour réamorcer le processus de division cellulaire.

Pour nos lignées de *V. vinifera*, l'autre source d'azote, l'ion nitrate, semble consommée régulièrement dès la disparition de l'ion ammonium du milieu de culture. Il est plausible que dans ce contexte les rendements globaux en biomasse sur les ions ammonium soient reliés au rendement en biomasse sur les ions nitrates.

Le saccharose est hydrolysé dans les 2 à 4 premiers jours de culture en glucose et en fructose. Le glucose est assimilé plus rapidement que le fructose, et la biomasse continue d'augmenter tant que les hydrates de carbone ne sont pas complètement consommés. Il s'avère que la méthode de mesure utilisée pour les hydrates de carbone mène à une surestimation systématique de la quantité totale d'hydrates de carbone dans le milieu de culture. Cette surestimation provient du recouvrement des pics de saccharose et de glucose en début de

culture. Dans ce contexte, le taux d'hydrolyse du saccharose a été assimilé au taux d'apparition du fructose au rapport des masses moléculaires près, selon la relation suivante :

$$q_h = \frac{q_{Frc}}{0,53}. \tag{27}$$

Le taux spécifique d'apparition du fructose a été calculé par différence, sur la base des mesures de concentration de fructose et biomasse sèche dans le milieu de culture et suivant l'hypothèse qu'en début de culture les cellules consomment préférentiellement le glucose plutôt que le fructose, avec l'équation :

$$q_{Frc} = \frac{(Frc_t - Frc_{t-1})}{(t - t_{t-1})} \cdot \frac{1}{(x_{MS})_{t-1}}. \tag{28}$$

En cuvée, les rendements globaux en biomasse sur les différents nutriments sont définis comme suit :

$$\overline{Y_{x/s}} = \frac{x_f - x_0}{s_0 - s_f} \tag{29}$$

si l'on a pris soin de présenter toutes les concentrations sur une même base volumique, ici le volume initial de la culture, et que des corrections ont été apportées pour compenser la concentration par évaporation. Afin de pouvoir mieux caractériser le comportement des cultures à des moments précis de leur déroulement, le concept de production de biomasse sèche par unité de nutriments consommés a été introduit :

$$\left(\frac{\Delta x}{\Delta s}\right)_t = \frac{x_t - x_0}{s_0 - s_t} \tag{30}$$

Les rendements apparents en biomasse sur les hydrates de carbone et l'azote, $Y_{x_{MS}/s}$ ont été évalués suivant la relation :

$$q_s = \frac{\mu}{Y_{x_{MS}/s}} + m_s \approx \frac{\mu}{Y_{x_{MS}/s}}, \tag{31}$$

qui, pour des cultures en cuvée, peut être approximée par :

$$x_{MS} = Y_{x_{MS}/s} \cdot s + Cl \tag{32}$$

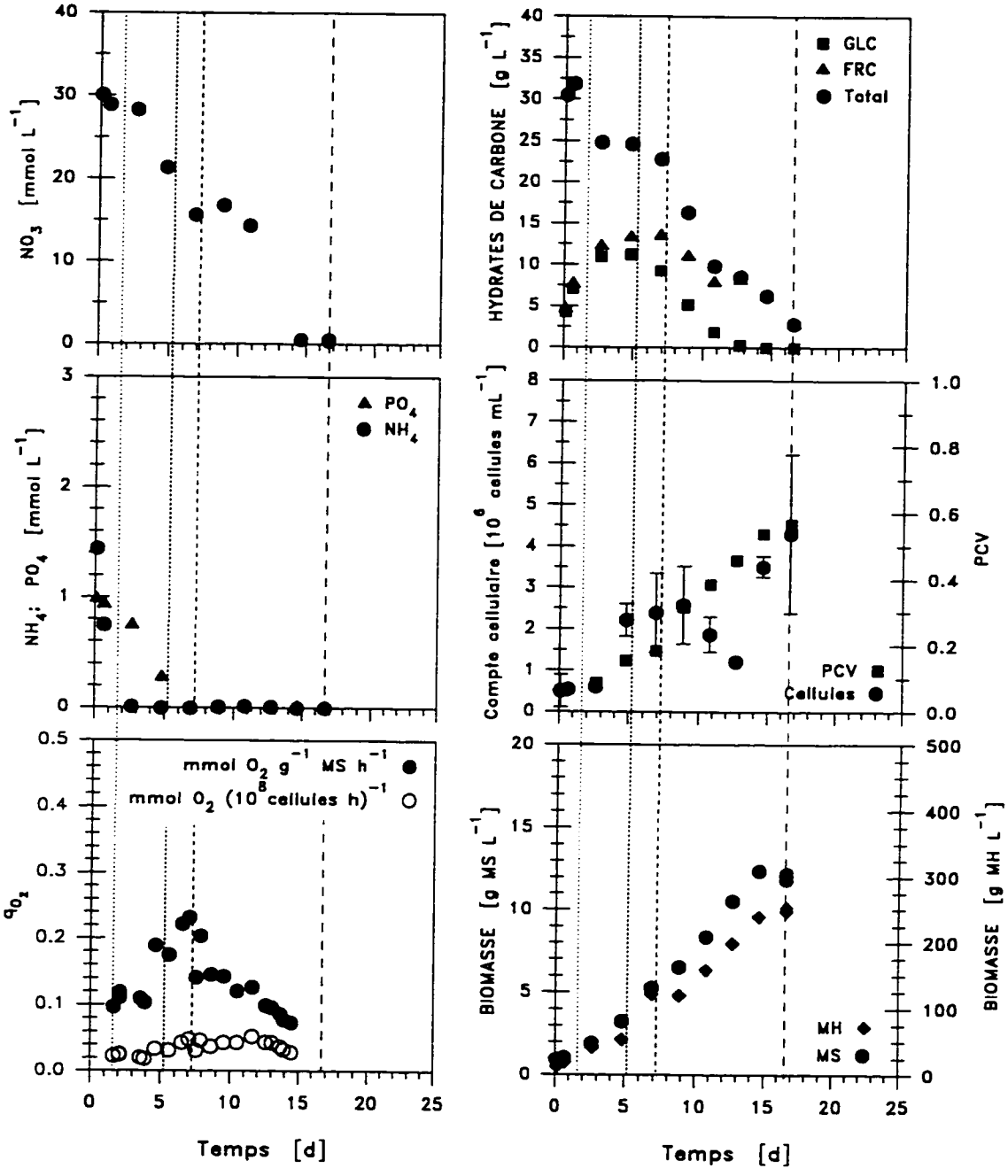


Figure 3.6 ***Courbes typiques de consommation des nutriments et de croissance de la biomasse d'une culture en cuvée effectuée dans le bioréacteur HRI-5L à 50% d'OD.*** *Lignée VVG111 sc20.*

L'équation 32 a été modifiée afin de pouvoir représenter sur une même base toutes les courbes de croissance et d'intégrer les ajouts ponctuels de milieu, noté ici s_{ajout}; toutes les concentrations étant rappelons-le, rapportées par rapport au volume initial des cultures pour tenir comptes des changements de volume occasionnés par l'évaporation et l'ajout de nutriments, lorsqu'il y avait lieu. Ainsi, on a redéfini :

$$x_{MS} - x_{MS_0} = Y_{x_{MS}/s} \cdot (s - s_{ajout}) + C2 \qquad (33)$$

3.2.2.3 Taux spécifiques de croissance

La croissance de la biomasse ou des cellules est schématisée par la relation suivante :

Substrats + Biomasse ⟶ **Biomasse** (34)

La génération de biomasse est un phénomène autocatalytique qui est mieux décrit par un taux spécifique de croissance qu'un taux volumétrique d'apparition de la biomasse. Formellement, le taux spécifique de croissance, μ, est défini par le taux d'augmentation de la biomasse par rapport à la biomasse initialement présente:

$$\mu = \frac{1}{X}\frac{dX}{dt}.$$

En cuvée le volume est constant et la définition du taux spécifique de croissance peut être exprimée par :

$$\mu = \frac{1}{x}\frac{dx}{dt}. \qquad (35)$$

Pour les cultures de cellules végétales, le taux spécifique de croissance est le plus souvent défini sur la base de l'augmentation de la biomasse sèche et est représenté par la relation :

$$\mu = \mu_{max} \prod_{n=1}^{n} \frac{s_n}{K_n + s_n}. \qquad (36)$$

En fait, en cuvée, l'évolution du taux spécifique de croissance avec les changements graduels de concentration des nutriments disponibles représente la principale difficulté d'interprétation des

résultats de cultures. De plus, la tendance à croître en amas des cellules végétales impose des échantillonnages relativement volumineux, ce qui limite leur fréquence à l'échelle laboratoire. La difficulté d'évaluer le terme dérivatif étant donné le nombre restreint de données expérimentales et les changements constants de l'environnement des cultures, a entraîné l'utilisation de plusieurs variantes du taux spécifique de croissance.

L'analyse des performances des cultures en cuvée effectuées à diverses concentrations d'OD a été faite sur la base du taux spécifique global de croissance moyen de la biomasse sèche, $\overline{\mu}$. Celui-ci représente l'augmentation de la biomasse au cours d'une culture en cuvée par rapport à la concentration initiale de biomasse. Le taux spécifique global est défini par la relation

$$\overline{\mu} = \overline{\mu}\Big|_{t_{x_0}}^{t_{x_{max}}} = \frac{\ln(x_{max}) - \ln(x_0)}{t_{x_{max}} - t_0} \tag{37}$$

L'épuisement progressif des nutriments essentiels à la croissance fait en sorte que l'on s'attend à ce que le μ diminue dans le temps. Par conséquent, pour chacune des cultures effectuées à concentration d'OD constante, les taux de croissance rapportés reflètent la portion exponentielle initiale des courbes de biomasse sèche.

Au cours de l'interprétation des résultats, nous recourrons à une extension de cette relation en définissant un taux spécifique global de croissance évalué au moment où la culture présente un taux volumique d'assimilation d'oxygène maximal. Dans ce cas, on a :

$$\overline{\mu}_{OUR} = \overline{\mu}\Big|_{t_{x_0}}^{t_{OUR_{max}}} = \frac{\ln(x_{OUR_{max}}) - \ln(x_0)}{t_{OUR_{max}} - t_0}. \tag{38}$$

3.2.2.4 Taux spécifique d'assimilation d'oxygène

Les mesures du taux volumique d'assimilation d'O_2, OUR, ont été transformées en estimés du taux spécifique d'assimilation d'O_2, $(q_{O_2})_{MS}$, en utilisant des valeurs de biomasse sèche au moment des mesures de l'OUR, obtenues par un lissage des données expérimentales, tel que :

$$\left(q_{O_2}\right)_{MS} = \frac{OUR_{mesuré}}{x_{MS_{lissé}}} \tag{39}$$

Comme la variation de la concentration de biomasse dans le temps n'est pas utilisée, le type d'équation choisi pour l'interpolation des valeurs de x correspondant au temps d'échantillonnage d'OUR ne revêt pas une grande importance. Pour la série de cultures effectuées avec la lignée VVG12, les courbes de croissance ont été modélisées par des polynômes. Pour la série de cultures effectuées avec les lignées VVG105 et VVG111, les courbes de croissance ont été modélisées par une courbe logistique définie par

$$\frac{dx}{dt} = \mu_{max} \cdot x\left(1 - \frac{x}{x_{max}}\right) \tag{40}$$

Ainsi définie, la courbe de x en fonction de t possède un point d'inflexion à $x_{max}/2$ (correspondant à t_I) et a pour solution

$$x_{MS_{lissé}} = \frac{x_{max}}{1 + \left(\frac{x_{max} - x_0}{x_0}\right)\exp\left(-\mu_{max}\left(t - t_0\right)\right)}. \tag{41}$$

x_{max} a été fixé en choisissant t_I au moment où OUR est maximal. Ainsi,

$$t_I = \frac{1}{\mu_{max}} \ln\left(\frac{x_{max} - x_0}{x_{max}}\right) + t_0 \tag{42}$$

et

$$x_{max} = \frac{x_0}{1 - \exp\left(\mu_{max}\left(t_I - t_0\right)\right)}, \tag{43}$$

et μ_{max} est évalué en minimisant la somme des carrés des erreurs sur les estimés de concentration de biomasse sèche évalués selon l'équation 41. La figure 3.7 présente un exemple de représentation d'une courbe de croissance de la biomasse selon ce modèle. Les taux spécifiques de respiration sont calculés à partir des mesures d'OUR et des estimés de $(x_{MS})_{lissé}$ selon l'équation 39.

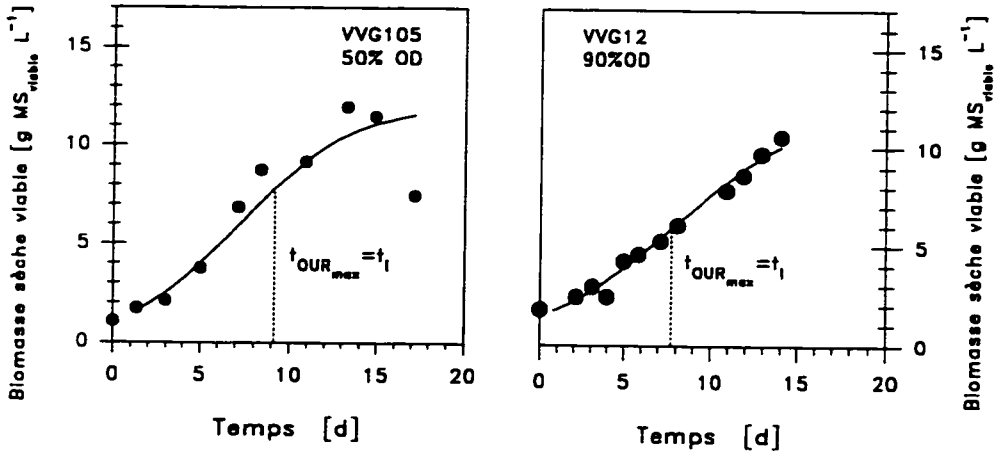


Figure 3.7 Représentation d'une courbe typique de croissance de la biomasse sèche par un modèle logistique où le point d'inflexion correspond à t_{OURmax}.

Une opération similaire a été effectuée pour évaluer $(q_{O_2})_{cell}$. Pour ce faire, les courbes de prolifération cellulaires ont été représentées mathématiquement par une courbe exponentielle.

Sur la base des valeurs de q_{O_2} obtenues et des μ utilisés, nous avons tenté de relier plus directement les taux spécifiques d'assimilation d'O_2 au taux spécifique de croissance en μ selon l'équation (35). Les représentations graphiques de q_{O_2} en fonction de μ sont présentées aux annexes 2 et 4.

3.2.2.5 Estimés des concentrations de CO_2 dans le milieu

Afin de comparer les cultures effectuées en flacons agités et en bioréacteurs HRI sur la base du plus grand nombre de paramètres, les concentrations de CO_2 dissous dans le milieu de culture ont été estimées sur la base de bilans de masse. Ces estimés éclaireront les comparaisons entre le comportement des cuvées effectuées dans les deux systèmes de culture en absence de mesures de concentration de CO_2 dans le milieu.

Dans le milieu de culture, le bilan de masse sur un composé volatil est similaire au bilan de masse sur l'oxygène :

$$\frac{dOD}{dt} = k_L a \cdot \left(\frac{p_{O_2}}{H_{O_2} \cdot R \cdot T} - OD \right) - OUR = OTR - OUR \qquad (44)$$

Pour l'oxygène, considérant en parallèle un bilan de masse dans la phase gazeuse (équation 15), un régime pseudo-permanent, une phase gazeuse parfaitement mélangée et une pression constante de 1 atm, on obtient :

$$OD = \frac{p_{O_2}}{H_{O_2} \cdot R \cdot T} - \frac{OUR}{k_L a}, \qquad (45)$$

et

$$p_{O_2} = (p_{O_2})_0 - OUR \cdot \frac{V_L \cdot R \cdot T}{K}. \qquad (46)$$

Substituant l'équation 46 dans l'équation 45, on trouve que la concentration d'OD est fixée principalement par l'OUR et les taux de transfert du système de culture selon la relation :

$$OD = \frac{(p_{O_2})_0}{H_{O_2} \cdot R \cdot T} + OUR \left(\frac{V_L}{K \cdot H_{O_2}} + \frac{1}{k_L a} \right) \qquad (47)$$

En bioréacteur, K est remplacé par F_g, le débit gazeux. Pour l'oxygène, la constante de Henry est de 32 mol mol^{-1}. Considérant les valeurs usuelles de V_L, de K et du taux volumique unitaire d'aération (F_g/V_L), le terme dominant affectant l'OUR dans l'équation 47 est $k_L a^{-1}$.

Pour le CO_2, la situation est potentiellement plus complexe. En effet, le CO_2 peut se trouver sous quatre formes dépendamment des conditions de pH du milieu : CO_2, H_2CO_3, HCO_3^- et $CO_3^=$ selon les conditions d'équilibre des réactions :

Cellules

⋮ *CPR*

$$p_{CO_2} \leftrightarrow [CO_2]_L \underset{k_2}{\overset{k_1}{\leftrightarrow}} H_2CO_3 \overset{K_1}{\leftrightarrow} H^+ + HCO_3^- \overset{K_2}{\leftrightarrow} H^+ + CO_3^=$$

⋮ *CTR*

À 25°C, $k_1 = 0{,}03\ s^{-1}$ et $k_2 = 20\ s^{-1}$.[11] La formation du H_2CO_3 est donc une réaction relativement lente, bien qu'elle soit rapide relativement aux taux de transfert et de production en cause dans les cultures de cellules végétales. À l'équilibre, la concentration de H_2CO_3 ne représente cependant que 0,0015 fois la concentration de CO_2 et est donc négligeable. Comparativement, la formation des ions bicarbonate et carbonate est très rapide. Les constantes d'équilibre sont les suivantes : [11,17]

$$K_1 = \frac{10^{-pH} \cdot [HCO_3^-]}{[CO_2] + [H_2CO_3]} = 10^{-6,3}\,M\,(25°C) \tag{48}$$

$$K_2 = \frac{10^{-pH} \cdot [CO_3^=]}{[HCO_3^-]} = 10^{-10,25}\,M\,(25°C) \tag{49}$$

Au pH typique des cultures de cellules végétales et plus particulièrement pour les cultures en cuvée de *V. vinifera* dont le pH atteint rarement plus de 6,3 en fin de culture, les ions carbonates sont pratiquement inexistants. Le bilan de masse sur le CO_2 pour un pH inférieur à 8,0 est le suivant :

$$\frac{d[CO_2]}{dt} + \frac{d[HCO_3^-]}{dt} = (k_L a)_{CO_2} \cdot \left(\frac{p_{CO_2}}{H_{CO_2} \cdot R \cdot T} - [CO_2] \right) + CPR. \tag{50}$$

À l'équilibre, l'équation (49) indique que la concentration d'ion bicarbonate, elle, sera dix fois supérieure à celle du CO_2 à pH 7,3, mais égale à pH 6,3 et réduite à 5% de la concentration de CO_2 à pH 5. La concentration de HCO_3^- atteinte en fin de culture alors que le pH atteint 6 à 6,5, représente donc peu par rapport au CO_2 produit pendant la culture et continuellement transféré au gaz d'aération. En fait, considérer l'équilibre CO_2-HCO_3^- lorsque le pH du milieu est inférieur à 6,5 et qu'il évolue à un taux de $0{,}05\ h^{-1}$, corrige l'estimé de la concentration de CO_2 dissous obtenu d'un bilan sur le CO_2 de 5% au maximum. Hormis les situations de contrôle de pH dans lesquelles celui-ci peut fluctuer rapidement et faire varier la concentration de CO_2 dissous et la pression partielle de CO_2, [133] le taux de transfert de CO_2, CTR, n'est pas influencé significativement par les conditions de pH des cultures de cellules de plantes et peut être

assimilé au taux de production de CO_2, CPR. De plus, comme les réactions biologiques impliquées sont lentes par rapport à la capacité de transfert, on considérera, comme pour l'oxygène, un régime pseudo-permanent. Le bilan global sur le CO_2 dans le liquide (Équation 50) se réduit donc simplement à :

$$\frac{d[CO_2]_L}{dt} = k_L^{CO_2}a \cdot \left(\frac{p_{CO_2}}{H_{CO_2} \cdot R \cdot T} - [CO_2]_L \right) + CPR = CTR + CPR. \qquad (51)$$

Considérant le bilan de masse dans la phase gazeuse défini plus haut (équation 16), un régime pseudo-permanent et une pression constante de 1 atm, on obtient :

$$[CO_2]_L = \frac{p_{CO_2}}{H_{CO_2} \cdot R \cdot T} + \frac{CPR}{k_L^{CO_2}a} \qquad (52)$$

et

$$p_{CO_2} = (p_{CO_2})_0 + CPR \cdot \frac{V_L \cdot R \cdot T}{K}, \qquad (53)$$

Lorsque des mesures de la production de CO_2 sont disponibles, la concentration de CO_2 dans les bioréacteurs est obtenue en substituant l'équation 53 dans l'équation 52 pour obtenir :

$$[CO_2]_L = \frac{(p_{CO_2})_0}{H_{CO_2} \cdot R \cdot T} + CER\left(\frac{V_L}{F_g \cdot H_{CO_2}} + \frac{1}{k_L^{CO_2}a} \right). \qquad (54)$$

Chez *Catharanthus roseus*, les coefficients respiratoires rapportés dans la littérature, RQ = CPR/OUR, varient en moyenne de 0,8 à 1,3.[127,164] En fixant le coefficient respiratoire RQ égal à 1, il est possible de comparer les conditions de cultures en bioréacteur HRI et en flacon agité en termes de concentrations de CO_2 par les relations :

$$[CO_2]_L = \frac{(p_{CO_2})_0}{H_{CO_2} \cdot R \cdot T} + OUR\left(\frac{V_L}{F_g \cdot H_{CO_2}} + \frac{1}{k_L^{CO_2}a} \right), \text{ et} \qquad (55)$$

$$[CO_2]_L = \frac{(p_{CO_2})_0}{H_{CO_2} \cdot R \cdot T} + OUR\left(\frac{V_L}{K \cdot H_{CO_2}} + \frac{1}{k_L^{CO_2}a} \right) \qquad (56)$$

pour le bioréacteur et le flacon agité, respectivement. Pour le CO_2, la constante de Henry à 25°C est de 1,21 mol mol^{-1} et, dépendamment des conditions de culture, les deux termes affectant l'OUR (ou le CER) peuvent être significatifs tant pour le réacteur HRI aéré par la surface que pour les flacons agités.

3.2.2.5.1 Estimés du contenu en carbone de la biomasse

La quantité totale de CO_2 produite peut être utilisée conjointement avec les quantités totales d'hydrates de carbone consommées et de biomasse produite, pour estimer le contenu en carbone de la biomasse selon la relation :

$$C-MS_{estimé} = \frac{C_{consommé} - C_{produit}}{\text{biomasse produite}} \tag{57}$$

où chacun les trois variables de l'équation (57) sont respectivement,

$$C_{consommé} = \left(\left([CH_2O]_0 - [CH_2O]_f\right) V_{L,0} + \left([CH_2O]_{alim} \cdot V_{L,alim}\right)\right)(1-\alpha) \cdot \frac{6\,C-mol}{180\,g\,CH_2O} \cdot \frac{12\,g\,C}{C-mol} \tag{58}$$

où α représente la portion des hydrates de carbone sécrétés dans le milieu sous forme de polysaccharides qui pourrait atteindre 8% [164,165] à 20%; [35]

$$C_{produit} = \sum_{t=0}^{t=t_f} \frac{0{,}5 \cdot \left(\left(p_{CO_2}\right)_{i+1} + \left(p_{CO_2}\right)_i\right) \cdot 0{,}5 \cdot \left(V_{L,i+1} + V_{L,i}\right)}{RT\left(t_{i+1} - t_i\right)} \cdot \frac{12\,g\,C}{mmol\,CO_2}, \text{ et} \tag{59}$$

$$\text{biomasse produite} = \left(x_{MS,f} - x_{MS,0}\right) V_{L,0}. \tag{60}$$

3.2.2.5.2 Estimés de RQ moyen sans mesures de CTR

À l'inverse, en absence de mesures de CO_2, des estimés des valeurs moyennes du coefficient respiratoire ont été obtenus en considérant d'une part la quantité de carbone provenant de la consommation des hydrates de carbones non incorporée à la biomasse et, d'autre part, la quantité totale d'oxygène consommée. Ainsi,

$$\overline{RQ} = \frac{(C\text{-mole})_{consommé} - (C\text{-mole})_{assimilé}}{(O_2)_{assimilé}} \tag{61}$$

et pour les cultures en cuvée l'équation (61) devient

$$\overline{RQ} = \frac{\left(\left([CH_2O]_0 - [CH_2O]_f\right) V_{L,0}(1-\alpha)\frac{6C-mol}{180g\,CH_2O}\right) - \left(\left(x_{MS,f} - x_{MS,0}\right) V_{L,0}\,\frac{\%\frac{gC}{gMS}}{100}\cdot\frac{1C-mol}{12gC}\right)}{\sum_{t=0}^{t=t_f}\frac{0,5\cdot\left(OUR_{i+1}+OUR_i\right)\cdot 0,5\cdot\left(V_{L,i+1}+V_{L,i}\right)}{\left(t_{i+1}-t_i\right)}}$$

(62)

La proportion de carbone assimilé à la biomasse n'ayant pas été mesurée, $\overline{RQ}$ doit être évalué en substituant dans l'équation (62) des données de la littérature pour le pourcentage de carbone intégré à la biomasse, celles-ci variant de 35% à 41%. [158,165]

Finalement, de façon accessoire et pour le bénéfice du groupe de recherche, le travail d'analyse préliminaire qui a été effectué dans le cadre d'une tentative de valorisation de mesures de pression partielle de CO_2 dans le gaz effectuées avec un appareil de démonstration qui s'est avéré mal adapté à notre besoin est présenté à l'annexe 5.

4. CULTURES EN SUSPENSION EN FLACONS AGITÉS DE CELLULES DE *Vitis vinifera*[a]

[a] Reproduisant un article publié dans la revue *Biotechnology and Bioengineering*, 47 : 131-138 (1995).

GROWTH KINETICS OF *Vitis vinifera* CELL SUSPENSION CULTURES : I. SHAKE FLASK CULTURES

Marie-France Pépin, [1] Jean Archambault, [1,2,a] Claude Chavarie, [1,b] and François Cormier [3,c]

[1] BIOPRO R & D Centre, Chemical Engineering Department, École Polytechnique de Montréal, P. O. Box 6079 Centre-Ville Station, Montréal (Québec), Canada, H3C 3A7

[2] Engineering Department, Université du Québec à Trois-Rivières, P. O. Box 500, Trois-Rivières (Québec), Canada, G9A 5H7

[3] Food Research and Development Centre, Agriculture Canada, 3600 Casavant Boulevard W., Saint-Hyacinthe (Québec), Canada, J2S 8E3

Received November 28, 94; Accepted February 13, 1995

---

[a] pour son apport significatif au niveau scientifique et à titre de co-directeur de recherche et de directeur scientifique du projet pour BIOPRO.

[b] à titre de directeur de recherche

[c] à titre de directeur scientifique du projet pour le CRDA

4.1 SOMMAIRE

La progression de la croissance de la biomasse et la division cellulaire de cultures en flacons agités de cellules de *Vitis vinifera* est mis en relation avec la consommation des hydrates de carbones, des ions NH_4, NO_3, PO_4, et l'assimilation de l'oxygène dissous (OD). Le taux volumique d'assimilation d'oxygène des cultures dérivé des mesures en ligne d'OD a cru graduellement jusqu'à une valeur de 3.8 mmol O_2 L^{-1} h^{-1} entre l'inoculation et le 7ième jour de culture, moment où un plafonnement de la division cellulaire a été observé et où la concentration d'OD atteignait un minimum à 17% (par rapport à la saturation de l'air dans l'eau). Durant cette première phase de croissance, le taux spécifique d'assimilation d'oxygène est demeuré constant à ~0.6 mmol O_2 g^{-1} MS h^{-1} ou ~2.2 µmol O_2 $(10^6 cells)^{-1}$ h^{-1} pendant que la biomasses augmentait exponentiellement de 1,5 à 6,0 g MS L^{-1}. À compter de ce moment, la concentration de biomasse sèche a augmenté linéairement pour atteindre ~14 g MS L^{-1} au 14ième jour de culture au moment de l'épuisement du milieu de culture en ions nitrate et en hydrates de carbone. Une inflexion des courbes de concentration de la biomasse, tant humide que sèche, et du volume de cellules centrifugé coïncide avec le début de cette seconde phase de croissance pendant laquelle le ratio de masse humide sur masse sèche a augmenté dans une relation inverse avec la pression osmotique estimée du milieu de culture. De plus, les courbes de croissance et de consommation des nutriments suggèrent que la limitation de la division cellulaire pourrait être reliés à l'épuisement rapide du milieu de culture en ammonium et en ions phosphate. Ces résultats indiquent que pour les cultures de cellules végétales, la division cellulaire n'est pas toujours directement associée à la production de biomasse, ce qui ouvre de nouvelles avenues en ce qui concerne le choix de l'indicateur à optimiser pour améliorer la productivité des cultures.

4.2 ABSTRACT

Vitis vinifera cell suspension cultures carried out in shake flasks were closely examined for biomass growth and cell division in relation to carbohydrate, NH_4, NO_3, PO_4, and dissolved oxygen (DO) consumption. After inoculation, the oxygen uptake rate of the cultures measured on-line was observed to increase continuously to a maximum value of 3.8 mmol O_2 L^{-1} h^{-1} at day 7 when cell division ceased and dissolved oxygen concentration reached its lowest level of 17% air saturation. During this first phase of growth, the specific oxygen uptake rate remained constant at ~0.6 mmol O_2 g^{-1} dw h^{-1} or ~2.2 µmol O_2 $(10^6 cells)^{-1}$ h^{-1}, whereas dry biomass concentration increased exponentially from 1.5 to 6.0 g de L^{-1}. Thereafter, dry biomass concentration increased linearly to ~14 g dw L^{-1} at day 14 following nitrate and carbohydrate uptake. During this second phase of growth, the biomass wet-to-dry weight ratio was found to increase in an inverse relationship with the estimated osmotic pressure of the culture medium. This corresponded to inflection points in the dry and wet biomass concentration and packed cell volume curves. Furthermore, growth and nutrient uptake results suggest that extracellular ammonium or phosphate ions availability may limit cell division. These findings indicate that cell division and biomass production of plant cell cultures may not always be completely associated, which suggests important new avenues to improve their productivity.

© 1995 John Wiley & Sons, Inc.

Key words. *Vitis vinifera*, plant cell culture, nutrients, cell division, growth, oxygen consumption, anthocyanins.

4.3 INTRODUCTION

Plant cell culture offers interesting possibilities for the large scale production of pharmaceuticals, food additives, and somatic embryos. However, knowledge about the effect of the physicochemical environment on plant cell behavior is still limited, and the low productivities usually obtained compromise bioprocess profitability.

Until now, the development of plant cell bioprocesses has been carried out in sequential steps, from cell line selection to secondary metabolite production and from static solid to agitated liquid shake flask and bioreactor cultures. Plant species are chosen for their economic potential. Cell lines are selected from calli and grown in suspension cultures using standard media, usually Gamborg's B5[55] or MS. [106] For practical reasons, cell lines are generally maintained by subculturing every 1 or 2 weeks. The formulation of growth media, usually developed from shake flask factorial experiments, is aimed at maximizing growth index [final-to-initial dry biomass ratio $(x_f/x_0)_{dw}$], for a given culture duration. [176] The shake flask remains the reference culture system. Its main advantages are its low mixing shear and simplicity. However, even though the specific oxygen uptake rate (q_{O_2}) of plant cells is relatively low, ranging from 0.2 to 1.0 mmol O_2 g^{-1} dw h^{-1}, [42,150,158,164] shake flask cultures may be oxygen limited due to their low gas transfer coefficient ($k_La \sim 3$ to 20 h^{-1}). [82,150] Nevertheless, for medium formulation and first productivity experiments, dissolved oxygen (DO) concentration is usually assumed adequate and the biomass obtained after a fixed period of time is believed representative of good growth. Furthermore, secondary metabolite production is often induced by physicochemical stress, generally leading to specific production medium formulations, [39,52,62,176] or pH and temperature shocks. [10] Unfortunately, the metabolic state of these cultures until product induction is usually neglected and not optimized, thus limiting the reproducibility and productivity of the process and the understanding of the biosystem studied.

This approach is stillinadequate to achieve high productivities. This biological system remains poorly understood, most difficulties arising from its multicomponent complex kinetics.

Molecular biology and biochemistry can provide valuable information on essential aspects involved in secondary metabolite biosynthesis through the analysis of precursors, key enzymes, and transport mechanisms. Biochemical engineering studies, on the other hand, focus on mixing shear and gas transfer problems, their relations with the mechanical aspects of the bioreactor used, and on main nutritional requirements. The combination of both approaches should lead to a better understanding of plant cell behavior and interactions between growth and secondary metabolites production, thus allowing the development of improved production protocols.

The most extensively studied plant cell species are *Nicotiana tabacum*, [144] for ease of growth and simple quantification of its secondary metabolites, and *Catharanthus roseus*, [112] for the high economic value of dimer indole alkaloids. The plant cell species *Vitis vinifera* represents an interesting source of anthocyanins, a potential substitute for toxic synthetic food colorants. [152] Compared to the high value of other plant secondary metabolites, anthocyanins have a low commercial value (~$6 to 10 L^{-1} of a 1% concentrate) but a large estimated annual market (~$50 M). [70,93] Moreover, anthocyanins are flavonoids for which the biochemical pathways are well known. [22,26] Their chromophoric structure facilitates cell line selection and monitoring through routine selection and subculturing. [41,145] Their easy quantification simplifies the collection of production data. High performance liquid chromatography (HPLC) separation techniques have been developed to identify and quantify specific anthocyanins. [37,53] Considering these advantages, *V. vinifera* represents a valuable biological model for bioengineering studies of a plant cell culture bioprocess.

Induction of high anthocyanin production is generally obtained following an osmolarity rise [39] or as a consequence of a low initial nitrate concentration [39,177] of the culture medium. Because culture conditions promoting anthocyanin production are usually detrimental to growth, an efficient bioprocess would operate in two stages, first for biomass growth and then for anthocyanin production. [145] Initially, we had some success in increasing the productivity of *V. vinifera* cell cultures through intensive cell line selection and development of production media. [36,39] Further improvements in productivity for eventual industrial production, however,

could not be achieved using the conventional approach described above. Consequently, subsequent research efforts were concentrated on the growth stage of this bioprocess to gain a better understanding of this biological system, to characterize its growth behavior for eventual optimal induction of anthocyanin production for highest productivity, and to minimize scale-up problems.

This report presents the first part of an extensive study on the growth kinetics of *V. vinifera* cell suspension cultures. The growth of shake flask suspension cultures is characterized in relation to main nutrient needs, including measured on-line dissolved oxygen concentration. Subsequently, DO-controlled cultures carried out in a helical ribbon impeller bioreactor, which was found highly efficient for plant cell suspension culture, [74,76] will be similarly characterized. In the third study, it will be shown how these results and further nutritional studies yielded an original approach to improve significantly the growth of these cultures.

4.4 MATERIAL AND METHODS

4.4.1 Plant Cell Line and Suspension Cultures

Vitis vinifera cell line VVG111 of the variety L. cv Gamay fréaux was developed as previously described. [109] Suspension cultures were maintained in the dark in 500-mL large-mouth Erlenmeyer flasks enclosed with cotton plugs and containing 100 mL B5 medium supplemented with 0.1 mg L^{-1} α-naphthaleneacetic acid (NAA), 0.2 mg L^{-1} kinetin (K), and 30 g L^{-1} sucrose. The pH of this medium was adjusted to 5.8 with 0.1 N KOH before sterilization (30 min, 121°C, 1 bar). The inoculum size was adjusted from 10 to 15% (v/v) to insure a 1.5 to 2 g L^{-1} initial dry biomass concentration for all cultures. Cultures were transferred weekly, maintained at 25°C, and agitated at 115 rpm. For all experiments, eight flasks were inoculated. Two or more flasks were sampled every day or every other day, as required, in rotation.

4.4.2 Dissolved Oxygen Concentration and Gas Transfer Coefficient Measurements

The dissolved oxygen (DO) concentration was continuously monitored using an Ingold polarographic electrode inserted through the cotton plug anchored to the flask neck and dipping in the suspension culture. After steam sterilization, the probe was calibrated at operating conditions in water with nitrogen and air before each experiment.

Since the diffusivity of O_2 in the cotton plug is ~80% of that in air,[59] the main resistance to gas transfer in the flask is the gas-liquid interface. The resulting oxygen transfer coefficient (k_La) was calculated from the rate of DO concentration recovery from air after nitrogen degassing of the liquid phase and rapid initial purging of the gas phase with air using a silicone tube inserted into the cotton plug. The measured oxygen transfer coefficient between the head space gas and the liquid phase for the shake flask system used was 18 h^{-1} ± 0.3 (standard deviation) (n=3).

Because growth and oxygen uptake rates (OUR) are low for plant cell cultures, pseudo steady-state behavior can be assumed between the oxygen partial pressure in ambient air, flask head space, and liquid phase. Therefore, if the variation of DO concentration is neglected, the oxygen mass balance of this culture process reduces to Eqs. 2 and 63 whereby the oxygen transfer rate (OTR) equals OUR for the culture.

$$\frac{dDO}{dt} \approx 0 \approx OTR - OUR \tag{2}$$

$$OTR = k_La\left(DO^* - DO\right) \approx q_{O_2}x = OUR \tag{63}$$

Considering a critical DO concentration (DO_c) below which no growth occurs and viability is questionable, the maximum effective OTR for growth of the flask system is given by Eq. (64).

$$OTR_{max} = k_La\left(DO^* - DO_c\right) \tag{64}$$

Minimum DO_c levels of 0.04 mmol L^{-1} and 0.025 to 0.095 mmol L^{-1} have been reported for *D. carota*[79] and *C. roseus*[112,135,157] cell cultures, respectively. Assuming this DO_c range to be valid for *V. vinifera* suspension cultures, the maximum expected OTR of the flask system used in this study is of the order of 2.8 to 4.1 mmol L^{-1}. This OTR_{max} lies within the range of typical OUR values reported for growing plant cell cultures, which vary from 0.1 to 4.0 mmol $L^{-1} h^{-1}$.[42,82,150,158,164] Consequently, DO concentration may not be limiting for shake flask cultured plant cells, except for species of higher oxygen uptake rates or for stressed cell cultures (unpublished results).

4.4.3 Analytical

Cell number was measured using a Fusch-Rosenthal hemacytometer after dissociation of cell aggregates from a 1-mL suspension sample with 2 mL of a 10% (w/v) chromium trioxide solution at 60°C for 60 min.[36] Cell viability was assayed after coloration with a solution of 5 g fluorescein diacetate dissolved in 1 L acetone.[75] Biomass wet (ww) and dry weight (dw) concentrations, and packed cell volume (PCV) were measured as described previously.[115] The anthocyanin content of filtered wet biomass samples (~ 100 mg) was determined by extraction with 10 mL acidic ethanol (15:85 solution of 1% HCl and ethanol) for 24 hours at 4°C. The optical density of the extract was measured at 535 nm. Absorbance measurements were converted to cyanidin-3-monoglucoside concentrations (MW of 445.2) using a molar extinction coefficient of $\log \varepsilon_{1cm} = 4.47$.[1]

The pH and conductivity of the medium were measured using Orion pH and ATC Conductivity probes. Extracellular carbohydrates concentration was determined by HPLC (pump model 6000A from Waters, automatic injector model 231/401 from Gilson, refractive index detector model 132 from Gilson, block heater model 7980 from Mandel Technology, and integrator model 3394A from Hewlett-Packard). Separation was achieved using a Biorad Aminex Carbohydrate HPX-87C column maintained at 80°C. The mobile phase was water flowing at 1.0 mL min^{-1} (50 to 70 bars). Nitrate, ammonium, and inorganic phosphate ion concentrations

were measured as previously described.[115] All concentrations were corrected for water evaporation and wet biomass volume, and, consequently, are reported on the basis of the initial culture volume.

4.5 RESULTS AND DISCUSSION

4.5.1 Growth in Shake Flask

Much can be gained in understanding the basic growth behavior of plant cell cultures in studying their nutrient uptake patterns. Typical curves of biomass growth, cell count, and viability of *V. vinifera* cell suspension cultures of line VVG111 grown in regular B5 are presented in Figure 4.1. Corresponding nutrient consumption as well as anthocyanin production, DO concentration, and medium pH and conductivity curves are shown in Figures 4.2 to 4.3. Similar patterns were obtained for three consecutive experiments.

An increase in cell debris was observed during the first 2 days of all cultures, suggesting that a significant change in the chemical environment may be detrimental to *V. vinifera* plant cells. As seen in Figures 4.1 and 4.2, viability remained high (90 to 99%) until completion of carbohydrate uptake at ~day 15. Depending on inoculum viability, the mean cell viability varied from 75 to 92%. After day 15, viability declined rapidly likely as a result of a multiplicity of factors including the exhaustion of readily usable carbohydrates from the culture, because *V. vinifera* cells do not accumulate carbohydrates in the form of starch granules as confirmed by microscopic observation (un-published results), and the release of toxic phenolic compounds (see below). However, this occured without apparent extensive cell lysis, as no PO_4 nor NH_4 release was observed by day 16 (Fig. 4.2).[97] Similar declines in viability upon exhaustion of extracellular carbohydrates have been seen for cell cultures of various Papaver species[7] (and other unpublished results) which also showed no accumulation of carbohydrates in the form of starch granules.

In all cases, high cell division was observed up to days 5 to 7. Thereafter, cell division stopped while wet and dry biomass concentration, and packed cell volume increased further. Cell-specific dry weight remained constant until cell division stopped, and wet weight : dry weight (ww/dw) ratio increased with time afterward (Fig. 4.1). Few studies have been published on this aspect of plant cell culture growth. Pareilleux and Vinas[112] noticed parallel increases of dry biomass concentration and cell division for *C. roseus* cell suspension cultures. Consequently, it appears that biomass concentration, which is widely used in this field to assess growth, may not be fully representative of the effective growth of plant cell cultures.

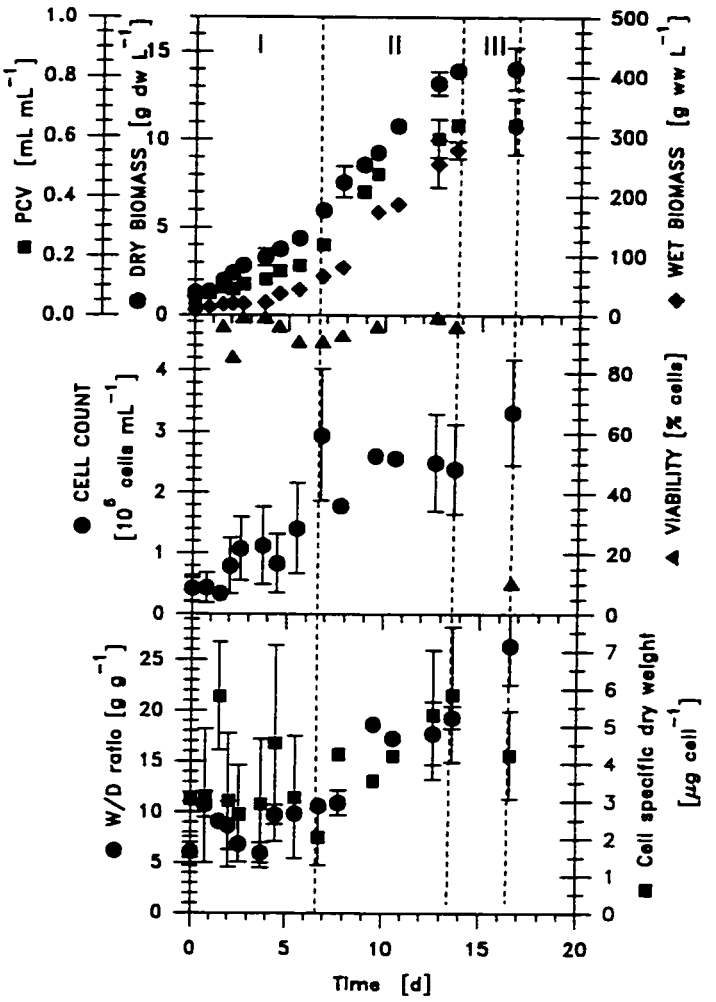


Figure 4.1 Growth of V. vinifera cells cultured in 500 mL shake flasks.
(Error bars represent standard deviation from the mean)
(Part I, II and III delimited by changes in DO concentration curve)

The selection of a growth indicator should be supported by well-defined growth curves. This is especially important when developing two-phase bioprocesses whereby the main goal of the growth phase remains the fastest production of the largest quantity of highly viable cells to yield the highest specific and total productivity during the later stage.

Nutrient consumption curves show that sucrose was hydrolyzed within 2 to 3 days (Fig. 4.2) at a specific rate of 7.2 ± 1.1 g sucrose g^{-1} dw d^{-1} ($n = 3$). Ammonium and phosphate ions were taken up within 4 days (Fig. 4.2). The delay between NH_4 and PO_4 depletion and cell count leveling (Fig. 4.1) suggests that phosphate is accumulated and redistributed through cell division. The pH of the medium fell from 5.1 at inoculation to 4.6 within a day as a result of H^+/NH_4^+ exchange upon ammonium uptake,[147] and increased thereafter up to 6 reflecting a change from ammonium to nitrate utilization.[160] As expected, the conductivity of the medium, which is related to the concentration of the major ions, NO_3 and K closely followed NO_3 concentration after a rapid early decrease, which can be attributed to rapid uptake of NH_4 and PO_4 at the beginning of the culture. Cell division ceased before NO_3 and carbohydrate depletion even though biomass growth continued until simultaneous complete uptake of these nutrients. Overall, dry biomass yields on carbohydrates and nitrate were 0.48 ± 0.01 g g^{-1} and 0.48 ± 0.07 g $mmol^{-1}$, respectively, for the three experiments.

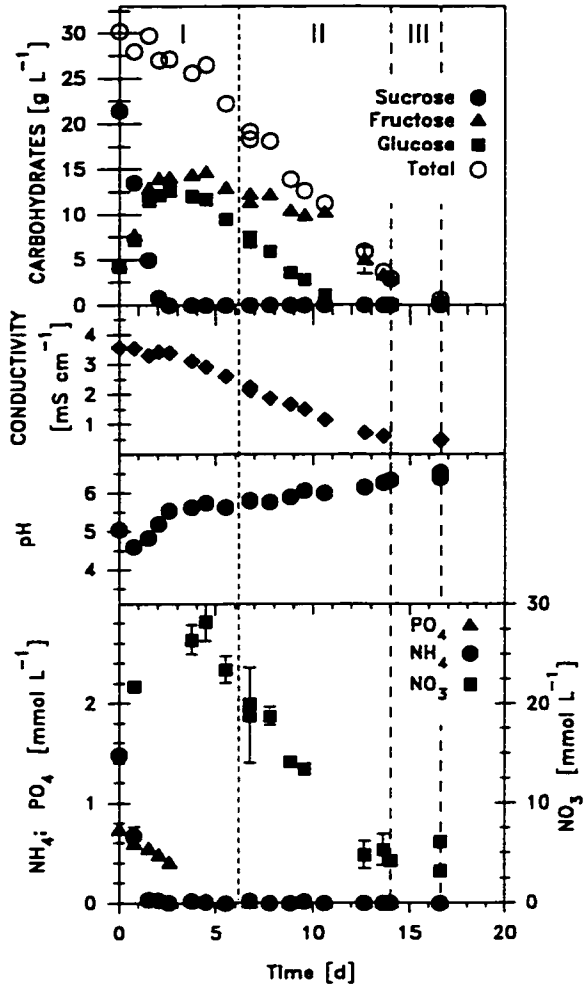


Figure 4.2 Sucrose hydrolysis and monosaccharides uptake, conductivity, pH and nutrient uptake of V. vinifera cell suspension cultures grown in shake flask. (Part I, II and III delimited by changes in DO concentration curve)

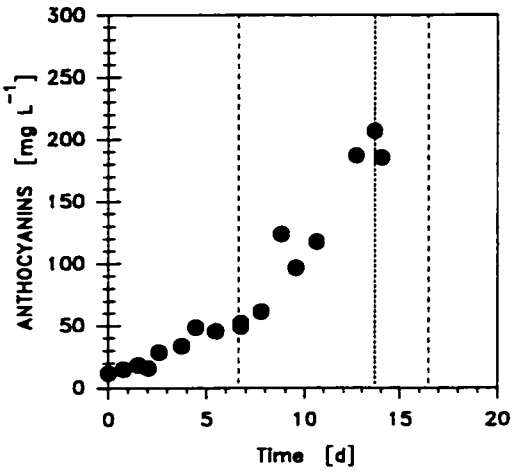


Figure 4.4 Anthocyanin production of V. vinifera cells grown in B5 medium in the dark. (Part I, II and III delimited by changes in DO concentration curve)

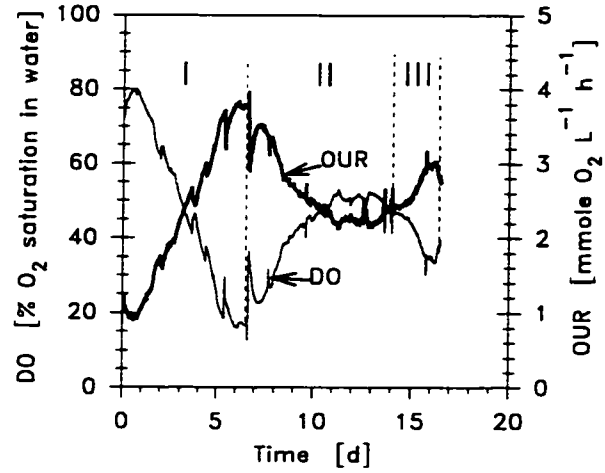


Figure 4.3 Time course of DO concentration and OUR of V. vinifera cell culture grown in shake flask.

The sharp decrease of cell division noticed above did not coincide with the extracellular depletion of any major nutrient monitored. Cell division may be limited by extra- or intracellular exhaustion of NH_4, PO_4, or other unmeasured medium component. Due to the rapid consumption of extracellular NH_4 and PO_4, clear identification of the limiting factor remained impossible. However, considering the specific cell division rate of these cultures (~0.24 d^{-1}), it appears that cell division ceased approximately one doubling time (~2.8 d) after NH_4 or PO_4 depletion, which occurred between day 1.5 and 3.5. At that time, dry dividing biomass yields were 4.3 ± 0.4 g dw $mmol^{-1}$ NH_4 and 7.3 ± 1.1 g dw $mmol^{-1}$ PO_4.

Anthocyanin production of these growing cultures is shown in Figure 4.4. This production reached 200 mg L^{-1} at the end of all three experiments, which is lower than that obtained by Yamakawa *et al.*[176] (330 mg L^{-1} after 2 weeks in the dark) and Hirasuna *et al.*[62] (400 mg L^{-1} under light) with *Vitis* cells cultured in the same growth medium. No anthocyanin was detected in the medium. However, after 10 days of culture, the medium gradually turned brown, likely

from the secretion of phenolics or oxidation into phenolic compounds of samll quantities of anthocyanins released from the few dying cells observed before day 16. Anthocyanin accumulation within the biomass continued after cell division stopped, as observed by Hirose *et al.* [63] with *V. vinifera* cells cultured in phosphate free medium or upon aphidicolin addition to inhibit DNA synthesis. The anthocyanin yield on biomass dry weight (Table 4.1) remained constant for the whole culture duration indicating that productivity was clearly related to biomass increase.

Table 4.1 Anthocyanin yield on dry biomass.

Cell line	Number of subcultures since selection	Yield mg g^{-1} dw
VVG111	20	14.17±2.89 (n=31)
VVG111	27	11.52[a]±0.86 (n=35)
VVG111	31	10.55[a]±2.28 (n=29)

Data expressed ± 95% confidence interval
[a] Means not significantly different

4.5.2 Dissolved Oxygen Pattern of Shake Flask Culture

The performance of flask cultures can be altered by the availability of oxygen, as shown in previous studies on the effect of initial k_La on growth. [82,90,176] Moreover, discrepancies between performance of flask and bioreactor cultures provide for other evidence of the effect of DO concentration on their growth. The DO concentration of the flasks cultures discussed above was measured on-line to further evalutate their behavior and respiration rate. Although the inocula used varied somewhat from experiment to experiment, the DO concentration and estimated OUR curves of all cultures followed the same pattern. Typical time courses of the DO concentration and resulting OUR estimated according to Eq. (63) of the culture described by the previous figures are shown in Figure 4.3. The DO concentration varied markedly during the experiment, declining from 80% to a minimum value of 17% between days 5 and 7, increasing to 53% between days 11 and 14 (Fig. 4.3, part II) and decreasing again thereafter (Figure 4.3, part III).

Other experiments displayed initial DO levels of 85% and 95% and first lowest DO levels of 33% and 46%, obviously from small variations in culture conditions.

The rate of DO concentration variation remained below 1.7 μmol O_2 L^{-1} h^{-1} for the whole culture duration. This value is much lower than the lowest OTR and OUR values calculated from the DO concentration measurements (0.9 mmol O_2 L^{-1} h^{-1}), which validates the pseudo steady-state hypothesis made in deriving Eq. (0) and justifies the use of on-line DO concentration measurements to assess the respiration rates of flask cultures.

During the first part of the culture, up to day 7, the biomass concentration remained low (Fig. 4.1 : ≤ 60 g ww L^{-1} or ≤ 6 g dw L^{-1}) and the k_La resulting from surface aeration was likely little affected by the low viscosity of the cell suspension.[74] Consequently, OTR was maximum during that time and the minimum DO concentration measured corresponded to a maximum oxygen uptake rate (OUR_{max}). Between this low DO concentration and the end of the subsequent plateau (part II of Fig. 4.3: from days 7 to 14), culture conditions were such that

$$q_{O_2}x = OUR < OTR = k_La\left(DO^* - DO\right) \tag{65}$$

Because the biomass concentration (x) increased and the OUR decreased, it follows that q_{O_2} decreased after day 7. After the second maximum DO concentration was reached on day 11, the biomass concentration increased from 150 to 320 g dw L^{-1}, as well as, likely, the culture viscosity. [12,74] Consequently, the last decrease in DO concentration can be attributed mostly to a corresponding decrease in k_La and OTR rather than an increase in OUR.

For the first two parts of the culture, k_La can be assumed nearly constant. [74] Therefore, the specific O_2 uptake rate (q_{O_2}) of the culture can be estimated from OUR calculations according to Eqs. (63) and (66)

$$q_{O_2} = \frac{k_La\left(DO^* - DO\right)}{x} \tag{66}$$

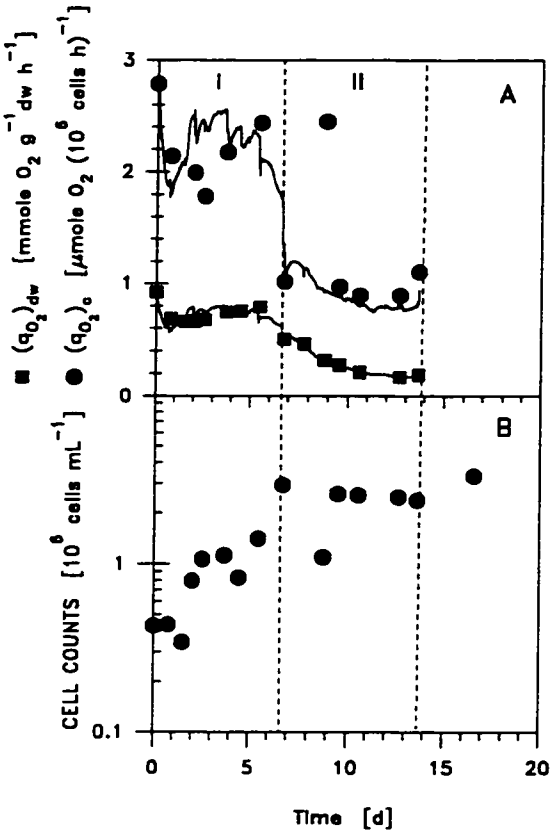


Figure 4.5 Estimated specific oxygen uptake rates (A) and cell growth curve (B). Lines represents q_{O_2} estimates based on growth curve fits. Solid symbols are q_{O_2} estimates based on growth data.

Estimates of $(q_{O_2})_{dw}$ and $(q_{O_2})_{cell}$ are presented in Figure 4.5A. They were obtained from the results presented in Figure 4.3 and from the actual and simulated dry biomass and cellular growth based on logistic, [89] and exponential and linear models, [103] respectively. These estimated q_{O_2} remained constant during the first 7 days at 0.71 ± 0.04 mmol O_2 g^{-1} dw h^{-1} and 2.2 ± 0.8 μmol O_2 (10^6 cells h)$^{-1}$. This $(q_{O_2})_{dw}$ value lies within the range of typical q_{O_2} values of 0.25 to 1.0 mmol O_2 g^{-1} dw h^{-1} reported for other plant cell species. [42,82,150,152,158] Thereafter, both $(q_{O_2})_{dw}$ and $(q_{O_2})_{cell}$ declined to 0.11 to 0.22 mmol O_2 g^{-1} dw h^{-1} and 0.9-1.1 μmol O_2 (10^6 cells h)$^{-1}$, respectively, for all three experiments, which may correspond to maintenance levels.

The first minimum DO concentration observed on days 5 to 7, as well as the corresponding maximum OUR and decreasing q_{O_2} estimates, occurred before the end of the exponential growth phase based on PCV, and wet and dry biomass concentrations (Fig. 4.1). Snape et al.[150] reported similar OUR and q_{O_2} patterns when measuring OUR_{max} for *C. roseus* suspension cultures carried out in shake flasks in which respiration rate was evaluated off-line by discrete measurements using respirometer. However, the OTR of their culture system suggests that DO may have been limiting 2 days before the q_{O_2} decrease was observed. In the present study, the first minimum DO concentration for the three experiments performed varied from 17 to 46%. Consequently, these lowest DO levels cannot be clearly identified with a critical DO concentra-

tion and the related change in q_{O_2} cannot be associated to DO limitation. The observed maximum specific respiration rate seems closely related to the sudden reduction of cell division indicated in Figures 4.1 and 4.5B. Consequently, high cellular division and increasing OUR characterize this culture process as long as critical nutrients are available extra- or intracellularly. At OUR = OURmax, cell division ceases, while growth continues in terms of wet and dry biomass, until carbohydrate and nitrate depletion.

During this later phase of growth and as reported by others,[42,150] the biomass expands and accumulates more water as indicated by the wet biomass concentration and the ww/dw ratio increases. This behavior can be explained by considering the changing chemical composition of the medium in terms of its resulting osmolarity, which can be estimated using the osmolarity of the equivalent sodium chloride concentration of the medium conductivity measurement (Fig. 4.2) plus the osmolarity corresponding to residual extracellular carbohydrates. As a result, and as shown in Figure 4.6, a direct correlation is obtained between PCV, wet biomass concentration, and ww/dw ratio increases, after OUR_{max}, and declining medium osmotic potential during growth. Obviously, this cell volume increase is related to the increasing cell volume turgor pressure in response to the medium decreasing osmotic pressure.

4.6 CONCLUSION

Most reports on plant cell culture discuss growth in terms of PCV and wet and dry biomass concentrations. This study presents a more complete insight into the growth behavior of cultured plant cells. Biomass production of *V. vinifera* cell cultures was found to be not completely associated with cell division. Indeed, cell division ceased while biomass production increased further. This occurred without apparent DO limitation and before nitrate and carbohydrate depletion, but seemed to be linked to the availability of extra- or intracellular ammonium, or phosphate ions, and, possibly, other nutrients. This early phase of growth was also shown to be closely related to the respiration behavior which displayed highest OUR when cell division peaked. Subsequent growth, the major concern of most studies in this field, was found to in-

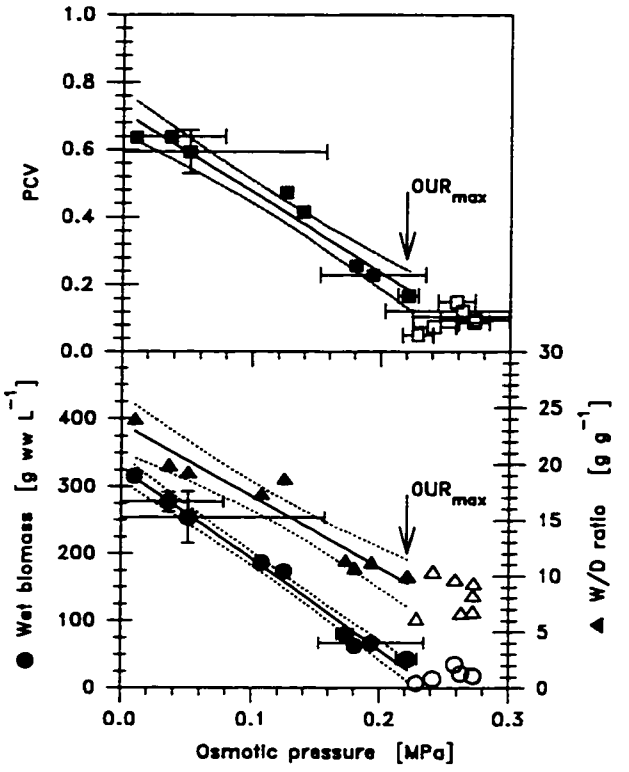


Figure 4.6 ***Relation between the biomass PCV, ww/dw ratio, and the medium osmotic pressure of V. vinifera cell cultures.***
Dashed lines correspond to 95% confidence interval.
The slopes are:
$2.4 \bullet 10^{-3}$ (mL mL^{-1}) (kPa)$^{-1}$ ($r^2 = 0.983$), 1.36 (g ww L^{-1}) (kPa)$^{-1}$ ($r^2 = 0.994$) and
$6.4 \bullet 10^{-2}$ (g ww g^{-1} dw) (kPa)$^{-1}$ ($r^2 = 0.957$).

volve mostly biomass weight increase and cell expansion as a result of nutrient accumulation and medium osmolarity decrease. This behavior was reproducible for the cell line used in this study as well as for other *V. vinifera* cell lines evaluated in this project.

Results from this study strongly suggest that it is essential to measure cell as well as biomass concentration to better characterize and optimize the growth behavior of plant cell cultures to maximize their subsequent production performance. Furthermore, in the context of plant cell

based bioprocess development, these results and the approach that they suggest are critically important. Thus, the first objective in optimizing the growth phase of these cultures must be to maximize the number of productive plant cells rather than only biomass concentration. Consequently, the subsequent phases of this project, which are discussed in the following articles of this series, focus on the better monitoring of *V. vinifera* cell cultures performed in an improved DO-controlled bioreactor system. [74]

This research was supported by the Centre Québécois de Valorisation de la Biomasse (Ministère de l'industrie et du commerce du Québec), Botanical Phytotech Ltd. and the Food Research and Development Centre (Agriculture Canada).

5. CULTURES EN BIORÉACTEURS : EFFET DE LA CONCENTRATION D'OXYGÈNE DISSOUS SUR LA CROISSANCE DE LA BIOMASSE, LE TAUX D'ASSIMILATION D'OXYGÈNE ET LA PRODUCTION D'ANTHOCYANES

L'analyse présentée au chapitre 4 a montré que le suivi du compte cellulaire fournit un important complément d'information aux mesures de biomasse sèche (MS) et humide (MH) ou au volume de la biomasse (packed cell volume, PCV) généralement utilisés comme indicateurs de la croissance de la biomasse. De plus, au cours des expériences en flacons agités relatées au chapitre précédent, le ralentissement de la prolifération cellulaire coïncidait avec l'observation d'une concentration minimale d'oxygène dissous (OD) dans le milieu de culture, synchronisée avec un taux volumique maximal de respiration (OUR). Après ce ralentissement, le taux spécifique de respiration diminuait sans qu'il ait été possible de relier clairement cet événement à la disparition d'un des éléments nutritifs mesurés ou à la concentration d'OD. Pour mieux comprendre le comportement des cultures de cellules de plantes, ces deux causes doivent, dans la mesure du possible, être dissociées. Ainsi, l'étude de l'effet de la concentration d'OD sur la croissance de la biomasse uniquement possible dans l'environnement contrôlé d'un bioréacteur est abordée dans le présent chapitre alors que l'étude des limitations nutritionnelles sera abordée au chapitre 6.

Comme indicateur de croissance, la mesure de la biomasse sèche domine le domaine de la culture de cellules végétales. Ainsi pour l'étude de l'effet de la quantité d'oxygène dissous disponible, notre objectif initial était d'optimiser le taux de croissance moyen de la biomasse

sèche ou la biomasse sèche finale. La mesure de biomasse sèche reflète directement l'assimilation des hydrates de carbone qui constituent en masse le principal nutriment de ces cultures. La capacité des cellules végétales de constituer des réserves vacuolaires entraîne une augmentation de la masse des cellules, souvent décrite par le terme de grossissement, qui ne reflète pas nécessairement la prolifération cellulaire tel que démontré au chapitre 4. Les difficultés d'interprétation des données de biomasse sèche reliées à ce phénomène ont mené à compléter notre démarche expérimentale par des dénombrements cellulaires dont l'analyse éclairera l'interprétation des données de croissance de la biomasse sèche.

5.1 INTRODUCTION

Malgré le fait que l'oxygène soit un nutriment essentiel aux cultures de cellules de plantes, peu d'études systématiques ont été faites sur l'effet de la concentration d'oxygène dissous (OD) sur la croissance de ces cellules. Comme nous l'avons évoqué au chapitre précédent, certaines études, en rapportant des résultats obtenus en flacons agités ou en colonne à bulles, font état d'une diminution du taux spécifique d'assimilation d'oxygène, q_{O_2}, avec le temps et de l'observation d'une valeur maximale du taux volumique d'assimilation d'oxygène, OUR, dans la phase logarithmique de la courbe de croissance de la biomasse sèche [150,158,160] sans toutefois les relier au stade de développement des cellules. De plus, celles-ci présentent, au mieux, un suivi de la concentration d'oxygène, non contrôlé, dans le milieu et des mesures hors ligne du taux de respiration.

En fait, la plupart des études recensées abordent très indirectement l'effet de la concentration d'oxygène dissous en reliant les performances des cultures au coefficient volumique de transfert de gaz initial des systèmes de culture utilisés, $(k_La)_0$, sans mesurer la concentration d'oxygène dans le milieu. Ainsi, pour des cultures en flacons agités et dans des conditions d'agitation et de rapport surface-volume telles que le taux d'assimilation d'oxygène, OUR, ne puisse pas être limité par le taux maximal de transfert d'O_2, $OTR_{max} = k_La \cdot OD^*$, Kobayashi et coll. [82] n'ont observé aucun effet d'une augmentation du k_La initial sur la concentration en

biomasse sèche ainsi que sur la production de métabolites secondaires après 15 jours de culture. Les résultats de cette étude tendraient donc à étayer l'hypothèse d'une absence d'effet de la concentration d'OD sur l'augmentation de la concentration de la biomasse sèche en fin de culture. Une concentration d'oxygène élevée imposée à la fin de la phase de croissance n'induirait aucune augmentation significative de la concentration de biomasse sèche.[42] Utilisant un bioréacteur muni d'un agitateur de type Rushton et d'aérateurs submergés, Leckie et coll.[90] ont étudié l'effet de l'augmentation du k_La initial en variant principalement le taux d'aération. Ces chercheurs ont observé que des k_La inférieurs à 4 h^{-1} et supérieurs à 10 h^{-1} sont préjudiciables à l'augmentation de la concentration de la biomasse sèche. De plus, ils ont observé que l'opération de leur bioréacteur dans des conditions où la valeur du k_La est de 20 h^{-1} favorise la formation d'agrégats comparativement à des conditions d'opération engendrant un k_La de 2.5 h^{-1}. Une disponibilité plus grande de l'oxygène à l'intérieur des amas cellulaires suite à une augmentation de la concentration d'oxygène dissous découlant du meilleur coefficient de transfert pourrait expliquer ce dernier résultat. Yamakawa et coll.[176] ont étudié spécifiquement la production d'anthocyanes de cultures en suspension de *Vitis vinifera* dans un milieu de croissance, effectuées dans un réacteur gazo-siphon opéré à trois taux d'aération avec des k_La résultants de 15, 35 et 80 h^{-1}. Ils ont obtenu un taux spécifique global de croissance de la biomasse sèche, $\bar{\mu}_{MS}$, et un rendement en anthocyanes plus élevés dans les conditions d'opération résultant en un k_La de 35 h^{-1}. La contre-performance observée à un k_La de 80 h^{-1} peut être causée par un cisaillement excessif, un épuisement en CO_2 ou une concentration d'OD élevée.

L'influence de l'oxygène dissous sur la croissance et les rendements de cultures de *C. roseus* a été étudiée plus directement par Tate et Payne.[157] Pour ce faire, ils ont varié la composition du gaz introduit dans des flacons agités sans toutefois mesurer la concentration d'OD résultante, ni son évolution dans le temps. Ils ont observé une augmentation du taux spécifique moyen de croissance de la biomasse sèche avec la concentration d'oxygène présent dans la phase gazeuse selon une cinétique apparentée à une cinétique de saturation avec une constante de 0,034 atm correspondant à une concentration initiale d'OD de 16% (0,04 mmol O_2 L^{-1}). Les rendements en

biomasse sèche sur les hydrates de carbones sont demeurés constants jusqu'à un seuil de 50% d'oxygène dans la phase gazeuse (~0,6 mmol O_2 dissous L^{-1} initialement), concentration à partir de laquelle ces auteurs ont aussi observé un effet négatif sur la croissance de la biomasse.

En bioréacteurs, des taux de transfert trop faibles ou trop élevés réduisent généralement les performances des cultures de cellules végétales. Or, dans la plupart des études rapportées dans la littérature, les modifications des conditions d'oxygénation du milieu de culture sont obtenues en modifiant le taux de transfert par la manipulation des débits de gaz alimentés, du type ou des dimensions de l'agitateur, de la vitesse d'agitation, ou de plus d'un paramètre, ne permettant pas de découpler les effets sur les cultures de la concentration d'oxygène (le plus souvent d'ailleurs non contrôlée ni mesurée), de la concentration résiduelle de CO_2 et du stress hydrodynamique. Dans ce contexte, il ne peut exister de consensus sur les raisons des contre-performances obtenues en bioréacteurs et celles-ci sont généralement attribuées au stress hydrodynamique [102,156] ou à l'enlèvement parallèle du CO_2 ou de composés volatils utiles aux cultures lorsque k_La est élevé. [60,101] Dans des conditions où k_La est très faible, en plus d'une limitation potentielle en oxygène, une concentration élevée de CO_2 aurait un effet négatif sur la croissance. [7,60]

Comparativement aux flacons agités, les bioréacteurs permettent une meilleure surveillance et un meilleur contrôle des conditions de cultures, rarement bien mis à profit en culture de cellules végétales. Pourtant des conditions de culture contrôlées sont essentielles pour étudier l'effet de la concentration d'OD sur la croissance de la biomasse et pour associer les taux spécifiques d'assimilation d'oxygène aux étapes de croissance de la biomasse ou aux états métaboliques.

Par ailleurs, les cultures de cellules végétales lorsqu'elles atteignent 10 à 15 g MS L^{-1} correspondant typiquement à 200 à 300 g MH L^{-1}) présentent une augmentation de la vitesse de sédimentation et de la viscosité, ainsi qu'un comportement pseudo-plastique qui compliquent le choix d'un mélangeur efficace. Ainsi, les cellules de plantes nécessitent souvent l'utilisation d'une configuration de mélangeur à faible taux de cisaillement ou l'utilisation d'agitateurs plus

conventionnels opérés à faible vitesse, lesquels ont des coefficients de transfert de gaz faibles. L'utilisation de réacteurs gazo-siphons, d'injection d'air dans le milieu de culture ou d'agitateurs opérés à plus grande vitesse pour augmenter le transfert de masse se traduit par un enlèvement du CO_2 dissous et, fréquemment, par des problèmes associés à la production de mousse.

Le bioréacteur à double ruban hélicoïdal (helical ribbon impeller, HRI) décrit au chapitre 3 permet d'obtenir une bonne efficacité de mélange[74] avec un faible cisaillement associé[76] pour les fluides de viscosité élevée et non-newtoniens que sont, à haute concentration, les cultures en suspension de cellules végétales. Opéré avec une aération de surface uniquement, les faibles valeurs de k_La de ce bioréacteur permettent de minimiser l'enlèvement du CO_2 dissous. Ainsi, compte tenu des taux volumiques d'assimilation d'O_2 relativement faibles des cultures de cellules de plantes qui varient typiquement entre 0,1 et 4 mmol O_2 L^{-1} h^{-1},[42,82,150,158,164] des concentrations d'OD adéquates peuvent être maintenues dans le bioréacteur en enrichissant la phase gazeuse en O_2 tout en conservant la vitesse d'agitation au minimum et en préservant un bon mélange. Ainsi, opéré dans des conditions contrôlées, le réacteur à ruban hélicoïdal permet d'étudier l'effet de l'oxygène dissous sur la croissance de cellules de plantes tout en minimisant les effets négatifs du cisaillement induit par l'agitation et de l'enlèvement du CO_2 dissous associé à l'injection de gaz et aux k_La élevés.

Ce chapitre fait état d'une étude effectuée en bioréacteurs HRI sur l'effet de la concentration d'oxygène dissous sur la croissance des cellules de *V. vinifera*. La concentration d'OD a été contrôlée à plusieurs niveaux (de 10 à 90% d'OD) sans injection directe de gaz dans le milieu de culture et des mesures périodiques du taux d'assimilation d'O_2 ont permis de relier la croissance à l'assimilation de nutriments et à la respiration. Cette étude a permis de relier l'effet de la concentration d'oxygène dissous à la croissance de la biomasse et de comparer les performances des cultures en bioréacteurs à celles obtenues dans le système de culture témoin que constituent les flacons agités.

5.2 MÉTHODOLOGIE ET TECHNIQUES EXPÉRIMENTALES

5.2.1 Lignée cellulaire et cultures en suspension

Les lignées cellulaires de *Vitis vinifera* L. cv Gamay fréaux ont été sélectionnées et stabilisées par l'équipe du Dr. Cormier, selon une procédure déjà décrite [109]. Trois lignées cellulaires ont été utilisées au cours de cette étude: les cellules des lignées VVG105 et VVG111 croissaient dans l'obscurité alors que celles de la lignée VVG12 étaient cultivées sous illumination constante. En flacon agité, les suspensions cellulaires étaient cultivées dans les mêmes conditions que celles décrites au chapitre 3. Les inocula des bioréacteurs étaient préparés dans des flacons Erlenmeyer à large goulot de 1-L dans les mêmes conditions. Pour chaque série d'expériences, quatre à huit flacons témoins de 500-mL étaient inoculés et soumis à un échantillonnage en rotation et concomitant avec celui des bioréacteurs.

5.2.2 Cultures en bioréacteurs

Les cultures en bioréacteurs ont été effectuées dans des réacteurs à double ruban hélicoïdal (HRI) d'un volume nominal de 2-L et 5-L. Le bioréacteur de 5-L (BioExpert, Québec, Canada) [74] était instrumenté pour le suivi en ligne du pH, de la température, de la conductivité électrique du milieu de culture, de la concentration d'oxygène dissous (OD) et de la vitesse d'agitation (Figure 3.1a). Les bioréacteurs HRI de 2-L étaient équipés d'une sonde d'OD polarographique (Ingold) et d'une sonde de conductivité de construction domestique. Leur enceinte était constituée d'un vaisseau de verre de 2-L (Corning Glass Works, Corning, N.-Y.) fermé par un couvercle d'acier inoxydable 316 (Figure 3.1b) retenu par une bride. La culture était agitée à l'aide d'une hélice à double ruban hélicoïdal conçu d'après Jolicoeur et coll.,[74] montée sur un joint mécanique stérile (Bellco, Vineland, N.-J.), et actionnée à l'aide d'un moteur à vitesse variable (Cole Palmer, Chicago). Trois contre-pales verticales installées à la surface du liquide et orientées à 10° améliorent l'efficacité de l'aération de surface. [74]

Tous les bioréacteurs étaient reliés à un système de contrôle (Bioexpert, Québec, Canada) pour l'acquisition de données et le contrôle du procédé. La température était maintenue à 25°C par l'entremise du système de contrôle Bioexpert pour le bioréacteur de 5-L et de contrôleurs externes de température reliés à une plaque chauffante sur laquelle chaque bioréacteur de 2-L reposait.

Afin d'évaluer l'effet de la concentration d'OD sur la croissance, plusieurs cultures en cuvée ont été effectuées à diverses concentrations d'OD (Tableau 2.1, page 60). Une série de cultures supplémentaires a été effectuée à 50% d'OD avec la lignée VVG111 pour compléter les courbes de croissance de la biomasse par des comptes cellulaires. Les milieux de culture utilisés étaient le milieu B5 standard décrit plus haut et contenant 25 mM NO_3 ainsi qu'un milieu B5 modifié contenant une quantité réduite de NO_3: 12,5 mM NO_3 (B5DN). Les milieux de culture, incluant les milieux des flacons contrôles étaient stérilisés à la vapeur (60 min., 121°C et 1 bar).

La concentration d'OD était mesurée par des sondes polarographiques calibrées dans l'eau avec de l'azote et de l'air avant chaque expérience. Les coefficients de transfert d'oxygène des bioréacteurs, k_La, ont été calculés à partir du profil de rétablissement de la concentration d'OD par aération de surface avec de l'air après un dégazage prolongé à l'azote assisté d'une agitation à 100 rpm suivi d'un changement du gaz contenu dans la tête du réacteur sans agitation. La variation du k_La dans le bioréacteur HRI de 5-L en fonction de la vitesse d'agitation (RPM) et du niveau de liquide au-dessus des contre-pales (H), représentée à la Figure 3.1, est décrite par la relation :

$$k_La = 0{,}26 + (0{,}33 \cdot H - 1{,}6)^2 + 0{,}002 \cdot (RPM - 60)^2. \qquad (17)$$

Comme des résultats antérieurs avaient montré une augmentation de la quantité de débris cellulaires présents en début de culture à des vitesses supérieures à 60 rpm,[116] la vitesse d'agitation initiale utilisée pour les cultures a été fixée à 60 rpm pour les deux bioréacteurs. La concentration d'OD était contrôlée au point de consigne en manipulant la pression partielle

d'oxygène dans le mélange gazeux alimenté en surface aux bioréacteurs à 0,1 vvm. L'air, l'oxygène et l'azote étaient alimentés au bioréacteur HRI 5-L par l'entremise de débitmètres massiques et aux bioréacteurs HRI 2-L en utilisant des rotamètres couplés à des vannes solénoïdes (Figure 3.2). Les k_La étant faibles, la vitesse d'agitation était graduellement augmentée jusqu'à 95 rpm lorsque les contrôleurs atteignaient la saturation. Les vitesses d'agitation n'étaient pas suffisantes pour provoquer la formation et l'entraînement de bulles dans la masse de liquide. Dans ces conditions, le stress hydrodynamique induit par l'augmentation lente et progressive de la vitesse d'agitation ont probablement peu affecté les cultures comme en font foi la faible proportion de débris cellulaires observés ou estimés (Annexe 3) ainsi que les résultats rapportés de cultures dans des réacteurs HRI comparables, de cellules d'insecte[76] et d'embryons végétaux.[5]

5.2.2.1 Mesure du taux d'assimilation d'oxygène

Le taux d'assimilation d'oxygène (OUR) des cultures a été mesuré périodiquement. Pour ce faire, la vitesse d'agitation était réduite à 12 rpm afin de minimiser le taux de transfert d'oxygène (OTR). La variation de la concentration d'oxygène dans le milieu de culture est décrite par l'équation suivante :

$$\frac{dOD}{dt} = OTR - OUR = k_La\left(OD^* - OD\right) - q_{O_2}x \qquad (67)$$

où OD^* représente la concentration d'oxygène dissous en équilibre avec le gaz d'aération et x, la concentration de biomasse sèche. OUR peut donc être exprimé en fonction de la concentration d'OD.

$$k_La\left(OD^* - OD\right) - \frac{dOD}{dt} = q_{O_2}x = OUR \qquad (68)$$

Le k_La du HRI-5L est de 0,36 h^{-1} à 30 rpm alors que le k_La du HRI-2L est de 0,29 h^{-1} à 12 rpm. Ainsi à une vitesse d'agitation de 12 rpm, la valeur du terme k_La (OD^*-OD) ne dépasse pas 5% de dOD/dt, l'équation (68) devient :

$$OUR = -\frac{dOD}{dt} \tag{69}$$

Les taux spécifiques d'assimilation d'oxygène (q_{O_2}) ont été estimés à partir des mesures d'OUR et des données correspondantes à la portion viable de la biomasse sèche ou aux comptes cellulaires, telles que mesurées et sans compensation pour l'évaporation, ou interpolées à l'aide d'un modèle logistique[89] pour la biomasse sèche ou de modèles exponentiels et linéaires pour le compte cellulaire.[103] Les taux spécifiques moyens de croissance de la biomasse, $\bar{\mu}_{MS}$, ont été calculés par régression sur la portion linéaire des représentations logarithmiques des courbes de croissance de la biomasse sèche totale.

5.2.2.2 Estimé des concentrations de CO_2 dans le milieu

En absence de mesure expérimentale et en négligeant pour des mesures de pH inférieures à 6,3 l'effet du déplacement de l'équilibre chimique entre le CO_2 dissous et l'ion bicarbonate,[11,133] des bilans de masse sur le CO_2 permettent d'estimer la concentration de CO_2 dans le liquide, $[CO_2]_L$, en fonction du taux volumique de production de CO_2, CPR (carbon production rate), du coefficient de transfert volumique de CO_2, $k_L^{CO_2}a$, et de la pression partielle de CO_2 dans la phase gazeuse, p_{CO_2}, selon la relation:

$$[CO_2]_L = \frac{p_{CO_2}}{H_{CO_2} \cdot R \cdot T} + \frac{CPR}{k_L^{CO_2}a} \tag{52}$$

où H_{CO_2} représente la constante de Henry. Le $k_L^{CO_2}a$ est relié au $k_L^{O_2}a$ mesuré pour l'O_2 par le rapport des diffusivités, $\mathcal{D}_{CO_2}/\mathcal{D}_{O_2}$, dans le milieu de culture, assimilé à de l'eau prenant:

$(\mathcal{D}_{O_2})_{eau}$ $= 2{,}5\ 10^{-5}\ cm^2\ sec^{-1}$, et

$(\mathcal{D}_{CO_2})_{eau}$ $= 1{,}95\ 10^{-5}\ cm^2\ sec^{-1}$.[118]

Par bilan de masse, la pression partielle de CO_2 dans la phase gazeuse, p_{CO_2}, est reliée à la pression partielle de CO_2 dans l'air ambiant ou alimenté, $(p_{CO_2})_0$, au volume de liquide, V_L, au débit de gaz alimenté dans le bioréacteur, F_g, et au taux de production de CO_2, CPR, par la relation suivante:

$$p_{CO_2} = (p_{CO_2})_0 + CPR\frac{V_L \cdot R \cdot T}{F_g} \tag{53}$$

Dans les flacons agités, le terme V_L / F_g est remplacé par V_L / K où K représente le coefficient de transfert des gaz à travers le bouchon. K a été mesuré être égal à 1,64 en comparant le transfert d'O_2 entre la masse d'air présente dans la tête des flacons agités et un volume d'eau, au transfert d'O_2 entre l'air ambiant et un volume d'eau contenu dans le flacon séparés par un bouchon et une masse d'azote (Chapitre 3), et considérant un système binaire N_2-(O_2-CO_2) dans lequel les constituants O_2 et CO_2 ont la même vitesse lorsque le coefficient respiratoire, RQ = CPR/OUR, est près de 1. Ainsi, pour les flacons agités l'équation 53 devient :

$$p_{CO_2} = (p_{CO_2})_0 + CPR\frac{V_L \cdot R \cdot T}{K}. \tag{70}$$

Pour le système biologique modèle *Catharanthus roseus*, la littérature montre que le coefficient respiratoire moyen, RQ, varie en moyenne de 0,8 à 1,3. [127,164] En fixant RQ égal à 1, il est possible de comparer les conditions de cultures en bioréacteur HRI et en flacon agité en termes de concentrations de CO_2 dans la phase liquide en substituant les équations (52) et (70) dans l'équation (51) pour obtenir :

$$[CO_2]_L = \frac{(p_{CO_2})_0}{H_{CO_2} \cdot R \cdot T} + OUR\left(\frac{V_L}{F_g \cdot H_{CO_2}} + \frac{1}{k_L^{CO_2}a}\right), \text{ et} \tag{55}$$

$$[CO_2]_L = \frac{(p_{CO_2})_0}{H_{CO_2} \cdot R \cdot T} + OUR\left(\frac{V_L}{K \cdot H_{CO_2}} + \frac{1}{k_L^{CO_2}a}\right) \tag{56}$$

respectivement pour le bioréacteur et le flacon agité.

5.2.3 Méthodes analytiques

Le compte cellulaire, la viabilité, la biomasse sèche (MS) et humide (MH), le volume centrifugé de biomasse (PCV) ainsi que le pH, la conductivité du milieu de culture, la concentration extracellulaire en hydrates de carbone, en ions nitrate, ammonium et phosphate ont été

déterminés selon les méthodes décrites au chapitre 3. Toutes les concentrations sont rapportées sur la base du volume initial de culture puisqu'elles ont été corrigées pour tenir compte de l'évaporation et du volume occupé par la biomasse.

5.3 RÉSULTATS ET DISCUSSION

5.3.1 Croissance et consommation de nutriments

Des courbes typiques de consommation des principaux substrats (NO_3, NH_4, PO_4, hydrates de carbones) et de croissance (biomasse sèche, biomasse humide, PCV, compte cellulaire, viabilité) d'une culture en cuvée effectuée à une concentration d'oxygène dissous de 50% sont présentées à la figure 5.1. Elles permettent d'aborder la relation entre la progression dans le temps des multiples paramètres qui ont fait l'objet d'un suivi expérimental, et la croissance de la biomasse pour une des conditions d'oxygénation testées.

Ainsi, comme pour les cultures en flacons discutées au chapitre 4 (Figure 4.2), la courbe de prolifération cellulaire s'infléchit avant l'épuisement du milieu de culture en NO_3 ou en hydrates de carbones. La biomasse, elle, continue à augmenter et n'est donc pas, comme cela a été mis en évidence au chapitre précédent, un indicateur fiable de la prolifération cellulaire pour toute la durée de la culture en cuvée.

Une consommation rapide des ions ammonium et phosphate a lieu en début de culture alors que la consommation du nitrate et des hydrates de carbone s'étale sur toute la période d'augmentation de la concentration de la biomasse, comme pour les cultures en flacons agités. Le saccharose initialement présent est hydrolysé rapidement à un taux spécifique de $4,9 \pm 1,0$ g g^{-1} MS d^{-1} ($\pm$ intervalle de confiance à 95% sur les estimés) et la consommation des ions nitrate est presque entièrement différée après l'assimilation complète des ions ammonium.

La faible fréquence d'échantillonnage conjuguée à l'assimilation rapide des ions phosphate et ammonium rend difficile l'évaluation et, qui plus est, la comparaison des taux d'assimilation

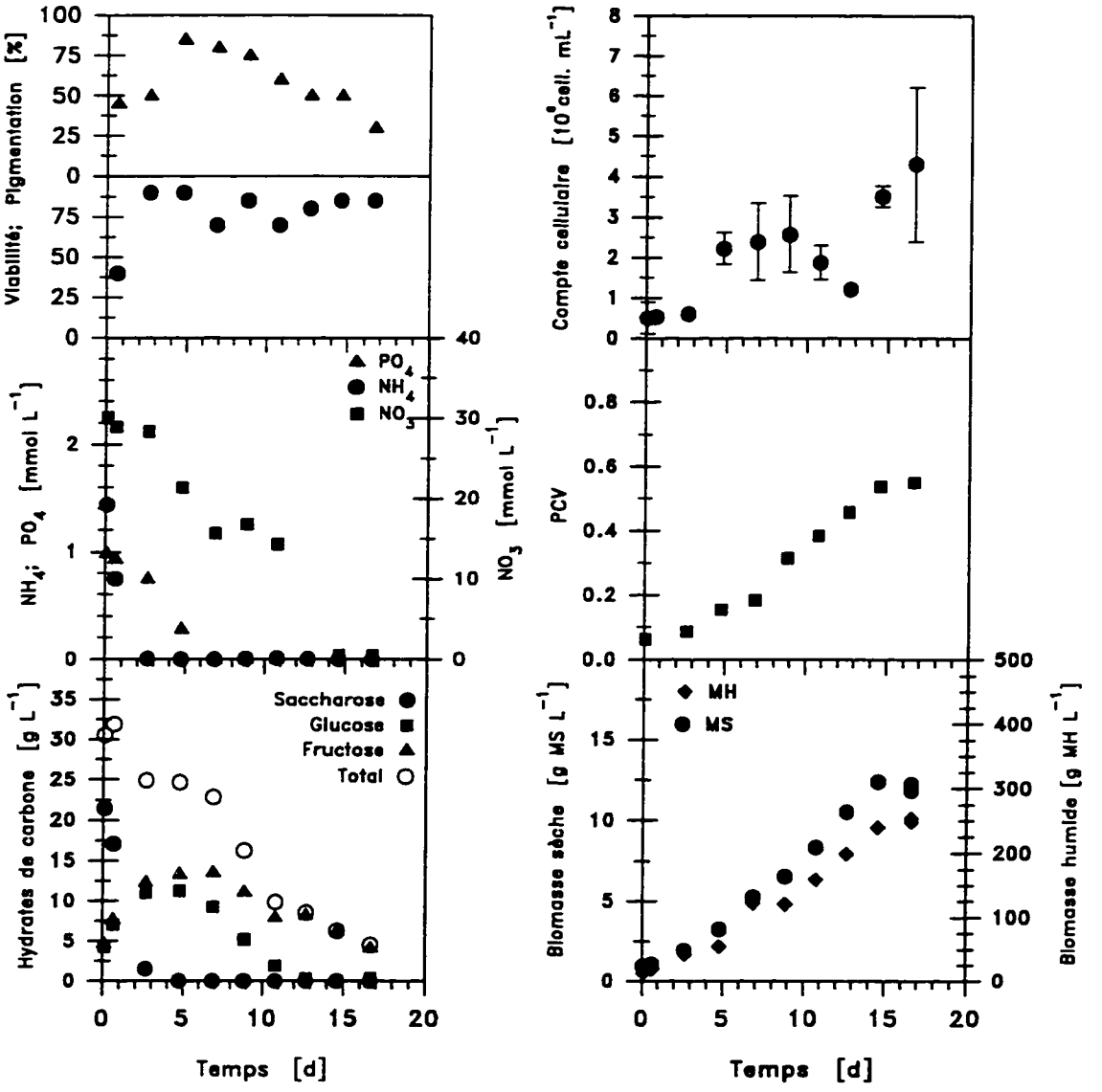


Figure 5.1 Courbes de croissance et de consommation de nutriment typiques d'une culture en bioréacteur avec contrôle de l'oxygène dissous à 50%. Lignée VVG111, sc20, 50% d'OD et 60 à 100 rpm dans le bioréacteur.

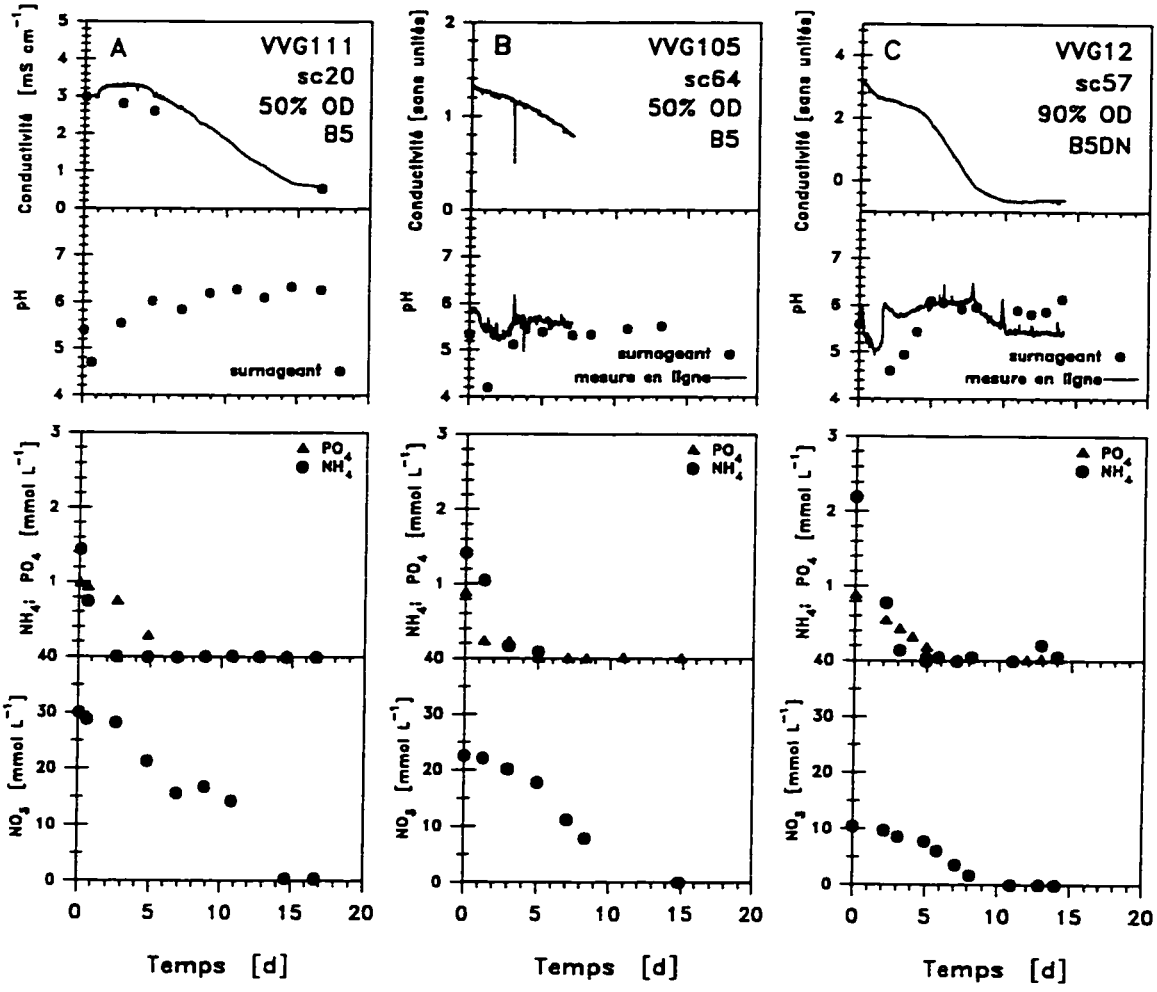


Figure 5.2 Consommation des ions ammonium, phosphate et nitrate de cultures de diverses lignées cellulaires, effectuées en bioréacteurs à 50% d'oxygène dissous.

d'une lignée cellulaire ou d'une culture à l'autre. L'analyse des courbes de consommation montre cependant que la consommation de ces deux nutriments varient selon la lignée cellulaire (Figure 5.2). Ainsi, pour la lignée VVG105 l'ion phosphate est consommé plus rapidement que l'ion ammonium contrairement aux lignées VVG12 et VVG111. Cette différence de comportement résulte probablement du processus de sélection de souche effectué dans un milieu de culture à faible concentration en azote dans lequel les cellules destinées à survivre sont celles qui s'approprient les faibles ressources d'azote réduit disponible, notamment l'ion ammonium immédiatement assimilable.[109,116] Quoi qu'il en soit, la manifestation de comportements différents de souches issues d'une même lignée cellulaire fait ressortir la nécessité d'un suivi serré du processus d'entretien des lignées, mais aussi d'une bonne caractérisation des cultures, idéalement reflétée dans un schéma réactionnel.

La mesure en ligne de la conductivité électrique suit la consommation des ions nitrate. Les mesures de pH affichent une baisse rapide en début de culture reliée à la consommation des ions ammonium et reflètent par la suite une alcalinisation parallèle à l'assimilation du phosphate[135] et, surtout des ions nitrate.

Les taux volumiques d'assimilation d'oxygène de la culture décrite plus haut (Figure 5.1) sont présentés à la figure 5.3. Ces taux sont comparés aux OUR estimés de la culture témoin en flacon agité déduits, comme au chapitre 3, de la courbe de concentration d'OD selon les équations:

$$\frac{dOD}{dt} = OTR - OUR \approx 0 \qquad (2)$$

$$OUR \approx OTR = k_L a\left(OD^* - OD\right) \qquad (21)$$

prenant $k_L a = 14\ h^{-1}$ pour les sept premiers jours de culture et $18\ h^{-1}$ pour la portion restante compte tenu du volume de la culture, et $OD^* = 0{,}253$ mmol L^{-1} (Chapitre 3). On constate à la figure 5.3 que pour la culture en bioréacteur où l'OD a été contrôlée à 50%, le taux volumique de respiration est maximal autour du 6ième jour de culture.

Ce comportement est similaire à celui observé en flacons agités (Chapitre 3). Ici encore, le plafonnement de l'OUR ne concorde pas avec un arrêt de l'augmentation de la concentration en biomasse sèche (Figure 5.1); il se reflète plutôt dans une inflexion de la courbe de croissance de la biomasse sèche (Figure 5.3) et semble synchronisé avec une diminution très nette de la prolifération cellulaire. Comme la concentration d'OD dans le bioréacteur était maintenue à 50% alors qu'elle descendait jusqu'à 17% dans les flacons agités (Chapitre 4), le plafonnement du nombre de cellules et de OUR ne serait donc pas relié à la disponibilité de l'oxygène.

Par ailleurs, dans les premières heures de culture, la demande en oxygène est très forte (Figure 5.3, encadré pointillé et Annexe 2). Treat et ses collaborateurs[160] ont montré une augmentation notable de la production de protéines solubles durant cette période, à laquelle pourrait être reliée la forte demande d'O_2, alors que Yokoi et coll.[179] ont relié la forte consommation d'O_2 en début de culture à l'hydrolyse du saccharose. Globalement, toutes ces observations peuvent être assimilées à des manifestations du stress initial que représente le changement subit de l'environnement des cellules : saccharose à hydrolyser, disponibilité des hormones, des vitamines et des ions et, pour les cultures en flacons agités, forte concentration d'oxygène.

5.3.2 Taux spécifique de croissance et performance comparée

Les résultats présentés plus haut ne permettent pas de relier directement l'arrêt de la prolifération cellulaire à la disponibilité de l'oxygène dans le milieu de culture. La concentration d'OD peut cependant avoir eu un impact sur le comportement global des cultures, sur le taux spécifique de croissance et, conséquemment, sur les taux d'utilisation de nutriments et les manifestations de limitations nutritionnelles. Dans un contexte de culture en cuvée, l'investigation de l'effet de la concentration d'OD sur la croissance de la biomasse peut fournir des indications intéressantes au-delà de la détermination d'un seuil minimal de concentration d'OD dans le but d'améliorer les conditions de cultures.

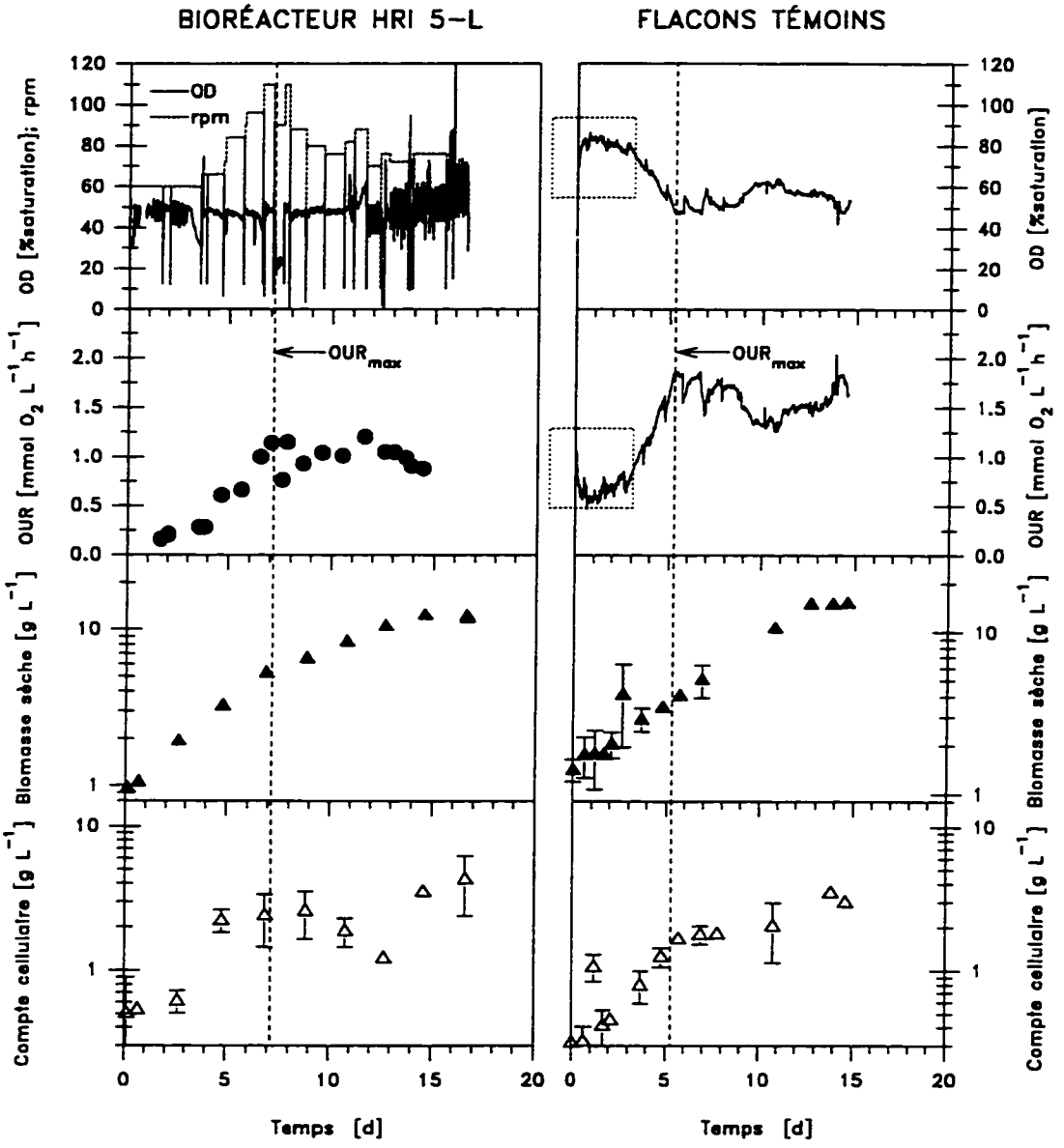


Figure 5.3 Concentration d'oxygène dissous, taux volumiques d'assimilation d'oxygène et courbes de croissance d'une culture en bioréacteur et de sa culture contrôle en flacon agité. Lignée VVG111, sc20, 50% d'OD et 60 à 100 rpm dans le bioréacteur.

5.3.2.1 Taux spécifique de croissance et concentration d'OD

L'effet apparent de la concentration d'oxygène dissous sur les taux spécifiques moyens de croissance de la biomasse sèche, $\overline{\mu}_{MS}$, des cultures en cuvée effectuées selon le schéma présenté au tableau 2.1 est représenté à la figure 5.4. Les résultats présentés incluent aussi les taux spécifiques moyens de croissance de cinq cuvées répétées à 50% d'OD effectuées avec la lignée VVG111, et de leurs cultures témoins en flacons agités. Les résultats obtenus de ces cinq répétitions permettent d'établir que l'utilisation de différents inocula n'a pas une grande incidence sur $\overline{\mu}_{MS}$ lorsque la concentration d'OD est contrôlée. Les variations du taux de croissance associées aux changements dans les conditions d'oxygénation du milieu, conditions qui varient aussi pour les cultures en flacons agités (Figures 4.4 et 5.3, Annexe 4), ne peuvent donc être totalement imputables à la variation des inocula.

Ainsi, sous un seuil de 50% d'OD, l'augmentation de la concentration d'OD a un effet positif sur la croissance de la biomasse. Pour la série d'expérience effectuée, le taux spécifique moyen de croissance de la biomasse sèche semble progresser selon une cinétique de saturation par rapport à la concentration d'OD maintenue dans les réacteurs. Une telle représentation de la cinétique, décrite par l'équation :

$$\mu = \mu_{max} \frac{OD}{K_{OD} + OD} \qquad (71)$$

impliquerait une constante de demi-saturation, K_{OD}, de 10% d'OD (0,025 mmol O_2 L^{-1}). Cette valeur est plus faible que celle de 0,04 mmol O_2 L^{-1} évaluée par Tate et Payne [157] pour des cultures de *C. roseus* en supposant un équilibre entre le milieu et le gaz d'aération de composition connue. Toutefois, avec des valeurs typiques d'OUR de 0,8 à 5 mmol O_2 L^{-1} h^{-1} pour *C. roseus* à la fin de la phase exponentielle de croissance, [42,90,147,150,164] et un k_La de 18 h^{-1} dans les flacons agités utilisés dans leur étude, il est possible que l'approche expérimentale employée par Tate et Payne [157] consistant à contrôler la composition du gaz d'aération, ait

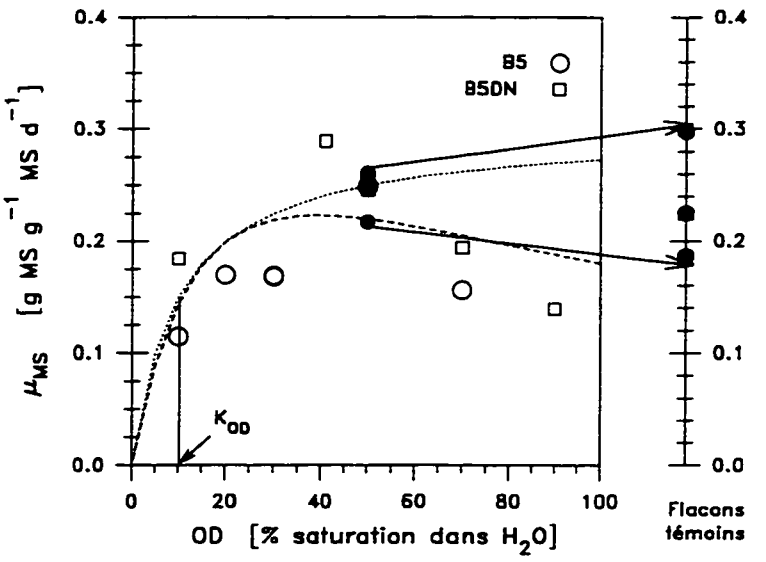


Figure 5.4 Taux de croissance spécifique moyen, μ_{MS}, en fonction de la concentration d'oxygène dissous de cultures en bioréacteurs.
Symboles vides : lignées VVG105 et VVG12; symboles pleins : portions en cuvée des cultures en réacteur effectuées avec la lignée VVG111 ainsi que leurs cultures témoins en flacons agités. Courbe pointillée : cinétique de saturation (K_{OD} = 10%, μ_{max} = 0,28 h^{-1}); courbe hachurée : cinétique de saturation avec inhibition par le substrat (K_{OD} = 20%, K_I = 76%, μ_{max} = 0,45 h^{-1})

donné lieu pour certaines conditions expérimentales à une limitation sévère en oxygène pouvant biaiser leurs conclusions.

Parallèlement, les données de viabilité recueillies ne permettent pas de relier la concentration d'OD à une tendance générale à la hausse ou à la baisse de la viabilité au cours des cultures (Annexe 3, tableau A3.3 et figures indexées au tableau A3.1). La proportion des débris cellulaires, évaluée sur la base du volume stratifié de la biomasse centrifugée pour l'évaluation du PCV, n'a jamais dépassé 1 à 2% du volume de la biomasse. La viabilité de toutes les cultures décrites au tableau 2.1 est demeurée élevée. Similairement au comportement de la

culture décrite par la figure 5.1, la valeur minimale de viabilité a été observée à l'inoculation et était de 60% (Tableau A3.3). Pour toutes les cultures effectuées avec les lignée VVG12 et VVG105, la viabilité moyenne a varié entre 89 et 97% (Annexe 3). Seules les viabilités des cultures effectuées à une concentration d'OD de 10% ou de celle effectuée sans contrôle de la concentration d'oxygène et résultant en des concentrations d'OD demeurant sous 10%, ont décliné de 20% au cours de la culture, y compris pour les agrégats cellulaires de moins de 100 µm, indiquant qu'une concentration d'oxygène dissous de 10% ou moins suffit à préserver en grande partie la viabilité des cultures mais limite la croissance de la biomasse (Annexe 3, figures A3.6 et A3.28). Cette observation suggère, comme les résultats publiés par Kessel et Carr,[79] qu'il existe une concentration d'OD létale, ici légèrement sous 10%, au-dessous de laquelle la viabilité des cellules est affectée.

La possibilité d'une limitation interne en oxygène dans les amas cellulaires ne peut expliquer les ralentissements de croissance observés à faible concentration d'OD. En effet, considérant un taux d'assimilation d'O_2 constant à l'intérieur de l'amas (réaction d'ordre 0) et une limitation externe au transfert d'oxygène découlant d'un gradient de vitesse nul entre les amas et le liquide, deux hypothèses reproduisant des conditions extrêmes, la résolution des équations de bilans de masse sur l'oxygène à l'intérieur des amas cellulaires (Annexe 3) permet d'exprimer la limite du diamètre d'un amas qui permet de maintenir une concentration critique d'oxygène, OD_{cr}, fixée à 5% par rapport à la saturation, en fonction de la diffusivité de l'oxygène dans l'amas (assimilé à $(\mathcal{D}_{O_2})_{eau}$ puisque les membranes cellulaires n'offrent pas de résistance à la diffusion de l'oxygène); du taux spécifique moyen d'assimilation d'O_2 estimé sur une base volumique, $=OUR/(0{,}5 \cdot PCV)$, et de la concentration d'OD maintenue dans le milieu de culture, OD. Ainsi, le diamètre limite des amas, D_{lim}, pour lequel la concentration d'OD demeure supérieure à la concentration critique est donné par :

$$D_{lim} = 2\left[(OD - OD_{cr})\frac{2 \cdot \mathcal{D}}{OUR/0{,}5 \cdot PCV}\right]^{1/2} \qquad (72)$$

Pour les conditions observées aux cours des cultures, la limite calculée du diamètre moyen est supérieure à 500 µm, à l'exception d'une culture à 10% d'OD pour laquelle D_{lim} atteint 300 µm (Figure 5.5), alors que les diamètres des amas sont majoritairement de l'ordre de 100 à 300 µm (Annexe 3). Ainsi, la variation observée des taux spécifiques moyens de croissance de la biomasse en fonction de la concentration d'OD n'est pas causée par une limitation en oxygène.

À des concentrations d'OD plus élevées que 50%, une diminution des taux spécifiques moyen de croissance accompagnée d'un brunissement des cultures ont été observés, contrairement aux résultats obtenus en flacons agités par Tate et Payne[157] avec *C. roseus* en présence d'une concentration d'O_2 dans la phase gazeuse allant jusqu'à 60% et correspondant à une concentration d'OD de plus de 100% de saturation par rapport à l'air en tout temps. Ainsi, il semble exister, pour *V. vinifera* et dans les conditions de cultures utilisées, une concentration optimale d'OD favorisant la croissance autour de 50% d'OD.

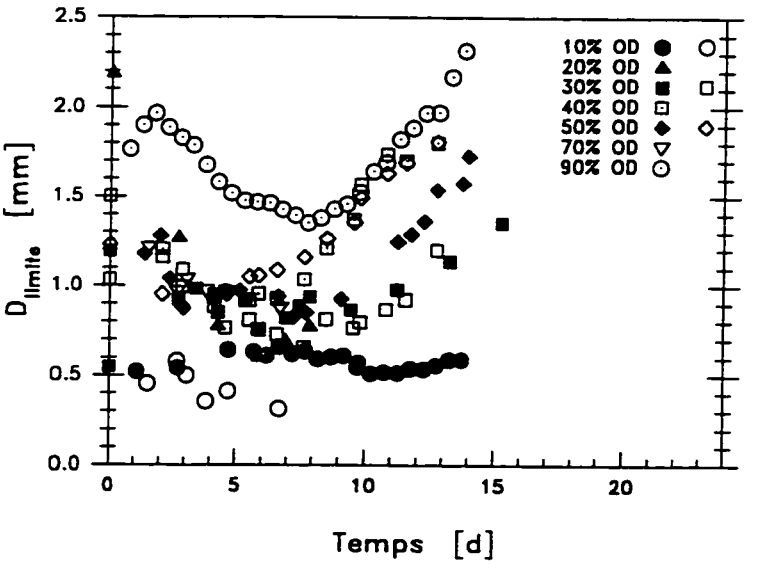


Figure 5.5 Limite de diamètre des amas cellulaires pour une oxygénation adéquate selon la concentration d'OD.
Lignées VVG105 et VVG12 confondues; symboles pleins : milieu B5, symboles vides : milieu B5DN.

Étant donné l'allure parabolique des résultats, il est difficile de représenter l'augmentation et la diminution successive du taux spécifique de croissance de la biomasse avec l'OD avec un modèle standard d'inhibition par le substrat : [105]

$$\mu = \mu_{max} \frac{1}{1 + \frac{K_{OD}}{OD} + \frac{OD}{K_{LOD}}} \quad (73)$$

En effet, la faible quantité et la variabilité des résultats font en sorte que même en imposant un poids relatif aux résultats obtenus à 10 et à 90%, une série de paramètres reliés peuvent assurer une bonne représentation de l'allure des données. Il n'est donc pas certain qu'ils aient une signification physique. Ainsi, nous avons arbitrairement choisi K_{OD} de l'ordre de 20% ce qui a pour effet d'imposer un μ_{max} ($= 2 \cdot \mu(K_{OD})$) élevé et une constante d'inhibition symétrique à la constante de saturation par rapport à la concentration optimale d'OD.

D'ailleurs, outre une hypothétique inhibition par le substrat lui-même, plusieurs phénomènes ont pu contribuer à la diminution du taux spécifique moyen de croissance de la biomasse à des concentrations d'OD plus grandes que 50%, observée à la figure 5.4.

a. **Lyse cellulaire.**

Cette diminution pourrait être le reflet d'une distorsion causée par une lyse cellulaire importante reliée au changement subit de composition du milieu, jumelé à une concentration élevée d'OD en début de culture. Au début de la culture, cette lyse est difficile à quantifier en utilisant les rapports de volume des strates de PCV (biomasse surmontée d'une couche de débris) étant donné les faibles volumes de biomasse mesurés. Toutefois l'observation microscopique des premiers échantillons des cultures a montré une quantité de débris croissante avec la concentration d'OD, pour atteindre un niveau similaire à celui observé en flacon agité (Chapitre 3).

b. **Toxicité potentielle.**

La diminution observée de $\overline{\mu}_{MS}$ pourrait aussi être un effet indirect de l'oxydation de composés présents dans la phase abiotique des cultures, provoquant le brunissement des cultures et résultant en l'accumulation de composés potentiellement toxiques.

c. **Cisaillement.**

Le cisaillement induit par les variations de la vitesse d'agitation pourrait aussi expliquer la diminution du taux spécifique moyen de croissance. Si c'est le cas, il semble toutefois que sous 50% d'OD, l'augmentation du taux de croissance supplée l'effet négatif de l'augmentation progressive de la vitesse d'agitation jusqu'à un maximum de 95 rpm (pour 50% d'OD) au moment de la fin de la phase exponentielle de croissance. Par contre, à 70% d'OD, on observe un taux de croissance spécifique moyen moindre qu'à 50% d'OD alors qu'un taux d'assimilation d'O_2 élevé a forcé l'augmentation de la vitesse d'agitation à 100 rpm dès le deuxième jour de culture. Or, comme le montrait une étude préliminaire,[116] une agitation à 100 rpm en début de culture, même dans le HRI, a pu causer un stress hydrodynamique suffisant pour provoquer la lyse d'une partie de la population cellulaire.

d. **Épuisement ou niveau élevé de CO_2.**

Finalement, les conditions prévalant dans le réacteur HRI en termes de concentration de CO_2 ne sont pas connues. Une augmentation du taux de production de CO_2 peut entraîner une élévation de la concentration de CO_2 dans le milieu de culture comme, inversement, l'augmentation du taux de transfert de gaz par la variation de la vitesse d'agitation peut provoquer un épuisement en CO_2.

Les études recensées fournissent généralement des informations fragmentaires sur l'effet de la concentration de CO_2 sur le comportement des cultures. Comme les sondes actuellement disponibles pour mesurer la concentration de CO_2 dans la phase liquide n'ont pas la fiabilité requise, les résultats publiés portent généralement sur l'effet d'une alimenta-

tion gazeuse enrichie en CO_2 sur la croissance et la production de métabolites secondaires. De plus, seules quelques études ont été effectués en mesurant, ou mieux en contrôlant, la concentration d'OD.[81,114,138] Dans l'état actuel de la littérature, les résultats rapportés tendent généralement à montrer qu'un apport externe de CO_2 a peu ou pas d'effet positif sur la croissance[7,81,101,114,137,157] bien qu'il semble prévenir le brunissement des cultures[83] et augmenter les rendements en métabolites secondaires.[67,81,83]

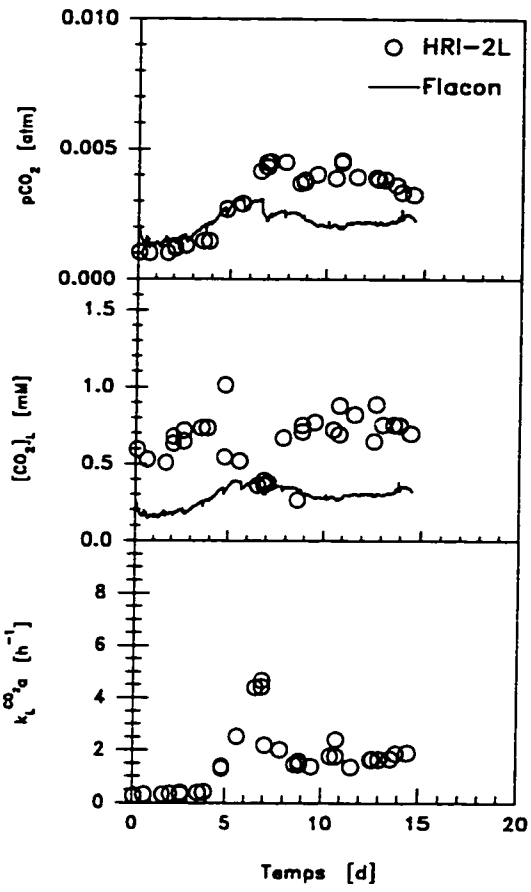


Figure 5.6 Concentrations calculées de CO_2 d'une culture en cuvée en bioréacteur et de sa culture contrôle en flacon agité et incidence de la variation du k_La dans le bioréacteur. Lignée VVG111, sc20, 50% d'OD et 60 à 100 rpm dans le bioréacteur, RQ fixé à 1.

La figure 5.6 présente les estimés des concentrations calculées de CO_2 dans les phases liquide et gazeuse correspondant aux cultures présentées aux figures 5.1 et 5.3. Les estimations ont été faites sur la base des taux volumiques d'assimilation d'O_2 mesurés et en posant le coefficient respiratoire égal à 1. On constate que pour les conditions d'opération du bioréacteur HRI utilisées lors de cette culture, la concentration de CO_2 dans la phase gazeuse devrait toujours être inférieure à 0,8%, ce qui la situerait à la limite inférieure de la plage de concentration testée dans les expériences d'enrichissement en CO_2 de l'alimentation gazeuse rapportées dans la littérature. Comme l'illustre aussi la figure 5.6, la variation de la concentration de CO_2 dans la phase liquide du bioréacteur, bien qu'en partie causée par l'évolution des taux d'assimilation d'O_2, est surtout sensible aux changements du k_La estimé suite à

l'augmentation de la vitesse d'agitation et à la diminution du volume de culture causée par l'évaporation et l'échantillonnage.

Pour la portion opérée en cuvée des cinq cultures en bioréacteurs effectuées avec la lignée VVG111 à 50% d'OD, les concentrations calculées de CO_2 dans le milieu dépendent des conditions d'alimentation gazeuses, du k_La et du volume de culture. Ainsi, les conditions d'opération, dictées principalement par l'objectif de contrôle de la concentration d'OD, font en sorte que les concentrations calculées de CO_2 dans la phase liquide fluctuent surtout avec les variations de k_La, bien qu'elles demeurent dans une plage variant de 0,2 à 1,2 mmol CO_2 L^{-1} avec des valeurs moyennes de 0,6 à 1,0 (Figure 5.7). Comme pour ces cultures les taux spécifiques moyens de croissance sont similaires (Figure 5.4), les taux spécifiques de croissance ne devraient donc pas avoir été influencés par les faibles variations calculées de concentration de CO_2 dans le liquide. Pour leurs trois cultures témoins en

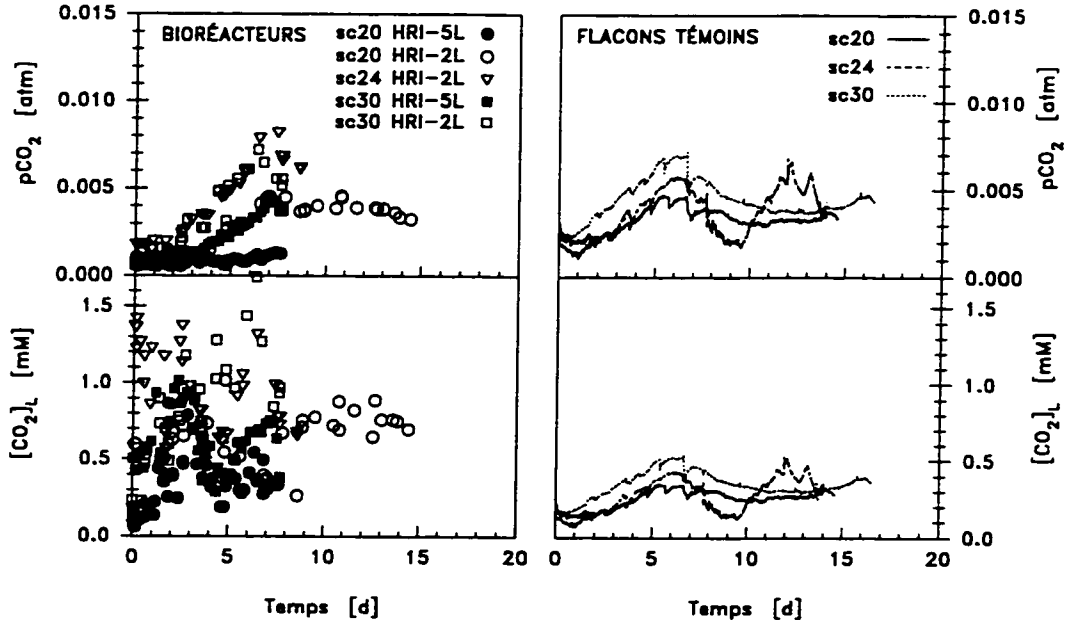


Figure 5.7 Comparaison des estimés des concentrations de CO_2 dans les phases gazeuse et liquide de cultures en bioréacteur et de cultures témoins en flacons agités. Lignée cellulaire VVG111, trois cultures en flacons agités, une culture complète opérée en cuvée et quatre autres cultures en bioréacteur opéré en cuvée pour une période de 6 à 8 jours en début de culture, RQ fixé à 1.

flacons agités, la concentration calculée de CO_2 que subissent les cellules fluctue d'environ 0,3 mmol CO2 L^{-1} pour chacune des expériences en réponse aux variations de l'OUR (Figure 5.7). Dans ce cas, cette faible variation de concentration de CO_2 calculée pour les flacons témoins ne peut expliquer des taux spécifiques moyens de croissance variant de 0,19 à 0,30 d^{-1} (Figure 5.4). Ces deux observations indiquent que les taux spécifiques moyens de croissance devraient être influencés par un autre paramètre de culture que la concentration de CO_2 dans le milieu.

Dans les conditions d'opération utilisées, la faible capacité de transfert du réacteur HRI fait en sorte que les concentrations de CO_2 dans les phases gazeuses et liquides sont similaires aux conditions prévalant dans les flacons agités témoins et n'ont pas occasionné un épuisement en CO_2, essentiel aux cellules végétales. Dans ces conditions, il est raisonnable d'affirmer que les conditions de culture ne devraient pas non plus avoir occasionné d'épuisement en un autre composé volatil mais soluble essentiel tel l'éthylène.

Les différences entre les conditions de culture prévalant dans les bioréacteurs HRI utilisés avec aération de surface uniquement et celles des flacons agités utilisé comme système de culture témoin semblent donc surtout reliées à la concentration d'OD et au cisaillement subi.

5.3.2.2 Performance comparée des cultures en bioréacteur et en flacons agités

En termes de production de biomasse, la littérature ne présente pas de résultats comparatifs de cultures en bioréacteur et en flacon agité, ce dernier demeurant pourtant le système de culture de référence. Une comparaison des indices de croissance, $(x/x_0)_{MS}$, des cultures effectuées dans les bioréacteurs HRI et de leurs cultures témoins en flacons agités montre cependant que pour toutes les conditions d'oxygénation explorées, une production de biomasse égale ou supérieure est obtenue dans les bioréacteurs (Figure 5.8). Ceci est particulièrement accentué lorsque $(x/x_0)_{MS}$ atteint une valeur de 4 après environ 5 à 6 jours de culture. À ce moment, OUR atteint un plafond et OD augmente dans les flacons agités (Figures 4.4 et 5.3). De plus, à la lumière

des courbes comparées d'oxygène dissous en bioréacteur et en flacons agités (Figures 5.3), ces résultats tendent à confirmer un effet négatif des hautes concentrations d'OD sur les cultures de *V. vinifera.*

En résumé, les résultats présentés ici indiquent que, pour les cellules utilisées, les conditions prévalant dans le réacteur à double ruban hélicoïdal sont supérieures à celles des flacons pour la

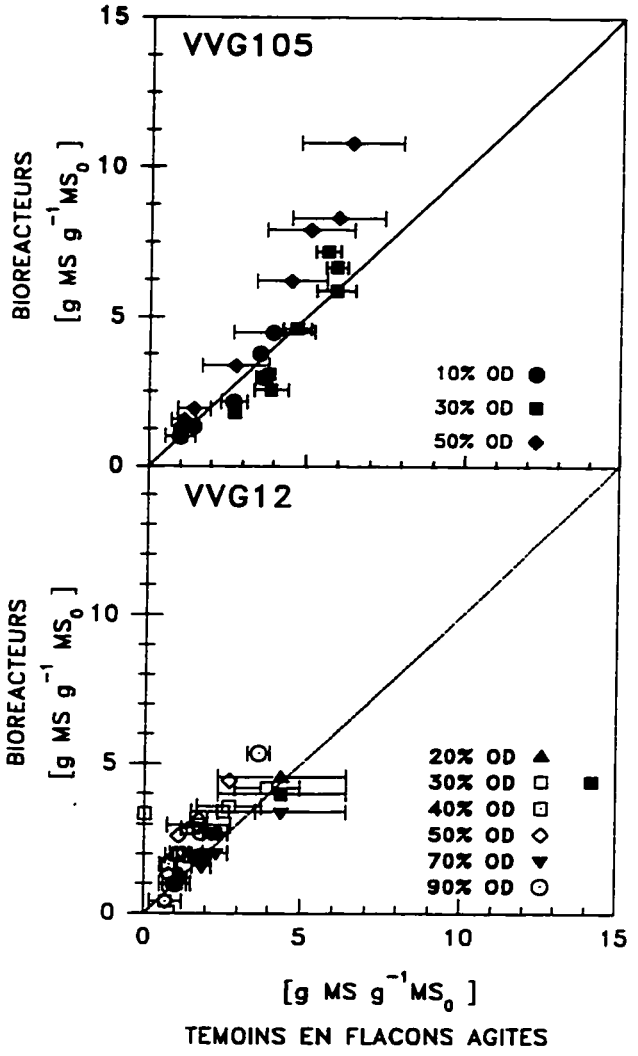


Figure 5.8 Comparaison des indices de croissance des cultures en bioréacteur avec leur cultures témoins en flacon agité.

production de biomasse même si les taux spécifiques moyens de croissance de la biomasse sèche pour la portion exponentielle des courbes de croissance sont influencés négativement par les concentration d'OD trop faibles (~10% d'OD) ou trop élevées (~90% d'OD).

5.3.3 Concentration d'oxygène dissous et assimilation d'oxygène

Dans les sections précédentes, le plafonnement du nombre de cellules et l'inflexion de la courbe de croissance de la biomasse sèche ont été associés à l'observation d'un taux volumique maximum d'assimilation d'O_2, OUR_{max}. Parallèlement, pour un éventail plus large de cultures en cuvée pour lesquelles seules les données de biomasse sèche sont disponibles, le taux spécifique moyen de croissance de la biomasse semble varier avec la concentration d'OD.

Pour toutes ces cultures, la figure 5.9 montre, pour toutes les cuvées, une progression de l'OUR mesuré similaire à celle illustrée à la figure 5.3: augmentation progressive de l'OUR,

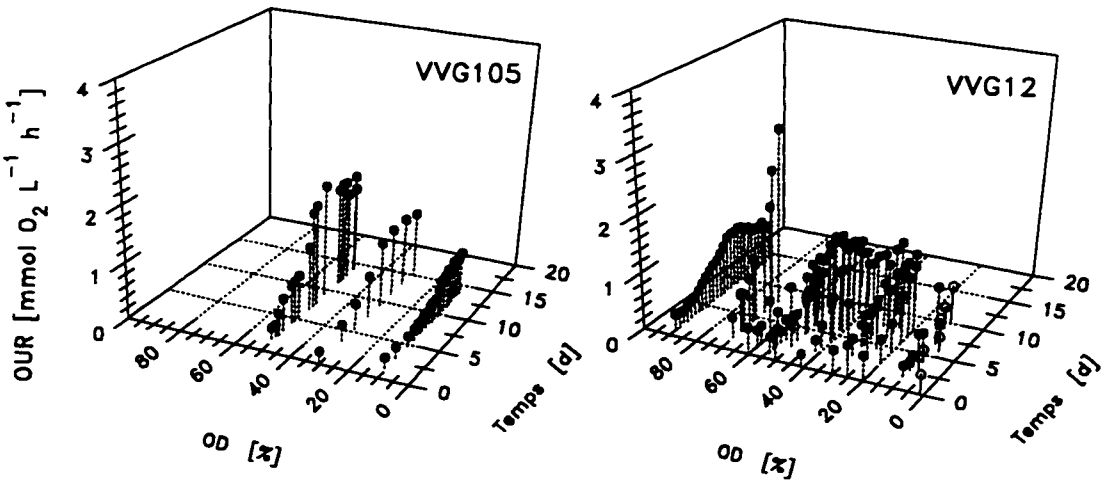


Figure 5.9 Progression des taux volumiques d'assimilation d'oxygène dans le temps selon la concentration d'oxygène dissous de cultures en cuvée effectuées avec les lignées VVG12 et VVG105

plafonnement plus ou moins prolongé et, lorsque les cultures ont été poursuivies suffisamment longtemps pour l'observer, diminution du taux d'assimilation d'O_2. Afin de pouvoir présenter ces informations sur une base comparable, les taux spécifiques d'assimilation d'O_2, q_{O_2}, ont été calculés.

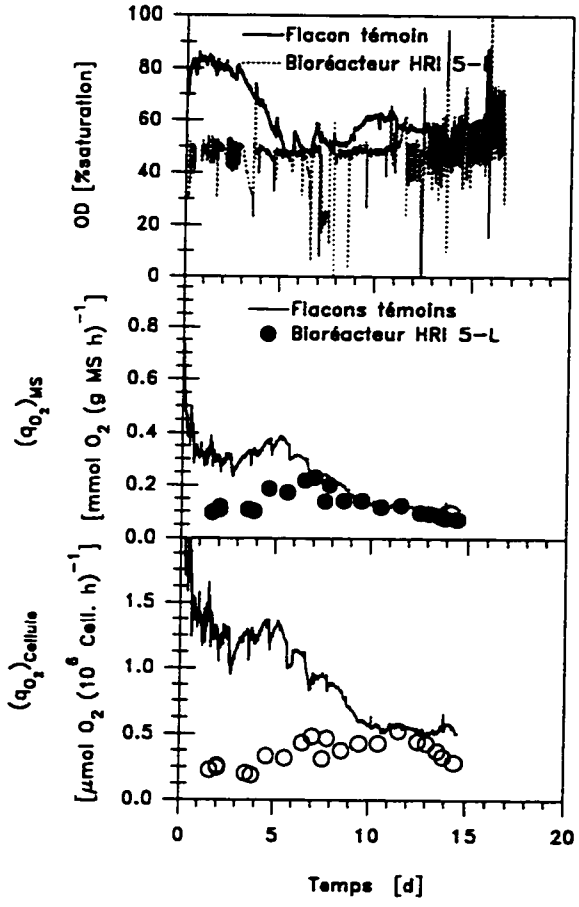


Figure 5.10 Comparaison des taux spécifiques d'assimilation d'oxygène d'une culture en bioréacteur et de sa culture contrôle en flacon agité.

Lignée VVG111, sc20, 50% d'OD et 60 à 100 rpm dans le bioréacteur.

Pour la cuvée présentée plus haut, il est possible de calculer ces taux spécifiques en fonction de la biomasse sèche et du nombre de cellules. La figure 5.10 présente la progression de taux spécifique pour cette cuvée et sa culture témoin en flacon agité. Si l'on excepte les premières heures de culture, $(q_{O_2})_{MS}$ reste stable ou augmente jusqu'à un maximum pour ensuite diminuer pour toutes les cultures effectuées. Similairement, les taux spécifiques d'assimilation d'O_2 des cellules, $(q_{O_2})_{cell}$, augmentent régulièrement pendant 6 à 7 jours de culture, plafonnent et diminuent vers le treizième jour de culture, au moment où le milieu est épuisé en nitrate et que le fructose reste la seule source d'hydrates de carbone encore disponible (Figure 5.1).

Ces résultats reflètent un changement dans l'activité métabolique des cellules. Comme il a été illustré au chapitre 3, en

mettant en relation les comptes cellulaires et les changements dans les taux volumiques d'assimilation d'oxygène, l'inflexion des taux volumiques et spécifiques d'assimilation d'oxygène est reliée à une diminution de la capacité des cellules à proliférer. Compte tenu de la concentration d'OD de 50% maintenue dans le bioréacteur, il ne peut s'agir ici d'une limitation en oxygène comme cela aurait pu être le cas dans les flacons agités qui ne sont pas soumis à un contrôle de la concentration d'OD. Ainsi, l'inflexion des courbes de $(q_{O_2})_{MS}$ et de $(q_{O_2})_{cell}$ renforce l'hypothèse faite plus haut d'une limitation nutritionnelle à la prolifération cellulaire. De plus, pour la culture témoin en flacon agité, la disponibilité plus grande de l'oxygène dans les 5 à 6 premiers jours de culture comparativement à 50% d'OD dans la culture correspondante en bioréacteur (Figure 5.3), se traduit par des taux spécifiques d'assimilation d'O_2 plus élevés dans les flacons agités.

Même en interprétant avec prudence les résultats issus des cultures à 10% d'OD, les courbes de progression de $(q_{O_2})_{MS}$ dans le temps et en fonction de la concentration d'OD, présentées à la figure 5.11 pour toutes les cultures en bioréacteurs, confirment que les taux

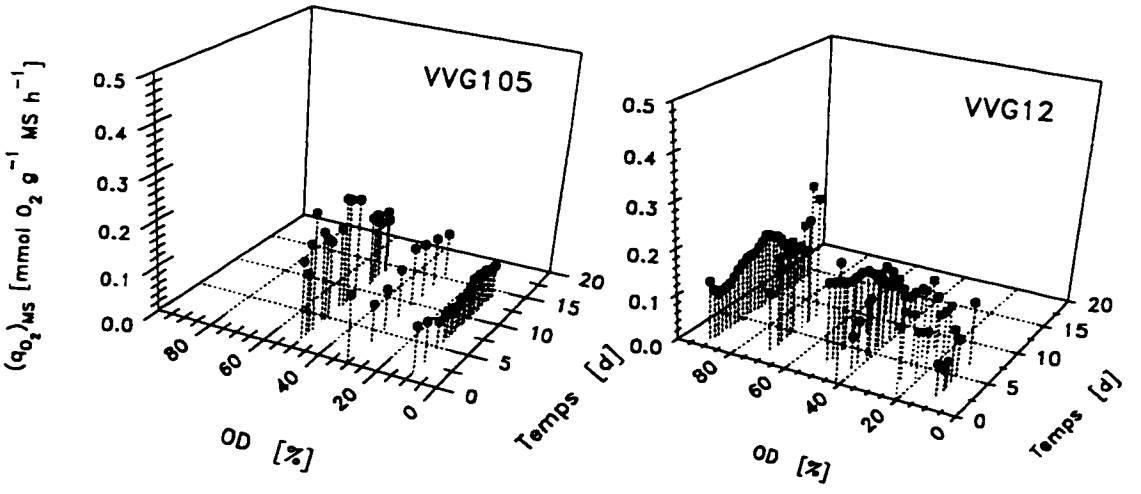


Figure 5.11 Progression des taux spécifiques d'assimilation d'oxygène dans le temps selon la concentration d'oxygène dissous de cultures en cuvée de cellules des lignées VVG12 et VVG105 dans le milieu B5.

la période où la croissance cellulaire n'est pas limitée, les taux spécifiques d'assimilation d'O_2 maximaux varient de 0,1 mmol O_2 g^{-1} MS h^{-1} à 10% d'OD jusqu'à 0,3 mmol O_2 g^{-1} MS h^{-1} à 70% OD. Comme l'illustre la figure 5.12, en présentant la progression historique des taux spécifiques d'assimilation d'O_2 suivant le nombre de repiquage subi, ces comportements ne découlent pas d'une sélection des cellules à haut taux de croissance souvent observée après nombre de sous-cultures. Le taux spécifique minimal d'assimilation d'O_2 observé en fin de culture est de l'ordre de 0,04 mmol O_2 (g MS h)$^{-1}$ (Annexe 3, figures indexées au tableau A3.1).

Plus globalement, la figure 5.13 illustre la tendance observée sur les variations des taux spécifiques d'assimilation d'O_2 dans la phase de prolifération cellulaire pour deux lignées et deux milieux de culture en fonction de la concentration d'OD. Les taux spécifiques d'assimilation d'O_2 augmentent avec la concentration d'OD similairement à ce qu'a observé Haigh en mesurant la progression des taux spécifiques d'assimilation d'O_2 dans des flacons agités munis de bouchons étanches, avec la concentration résiduelle d'OD dans la tête du flacon, celle-ci évoluant de 31 % à 0 % d'OD.[56] Comme pour le taux spécifique moyen de croissance de la biomasse sèche caractérisant cette période (Figure 5.4), une concentration d'OD élevée a un effet négatif sur la respiration. Même s'il a été suggéré que ces effets négatifs varient selon les espèces,[157] il est intéressant de noter que les taux d'assimilation d'O_2 demeurent élevés à 70% d'OD alors que les taux spécifiques moyens de croissance de la biomasse sont plus faibles qu'à 50% d'OD (Figure 5.4).

On peut tenter une analyse similaire sur les données tirées d'une étude récente effectuée avec des cellules de *N. tabacum* par l'équipe de Ho et coll.[64] Ces chercheurs ont effectués un suivi de la biomasse sèche, de la viabilité, du k_La et du taux volumique de respiration de culture en cuvée effectuées dans un bioréacteur agité à quatre vitesses de rotation au moyen d'hélice marine et aéré avec de l'air à un taux unitaire constant de 0.43 vvm. Leurs résultats montrent bien une perte de viabilité ainsi qu'une diminution du taux spécifique global de croissance de la biomasse et de la quantité maximale de biomasse produite qui semble reliée à l'augmentation de l'agitation mécanique dans le réacteur. Une représentation graphique de la progression de

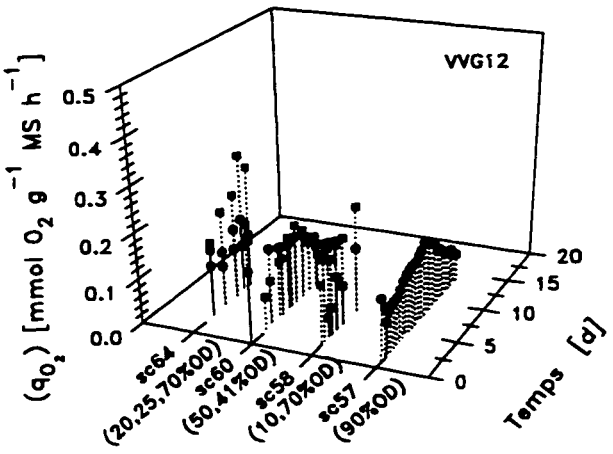


Figure 5.12 Progression des taux spécifiques d'assimilation d'oxygène dans le temps selon l'histoire des inocula de cultures en cuvée de cellules de la lignée VVG12.

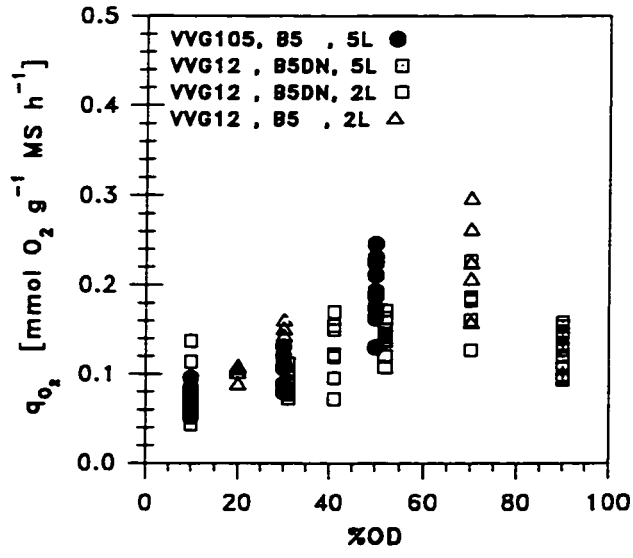


Figure 5.13 Variation des taux spécifiques d'assimilation d'O_2 avec la concentration d'O_2 avant la manifestation d'une limitation nutritionnelle.

l'OUR en fonction du temps et de la concentration d'OD (évaluées à partir de leurs données)[64] montre que l'OUR décroît en fonction de la vitesse d'agitation mais aussi en fonction de la concentration d'OD résultante (Figure 5.14) contrairement à nos résultats (Figure 5.9).

Toutefois, la concentration de biomasse sèche viable décroît relativement plus rapidement avec la vitesse d'agitation que l'OUR; comme l'illustre la figure 5.15, il s'ensuit que les taux spécifiques d'assimilation d'O_2, $(q_{O_2})_{MS}$, tendent tout de même à augmenter au delà de 80% d'OD. Ce pourrait être un effet de l'augmentation de la concentration d'OD comme une réaction des cultures au stress mécanique subi. Dans les conditions expérimentales utilisées, ces résultats, qui figurent parmi les seules études pour lesquelles des données comparables aux nôtres sont disponibles, ne permettent pas de dissocier l'effet de la concentration d'OD de celui de l'augmentation de la vitesse d'agitation.

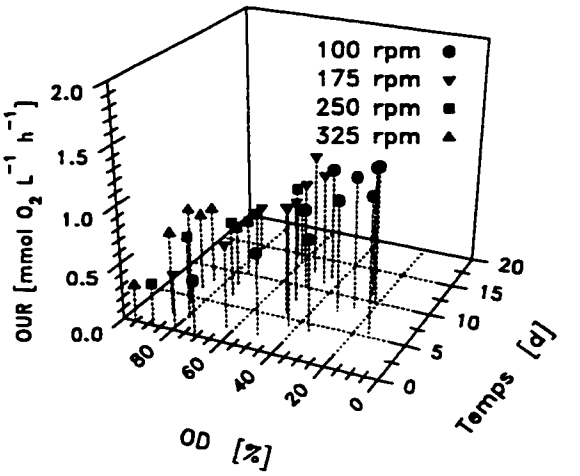


Figure 5.14 Progression des taux volumiques d'assimilation d'oxygène dans le temps selon la concentration d'oxygène dissous de cultures de N. tabacum en bioréacteur agité mécaniquement à quatre vitesses d'agitation. D'après Ho et coll.[64]

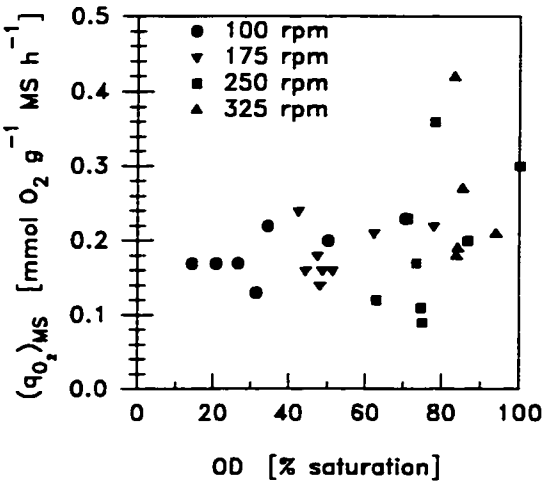


Figure 5.15 Variation des taux spécifiques d'assimilation d'O_2 avec la concentration d'O_2 avant l'observation de OUR_{max} de cultures de N. tabacum en bioréacteur agité mécaniquement à quatre vitesses d'agitation. D'après Ho et coll.[64]

Pour les cultures effectuées avec la lignées VVG12 dans les milieux B5 et B5DN, les prédictions de concentration de CO_2 dans la tête du bioréacteur HRI et dans le milieu sont similaires à celles présentées plus haut (Figure 5.16). Les pressions partielles de CO_2 dans la phase gazeuse suivent grossièrement l'allure des courbes correspondantes de OUR (Figure 5.9). Pour les raisons évoquées à la section 5.3.2.1 (page 159), la concentration calculée de CO_2 dans la phase liquide a beaucoup fluctué.

On ne peut toutefois établir une relation claire entre la variation des taux de croissance selon la concentration d'OD maintenue dans le réacteur (Figure 5.4) et les concentrations calculées de CO_2 dans le liquide induites par les actions de contrôle de l'OD (Figure 5.16). Ainsi, dans la phase exponentielle de croissance de la biomasse, pour les cultures effectuées à 10 et 40% d'OD auxquelles correspondent les taux spécifiques de croissances minimaux et maximaux observés, les concentrations de CO_2 dans le liquide varient de 0,2 à 0,7 mM CO_2 alors qu'à l'exception de la culture effectuée à 70% d'OD, elles ont varié entre 0,5 et 1.4 mM CO_2 pour toutes les autres cultures. La culture effectuée à 70% d'OD, elle, présente

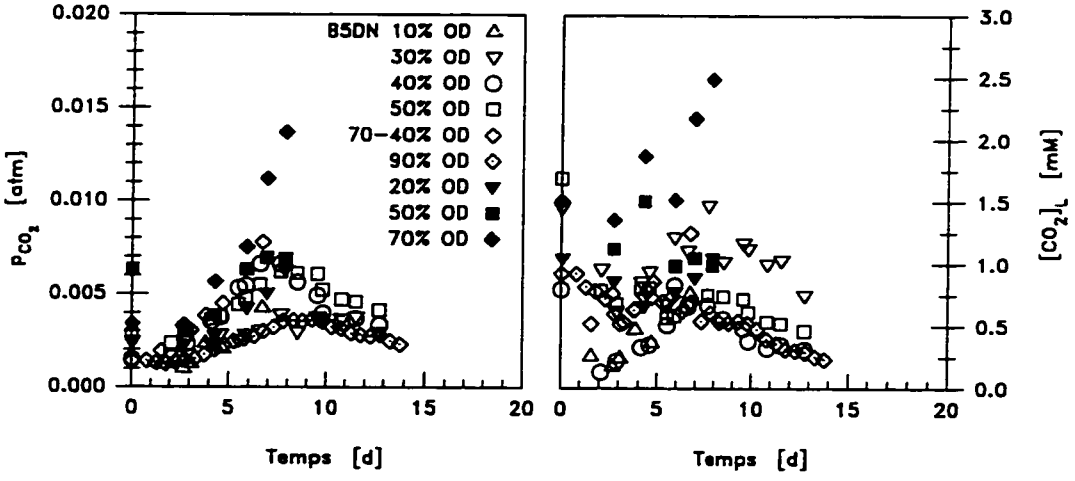


Figure 5.16 Estimés des concentrations de CO_2 dans les phases gazeuse et liquide des cultures en bioréacteur effectuées à diverses concentrations d'OD avec la lignée VVG12.

une pression partielle calculée de CO_2 plus élevées que dans les autres cultures, atteignant 0,015 atm à laquelle correspond une concentration en CO_2 de 2,5 mM dans le milieu de culture. Il est possible que cette concentration plus grande de CO_2 ait inhibé la croissance expliquant ainsi que l'on observe une augmentation du taux spécifique de respiration et une diminution du taux spécifique de croissance moyen à 70% par rapport aux cultures effectuées à 50% (Figures 5.4 et 5.13). Seules des études spécifiques avec contrôle de la concentration de CO_2 pourraient éclairer cette question.

Par ailleurs, si l'effet négatif d'une concentration élevée d'OD sur la croissance est relié à une oxydation de composés présents dans la phase abiotique des cultures, il s'avère que cet environnement provoque une dépense énergétique élevée. Dans ce contexte, il aurait été intéressant de pouvoir comparer pour ces conditions les rendements apparents en biomasse sur les hydrates de carbones. On peut toutefois d'ors et déjà conclure que chez *V. vinifera* les taux spécifiques d'assimilation d'oxygène dissous sont affectés par la concentration d'oxygène dissous présent dans le milieu de culture.

5.3.4 Rendements

Les rendements apparents en biomasse sèche sur les principaux ions mesurés dépendent fortement de la masse atteinte par la biomasse en fin de culture. Dans des conditions adéquates d'oxygénation, la masse sèche est clairement reliée à la consommation des hydrates de carbone puisqu'ils constituent l'élément principal du milieu de culture et que la proportion d'élément carbone dans la composition des cellules végétales cultivées in vitro est de l'ordre de 40% en masse, comparativement à 8% pour l'azote. [158,165] Les rendements apparents en biomasse sont donc régis par les voies métaboliques utilisées pour l'assimilation des hydrates de carbone : soit pour la dégradation des sources de carbone en énergie, soit pour leur intégration à la biomasse comme constituant cellulaire ou comme réserve d'hydrates de carbones.

Une incursion dans les résultats des cuvées alimentées présentées au chapitre 6 (et à l'annexe 4) permet d'évaluer la variabilité associée aux estimés de productivité en biomasse sur

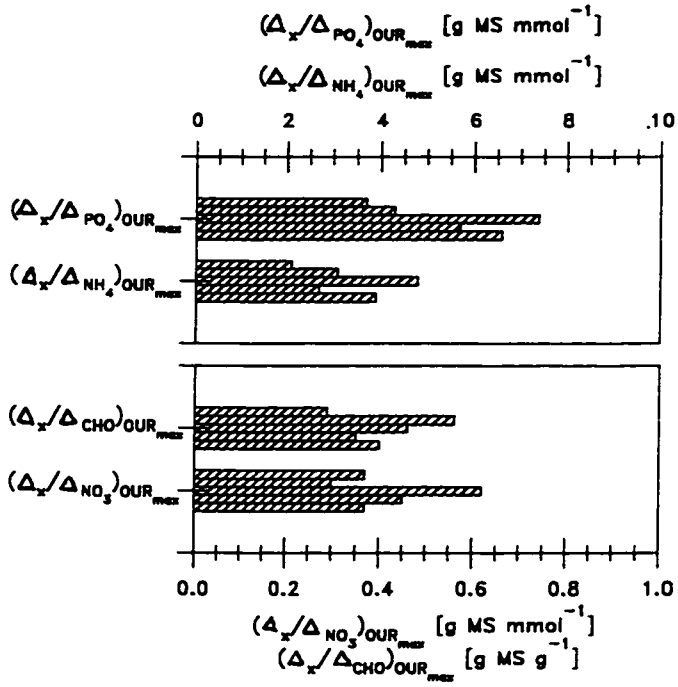


Figure 5.17 Production de biomasse par unité de nutriment consommé à OURmax de cinq cultures en bioréacteur contrôlées à 50% d'OD, effectuées avec la lignée VVG111.

la portion des cultures opérée en cuvée à 50% d'OD. Les résultats illustrés à la figure 5.17 montrent en effet des écarts-types importants : 1,5 g MS mmol^{-1} pour Y_{x_{MS}/PO_4} ; 1,0 pour Y_{x_{MS}/NH_4} ; 0,12 pour Y_{x_{MS}/NO_3} et 0,1 g MS g^{-1} pour $Y_{x_{MS}/CHO}$. Ces variations sont attribuables aux erreurs relatives sur les mesures de concentration de biomasse et de nutriments, mais aussi à la qualité de l'inoculum, à la grosseur des agrégats cellulaires et, possiblement, à l'évolution du comportement de la lignée cellulaire avec le nombre de sous-cultures subies. La variance associée à ces estimés accentuent donc les difficultés reliées à l'interprétation des rendements en biomasse sèche.

Malgré cette réserve importante, les rendements globaux en biomasse sèche sur les ions ammonium, phosphate et nitrate ainsi que sur les hydrates de carbones sont présentés au tableau 5.1, pour toutes les conditions de cultures. De plus, pour compléter l'information dans le

sens proposé au chapitre 3 d'une modification du métabolisme au moment où le taux volumique de respiration maximal est observé, les productions de biomasse sèche par unité de nutriments consommés au moment de cet événement sont aussi présentés au tableau 5.2.

Tableau 5.1 Rendements globaux des cultures en cuvée en bioréacteurs.

Lignée	Milieu de culture	OD	HRI	$\overline{Y_{X/NH_4}}$	$\overline{Y_{X/PO_4}}$	$\overline{Y_{X/NO_3}}$	$\overline{Y_{X/CHO}}$
VVG		%		g MS mmol^{-1}	g MS mmol^{-1}	g MS mmol^{-1}	g MS g^{-1}
105	B5	10	10	4,5	7,6	0,45	0,38
105	B5	30	9	5,0	9,4	0,41	0,38
105	B5	50	11	7,8	13	0,49	0,38
12	B5DN	10	13	3,8	8,2	0,37	ND
12	B5DN	30	16	4,7	6,8	0,58	ND
12	B5DN	70_{4d}-40	15	3,7	6,4	0,32	ND
12	B5DN	41	18	6,5	ND	0,92	ND
12	B5DN	50	17	8,8	14	0,95	ND
12	B5DN	90	12	4,1	10	0,84	ND
12	B5	20	20	ND	ND	0,49	ND
12	B5	50	21	ND	ND	0,58	ND
12	B5	70	22	ND	ND	0,32	ND
109	B5QN	54	24	2,8	ND	ND	ND
109	B5QN	60	25	3,1	5,7	0,70	ND
109	B5QN	NC	26	1,3	ND	ND	ND
111	B5	50	28	8,2	11	0,39	0,41

CH_2O: Hydrates de carbone
nd: non disponible

B5: $B5NA_{0.2}K_{0.1}$(3% Saccharose)
B5 DN B5(12,5mM KNO_3)
B5 QN B5(6,25mM KNO_3)

$\overline{Y_{MS/()}} = \frac{(x_{final} - x_0)_{MS}}{[\,]_0 - [\,]_{final}}$ *ou* $\frac{(x_{max} - x_0)_{MS}}{[\,]_0 - [\,]_{x_{max}}}$ représente le rendement global

Tableau 5.2 ***Production de biomasse sèche par unité de nutriment consommé des cultures en cuvée en bioréacteurs, évaluée au moment où OUR est maximal.***

Lignée	Milieu de culture	OD	HRI	$\left(\frac{\Delta x_{MS}}{\Delta NH_4}\right)_{OUR_{max}}$	$\left(\frac{\Delta x_{MS}}{\Delta PO_4}\right)_{OUR_{max}}$	$\left(\frac{\Delta x_{MS}}{\Delta NO_3}\right)_{OUR_{max}}$	$\left(\frac{\Delta x_{MS}}{\Delta CHO}\right)_{OUR_{max}}$
VVG		%		g mmol^{-1}	g mmol^{-1}	g mmol^{-1}	g g^{-1}
105	B5	10	10	3,6	6,1	0,50	0,36
105	B5	30	9	4,6	8,6	0,47	0,40
105	B5	50	11	5,5	8,8	0,54	0,44
12	B5 DN	10	13	3,8	8,2	0,37	ND
12	B5 DN	30	16	2,7	3,9	0,76	ND
12	B5 DN	70_{4d}-40	15	3,7	6,4	0,32	ND
12	B5 DN	41	18	3,2	ND	0,45	ND
12	B5 DN	50	17	5,1	7,5	0,39	ND
12	B5 DN	90	12	1,8	4,8	0,48	ND
12	B5	20	20	ND	ND	0,49	ND
12	B5	50	21	ND	ND	0,58	ND
12	B5	70	22	ND	ND	0,32	ND
109	B5 QN	54	24	2,8	ND	ND	ND
109	B5 QN	60	25	3,1	5,7	0,70	ND
109	B5 QN	NC	26	1,3	ND	ND	ND
111	B5	50	27	2,1	3,7	0,37	0,29
111	B5	50	28	3,1	4,3	0,30	0,56
111	B5	50	30	4,8	7,4	0,62	0,46
111	B5	50	31	2,7	5,7	0,45	0,35
111	B5	50	32	3,9	6,6	0,37	0,40

CH_2O: Hydrates de carbone
nd: non disponible

B5: B5$NA_{0.2}K_{0.1}$(3% Saccharose)
B5 DN B5(12,5mM KNO_3)
B5 QN B5(6,25mM KNO_3)

$$\left(\frac{\Delta x_{dw}}{\Delta[\ ]}\right)_{OUR_{max}} = \frac{x_{OUR_{max}} - x_0}{[\ ]_0 - [\ ]_{OUR_{max}}} \quad ou \quad \frac{x_{OUR_{max}} - x_0}{[\ ]_0 - 0} \text{ selon le cas}$$

5.3.4.1 Hydrates de carbone

Malgré un nombre limité de données sur la consommation d'hydrates de carbone, il est intéressant de noter que pour la série de cultures effectuées avec la lignée VVG105, les rendements globaux en biomasse sont constants (Tableau 5.1) alors que les taux spécifiques de croissance et d'assimilation d'O_2, évalués sur une base sèche, augmentent avec la concentration d'OD (Figures 5.9 et 5.13). Cela confirme que les cultures étant limitées par un autre nutriment, les hydrates de carbone déterminent la concentration finale de biomasse sans affecter le taux de croissance. [33]

Les expériences en flacons analysées au chapitre 3 ont montré qu'entre le début des cultures et le moment où le taux volumique d'assimilation d'oxygène atteint un maximum, la croissance de la biomasse reflète la prolifération cellulaire. En bioréacteur, pour la même portion des cultures, la production de biomasse par unité d'hydrates de carbone ou d'ion nitrate consommée a peu varié avec les conditions d'oxygénation du milieu compte tenu de la variabilité des mesures (Figure 5.18 et Tableau 5.2) si bien qu'il est difficile de conclure quant aux relations

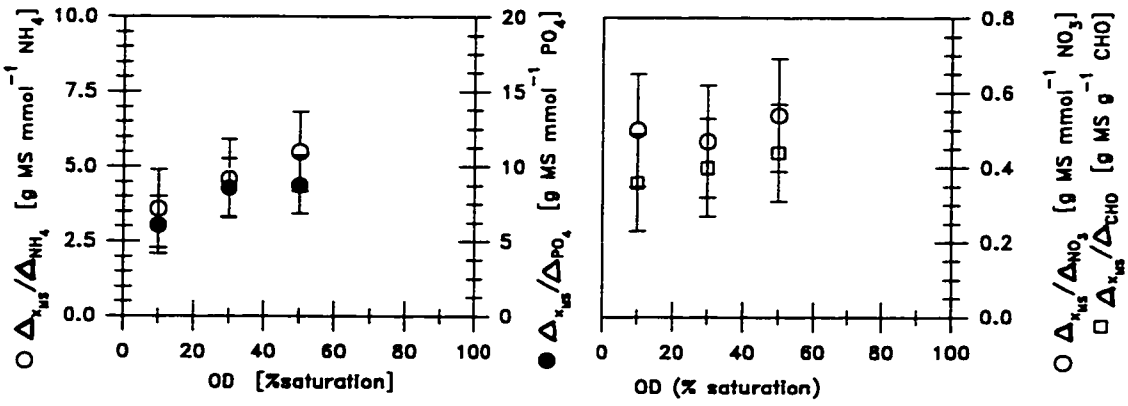


Figure 5.18 Production de biomasse par unité de nutriment consommé en fonction des conditions d'oxygénation du milieu de culture pour la lignée VVG105.

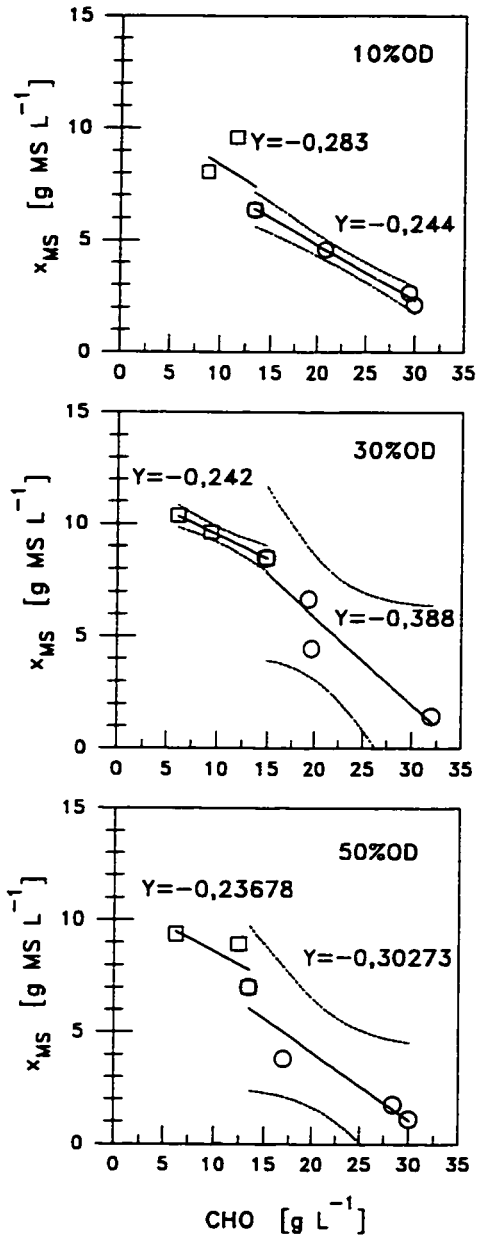


Figure 5.19 Production de biomasse en fonction de la concentration d'hydrates de carbone pour des cultures effectuées à 10, 30 et 50% d'oxygène dissous avec la lignée VVG105.(Y = rendements apparents)

entre la concentration d'OD, la consommation de ces nutriments et l'augmentation de la concentration de biomasse ou la prolifération cellulaire.

Pendant la même période, le rendement apparent en biomasse sur les hydrates de carbone était cependant plus élevé qu'après que OUR_{max} ait été observé (Figure 5.19). Le glucose étant consommé préférentiellement au fructose par les cellules de *V. vinifera* (Figures 4.2 et 5.1), il est possible que cette observation soit le reflet d'un rendement différent pour chacune de ces sources de carbone. Les mesures de concentrations d'hydrates de carbones disponibles ne permettent cependant pas de quantifier deux rendements avec précision.

L'observation de l'augmentation (non mesurée) de la viscosité du milieu en fin de culture, la présence d'un gâteau visqueux après une seconde filtration du milieu sur des filtres d'une porosité de 0,2 µm et la formation d'un gel lors de la congélation des échantillons de milieu sont la conséquence d'une production de biopolymères ou de protéines extracellulaires qui devraient avoir un effet négatif sur les rendements en biomasse. Il est aussi plausible

qu'une limitation nutritionnelle ayant provoqué le ralentissement de la prolifération cellulaire, la constitution de réserves intracellulaires des éléments nutritifs encore présents dans le milieu extracellulaire devienne l'activité métabolique ayant la plus grande influence sur l'augmentation de la masse sèche. L'augmentation de la masse spécifique des cellules en fin de culture reflète ce grossissement des cellules (Figure 3.1 et Annexe 2), et le rendement apparent en biomasse sur les hydrates de carbones (ici, le fructose comme source résiduelle d'hydrates de carbone) pourrait ne pas être le même pendant cette seconde moitié de la culture, de même, probablement, que le coefficient respiratoire.

Les valeurs moyennes de la quantité d'hydrates de carbone que les cellules utilisent pour fabriquer des composés extracellulaires carbonés peuvent être estimées pour les trois cultures en bioréacteur de VVG105 sur la base du bilan de masse sur le carbone et du coefficient respiratoire moyen, $\overline{RQ}$, généralement observé pour les cultures de cellules végétales. En effet, connaissant la quantité d'hydrates de carbones consommés, posant un contenu en carbone de la biomasse, g C $(g\ MS)^{-1}$, variant de 35% à 41%, [158,165] et un coefficient respiratoire moyen de 1,15, [127] et sommant sur toute la durée de la culture la quantité d'oxygène totale consommée, il est possible d'estimer la proportion d'hydrates de carbone qui a été utilisée pour produire des polysaccharides extracellulaires, g $C_{extracell.}$/g $C\text{-}CH_2O$, ou la quantité relative de composés extracellulaires de composition moyenne similaire à celle de la biomasse produite, [35] g $C_{extracell.}$/g $C_{produit}$, par les relations :

$$\frac{C_{extracell.}}{C-CH_2O} = \frac{\Delta CHO - \sum_{t_0}^{t} CO_{2\,produit} - \left(\Delta X \cdot \frac{C\text{-mole}}{g\,MS}\right)}{\Delta CHO} \quad \text{et} \tag{74}$$

$$\frac{C_{extracell.}}{C_{produit}} = \frac{\Delta CHO - \sum_{t_0}^{t} CO_{2\,produit} - \left(\Delta X \cdot \frac{C\text{-mole}}{g\,MS}\right)}{\Delta CHO - \sum_{t_0}^{t} CO_{2\,produit}} \tag{75}$$

où

$$\sum_{t_0}^{t} CO_{2\,produit} = \overline{RQ} \cdot \sum_{t_0}^{t} \left(OUR_t \cdot V_{L_t} \right) \Delta t_t \qquad (76)$$

Une approximation de l'erreur sur ces estimés a été faite en considérant des contributions de l'erreur de mesure sur le volume initial de culture, sur les quantités de biomasse produite et d'hydrates de carbone consommés de 50 mL, 1 g L^{-1} et 1 g L^{-1} respectivement, et d'une erreur de 5% sur l'assimilation globale d'O_2.

Ainsi estimés, les proportions d'hydrates de carbones utilisés pour la production de composés extracellulaires et la proportion de ces composés par rapport au total des composés organiques produits, sont présentés au tableau 5.3. On peut y constater que le pourcentage d'hydrates de carbone servant de base à la production de composés extracellulaires diminue

Tableau 5.3 ***Variation de la proportion d'hydrates de carbone utilisés pour la production de composés extracellulaires et du ratio de ces composés par rapport à la biomasse sèche produite en fonction de la concentration d'OD, au moment où OUR atteint son maximum et en fin de culture.***

OD	$t_0 \rightarrow t_{OURmax}$			$t_0 \rightarrow t_{final}$		
	$\frac{gC_{extracell}}{gC\text{-}CH_2O}$ [a,b]	$\frac{gC_{extracell}}{gC_{produit}}$ [a,c]	$\left(\frac{\Delta x_{MS}}{\Delta CHO}\right)$	$\frac{gC_{extracell}}{gC\text{-}CH_2O}$ [a,b]	$\frac{gC_{extracell}}{gC_{produit}}$ [a,c]	$\overline{Y_{X/CHO}}$
10%	0,54-0,49 (±0,07)	0,65-0,59 (±0,08)	0,36	0,50-0,44 (±0,06)	0,61-0,54 (±0,07)	0,38
30%	0,35-0,28 (±0,08)	0,46-0,37 (±0,11)	0,40	0,40-0,34 (±0,05)	0,56-0,48 (±0,07)	0,38
50%	0,30-0,23 (±0,07)	0,43-0,34 (±0,11)	0,44	0,28-0,23 (±0,05)	0,47-0,38 (±0,08)	0,38

[a] valeurs estimées pour une composition en carbone variant entre 35 et 41% en masse
[b] proportion des hydrates de carbone utilisés pour la production de composés extracellulaires
[c] ratio des composés extracellulaires produits (polysaccharides, protéines, débris; de composition similaire à celle de la biomasse) par rapport au total des produits carbonés

Lignée VVG105; Milieu B5, HRI 5-L
Coefficient respiratoire moyen égal à 1,15

lorsque la concentration d'OD maintenue dans le bioréacteur augmente comme le laissaient d'ailleurs présager la progression globale des OUR mesurés en fonction de la concentration d'OD (Figure 5.9) jumelée aux rendements apparents et à la productivité en biomasse sur les hydrates de carbone (Tableaux 5.1 et 5.2),.

Comparées sur la base de la proportion de composés extracellulaires qui devrait être présente dans le milieu de culture sous forme de polysaccharides, de protéines ou de débris cellulaires, il semble que les conditions d'oxygénation du milieu de culture influencent grandement le comportement des cultures (Tableau 5.3). Ainsi, à une concentration d'OD de 10% et en faisant l'hypothèse d'un coefficient respiratoire moyen égal à 1,15, la proportion de composés extracellulaires produits dépasserait 50% en fin de culture, excédant ainsi la quantité de biomasse récoltée. Comme à 10% d'OD la vitesse d'agitation a toujours été maintenue à 60 rpm (Annexe 3), cette plus grande proportion estimée de composés extracellulaires ne devrait pas provenir d'un bris des cellules causé par l'agitation. Pour expliquer les résultats de ces calculs avant comme après qu'OUR_{max} soit atteint, il faut qu'une lyse cellulaire plus importante résulte des faibles concentrations d'OD, que la formation de composés extracellulaires soit favorisée au détriment de la croissance de la biomasse à faible concentration d'OD, ou que le coefficient respiratoire moyen, $\overline{RQ}$, varie avec la concentration d'OD maintenue dans le réacteur.

5.3.4.2 Ions ammonium, nitrate et phosphate

En flacons agités, la production de biomasse par unité d'ions NH_4 et PO_4 au moment où le taux volumique d'assimilation d'O_2 est maximal, était constante d'une cuvée à l'autre (chapitre 3). Pour les cultures en bioréacteur, les productivités en biomasse à OUR_{max} semblent plutôt augmenter avec la concentration d'OD (Tableau 5.2).

Pour la lignée VVG105, les hydrates de carbone ne sont pas entièrement consommés lorsque la concentration de biomasse atteint son maximum alors que les rendements globaux en biomasse sur les hydrates de carbone sont constants. L'épuisement hâtif des ions NH_4 et PO_4

fait donc en sorte que le rendement global en biomasse sèche sur ces ions (Tableau 5.1) a varié avec la concentration d'oxygène dissous maintenue dans le milieu de culture de façon analogue au taux spécifique de croissance de la biomasse sèche (Figure 5.4). Cette tendance est aussi observée avec les lignées VVG12 et VVG109 et confirme une limitation nutritionnelle causée par un autre constituant du milieu que les hydrates de carbone.

Comme il a été évoqué plus haut, le pH et la conductivité du milieu de culture reflètent l'assimilation rapide de l'ion ammonium pour l'un et l'assimilation de l'ion prépondérant, le NO_3, pour l'autre (Figure 5.2), comme pour les cultures en flacons agités (Figure 3.2). Dans les conditions de culture testées, la concentration en biomasse sèche des cultures effectuées dans un milieu appauvri en NO_3 continue d'augmenter après la consommation complète de l'ion NO_3 jusqu'à l'épuisement complet des hydrates de carbone. Les rendements apparents en biomasse sèche sur l'ion NO_3 varient avec les conditions de culture (Figure 5.20). Dans la plage de concentration initiale de NO_3 utilisée, ces résultats confirment que la production totale de biomasse dépend d'un autre nutriment et pourrait varier avec la concentration d'OD. L'incertitude sur les rendements apparents en biomasse et la poursuite de la croissance après l'épuisement des ions NO_3 limitent la fiabilité des estimés en ligne la concentration en biomasse sèche basés sur les mesures de conductivité.[116, 163]

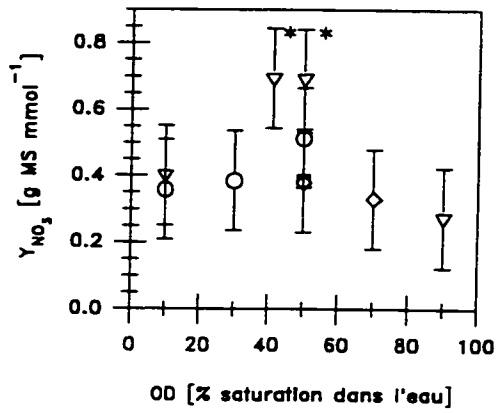


Figure 5.20 Rendements apparents en biomasse sèche sur l'ion NO3 en fonction des conditions d'oxygénation et de la composition du milieu de culture pour les lignées VVG105 et VVG12.
**: consommation complète du NO_3 avant l'arrêt de l'augmentation de la biomasse; O: VVG105, B5; ◊: VVG12, B5; ∇: VVG12, B5DN; Δ: VVG12, B5QN*

Bien que l'on ait observé un net ralentissement de la prolifération cellulaire avant l'arrêt de croissance de la biomasse, il est impossible d'associer directement cette limitation de la prolifération cellulaire à l'épuisement d'un constituant du milieu, entre les ions ammonium, phosphate ou un autre constituant du milieu non mesuré à partir de données de consommation et de croissance présentées ici. Par contre, il semble que la concentration d'oxygène dissous influence la production de biomasse, et ce notamment si l'on considère la période pendant laquelle le taux volumique d'assimilation d'oxygène croît et où la croissance de la biomasse et des cellules s'effectue en parallèle.

5.3.5 Analyse préliminaire de la production d'anthocyanes

Bien que les objectifs de ce doctorat soient concentrés sur la phase de croissance de la biomasse et que nous n'ayons pas travaillé en réacteur avec un milieu de production, il est intéressant de vérifier l'influence de la concentration d'oxygène dissous sur la production des anthocyanes dans le milieu de prolifération B5 standard et dans un milieu B5 appauvri en nitrates. Les milieux appauvris en NO_3 favorisent l'accumulation d'anthocyanes chez *V. vinifera*.[39] L'épuisement de la dernière source d'azote du milieu de culture avant celui des hydrates de carbone empêcherait la formation d'acides aminés comme réserve d'azote[14] faisant ainsi bifurquer les voies de synthèse vers la production d'anthocyanes, qui constitue, pour le système naturel des raisins, une réserve d'hydrates de carbone.

Comparativement au milieu B5 standard, des concentrations accrues d'anthocyanes ont été obtenues avec la lignée VVG12 cultivée dans le milieu B5DN. Les concentrations finales obtenues sont en effet passées de 200 mg L^{-1} d'anthocyanes dans le milieu de prolifération B5 standard, à 250 mg L^{-1} dans le milieu B5DN pour des concentrations similaires d'OD (Annexe 3).

Les taux volumiques de production d'anthocyanes ont progressé avec la concentration d'OD (Tableau 5.4). De plus, les cultures en bioréacteur effectuées à une concentration d'OD

supérieure à 40% ont un rendement en anthocyanes sur la quantité d'hydrates de carbone consommés plus élevé que les cultures témoins en flacons agités.

La seule étude portant directement sur l'effet de l'oxygène dissous sur la production d'anthocyanes présente des résultats concordants. En effet, Zhong et ses collaborateurs, [180] cultivant des cellules de *Perilla frutescens* dans un réacteur agité mécaniquement et sans apport de lumière, ont montré qu'une augmentation du k_La de 10 à 15 h^{-1}, provoquée par une variation du débit gazeux, résulte en une augmentation de 300% de la productivité en anthocyanes (g Acy $(L\ d)^{-1}$), sans occasionner d'effet notable sur la croissance de la biomasse. Leurs résultats montrent qu'une augmentation de la capacité de transfert d'oxygène a un effet sur la productivité similaire à celui de l'illumination des cultures. Par contre, une plus forte

Tableau 5.4 ***Relation entre la concentration d'OD, le rendement en anthocyanes sur les hydrates de carbone consommés et la productivité d'anthocyanes de cuvées effectuées dans le milieu B5DN.***

DO [%]	Y_{Acy/CH_2O} [mg g^{-1}]	$\bar{r}_{Acy}$ [mg $L^{-1}\ d^{-1}$]
10	2,1[a]	7,1
30	4,9	11
$70_{(3d)}$-40	6,7[a]	17
40	9,0[a,b]	22
50	8,1[a,b]	20
90[a]	9,8[a,b]	24
flacons agités	4,2[b]	15

Lignée cellulaire: VVG12 sc57, sc58 et sc60.
Milieu de culture: B5(12.5 mM KNO_3)
[a] significativement différent de la cuvée à 10%
[b] significativement différent des flacons agités
(Test de Duncan, erreur standard de l'échantillon complet)[61]

augmentation du débit de gaz, correspondant à un k_La de 23 h^{-1}, ou une augmentation du k_La à 15 h^{-1} conjuguée à une illumination de la culture ont un effet moins prononcé, l'augmentation de productivité étant limitée à 200% et à 160%, respectivement. Dans une communication subséquente, ces mêmes auteurs rapportent des productivités en anthocyanes similaires et des rendements constants en variant la vitesse d'agitation tant que le taux de cisaillement moyen résultant est inférieur à 28 s^{-1}, tout en contrôlant la concentration d'OD à 80%. [181] Dans ces deux séries d'expériences, l'enlèvement du CO_2 ou le cisaillement induit par un débit ou une vitesse d'agitation élevé ont pu causer les contre-performances rapportées.

Dans ce contexte, comme c'est souvent le cas dans le domaine de la culture des cellules végétales, les résultats obtenus ne sont pas directement comparables. Pour les cultures de *V. vinifera* présentées ici, l'augmentation de la concentration d'OD est reliée à une faible augmentation de la vitesse d'agitation. En particulier, la cuvée à 90% d'OD a été faite à vitesse d'agitation constante étant donné les faibles taux spécifiques de croissance et d'assimilation d'oxygène. Ainsi, contrairement à ce qui peut être déduit des résultats de Zhong rapportés plus haut, le taux de production moyen augmente avec la concentration de l'OD.

Une analyse qualitative des courbes de concentration d'anthocyanes selon la concentration d'OD maintenue dans le milieu, faite en parallèle avec les courbes de consommation de nutriments, permet de tirer quelques informations supplémentaires intéressantes concernant l'effet de la concentration d'OD sur la production d'anthocyanes.

En effet, l'augmentation de la production d'anthocyanes avec la concentration d'OD ainsi que l'augmentation rapide de la concentration de la biomasse sèche dans les sept premiers jours de culture, se reflètent dans les courbes d'accumulation moyenne d'anthocyanes dans la biomasse sèche, $Y_{Acy/x_{MS}}$, confectionnées à partir des résultats colligés à l'Annexe 3 (Figure 5.21). Pour toutes les concentrations d'OD testées, le contenu moyen en anthocyanes

diminue après l'inoculation jusqu'à un moment coïncidant avec l'épuisement du milieu de culture en ion ammonium (Figure 5.21, trait a). À l'exception de la culture effectuée à 10% d'OD, pour laquelle la production d'anthocyanes diminue au cours de la culture, l'augmentation du contenu moyen en anthocyanes se poursuit malgré l'épuisement des ions phosphate (Figure 5.21, trait b) mais atteint son maximum avant l'épuisement des ions nitrate ou l'observation d'un taux spécifique d'assimilation d'oxygène maximal (Figure 5.21, trait c). Après ce moment, les relevés visuels de la pigmentation des cellules (Annexe 3) ne permettent pas d'affirmer si l'augmentation de la production d'anthocyanes est attribuable à une augmentation de la pigmentation des cellules productrices ou au grossissement de la biomasse

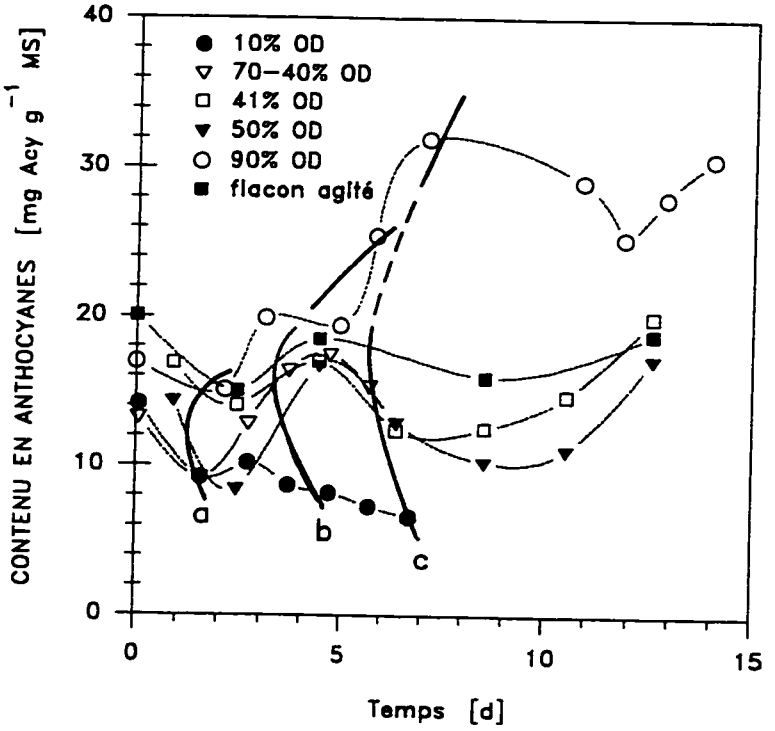


Figure 5.21 ***Production spécifique d'anthocyanes en fonction du temps pour des cultures en cuvée à différentes concentrations d'OD.*** *Cellules VVG12, milieu de culture B5DN, illumination constante; trait a : épuisement du NH_4; trait b : épuisement du PO_4; trait c : observation de $(q_{O_2})_{MS}$ maximal*

(30 à 50% d'OD), [57] ou encore à une augmentation du nombre de cellules productrices (90% d'OD) comme le montrent les résultats de Cormier et coll. [31]

Des estimés des taux spécifiques de production d'anthocyanes sont présentés à la figure 5.22. Ils ont été évalués pour chaque échantillon sur la base du taux volumique de production évalué par différence avant et de la concentration mesurée de biomasse. Les courbes montrent une augmentation rapide du taux spécifique de production suite à l'inoculation qui peut être attribuée à la disponibilité des nutriments comme aux stress associés à l'inoculation. Rapidement, entre le moment où les ions NH_4 et PO_4 sont épuisés (Figure 5.22, trait a), les taux spécifiques de production d'anthocyanes diminuent progressivement jusqu'au moment où on observe un coefficient spécifique d'assimilation d'O_2 maximal à des valeurs s'approchant de zéro (Figure 5.22, trait c). Après ce moment, les taux spécifiques de production réaugmentent alors que la prolifération cellulaire devrait avoir ralenti significativement.

À la lumière des taux spécifiques de production, l'analyse des courbes de production d'anthocyanes, présentées à la figure 5.23, montre que, dans le milieu de croissance modifié, l'augmentation de la productivité des anthocyanes semble être reliée à la capacité d'accumuler des anthocyanes de façon plus soutenue dans les cultures à haute concentration d'OD. Ainsi, à 90% d'OD, l'augmentation du taux spécifique de production d'anthocyanes est clairement plus lente que dans les cultures effectuées autour de 50% d'OD, et se prolonge sur une période de quatre jours. Cette période correspond grossièrement au temps requis pour d'assimilation complète des ions phosphates, particulièrement lente à 90% d'OD. Ainsi, malgré la faiblesse du taux de croissance spécifique pour la culture à 90% d'OD, le taux spécifique de production plus élevé entre les quatrième et septième jours de culture résulte en un taux volumique de production d'anthocyanes plus important.

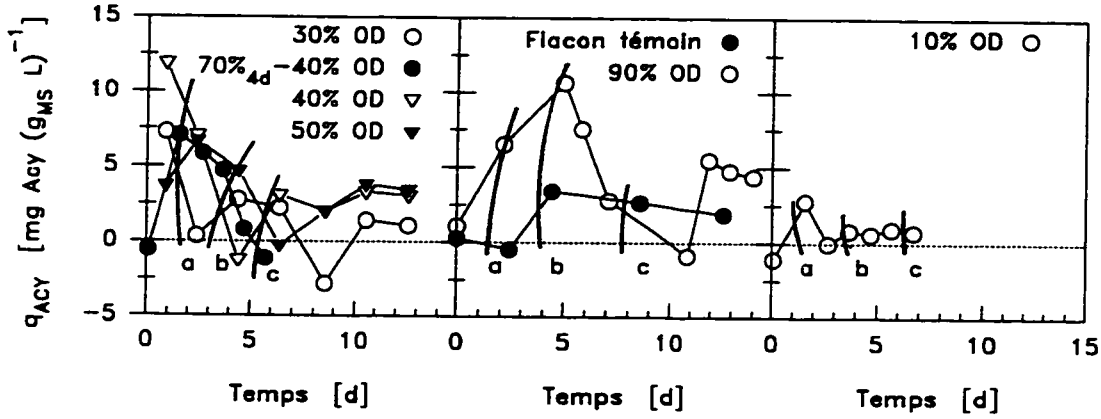


Figure 5.22 ***Estimés des taux spécifiques de production d'anthocyanes selon les conditions d'oxygénation.*** *Lignée VVG12, Milieu B5DN, illumination constante; trait a : épuisement du NH_4; trait b : épuisement du PO_4; trait c : observation de $(q_{O_2})_{MS}$ maximal*

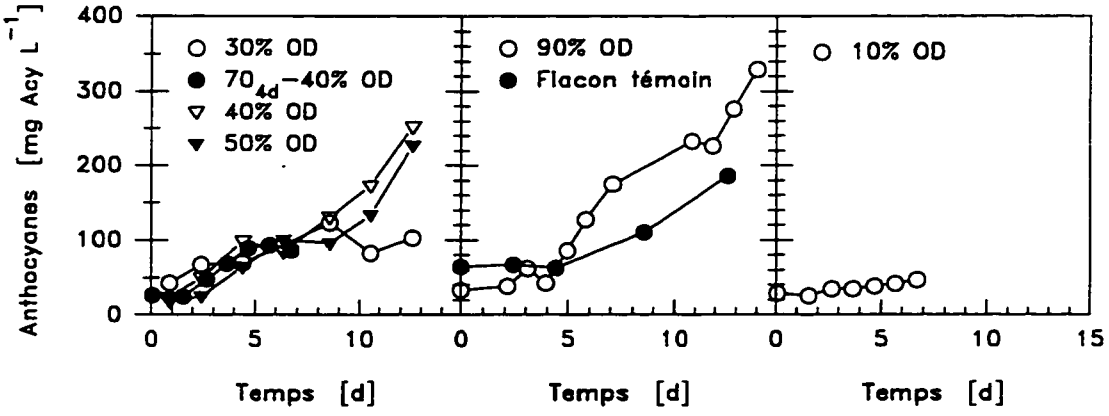


Figure 5.23 ***Production d'anthocyanes selon les conditions d'oxygénation.*** *Lignée VVG12, Milieu B5DN, illumination constante*

5.4 CONCLUSION

L'objectif de cette recherche était d'obtenir rapidement, lors de l'étape de croissance du bioprocédé, une biomasse de qualité. Or, les indices de croissance de la biomasse des cultures en bioréacteurs HRI effectuées avec contrôle de la concentration d'OD étaient égaux ou supérieurs à ceux obtenus dans les flacons agités. Le contrôle de la concentration d'OD a aussi permis d'observer des taux spécifiques de croissance de la biomasse plus reproductibles que dans les flacons agités. L'utilisation d'un bioréacteur HRI dans lequel les conditions d'agitation sont adaptées à la fragilité des cellules et les conditions de transfert de gaz ou d'alimentation gazeuse ne provoquent pas un épuisement en CO_2, permet donc de prétendre pouvoir procéder à la mise à l'échelle de bioprocédés de culture de cellules végétales.

De plus, une augmentation de l'OD jusqu'à environ 50% a eu un effet positif sur le taux spécifique de croissance de la biomasse des cultures de *Vitis vinifera*. Parallèlement au taux spécifique de croissance, le taux volumique d'assimilation d'O_2 ont aussi augmenté avec la concentration d'OD. Ainsi, les estimés de $(q_{O_2})_{MS}$ et de $(q_{O_2})_{\mathcal{C}}$ dérivés des mesures d'OUR ont aussi augmenté avec la concentration d'oxygène dissous maintenue dans le milieu de culture. Ces dernières observations obtenues dans un bioréacteur à faible taux de cisaillement et sans injection de gaz dans la masse du liquide permettent de découpler les effets mécaniques néfastes aux cellules végétales de ceux des concentrations de gaz dissous puisque la concentration estimée de CO_2 dans la phase liquide est similaire à celle calculée pour les flacons agités utilisés comme système de culture de référence.

Pour une culture en bioréacteur à 50% d'OD, comme pour les cultures en flacons agités discutées au chapitre 3, les représentations logarithmiques des courbes de croissance montrent qu'au moment où les taux volumiques et spécifiques d'assimilation atteignaient un maximum, la prolifération cellulaire a diminué radicalement alors que la croissance de la biomasse manifestait un ralentissement. Les cultures en bioréacteur avec contrôle de l'oxygène dissous ont permis d'établir que la limitation de la croissance n'est pas reliée à la disponibilité de

l'oxygène. Les courbes de disparition des nutriments du milieu de culture montrent que le ralentissement de la croissance ne coïncide avec l'épuisement d'aucun nutriment mesuré. En faisant l'hypothèse qu'il n'y a pas d'inhibition de la croissance causée par une molécule produite par les cellules elles-mêmes, la limitation de la croissance devrait être causée par un des nutriments rapidement transportés à l'intérieur des cellules, les ions NH_4 et PO_4, ou à d'autres ions non mesurés du milieu de culture.

L'étude en parallèle des courbes de croissance obtenues avec des concentrations d'OD de 10, 30 et 50% (lignée VVG105) révèle en fait que la production de biomasse sèche par unité de concentration des principaux nutriments et le taux spécifique moyen d'assimilation d'OD augmentent sur cette plage. Ce comportement peut être associé à une accélération de la prolifération cellulaire mais il peut aussi refléter une augmentation du rendement en hydrates de carbones. Ces constatations renforcent la justification de l'utilisation systématique des comptes cellulaires comme outils de compréhension et de caractérisation de la croissance des cellules végétales.

Afin de discriminer les causes de la limitation de la croissance, et surtout de la limitation de la prolifération cellulaire, et de pouvoir améliorer les conditions de culture, nous allons utiliser les mesures en ligne du taux d'assimilation de l'oxygène comme indicateur d'une limitation nutritionnelle et pilier d'une stratégie d'alimentation d'éléments nutritifs. La stratégie d'expérimentation repose sur l'idée qu'au moment où le taux volumique d'assimilation d'oxygène est maximal, la culture manque d'un des éléments essentiels à sa croissance. Le chapitre 6 traitera de la mise au point du milieu de culture et, indissociablement, de l'assimilation de certains nutriments essentiels.

6. IDENTIFICATION DES SOURCES DE LIMITATION NUTRITIONELLE DE LA PROLIFERATION CELLULAIRE.

Plus que la biomasse finale, le nombre de cellules présentes à la fin de l'étape de croissance est la variable à maximiser. Or, les résultats présentés aux chapitres 4 et 5 ont révélé l'existence d'une limitation de la prolifération cellulaire. Cette limitation n'est pas reliée à la disponibilité de l'oxygène mais serait plutôt causée par une limitation nutritionnelle en l'un, ou plusieurs, des composants du milieu. Le chapitre 6 rend compte des efforts effectués pour identifier la source de la limitation de la prolifération cellulaire de notre système végétal.

6.1 INTRODUCTION

Toute stratégie de mise au point d'un bioprocédé en deux étapes séquentielles, nommément une étape de croissance suivie d'une étape de production, s'appuie sur la possibilité d'obtenir une bonne capacité de production à la fin de l'étape de croissance. Cette capacité de production repose sur le maintien de l'intégrité et de la viabilité des cellules exposées au milieu de production, et sur l'obtention rapide de bons rendements.

Des études faites sur l'étape de production d'anthocyanes par *Vitis* [31,96,176] ont montré que le rendement en anthocyanes des cellules pigmentées augmente rapidement dès les premiers jours suivant l'inoculation dans un milieu de production. Les études portant plus spécifiquement sur l'influence de la concentration initiale de biomasse, [62] de même que notre étude préliminaire (Figure 1.14) montrent que l'induction d'un grand nombre de cellules permet d'améliorer le taux volumique de production d'anthocyanes. S'appuyant sur ce dernier constat, l'augmentation du taux volumique de production du bioprocédé devrait être directement reliée à la quantité de cellules soumises aux conditions de production.

L'augmentation du taux spécifique de croissance et la prolongation de la période de prolifération cellulaire sont deux moyens d'obtenir une plus grande concentration cellulaire à la fin de l'étape de croissance. Les conditions d'oxygénation propres à améliorer le taux spécifique de croissance de la biomasse ont déjà été cernées dans la série de culture en cuvée traitée au chapitre 5. Une alimentation programmée de milieu frais (ou d'une formulation de certains nutriments), ou une modification du milieu de croissance pourrait permettre de contourner la limitation en ions phosphate ou ammonium (ou en un autre constituant non mesuré du milieu) et de prolonger la période de prolifération cellulaire.

L'analyse des courbes de croissance obtenues en cuvée tant dans les flacons agités que dans les bioréacteurs et présentées aux chapitres 4 et 5, a permis de constater que dans le milieu de croissance B5, l'arrêt de la prolifération cellulaire a lieu avant l'épuisement de l'ion NO_3 et des hydrates de carbone. Parmi les nutriments importants du milieu mesurés, les ions phosphate et ammonium, fournis sous forme de NaH_2PO_4 et de $(NH_4)_2SO_4$, sont ceux qui sont assimilés très rapidement et qui disparaissent du milieu extracellulaire. Ce sont donc les premières sources de limitation visées par notre étude.

Afin de préserver l'avantage de la culture en bioréacteur HRI sur la culture en flacons agités en termes de productivité en biomasse, $(x/x_0)_{MS}$, nous avons choisi de poursuivre les travaux en bioréacteur. De plus, dans un contexte de développement séquentiel de procédé, une amélioration rapide et notable de l'étape de croissance en bioréacteur aurait permis un avancement technologique suffisant pour passer à l'étude de l'étape de production. Dans ce contexte de culture en bioréacteur, la stratégie adoptée repose sur l'utilisation d'une mesure périodique faite en ligne permettant de repérer le moment où la prolifération cellulaire cesse et d'initier l'alimentation d'un des nutriments potentiellement limitant.

6.1.1 Parallèle entre les courbes de croissance en cuvée et d'assimilation d'O_2

Pour une série de cultures en cuvée en bioréacteur HRI-5L à des concentrations d'OD maintenues à 10%, 30% et 50%, les courbes de croissance de la biomasse sèche, présentées à la figure 6.1, font ressortir deux tendances. La première, discutée au chapitre 5, est l'augmentation du taux spécifique de croissance avec la concentration d'oxygène dissous (OD), reflétée dans les changements de pente de la portion logarithmique des courbes de croissance. La seconde, qui sera d'intérêt ici, est que cette inflexion de la courbe de croissance a lieu plus tôt pour la culture effectuée à 50% d'OD que pour celle effectuée à 10% d'OD. Une croissance accrue de la biomasse, à laquelle devraient être associés des taux de consommation de nutriments plus élevés, se traduit donc par un épuisement rapide de la culture.

Pourtant, toutes ces cultures ont été effectuées dans le même milieu de croissance et ont résulté en un rendement global en biomasse sur les hydrates de carbone de 0,38 g MS g^{-1} (Tableau 5.3), confirmant qu'un autre composant du milieu de culutre que les hydrates de

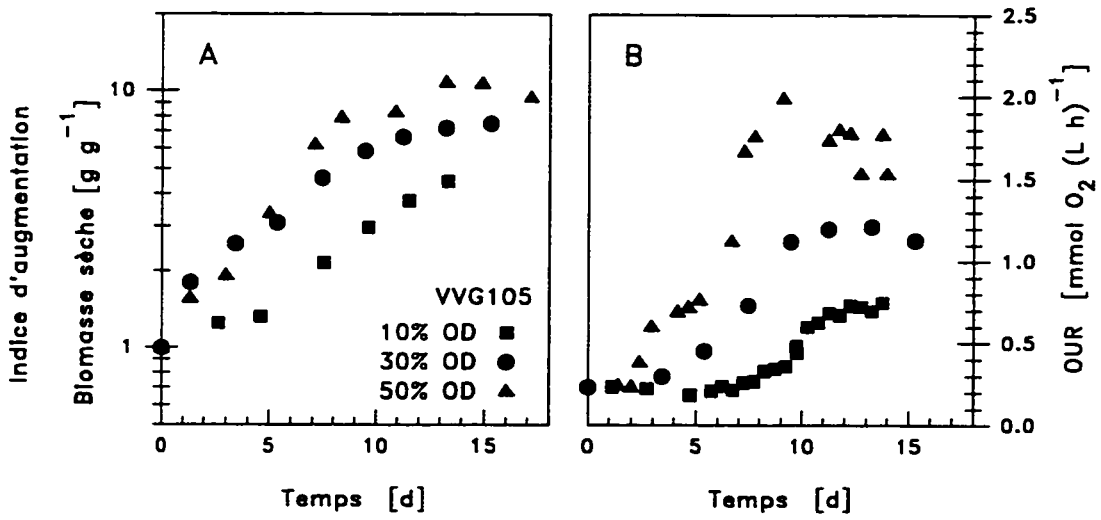


Figure 6.1. Parallèle entre croissance de la biomasse et assimilation d'oxygène pour trois cultures en cuvée en bioréacteurs à 10, 30 et 50% d'OD. A, Courbes de croissance; B, Mesures d'OUR. Lignée cellulaire VVG105

La figure 6.1 permet aussi de relier le moment de l'inflexion de la courbe de croissance, observable dans le graphe (A), et le plafonnement de la courbe d'OUR (graphe (B)). Or les relations dynamiques qui relient intrinsèquement le taux volumique d'assimilation d'OD et le taux spécifique de croissance sont les suivantes :

$$OUR = \left(q_{O_2}\right)_{MS} \cdot x_{MS} \tag{74}$$

où $(q_{O_2})_{MS}$ est généralement relié au taux spécifique de croissance par la relation

$$\left(q_{O_2}\right)_{MS} = \left(\frac{\mu_{MS}}{Y_{x/O_2}} + m_{O_2}\right) \tag{75}$$

dans laquelle à volume constant

$$\mu_{MS} = \frac{1}{x_{MS}} \frac{dx_{MS}}{dt} = \mu_{max} \cdot f(s) \tag{76}$$

Comme μ_{MS} est une fonction décroissante du temps et $x_{MS}(t)$ une fonction croissante tant que les cellules n'utilisent pas certains de leurs constituants comme source d'énergie, il s'ensuit qu'un plafonnement de l'OUR reflète nécessairement une diminution notable de μ_{MS} compensant l'augmentation de x_{MS}. Ainsi, la mesure d'OUR permet de détecter un événement ayant provoqué le ralentissement de la croissance de la biomasse.

La figure 6.2 présente la comparaison des mesures périodiques d'OUR, des taux spécifiques d'assimilation d'O_2 et des courbes de croissance, d'une culture en bioréacteur pour laquelle des comptes cellulaires ont été effectués. Elle permet de visualiser plus clairement que l'arrêt de la prolifération cellulaire coïncide avec un changement dans les taux spécifiques d'assimilation d'OD, $(q_{O_2})_{cell.}$, bien reflété par la courbe d'OUR accessible en ligne. Ce résultat, déjà présenté aux chapitres 4 et 5, valide l'utilisation de la mesure d'OUR pour identifier le moment où le nombre de cellules est maximal. Il permet aussi d'envisager, pour une étape future de développement du bioprocédé, exploiter ce repère pour changer les conditions de cultures et étudier en série les étapes de croissance et de production. Dans ce contexte, la

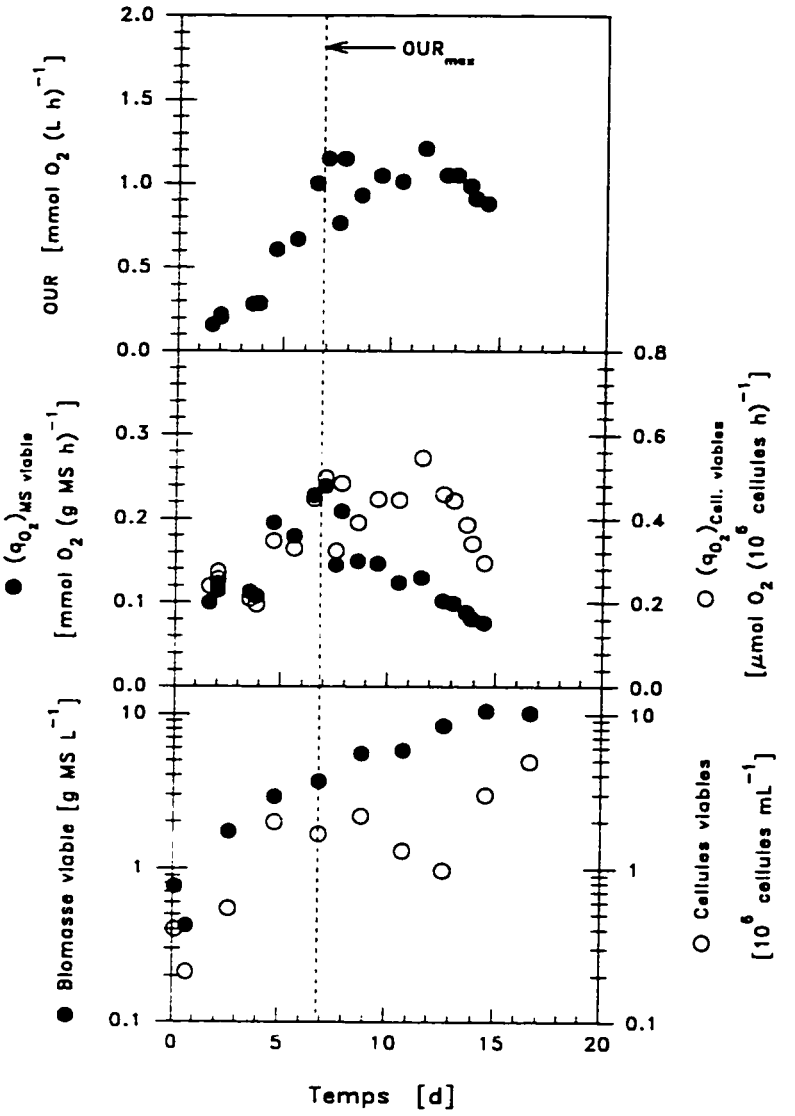


Figure 6.2. Parallèle entre croissance de la biomasse, prolifération cellulaire et taux volumique et spécifique d'assimilation d'oxygène. Lignée cellulaire VVG111, cuvée à 50% d'OD

culture en bioréacteur possède des atouts pour la mise au point de bioprocédés que les cultures en flacons agités n'ont pas.

Parallèlement, comme l'illustre la figure 6.3, l'appauvrissement du milieu de culture en chacun des constituants importants peut se refléter dans les courbes de progression de l'OUR et de q_{O_2}. L'épuisement de l'ion NH_4 au cours de la troisième journée de culture et de l'ion PO_4

entre le cinquième et le sixième jour est suivi d'une hausse du taux spécifique d'assimilation d'O_2, alors que pour cette culture effectuée en milieu à faible concentration initiale de NO_3, l'épuisement de l'ion NO_3 autour du neuvième jour coïncide avec le plafonnement de l'OUR suivi peu après de la chute de q_{O_2}. Ainsi, la quantité totale d'énergie dépensée pour le transport ou l'utilisation des nutriments progresse avec l'histoire des cultures.

Précisons ici que les conditions de culture de la cuvée rapportée à la figure 6.3 ont résulté en un taux de croissance de la biomasse faible par rapport à une culture effectuée dans le même milieu à plus faible concentration d'OD. Ainsi les taux spécifiques de croissance étaient de 0,14 d^{-1} pour une culture effectuée à 90% d'OD présentées dans la figure et de 0,25 d^{-1} pour une culture à 50% d'OD dans le même milieu et avec la même lignée cellulaire. Conséquemment, les dynamiques de consommation de nutriments étaient moins accentuées et l'utilisation d'un milieu appauvri en nitrates a donné lieu à

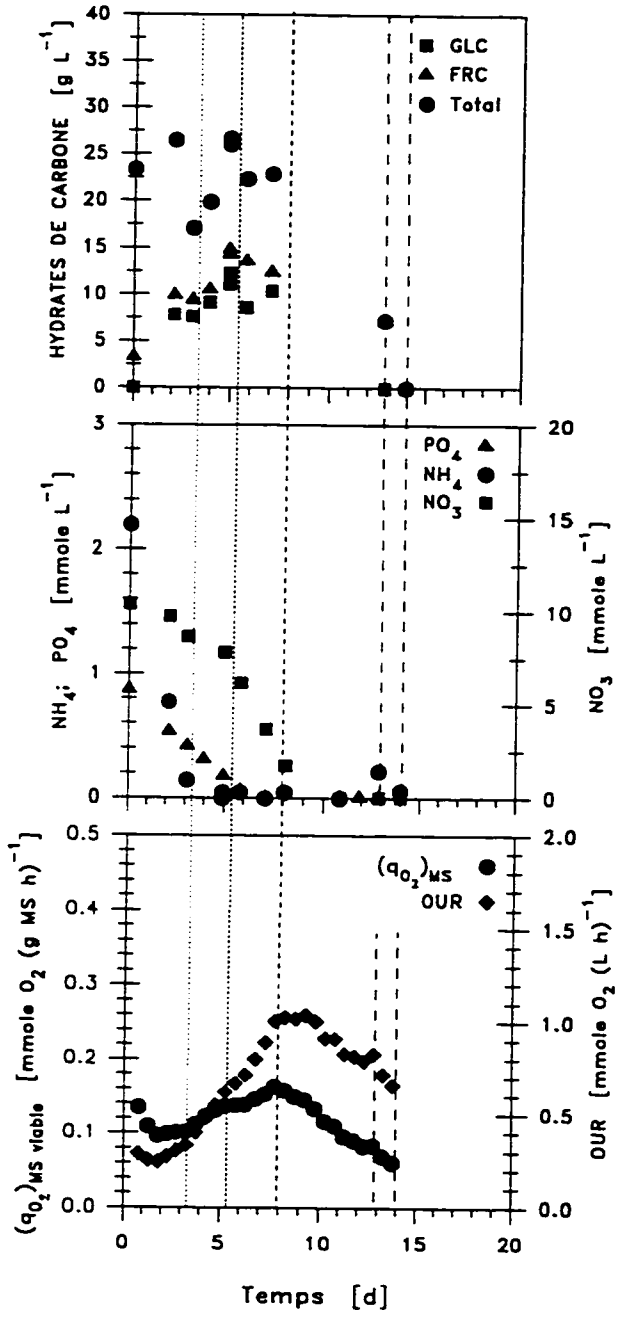


Figure 6.3 Progression de la composition du milieu de culture et taux volumique et spécifique d'assimilation d'oxygène. ·····, épuisement du NH_4, -----, épuisement du PO_4, – – –, OUR max; — —, épuisement des hydrates de carbone. Lignée cellulaire VVG12, cuvée à 90% d'OD, réacteur HRI-5L

un épuisement hâtif des ions NO_3 par rapport aux cultures effectuées dans un milieu B5 standard, qui se répercute ici dans les courbes d'OUR et de q_{O_2}.

Les inflexions de OUR (et de q_{O_2}) ne sont donc pas toujours aussi bien définies, surtout dans le cas où les mesures d'OUR sont moins fréquentes. De plus, les relations entre l'épuisement d'un des constituants du milieu et ces inflexions, lorsqu'elles sont discernables, ne peuvent être faites qu'a posteriori. Ainsi, le plafonnement du taux volumique d'assimilation d'oxygène sur une période de quelques heures est-il requis pour diagnostiquer d'une baisse de la croissance de la biomasse.

Dans ce contexte, ce chapitre rend compte d'une série d'expériences qui visent à confirmer la pertinence du plafonnement de l'OUR comme indicateur de limitation nutritionnelle. Au cours de ces expériences, le plafonnement de l'OUR sera utilisé pour déterminer le moment de l'ajout de solutions concentrées de nutriment afin d'identifier la nature de la limitation à la prolifération cellulaire et de la contourner.

6.2 MÉTHODOLOGIE ET TECHNIQUES EXPÉRIMENTALES

6.2.1 Cultures en bioréacteurs

Le plafonnement de l'OUR a été utilisé pour déterminer le moment de l'ajout de solutions concentrées d'ions dans des cultures en bioréacteur afin d'identifier la source de limitation de la prolifération cellulaire. Étant donné l'effet drastique d'une limitation en hydrates de carbone sur la viabilité et a fortiori sur la croissance des cultures de *V. vinifera* exposé au chapitre 4, les solutions testées étaient enrichies en glucose afin d'éviter une limitation éventuelle en hydrates de carbone et de pouvoir ainsi s'assurer que le milieu de culture puisse, le cas échéant, continuer à soutenir la croissance cellulaire. Les résultats présentés aux chapitres 4 et 5 montrent que parmi les nutriments dont nous avons suivi la disparition du milieu de culture, les ions ammonium ($(NH_4)_2SO_4$) et phosphate (NaH_2PO_4) sont les sources probables de la

limitation de la prolifération cellulaire. Une limitation potentielle en ion Mg ($MgSO_4$) a aussi été explorée en plus des ions NH_4 et PO_4, bien que nous n'en ayons pas mesuré la disparition du milieu.

Les cultures en bioréacteurs ont été effectuées dans des réacteurs à double ruban hélicoïdal (HRI) d'un volume nominal de 2-L et 5-L décrits au chapitre 3. Les conditions d'opération des cultures en cuvée discutées ici ont déjà été présentées aux chapitres 3 et 5. Celles des cultures en cuvée alimentée sont similaires, mises à part les stratégies d'alimentation de milieu. Ces cultures ont toutes été effectuées à 50% d'oxygène dissous (OD). Les stratégies d'alimentation des ions PO_4, NH4 et Mg sont résumées au tableau 2.2, page 66. Les ajouts de PO_4 et de Mg ont été faits rapidement par gravité, alors que l'ajout de NH_4 a été graduel et linéaire à un débit de 8.48 L h^{-1}, correspondant à 0,22 mM NH_4 h^{-1}. Les solutions aqueuses de sels et d'hydrates de carbone ont été préparées et stérilisées séparément. Le pH des solutions était ajusté à 5,8 avec une solution de 0,1 N KOH avant la stérilisation (100 kPa, 20 min). Les deux solutions concentrées d'ions et de glucose ont été mélangées immédiatement avant leur utilisation.

6.2.2 Lignée cellulaire et cultures en suspension

Les lignées cellulaires de *Vitis vinifera* L. cv Gamay fréaux mise à notre disposition ont été sélectionnées et stabilisées par l'équipe du Dr. Cormier, selon une procédure déjà décrite. [109] La lignée cellulaire VVG111 a été utilisée spécifiquement pour les expériences rapportées ici. Des informations tirées des résultats de cultures effectuées en bioréacteur HRI avec les lignées VVG12 et VVG105 et déjà décrites (Chapitres 4 et 5), ont permis de montrer la pertinence de l'approche proposée.

La lignée cellulaire VVG111 croissait dans l'obscurité. La culture des suspensions cellulaires et la préparation des inocula des bioréacteurs ont été faites dans les conditions décrites au chapitre 3. Le milieu de culture utilisé dans les expériences en bioréacteurs étaient le milieu B5 standard. [55] Pour chaque série d'expériences, huit flacons témoins de 500-mL étaient inoculés et soumis à un échantillonnage en rotation et concomitant avec les bioréacteurs.

6.2.3 Méthodes analytiques et calculs

Le compte cellulaire (¢), la viabilité, la biomasse sèche (MS) et humide (MH), le volume centrifugé de biomasse (PCV) ainsi que le pH, la conductivité du milieu de culture, la concentration extracellulaire en hydrates de carbone et en ions nitrate, ammonium et phosphate ont été déterminés selon les procédures décrites au chapitre 3 et à l'annexe 1. Toutes les concentrations ont été corrigées pour tenir compte de l'évaporation, de l'ajout de milieu et du volume occupé par la biomasse. Les concentrations sont donc exprimées sur la base du volume initial de culture. Une analyse du rendement apparent sur les hydrates de carbone et sur l'azote a été effectuée pour toutes les cultures effectuées avec la lignée VVG111 (Annexe 4) selon la procédure décrite au chapitre 3. Des estimés des taux spécifiques d'assimilation de phosphate ont été calculés en évaluant les taux de consommation des nutriments par différence selon la relation suivante :

$$q_S = \frac{(s_n - s_{n+1})/(t_{n+1} - t_n)}{x_n}$$

Les taux volumiques (OUR) et spécifiques (q_{O_2}) d'assimilation d'oxygène ont été mesurés périodiquement selon la procédure décrite au chapitre 3. Les taux spécifiques moyens de croissance de la biomasse sèche, $\overline{\mu}_{MS}$, ont été calculés par régression sur la portion linéaire des représentations logarithmique des courbes de croissance de la biomasse sèche totale.

6.3 RÉSULTATS ET DISCUSSION

6.3.1 Influence des ions phosphate

Une expérience explorant l'effet de l'ajout d'un supplément de PO_4, enrichi de glucose, après l'observation d'un plateau dans les mesures en lignes d'OUR a été effectuée sur des cultures au cours desquelles l'oxygène dissous était maintenu à 50%. Les courbes comparatives des indices d'augmentation du nombre de cellules viables et de la biomasse sèche sont présentées à la

figure 6.4. Contre toute attente, l'ajout d'un supplément de PO_4 au milieu n'a pas donné lieu à une hausse subséquente du nombre de cellules.

La viabilité de cette culture est demeurée au dessus de 80% pour toute la durée de la culture (Annexe 4, figure A4.17). Comme pour les cultures présentées au chapitre précédent, la culture en bioréacteur présente un léger avantage sur les cultures témoins en flacons agités en termes de taux de croissance de la biomasse, se reflétant dans la pente de la représentation logarithmique de l'augmentation de la biomasse dans le temps (Figure 6.4B). Par contre, que l'on considère la biomasse viable ou totale, cet avantage ne se répercute pas sur la biomasse finale puisque la concentration maximale de biomasse a atteint 15 g MS L^{-1} pour les deux systèmes de culture au moment où le nitrate et les hydrates de carbone sont épuisés du milieu de culture.

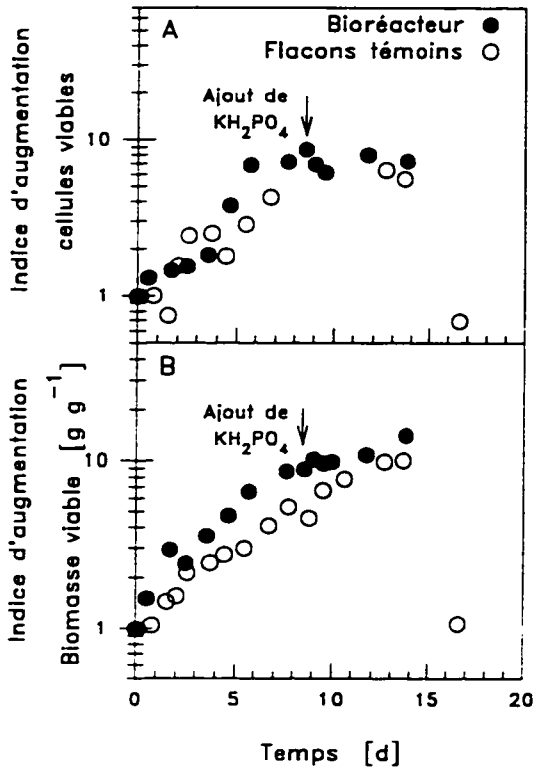


Figure 6.4 Indices d'augmentation de la fraction viable de la concentration de cellules et de biomasse sèche d'une culture en milieu B5 supplémenté rapidement avec une solution concentrée de KH_2PO_4 et de glucose. *VVG111, sc27(D6), HRI-2L, 50% OD.*

Comme une période de 7 jours correspond à la fréquence habituelle de repiquage de la lignée, le contenu en phosphate de l'inoculum et de la culture âgée de sept jours devrait être comparable et le contenu en phosphate des cellules être égal à :

$$\left(\frac{\Delta PO_4}{\Delta \not{c}}\right)_{7d}. \qquad (77)$$

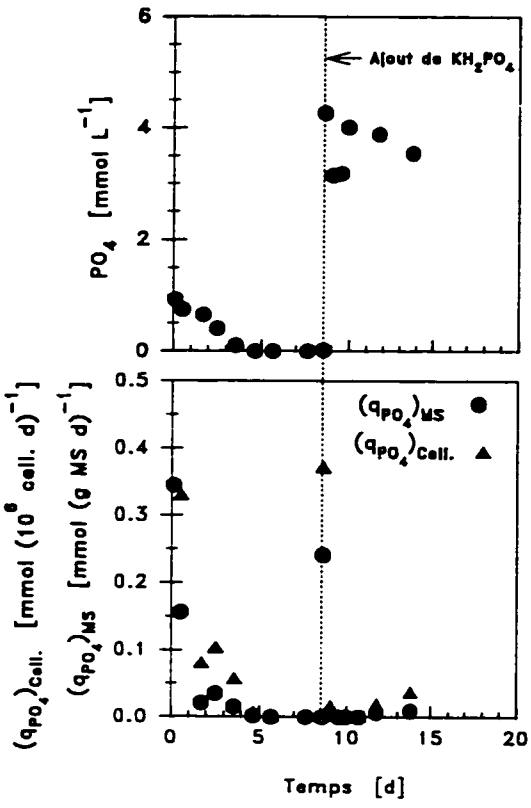


Figure 6.5 Concentration extracellulaire et taux spécifique de consommation des ions phosphates d'une culture en milieu B5 supplémenté rapidement avec une solution concentrée de NaH_2PO_4 et de glucose.
VVG111, sc27(D6), HRI-2L, 50% OD.

Au septième jour de culture en cuvée, au moment où OUR atteint un maximum et où la prolifération cellulaire s'arrête, le contenu en phosphate des cellules devrait être de 0,23 µmol P (10^6 cellules)$^{-1}$. Cette valeur est inférieure à celle de 0,38 µmol P (10^6 cellules)$^{-1}$ rapportée par Amino et de ses collaborateurs[4] pour *C. roseus*. Pourtant, le PO_4 est assimilé rapidement dans les dix (10) minutes séparant l'addition du concentré et l'échantillonnage subséquent, à un taux spécifique de 0,4 µmole (10^6 cellules d)$^{-1}$ comparable à celui observé par Amino et ses collaborateurs (0,6 µmole (10^6 cellules h)$^{-1}$).[4] Malgré ce taux d'assimilation élevé immédiatement après l'ajout du concentré, la concentration extracellulaire de PO_4 demeure élevée puisque le taux spécifique d'assimilation de PO_4 retombe rapidement près de zéro (Figure 6.5). L'assimilation du PO_4 hausse le contenu en phosphate des cellules à un niveau de 0,57 µmol P (10^6 cellules)$^{-1}$ et est accompagnée d'une hausse du taux d'assimilation d'O_2 (Annexe 4, figure A4.18). Cette augmentation de l'OUR se traduit par une augmentation des taux spécifique d'assimilation d'O_2 dans les vingt-quatre heures qui suivent l'addition de la solution concentrée de phosphate et de glucose (Figure 6.6). L'assimilation des autres nutriments est toutefois similaire à celle observée en flacons agités ou en cuvée à 50% d'OD (Figures A2.14 et A4.14).

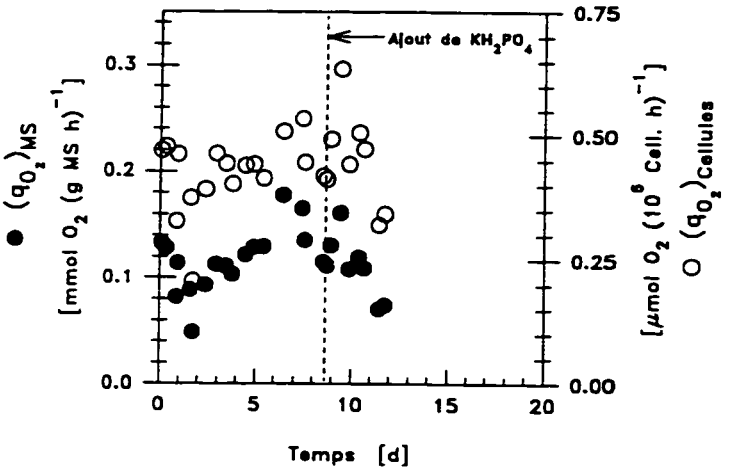


Figure 6.6 Taux spécifiques d'assimilation d'oxygène d'une culture en milieu B5 supplémenté rapidement avec une solution concentrée de NaH_2PO_4 et de glucose. VVG111, sc27(D6), HRI-2L, 50% OD.

La disponibilité additionnelle de phosphate ne suffit donc pas à réamorcer la croissance cellulaire immédiatement après l'ajout de PO_4 ni 37 heures après l'ajout, ce qui correspondrait à la durée d'un cycle cellulaire.[4] Elle n'a pas non plus d'effet sur la biomasse finale atteinte par rapport au flacon témoin (Figure 6.4B) ou à une cuvée témoin en bioréacteur (Annexe 4, figure A4.12). Ainsi, s'il y contribue possiblement, le phosphate n'est pas la cause unique de la limitation de la croissance de *V. vinifera* dans le milieu de croissance B5.

6.3.2 Influence des ions magnésium et sulfate

Une expérience similaire à celle présentée plus haut a été effectuée afin d'étudier l'effet de l'ajout d'un supplément de $MgSO_4$, enrichi de glucose, dans les mêmes conditions de culture. Les courbes comparatives des indices d'augmentation du nombre de cellules viables et de la biomasse sèche sont présentées à la figure 6.7. L'addition de la solution concentrée de $MgSO_4$ n'a pas provoqué d'augmentation de la prolifération cellulaire ou de la croissance de la biomasse.

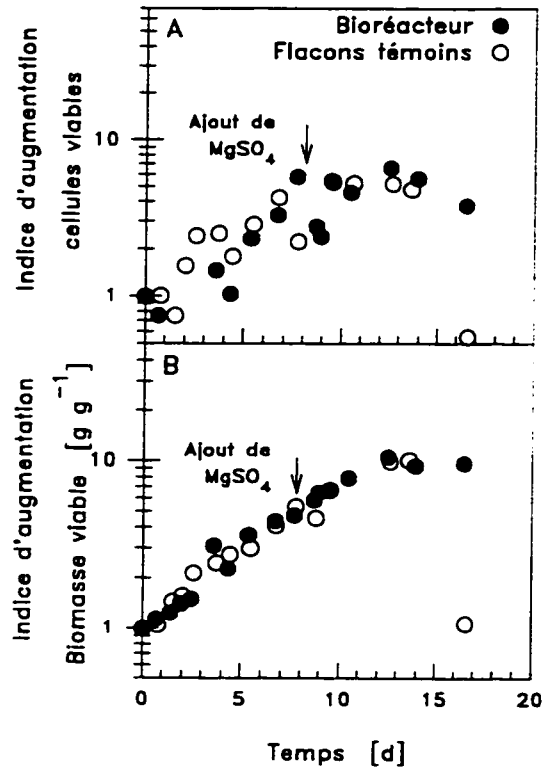


Figure 6.7 Indices d'augmentation de la fraction viable de la concentration de cellules et de biomasse sèche d'une culture en milieu B5 supplémenté rapidement avec une solution concentrée de $MgSO_4$ et de glucose. VVG111, sc31(D10), HRI-5L, 50% OD.

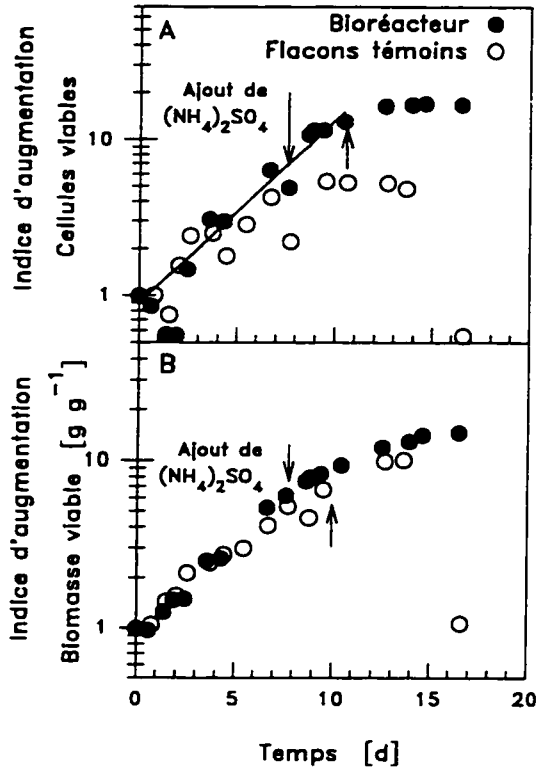


Figure 6.8 Indices d'augmentation de la fraction viable de la concentration de cellules et de biomasse sèche d'une culture en milieu B5 supplémenté avec une solution concentrée de $(NH_4)_2SO_4$ et de glucose. VVG111, sc31(D10), HRI-2L, 50% OD.

6.3.3 Influence de l'ion ammonium

Les courbes de progression du compte cellulaire et de la biomasse sèche d'une cuvée alimentée avec une solution de $(NH_4)_2SO_4$-glucose sont présentées à la figure 6.8. Comparativement aux deux essais précédents et aux performances des cultures témoins en flacons, l'ajout de NH_4 a permis de soutenir la croissance cellulaire après l'observation du plafonnement de l'OUR (Figure 6.8 A) et d'obtenir un plus grand nombre de cellules, comme nous l'avions escompté.

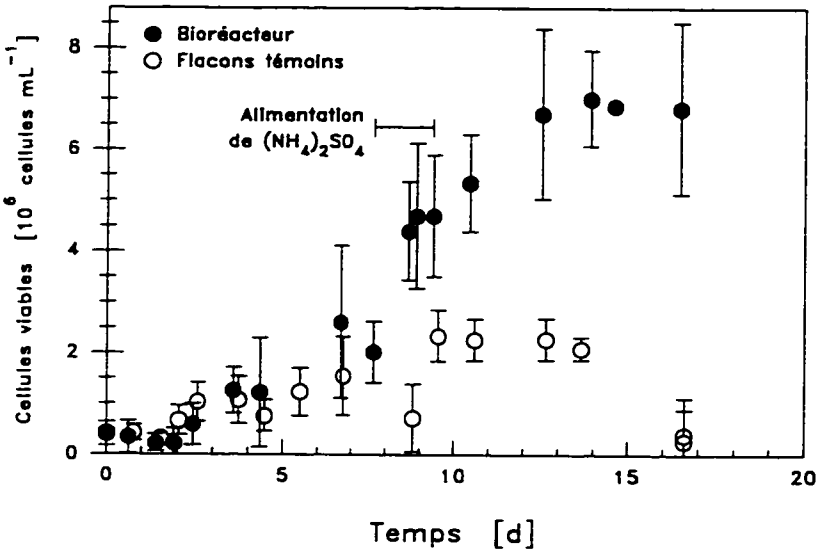


Figure 6.9 Concentration de cellules viables de la culture en milieu B5 supplémenté en NH_4. VVG111, sc31(D10), HRI-2L, 50% OD.

Ainsi, dans les quarante-huit premières heures suivant le début de l'alimentation de NH_4, le taux spécifique moyen de croissance des cellules, $\overline{\mu_t}$, est demeuré à 0,28 h^{-1} comme depuis le début de la culture. Cette prolongation de la période de prolifération cellulaire a permis d'atteindre $6{,}8 \cdot 10^6$ cellules viables par mL (sur la base du volume initial) pour la culture en bioréacteur alors qu'avant le début de l'alimentation, le compte cellulaire plafonnait au même niveau que les flacons témoins, autours de $2{,}3 \cdot 10^6$ cellules viables mL^{-1} (Figure 6.9). La stratégie d'utiliser le plafonnement de la mesure d'OUR pour fixer le moment de l'alimentation de nutriments a donc permis d'identifier et de contourner une source de limitation de la prolifération cellulaire.

Comme l'illustre la figure 6.10 représentant la disparition des nutriments du milieux extracellulaire et l'évolution du pH des cultures, l'ajout de la solution concentrée de NH_4-Glc à un taux spécifique de 0,38 mmol NH_4 (g MS h)$^{-1}$ (ou 9,9 mmol NH_4 (10^6 cellules h)$^{-1}$) n'a pas provoqué de modification importante du pH. Par contre, durant les vingt-quatre premières

heures d'alimentation, le taux volumique d'assimilation d'oxygène a augmenté. Cette hausse de l'OUR reflète une hausse de 60 à 70% des taux spécifiques d'assimilation d'O_2, $(q_{O_2})_{MS}$ passant ainsi de 0,21 à 0,36 mmol O_2 (g MS h)$^{-1}$ et $(q_{O_2})_{cell.}$, de 0,47 à 0,64 µmol O_2 (10^6 cellules h)$^{-1}$ (Figure 6.11).

La supplémentation de NH_4 et la poursuite de la prolifération cellulaire qui y est associée, ont donc eu pour conséquence de relever le taux spécifique d'assimilation d'O_2 au niveau qu'il avait au moment de l'observation de OUR_{max}. Par contre, après 24 heures de prolifération cellulaire soutenue, l'apport relatif de NH_4, qui a réduit de 9,9 à 5,5 mmol NH_4 (10^6 cellules h)$^{-1}$ suite à l'augmentation du nombre de cellules viables, n'a pas été suffisant pour maintenir les taux spécifiques d'assimilation d'O_2. Il est aussi possible qu'à la suite de l'augmentation du nombre de cellules, la baisse du contenu en PO_4 des cellules à $\approx$ 0,18 µmol P (10^6 cellules)$^{-1}$ se traduise par un ralentissement de l'assimilation d'O_2.

L'ajout de NH_4 a aussi eu un effet notable sur la morphologie des amas cellulaires, ce que nous avons malheureusement négligé d'immortaliser sur une pellicule photographique. Ainsi, avec des agrégats d'un diamètre toujours inférieur à 100 µm, la suspension cellulaire obtenue dans le bioréacteur alimenté en NH_4 était beaucoup plus fine et moins pigmentée que celle des flacons témoins ou de la culture alimentée en $MgSO_4$ effectuée avec le même inoculum. Pour ces trois conditions de culture, la viabilité est demeurée très élevée (en moyenne à 95%) pendant toute la culture.

L'effet positif de l'ajout de NH_4 sur la prolifération cellulaire ne s'est pas reflété sur l'augmentation de la biomasse sèche (Figure 6.8 B). On peut relier cette observation au fait que, contrairement aux cultures témoins en flacons agités (Figure 4.1) et aux autres cultures en bioréacteur (Annexe 4, Figures A4.12, A4.17 et A4.24), la masse spécifique des cellules est demeurée relativement constante à 2,4±0,4 µg MS cellule^{-1} (±intervalle de confiance à 95%) pour toute la durée de la culture (Figure 6.12A). Ainsi, la progression de la biomasse sèche

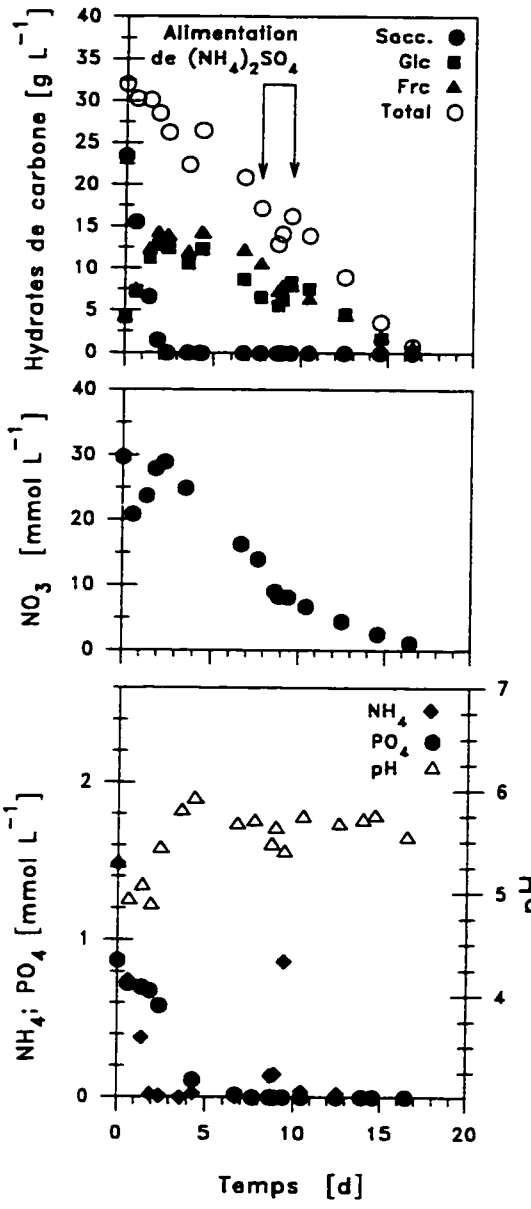


Figure 6.10 Courbes de concentration des hydrates de carbones, des ions nitrate, ammonium et phosphate et de pH de la culture en milieu B5 supplémenté en NH_4. VVG111, sc31(D10), HRI-2L, 50% OD.

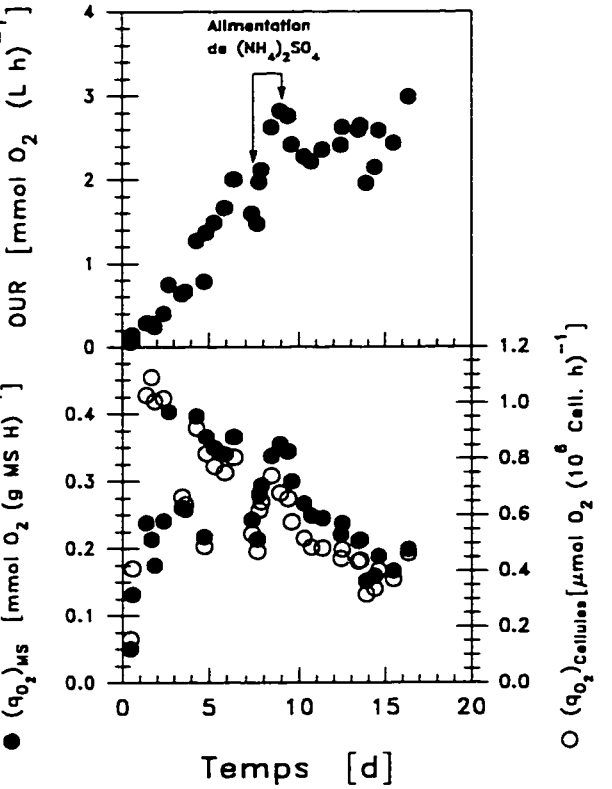


Figure 6.11 Taux volumique (A) et spécifiques d'assimilation d'O_2 (B) de la culture en milieu B5 supplémenté en NH_4. VVG111, sc31(D10), HRI-2L, 50% OD.

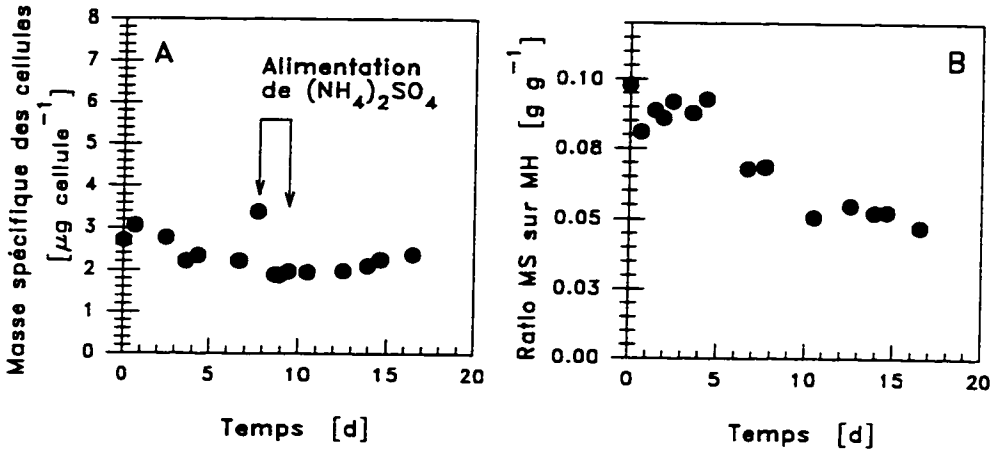


Figure 6.12 Masse spécifique des cellules (A) et ratio MS/MH (B) de la culture en milieu B5 supplémenté en NH_4.
Lignée VVG111, sc31(D10), HRI-2L, 50% OD.

s'effectue parallèlement à celle du nombre de cellules et la biomasse est simplement partagée dans un plus grand nombre de cellules.

Le ratio MH/MS (Figure 6.12B) présente cependant une progression similaire à celle observée pour toutes les cultures en cuvée de cellules végétales : suivant l'état initial des cellules, une diminution ou un plateau du ratio MS/MH dans les premiers jours suivant l'inoculation, suivi d'une augmentation progressive du ratio MH/MS parallèle à la diminution de l'osmolarité du milieu occasionnée par l'épuisement des ressources d'ions nitrate et d'hydrates de carbone (Figure 6.10).

Ajoutons que pour toutes les cultures effectuées avec la lignée VVG111 et à 50% d'OD, le rendement apparent en biomasse sèche sur les hydrates de carbone, Y_{MS/CH_2O}, était le même à 0,40±0,01 g MS g^{-1} CH_2O (±erreur standard, Figure 6.13). Cependant, par rapport aux autres cultures effectuées avec cette lignée cellulaire (Annexe 4), l'ajout de la solution de $(NH_4)_2SO_4$-Glc a provoqué un ralentissement de l'assimilation des ions NO_3 après 24 heures, comme l'indique le fléchissement de la courbe de concentration extracellulaire de NO_3

(Figure 6.10). Ce comportement reflète l'utilisation préférentielle des ions ammonium, déjà évoquée au chapitre 5. Ainsi, jusqu'au moment de l'arrêt de l'addition de NH_4-Glc, le rendement apparent en biomasse sèche sur l'azote total fourni à la culture, $Y_{MS/N}$ = 0,40 g MS $mmol^{-1}$ N (où N représente N-NH_4 + N-NO_3) (Figure 6.14B), était égal à celui calculé pour toutes les cultures effectuées avec la lignée VVG111 : 0,41±0,02 g MS $mmol^{-1}$ N (±erreur standard, Figure 6.14A). Après ce moment, l'apport supplémentaire de glucose, conjugué à une concentration résiduelle d'azote en fin de culture, se traduit par une hausse du rendement apparent sur l'azote en fin de culture (Figure 6.14B). Ce comportement n'apparait pas dans les deux autres cultures en cuvée alimentée, l'augmentation de la biomasse sèche qui pourrait résulter de l'assimilation du supplément de glucose fourni aux cultures a lieu lorsque l'azote est complètement consommé (Figure 6.14A).

Finalement, comme pour toutes les autres cultures en cuvée, l'épuisement des ressources d'ions nitrate et d'hydrates de carbone (Figure 6.10) a résulté en un plafonnement de la biomasse sèche et en l'arrêt de la prolifération cellulaire (Figure 6.8).

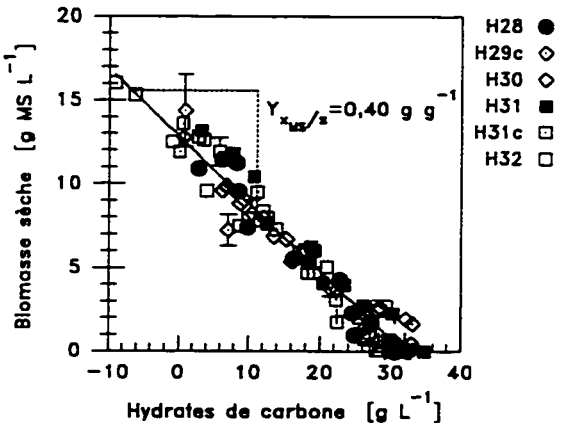


Figure 6.13 Rendement apparent en biomasse sèche sur les hydrates de carbone des cultures effectuées avec la lignée VVG111.

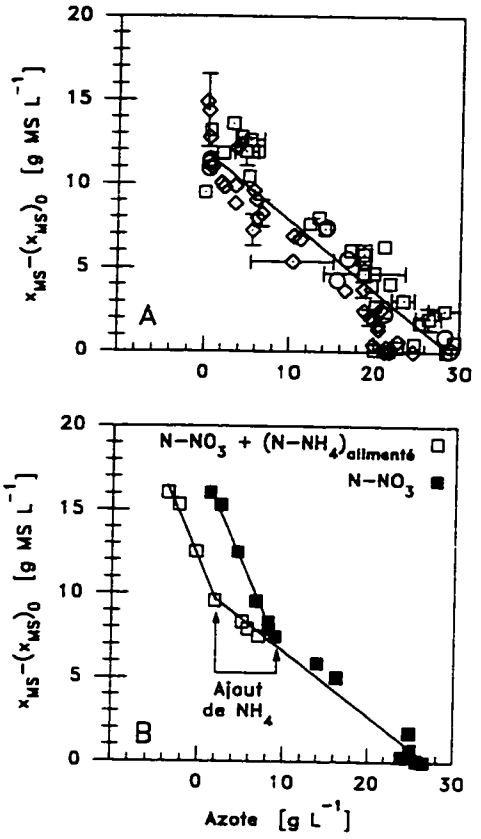


Figure 6.14 ***Rendement apparent en biomasse sèche sur l'azote (A) de toutes les cultures effectuées avec la lignée VVG111 et (B) de la culture en milieu B5 supplémenté en NH4.*** *Concentration du milieu extracellulaire en azote incluant les ions NH_4 présents initialement et les ions NO_3, ■; incluant les ions NH_4 présents initialement ainsi que les ions NH_4 alimentés □. Sur la première section de la courbe,* $Y_{MS/N}$ *=0,40 g^{-1} MS mmol N; après l'alimentation en NH_4,* $Y_{MS/N}$ *=1,2 g^{-1} MS mmol N. VVG111, sc31(D10), HRI-2L, 50% OD.*

6.4 CONCLUSION

En résumé, la relation qualitative établie pour *V. vinifera* entre l'activité métabolique de la biomasse et la mesure de taux d'assimilation d'O_2 a permis d'utiliser cette dernière pour repérer le moment d'un ralentissement de la prolifération cellulaire. La stratégie adoptée, qui consiste à alimenter une solution concentrée de nutriments au moment où OUR atteint un maximum afin d'identifier la source de limitation de la prolifération cellulaire, s'est avérée efficace. Bien que l'ajout de NaH_2PO_4 ou de $MgSO_4$, additionné de glucose pour éviter une éventuelle limitation en hydrates de carbone, n'a pas eu d'effet sur la prolifération cellulaire, l'ajout de $(NH_4)_2SO_4$ et de glucose a permis de prolonger la période de prolifération cellulaire. Ainsi la concentration de cellules viables a atteint $6,8 \cdot 10^6$ cellules par mL (sur la base du volume initial) pour la culture supplémentée en $(NH_4)_2SO_4$ comparativement à $2,3 \cdot 10^6$ cellules viables mL^{-1} dans les cultures témoins en flacons agités.

Le gain de productivité en cellules (cellules $(mL\ d)^{-1}$) entre les cultures en cuvée et la culture avec alimentation programmée de NH_4 n'est pas très élevé à environ 3% pour l'étape de prolifération. Toutefois, si l'on fait l'hypothèse que la productivité spécifique des cellules ainsi obtenues demeurera la même lorsqu'elles seront induites à la production d'anthocyanes, l'utilisation d'un mode d'opération en cuvée alimentée pour l'étape de croissance devrait se traduire en une augmentation de productivité volumique en anthocyanes de 10% pour une étape de production de 2,5 jours, de 15% pour un étape de 5 jours et de 21% pour une étape de 8 jours. Or, dans les conditions de culture établies pour l'étape de production d'anthocyanes par *V. vinifera*,[31,36,38] les concentrations maximales d'anthocyanes sont observées après 8 à 10 jours de culture. L'induction d'une population cellulaire plus importante pouvant mener à une augmentation de productivité de l'ordre de 20% est donc avantageuse du point de vue procédé. D'ailleurs, s'il peut être vérifié que la production d'anthocyanes est augmentée lorsque les milieux sont appauvris en PO_4, augmenter le nombre de cellules (donc réduire PO_4/nb cell.) devrait aller dans le sens d'augmenter la production.

Quand à l'étape subséquente de production d'anthocyanes, on doit noter que les efforts de sélection et d'entretien de souches hautement productives effectués par Hirasuna et ses collaborateurs[62] montrent qu'il est possible de prolonger la période de production d'anthocyanes et d'atteindre une production dépassant 2,5 g Acy L^{-1} avec un inoculum élevé (3 g MS L^{-1}) dans un milieu à haute osmolarité (80 g saccharose L^{-1}) et réduit en nitrate (< 10 mM NO_3), similaire à celui mis au point par l'équipe du CRDA. On peut envisager arriver à maintenir la viabilité et la capacité de production de la biomasse durant l'étape de production en programmant similairement à Srinivasan et Ryu[153] pour la production de shikonine, une alimentation cyclique d'une source d'azote, et possiblement de phosphate, tout en maintenant une osmolarité élevée et une concentration faible en nitrate.[18] Il sera intéressant de vérifier les relations entre l'assimilation de l'oxygène, la production d'anthocyanes, la prolifération cellulaires et le maintien de la viabilité dans des conditions de production.

L'utilisation de l'OUR a donc permis d'identifier la source de limitation de la prolifération cellulaire dans des conditions de culture en bioréacteur. Si les mesures d'OUR sont entachées d'une erreur trop importante pour être utilisées à des fins de contrôle, elles pourraient cependant servir à reconnaître les changements métaboliques qui accompagnent les conditions les plus propices à l'induction ou à l'élicitation de la production de métabolites secondaires. Dans ce contexte, les études sur l'étape de production gagneraient à être documentées du point de vue de l'assimilation de l'oxygène.

7. DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSIONS

L'objectif global de ce travail était de déterminer les conditions de culture en bioréacteur qui favorisent la croissance de cellules de *Vitis vinifera* afin d'augmenter la productivité de ce système de production d'anthocyanes. L'hypothèse voulant que la disponibilité de l'oxygène pour les cultures constitue l'un des paramètres influençant de façon notable le taux de croissance de la biomasse constitue une prémisse importante pour l'orientation de nos travaux expérimentaux, d'autant plus que lors de l'élaboration du projet l'une de nos visées premières était d'établir les paramètres d'un modèle cinétique reliant l'assimilation de l'oxygène, q_{O_2}, à la concentration d'oxygène dissous dans le milieu de culture, OD. Les cultures effectuées à diverses concentrations d'oxygène dissous pour lesquelles le principal indicateur de croissance suivi a été la concentration de biomasse sèche, ont permis de documenter la culture en cuvée en bioréacteur de nos cellules et d'orienter nos travaux de façon (i) à ajouter les comptes cellulaires aux autres indicateurs de croissance que nous utilisions, (ii) à compléter les courbes de croissance obtenues en flacons agités, qui demeurent le système de culture de référence, par un suivi de la concentration d'oxygène dissous dans le flacon, et (iii) à partir des observations faites dans ces deux systèmes de culture, à tenter d'identifier la source de limitation nutritionnelle à la prolifération cellulaire en reliant les observations contenues dans la progression du taux volumique d'assimilation d'oxygène, OUR, et dans les courbes de croissance de la biomasse et de prolifération cellulaire.

7.1 Croissance en bioréacteur et concentration d'oxygène dissous

Pour toutes les cultures effectuées dans les réacteurs à double ruban hélicoïdal (HRI), la comparaison des indices d'augmentation de la concentration de biomasse avec ceux obtenus dans les cultures témoins en flacons agités est à l'avantage des cultures en bioréacteurs (Figure 5.8), notamment après l'observation d'un maximum dans la progression du taux

volumique d'assimilation d'O_2. Bien évidemment, avoir en bioréacteur des résultats similaires à ceux observées en flacons agités est en soi extrêmement positif, même à petite échelle. Cela démontre que le bioréacteur choisi, en l'occurrence un réacteur HRI aéré par la surface, procure aux cultures des conditions de stress hydrodynamique et de pression partielle de métabolites gazeux (CO_2 et C_2H_4) qui permettent de rivaliser avec les conditions prévalant dans les flacons agités auxquelles les lignées cellulaires utilisées sont adaptées.

Les résultats des expériences en bioréacteurs avec contrôle d'oxygène dissous à des points de consigne variant de 10 % à 90 % d'OD ne sont pas aussi concluants du point de vue modélisation qu'il aurait été souhaité. En effet, les patrons de la progression des taux spécifiques d'assimilation d'O_2, qu'ils soient interprétés sur la base de la biomasse sèche ou sur la base des comptes de cellules, affichent tous, bien que de façon plus ou moins marquée, un accroissement graduel suivi d'une diminution vers ce qui semble être un taux minimum autour de 0,4 mmole O_2 $(g_{MS}\ h)^{-1}$ ou 0,2 µmole O_2 $(10^6$ cellules $h)^{-1}$ que l'on est tenté d'assimiler à un taux de maintenance. Le maximum de la courbe ne coïncide avec aucune information tirée des mesures de concentrations extra-cellulaires de nutriments. Dans ce contexte, pour chaque concentration d'OD testée, les taux spécifiques d'assimilation d'O_2 s'échelonnent sur une plage relativement large et si l'on désire relier dans une expression cinétique le taux spécifique d'assimilation d'O_2 et la concentration d'OD, il faut utiliser la moyenne des taux d'assimilation. Or, l'information contenue dans ces taux spécifiques moyens n'est pas très riche si bien que les conclusions les plus importantes en ce qui concerne l'effet de la concentration d'OD sur l'assimilation d'O_2 par *V. vinifera* sont plus de nature qualitative, à savoir :

- une augmentation de la concentration d'OD dans le milieu de culture de 10 % jusqu'à 50 à 70 % provoque une augmentation du taux spécifique d'assimilation d'O_2;
- une concentration d'OD de 90% a un effet négatif sur les taux spécifiques d'assimilation d'O_2, les ramenant aux valeurs observée autour de 30 % d'OD.

On peut faire un parallèle avec les écrits de Payne et coll. [113] qui indiquent que la concentration d'OD après laquelle on ne devrait pas observer d'amélioration de la croissance devrait être

d'environ 50 %, en se basant sur les valeurs attendues des constantes de saturation des enzymes impliqués dans la phosphorylation oxydative.

La relation entre les taux spécifiques moyens de croissance de la biomasse, considérés sur la portion logarithmique de la courbe de croissance des six à sept premiers jours de culture, et la concentration d'OD est similaire à celle observée entre $(\overline{q_{O_2}})_{MS}$ et OD : une progression vers un sommet autour de 50 % d'OD et une inhibition de la croissance après 70 % d'OD. Pour des croissances effectuées dans les milieux B5 et B5QN, la première portion de la courbe est bien représentée par une cinétique de Monod avec une constante de demi-saturation de 10 % et un taux spécifique maximal de 0,28 h^{-1}.

Jusqu'à 50 % d'OD, les effets conjugués des augmentations des taux spécifiques d'assimilation d'O_2 et de croissance de la biomasse avec la concentration d'OD résultent en des courbes de taux volumiques de respiration qui plafonnent à un niveau plus élevé et plus rapidement lorsque la concentration d'OD est élevée. Ce plafonnement reflète celui du taux spécifique d'assimilation d'O_2; il a lieu avant le plafonnement de la courbe de croissance de la biomasse à x_{MSmax} et, comme pour le taux spécifique d'assimilation d'O_2, il ne coïncide pas avec l'épuisement d'un élément nutritif mesuré du milieu de culture. Ce comportement est illustré à la figure 6.1, les courbes qui y sont présentées montrent bien que les conditions d'oxygénation influencent la cinétique des cultures. Une hausse de la concentration d'oxygène dissous provoque une augmentation du taux spécifique d'assimilation d'O_2, vraisemblablement reliée à une augmentation de l'activité métabolique, et une augmentation de la quantité maximale de biomasse sèche produite. Les cultures effectuées à 10 % d'OD sont de plus affectées d'une période de latence importante. Les rendements globaux en biomasse sur les hydrates de carbone sont toutefois constants, ce qui implique ou (i) qu'une partie des hydrates de carbone est déviée vers la production de protéines ou de polysaccharides extracellulaires, ou (ii) que le coefficient respiratoire des cultures augmente avec la disponibilité de l'oxygène, cette dernière hypothèse impliquant possiblement une dissipation d'énergie dans l'hydrolyse d'ATP produite ou dans la déviation d'une partie du métabolisme dans des voies futiles.[159] L'information supplémentaire qu'apporterait un suivi de la pression partielle de CO_2 dans les gaz d'aération à la sortie du

réacteur et des mesures du contenu en carbone de la biomasse et du milieu extracellulaire pourrait éclairer ces points, ce que le groupe de recherche du prof. Archambault a intégré dans ses recherches.

Dans la perspective d'une investigation des conditions de culture en bioréacteur les plus favorables pour une étape de croissance de la biomasse, il s'avère donc que pour des cultures en bioréacteur et dans un milieu de croissance de cellules de *V. vinifera*, une concentration d'OD de 50 % permet d'améliorer la productivité de la phase de croissance en terme de production volumique de biomasse sèche. Toutefois, sans validation préalable, il n'est pas certain que la biomasse sèche soit dans toutes les conditions de croissance représentative du nombre de cellules, qui plus est dans des conditions où le métabolisme semble accéléré et les dépenses énergétiques élevées. Dans ce contexte, pour les expériences subséquentes nous avons résolu d'ajouter des comptes cellulaires aux indicateurs de croissance que nous utilisions déjà; d'autant plus que nous voulions nous doter d'outils permettant d'éclaircir le lien entre la croissance de la biomasse et l'observation d'une retombée du taux spécifique d'assimilation d'O_2. De plus, à la lumière des résultats d'une culture effectuée à 90 % d'OD dans un milieu réduit en nitrate et dans laquelle les cinétiques sont particulièrement lentes, on remarque aussi que la progression des taux spécifiques d'assimilation d'O_2 semble refléter des changements métaboliques causé par la disparition des nitrates du milieu extracellulaire. Le plafonnement et la diminution subséquente du taux spécifique d'assimilation d'O_2 dans le milieu de croissance doit vraisemblablement aussi refléter un changement, important celui-là, dans le métabolisme des cellules.

7.2 Cultures en flacons agités

Afin de pouvoir mieux comparer les comportements des cultures en flacons agités et en bioréacteurs et de compléter notre étude de l'étape de croissance de notre système biologique, la concentration d'OD dans des flacons agités a été mesurée. Les courbes de concentration d'OD, de taux volumiques et spécifiques d'assimilation d'O_2 (obtenus sur la base de la caractérisation

des flacons agités en termes de transfert d'O_2), de croissance de la biomasse sèche et de prolifération cellulaire ont fourni des informations cruciales et inédites dans la littérature. Ainsi, dans le milieu de croissance, la prolifération cellulaire et la croissance de la biomasse de notre système biologique ne s'effectuent pas en parallèle sur toute la durée de la culture. Au contraire, la prolifération cellulaire cesse après 6 à 7 jours alors que la concentration de biomasse continue de progresser pendant encore 7 jours de culture. Ce résultat implique qu'il est essentiel de baser la caractérisation du comportement des cellules végétales et l'optimisation des conditions de culture sur des comptes cellulaires en plus de la concentration de biomasse sèche afin de maximiser le nombre de cellules productives. Il s'agit ici d'un changement d'approche important dans la mise au point de procédés impliquant des cellules végétales, essentiellement basée jusqu'à maintenant sur une optimisation de la biomasse sèche, et d'une contribution originale de cette thèse au domaine.

De plus, ces cultures en flacons agités ont permis de constater que l'arrêt de la prolifération cellulaire coïncide avec l'observation d'un maximum dans les courbes de taux volumique (OUR) et spécifiques ($(q_{O_2})_{MS}$ et $(q_{O_2})_{\epsilon}$) d'assimilation d'O_2. Ainsi, le plafonnement des mesures d'OUR observé dans toutes nos cultures en bioréacteurs avec contrôle de la concentration d'OD devrait aussi être relié à une diminution drastique du taux de division cellulaire et à une inflexion du taux de croissance de la biomasse. D'ailleurs, les courbes de croissance de la biomasse ont pu être bien représentées par un modèle logistique dans lequel le temps d'inflexion est fixé au moment de l'observation d'OUR_{max}.

Les données recueillies tant dans les cultures en flacons que dans la série de cultures en bioréacteurs avec contrôle de la concentration d'OD montrent que l'arrêt de la prolifération cellulaire n'est pas causé par une limitation en oxygène et n'est pas non plus relié directement à la disparition du milieu de culture d'un des nutriments mesurés, il devrait donc être causé par une limitation en un des nutriments rapidement prélevés du milieu de culture (NH_4 ou PO_4) ou en un nutriment non mesuré, ou encore par une inhibition causée par l'accumulation de métabolites.

7.3 Identification de la source de limitation de la prolifération cellulaire

À l'analyse des données recueillies sur la consommation des nutriments et notamment sur les rendements en biomasse, nous avons pu constater qu'il n'est pas facile d'en extirper des interprétations utiles pour orienter l'amélioration des conditions de culture. Bien que les changements de lignée cellulaire au cours du projet aient probablement accentué cette problématique, il demeure que les rendements en biomasse (sèche) sur les ions sont fortement reliés aux rendements sur les hydrates de carbone et que les erreurs sur les estimés des rendements sont importants. De plus, dans un contexte où la concentration cellulaire revêt plus d'intérêt que la concentration en biomasse sèche, le rendement en cellules sur chacun des nutriments est plus intéressant. Pour les quelques cultures en bioréacteur où il peut être évalué, on trouve que le contenu en phosphate des cellules après sept jours de culture et au moment de l'arrêt de la prolifération cellulaire est de 0,23 µmole P $(10^6 \text{ cellules})^{-1}$ et que le rendement sur l'ion ammonium est de 0,8 µmole $N\text{-}NH_4$ $(10^6 \text{ cellules})^{-1}$, bien que dans ce dernier cas, comme l'ion ammonium est consommé préférentiellement à l'ion nitrate, on s'attend à ce qu'une addition de NH_4 provoque une augmentation du rendement qui reflète en fait un transfert de la source prédominante (en concentration) d'azote du $N\text{-}NO_3$ au $N\text{-}NH_4$.

L'incidence sur le taux volumique d'assimilation d'O_2 du ralentissement de la prolifération cellulaire a permis d'utiliser le plafonnement de la courbe d'assimilation d'O_2 comme repère de la manifestation d'un limitation nutritionnelle à la division cellulaire et signal pour l'alimentation d'un supplément de nutriments. Trois nutriments potentiellement limitants ont été ainsi testé dans des cultures en bioréacteur effectuées à 50 % d'OD : PO_4, Mg et NH_4. Parmi ceux-ci, cette stratégie a permis d'identifier l'ion ammonium comme étant le premier élément nutritif responsable de la limitation de la prolifération cellulaire. L'alimentation programmée d'une solution concentrée de $(NH_4)_2SO_4$ et de glucose au moment où l'OUR plafonne a permis de soutenir le taux volumique d'assimilation d'O_2 et d'obtenir une concentration cellulaire atteignant 6,8 10^6 cellules mL^{-1} comparativement à 2,3 10^6 cellules mL^{-1} dans le milieu de

croissance usuel, ce qui représente une amélioration appréciable de la productivité de l'étape de croissance.

Cet outil de diagnostic s'avère être un atout précieux pour le développement de procédé que l'équipe du prof. Archambault a intégré dans ses démarches de mise au point de procédé avec d'autres lignées cellulaires, dans les étapes de croissance comme dans les étapes de production sous élicitation. Il constitue sans doute un outil performant pour le développement de bioprocédés impliquant les cellules végétales et une contribution importante de cette thèse au domaine.

7.4 Perspectives

On pourrait argumenter, appuyé en cela par une littérature abondante, sur le fait que les conditions propices à la croissance et à la production de métabolites secondaires sont le plus souvent antagonistes et que favoriser la croissance n'est pas nécessairement garant d'une amélioration globale de la productivité du bioprocédé. Ainsi l'augmentation de la concentration de phosphate dans le milieu de culture favorise la croissance et ce, souvent au détriment de la production. Cependant utilisant des conditions de cultures telles que le plafonnement de l'OUR sera une manifestation d'une limitation en phosphate, on pourrait s'assurer lors du déclenchement de l'étape de production d'avoir une biomasse avec un contenu en phosphate minimal. Similairement, favoriser la prolifération cellulaire avec une alimentation programmée de NH_4, une source d'azote plus directement assimilable que l'ion nitrate, comme nous l'avons fait pour *V. vinifera* peut résulter en une perte subséquente de productivité qu'il faut effectivement vérifier. Toutefois, dans notre contexte particulier, nous avions pu vérifier en marge d'une étude préliminaire de production en deux étapes effectuées dans des flacons agités que le remplacement du milieu de croissance par le milieu de production à contenu réduit en nitrate mis au point par l'équipe du Dr. Cormier du CRDA résulte pour les cultures en une concentration de nitrate extracellulaire inchangée par rapport à la concentration résiduelle de nitrate et à une addition au milieu d'ions ammonium et phosphate en plus du choc osmotique

provoqué par la forte augmentation de concentration de glucose. S'il est connu que le nitrate est un inhibiteur des voies de synthèses des anthocyanes, il est possible qu'un entretien de la viabilité des cellules et de leur métabolisme primaire par l'ajout ponctuel de nutriments essentiels au maintien dans une certaine mesure de la division cellulaire soit aussi bénéfique au rendement volumique en anthocyanes. Des résultats allant dans cette direction ont été obtenu par Srinivasan et Ryu [153] pour la production de shikonine avec *Lithospernum erythrorhizon* et par Hirasuna et ses collaborateurs [62] pour la production d'anthocyanes avec *Vitis*.

Éventuellement, aux conditions d'aération qui se sont avérées les plus adéquates, une simulation de la mise à l'échelle du procédé par des purges périodiques et des changements de milieu de culture dans le bioréacteur permettrait de valider d'éventuelles stratégies de cultures à alimentation programmée tout en tenant compte des effets cumulatifs sur la culture d'une concentration d'O_2 contrôlée à un point de consigne et des modifications des conditions de culture, du milieu de croissance et, éventuellement, du milieu de production sur la qualité de la biomasse et la capacitité de production. Il faudrait ajouter au suivi des cultures une procédure d'évaluation du maintien de la capacité de production.

L'extension à l'étape de production de la démarche que nous avons utilisée est certainement essentielle à une bonne compréhension du procédé et, plus particulièrement, des conditions de cultures favorables à la production. De plus, les anthocyanes possèdent un avantage singulier sur la plupart des métabolites secondaires étudiés puisque leur production est facile à vérifier et à mesurer et que des techniques de mesure *in situ* de la pigmentation des cultures sont envisageables. [149] Dans ce contexte, on peut espérer pouvoir relier les mesures en lignes d'assimilation d'O_2, de production de CO_2, et de la pigmentation cellulaire pour améliorer les conditions de cultures et accélérer la mise au point du bioprocédé.

7.5 Considérations techniques

Finalement, d'un point de vue plus technique, les deux aspects principaux des travaux rapportés ici qui devrait être améliorés concernent le contrôle de l'oxygène dissous et la variance élevée

des compte cellulaires. Dans toutes les cultures en bioréacteur avec contrôle de la concentration d'OD et particulièrement pour celles effectuées dans les réacteurs de 2-L pour lesquels les débit d'air et d'O_2 ou de N_2 étaient contrôlés via le temps relatif d'ouverture de vannes solénoïdes , un meilleur contrôle de la concentration d'oxygène dissous aurait sans doute permis d'obtenir des résultats plus probant. L'implantation d'algorithmes de contrôle adaptatifs par les étudiants qui se sont greffés au groupe de recherche ces dernières années (Dany Aubry, Joël Sirois et François Rioux) a réglé les problèmes d'oscillation importants que les cultures ont eu à subir.

Les courbes de comptes cellulaires auraient pu être moins dispersées en remplaçant la digestion chimique à l'oxyde de chrome par une digestion enzymatique des parois cellulaires. Un tel protocole a été implanté dans le laboratoire et permettra sans doute de pouvoir évaluer avec plus d'assurance les coefficients de rendements sur les cellules ainsi que les paramètres des équations cinétiques reliant les taux spécifiques de consommation de nutriments aux concentrations.

8. RÉFÉRENCES

1. AGRICULTURAL EXPERIMENTAL STATION (1976). Colors and pigments analyses in fruit products. Oregon State Univ., Corvallis, Bulletin 624.

2. AIBA, S., HUMFREY, A.E. et N.F. MILLIS. (1973). Biochemical Engineering, 2d ed. Academic Press, N.-Y.

3. ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K. et J.D. WATSON. (1983). *Molecular biology of the cell.* New-York, Garland Publishing, Inc.

4. AMINO, S., FUJIMURA, T et A. KOMAMINE. (1983). Synchrony induced by double phosphate starvation in a suspension culture of *Catharanthus roseus*. *Physol. Plant.*, **59** : 393-396.

5. ARCHAMBAULT, J., WILLIAMS, R., LAVOIE, L., PÉPIN, M.-F. et C. CHAVARIE. (1994). Production of somatic embryos in a helical ribbon impeller bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.*, **44**: 930-943.

6. ARCHAMBAULT, J., POUYEZ, C.M., PÉPIN, M.-F., PERRIER, M. et C. CHAVARIE. (1994). Effect of dissolved oxygen concentration on the growth of surface-immobilized *Catahranthus roseus* cells: A modelling and experimental study, dans : *Advances in Plant Biotechnology*. D.D.Y. Ryu et S. Furusake, Amsterdam, Elsevier Science, pp 153-207.

7. ARCHAMBAULT, J. (1991). Large-scale (20 L) culture of surface-immobilized *Catharanthus roseus* cells. *Enzyme Microb. Technol.*, **13**: 882-892.

8. ARCHAMBAULT, J., VOLESKY, B. et W.G.W. KURZ. (1990). Development of bioreactors for the culture of surface immobilized plant cells. *Biotechnol. Bioeng.*, **35**: 702-711.

9. ATKINSON, B. et F. MAVITUNA. (1991). *Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook*, 2ième édition. New-York, Stockton Press, MacMillan Publishers.

10. BAILEY, C.M. et H. NICHOLSON. (1990). Optimal temperature control for a structured model of plant cell culture. *Biotechnol. Bioeng.*, **35**: 252-259.

11. BAILEY, J.E. et D.F. OLLIS. (1986). *Biochemical Engineering Fundamentals*, 2ième édition. Toronto, McGraw Hill.

12. BALLICA, R. et D.D.Y. RYU. (1993). Effects of rheological properties and mass transfer on plant cell bioreactor performance: production of tropane alkaloids. *Biotechnol. Bioeng.*, **42**: 1181-1189.

13. BARZ, W., DANIEL, S., HINDERER, W, JACQUES, U., KESSMANN, H., KÖSTER, J., OTTO, C. et K. TIEMANN. (1988). Elicitation and metabolism of phytoalexins in plant cell cultures, dans : *Application of plant cell and tissue culture*. New-York, Ciba Foundation Symposium 137, Wiley, 178-198.

14. BECK, E. et U. RENNER. (1989). Ammonium triggers uptake of NO_3^- by *Chenopodium rubrum* suspension culture cells and remobilization of their vacuolar nitrate pool. *Plant Cell Physiol.*, **30** : 487-495.

15. BIDDINGTON, N.L. (1992). The influence of ethylene in plant tissue culture. *Plant Growth Regulation*, **11** : 173-187.

16. BIRD, R.B., STEWART, W.E. et E.N. LIGHTFOOT. (1960). *Transport Phenomena*. Toronto, John Wiley & Sons.

17. BONARIUS, H.P.J., DE GOOIJER, C.D., TRAMPER, J. et G. SCHMID. (1995). Determination of the respiration quotient in mammalian cell culture in bicarbonate buffered media. *Biotechnol. Bioeng.*, **45** : 524-535.

18. BONGUE-BARTELSMAN, M. et D.A. PHILLIPS. (1995). Nitrogen stress regulates gene expression of enzymes in the flavanoid biosynthetic pathway of tomato. *Plant Physiol. Biochem.*, **33** : 539-546.

19. BRAMBLE, J.L., GRAVES, D.J. et P. BRODELIUS. (1990). Plant cell culture using a novel bioreactor : the mechanically stabilized fluidized bed. *Biotechnol. Prog.*, **6**: 452-457.

20 BREENBERG, A.E., TRUSSEL, R.R. et L.S. CLESCERI. (1985). Standard Methods fot the Examination of Water and Wastewater. 16th ed. American Public Health Association, Washington D.C.

21. BRODELIUS, P. et H.J. VOGEL. (1985). A phophorus-31 nuclear magntic resonance study of phosphate uptake and storage in cultured *Catharanthus roseus* and *Daucus carota* plant cells. J. Biol. Chem. **260** : 3556-3560.

22. BROUILLARD, R. (1982). Chemical structure of anthocyanin, dans : *Anthocyanin as food colors*. P. Markakis, New-York, Academic Press, 1-37.

23. BUDAVARI, S., O'NEIL, M.J., SMITH, A. et P.E. HECKELMAN. (1989). *The Merk Index, An Encyclopiedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals*. Rahway, N.J., Merk & Co.

24. CALLEBAULT, A., VOETS, A.M. et J.C. MOTTE. (1990). Anthocyanin production by plant cell cultures on media based on milk whey. *Biotechnology Letters*, **12**: 215-218.

25 CALLEBAULT, A., HENDRICKS, G., VOETS, A.M. et J.C. MOTTE. (1990). Anthocyanin in cell cultures of *Ajuga reptans*. *Phytochemistry*, **29**: 2153-2158.

26. CHANDLER, V.L., RADICELLA, J.P., ROBBINS, T.P., CHEN, J. et D. TURKS. (1989). Two regulatory genes of the maize anthocyanin pathway are homologous : isolation of B using R genomic sequences. *Plant Cell*, **1**: 1175-1189.

27. CHAOUKI, F. (1992). *Relargage extracellulaire et récolte des anthocyanes produits par les cellules de Vitis vinifera*. Mémoire de M.Sc.A. Département de génie chimique, École Polytechnique de Montréal.

28. CHAVARIE, C.; DOCHAIN, D.; NORMANDIN, D.; PÉPIN, M.-F.; RAMSAY, J.; WILLIAMS, R.; BRAUNEGG, G. et J. ARCHAMBAULT. (1992). *Évaluation de la performance du système I.D.-Le Processeur de Bio-Expert Inc. sur un procédé à réacteurs multiples, pour la production d'anthocyanes par V. vinifera cultivé en suspension ainsi qu'en immobilisation. Rapport final.* Montréal, CDT-P1586 (Diffusion restreinte). Centre de développement technologique. École Polytechnique de Montréal.

29. CHISTI, M.Y. (1989). *Airlift bioreactors*. Londres, Elsevier.

30. CORMIER, F., DO, C.B., MORESOLI, C., ARCHAMBAULT, J., CHAVARIE, C., CHAOUKI, F. et M.-F. PÉPIN. (1992). Anthocyanin release from grape (*Vitis vinifera* L.) cell suspension. *Biotechnology Letters*, **14** : 1029-1034.

31. CORMIER, F., CREVIER, H.A. et C.B. DO (1990). Effects of sucrose concentration on the accumulation of anthocyanins in grape (*Vitis vinifera* L.) cell suspension. *Can. J. Bot.*, **68** : 1822-1826.

32. CRAWFORD, N.M. (1995). Nitrate : Nutrient and signal for plant growth. *Plant Cell*, **7** : 859-568.

33. CURTIS, W.R., HASEGAWA, P.M.et A.H. EMERY. (1991). Modeling release and variable growth in phosphate limited suspension cultures of *Opium puppy*. *Biotechnol. Bioeng.*, **38** : 371-379.

34. DALTON, C.C. et E. PEEL. (1983). Product formation and plant cell specialization: a case study of photosynthetic development in plant cell cultures, dans : *Progress in industrial microbiology*, vol.17. M.E. Bushell, New-York, Elsevier, 109-166.

35. De GUCHT, L.P.E. (1993). *Growth and respiration in chemostat cultures of Petunia hybrida cell suspensions*. Ph.D. Thesis, Amsterdam, Vrije Universiteit.

36. DO, C.B. et F. CORMIER. (1990). Accumulation of anthocyanins enhanced by a high osmotic potential in grape (*Vitis vinifera* L.) cell suspensions. *Plant Cell Rep.*, **9** : 143-146.

37. DO, C.B. et F. CORMIER. (1990). Accumulation of peonidin 3-glucoside enhanced by a high osmotic potential in grape (*Vitis vinifera* L.) cell suspension. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. **24**: 49-54.

38. DO, C.B. et F. CORMIER. (1990). Effect of high ammonium concentration in grape (*Vitis vinifera* L.) cell suspension in a production medium. Plant Cell Tissue and Organ Culture. **27**: 169-173.

39. DO, C.B. et F. CORMIER. (1991). Effects of low nitrate and high sugar concentrations on anthocyanin content and composition of grape (*Vitis vinifera* L.) cell suspension. Plant Cell Rep. **9**: 500-504.

40 DOUGALL, D.K. et G.C. FRAZIER. (1989). Nutrient utilization during biomass and anthocyanin accumulation in suspension cultures of wild carrot cells. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, **18** : 95-104.

41. DOUGALL, D.K., JOHNSON, J.M. et G.H. WHITTEN. (1980). A clonal analysis of anthocyanin accumulation by cell cultures of wild carrot. *Planta*, **149**: 292-297.

42. DRAPEAU, D., BLANCH, H.W. et C.R. WILKE. (1985). Growth kinetics of *Dioscorea deltoidea* and *Catharanthus roseus* in batch culture. *Biotechnol. Bioeng.*, **28** : 1555-1563.

43. DRAPEAU, D., BLANCH, H.W. et C.R. WILKE. (1985). Economic assesment of plant cell culture for the production of ajmalicine. *Biotechnol. Bioeng.*, **30**: 946-953.

44. DUCOS, J.P. et A. PAREILLEUX. (1986). Effect of aeration rate and influence of pO_2 in large-scale cultures of *Catharanthus roseus* cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **25** : 101-105.

45. DUCOS, J.P., FERON, G. et A. PAREILLEUX. (1988). Growth and activities of enzymes of primary metabolism in batch cultures of *Catahranthus roseus* cell suspension under different pCO_2 conditions. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, **13** : 167-177.

46. EPSTEIN, E. (1972). *Mineral Nutrition of Plants : Principles and Perspectives*, New-York, John Wiley and Sons.

47. FACCHINI, P. et F. DICOSMO. (1990). Immobilization of cultured *C. roseus* cells using a fiberglass substrantum. *Applied Microbiol. Biotechnol.*, **33** : 36-42.

48. FOGLER, H.S. (1986) *Elements of Chemical Reaction Engineering*. Englewood Cliffs, Prentice Hall.

49. FOWLER, M.W. et A.M. STAFFORD. (1992). Plant cell culture, process systems and product synthesis, dans : *Plant Biotechnology. Comprehensive biotechnology*, second supplement. M.W Fowler et G.S. Warren, New-York, Pergamon Press, 79-98.

50. FRANCIS, F.J. (1989). Food colorants: Anthocyanins. *Critical Reviews in Food Sciences and Nutrition*, **8**: 273-314.

51. FUJITA, Y., HARA, Y. et C. SUGA. (1981). Production of shikonin derivatives by cell suspension cultures of *Lithospernum erythrohizon*. 2. A new medium for production of shikonin derivatives. *Plant Cell Report*, 1 : 59-63.

52. FUJITA, Y. et Y. HARA. (1985). The effective production of shikonin by cultures with an increased cell population. *Agric. Biol. Chem.*,**49**: 2071-2075.

53. FULEKI, T. et R.G. SOMMERVILLE. (1984). Separation of anthocyanins of Concord grapes by high performance liquid chromatography. *Bulletin de liaison du groupe polyphénols*, **2**: 506-512.

54. FULLER, K.W. et D.J. BARLETT. (1985). The chemiosynthetic potential of plants and its utilisation by immobilized systems. Dans : Plant Products and the New Technology, K.W. Fuller et J.R. Gallon. Oxford,Clarendon Press, 229-247.

55. GAMBORG, O.L., MILLER R.A. et K. OJIMA. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.*,**50**: 151-158.

56. HAIGH, J.R. (1993). *Gas Concentration Effects on Plant Cell Cultures of Artemisia Annua*. Ph. D. Dissertation, Colorado State University, Fort Collins, Colorado.

57. HALL, R.D. et M.M. YEOMAN. (1986). Factors determining anthocyanin yield in cell cultures of *Catharanthus roseus* (L.)G. Don. *New Phytol.*,**103** : 33-43.

58. HANG, Y.D. (1988). Recovery of food ingredients from grape pomace. *Process Biochemistry*,**23**(2) : 2-4.

59. HENZLER, H.-J. et M. SCHEDEL. (1991). Suitability of the shaking flask for oxygen supply to microbiological cultures. *Bioprogress Eng.*,**7**: 123-131.

60. HEGARTY, P.K., SMART, N.J., SCRAGG, A.H. et M.W. FOWLER. (1986). The aeration of *Catharanthus roseus* L.G. Don suspension cultures airlift bioreactors : the inhibition effect at high rates on culture growth. *J. Exp. Bot.*, **37**: 1911-1920.

61. HINES, W.W. et D.C. MONTGOMERY. (1980). *Probability and Statistics in Ingineering and Management Science*. 2ième édition, Toronto,Wiley.

62. HIRASUNA, T.J., SHULER, M.L., LACKNEY, V.K. et R.M. SPANSWICK. (1991). Enhanced anthocyanin production in grape cell cultures. *Plant Science*, **78**: 107-120.

63. HIROSE, M., YAMAKAWA, T., KOMADA, T. et A. KOMAMINE. (1990). Accumulation of betacyanin in *Phytolacca americana* cells and of anthocyanin in *Vitis* sp. cells in relation to cell division in suspension cultures. *Plant Cell Physiol.*, **31**: 267-271.

64. HO, C.-H., HENDERSEN, K.A. et G.L. RORRER. (1995). Cell damage and oxygen mass transfer during cultivation of *Nicotiana tabacum* in a stirred-tank bioreactor. *Biotechnol. Prog.*, **11** : 140-145.

65. HO, C. S. et J.F. SHANAHAN. (1987). Carbon dioxide transfer in bioreactor. *CRC Critical Reviews in Biotechnology*, **4** (2) : 185-251.

66. HOLTON, T.A. et E.C. CORNISH. (1995). Genetics and biochemistry of anthocyanin biosysnthesis. *Plant Cell*, **7** : 1071-1083.

67. HOOKER, B.S., LEE, J.M. et G. AN. (1989). Response of plant tissue culture to a high shear environment. *Enzyme. Microb. Technol.*, **11**: 484-489.

68. HOOKER, B.S., LEE, J.M. et G. AN. (1989). Cultivation of plant cells in a stirred vessel: Effect of Impeller Design. *Biotechnol. Bioeng.*, **35**: 296-304.

69. HULST, A.C. et J. TRAMPER. (1989). Immobilized plant cells: a literature survey. *Enzyme Microb. Technol.*, **11**: 546-558.

70. ILKER, R. (1987). In-vitro pigment production: an alternative to color synthesis. *Food Technol.*, **4**: 70-72.

71. JACKMAN, R.L., YADA, R.Y., TUNG, M.A. et R.A. SPEERS. (1987). Anthocyanins as food colorants - A review. J. *Food Biochem.*, **11**: 201-247.

72. JESSUP, W. et M.W. FOWLER. (1976). Interrelationships between carbohydrate metabolism and nitrogen assimilation in cultured plant cells. I. Effects of glutamate and nitrate as alternative nitrogen sources on cell growth. *Planta*, **132** : 119-123.

73. JOLICOEUR, M. (1990). Conception d'un bioréacteur pour la culture en suspension de cellules de plantes. Mémoire de maîtise, Département de génie chimique, École Polytechnique de Montréal.

74. JOLICOEUR, M., CHAVARIE, C., CARREAU, P. et J. ARCHAMBAULT. (1992). Development of a helical-ribbon-impeller bioreactor for high-density plant cell suspension culture. *Biotechnol. Bioeng.*, **39**: 511-521.

75. JONES, K. et J.A. SENFT. (1985). An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate-propidium iodine. *J. Histochem. Cytochem.*, **33**: 77-79.

76. KAMEN, A.A., CHAVARIE, C., ANDRÉ, G. et J. ARCHAMBAULT. (1992). Design parameters and performance of a surface baffled helical ribbon impeller bioreactor for the culture of shear sensitive cells. *Chem. Eng. Science*, **47** : 2375-2380.

77. KAMEN, A.A., TOM, R.L., CARON A.W., CHAVARIE, C., MASSIE, B. et J. ARCHAMBAULT. (1991). Culture of insect cells in a helical ribbon impeller bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.*, **38** : 619-628.

78. KARGI, F., GANAPATHI, B. et K. MARICIC. (1990). Indole alkaloid formation by *Catharanthus roseus* cells in a biofilm reactor. *Biotechnol. Prog.*, **6** : 243-248.

79. KESSEL, R.H.J. et A.H. CARR. (1972). The effect of dissolved oxygen concentration on growth and differenciation of carrot (*Daucus carota*) tissue. J. EXP. BOT., **23** : 996-1007.

80. KESSEL, R.H.J., GOODWIN, C., PHILP, J. et M.W. FOWLER. (1977). Teh relationship between dissolved oxygen concentration, ATP and embryogenesis in carrot (*Daucus carota*) tissue cultures. *Plant Sci. Lett.*, **10** : 265-274.

81. KIM, D.-I., PEDERSEN, H. et C.-K. CHIN. (1991). Cultivation of *Thalictrum rugosum* cell suspension in an improved airlift bioreactor : stimulatory effect of carbon dioxide and ethylene on alkaloid production. *Biotechnol. Bioeng.*, **38** : 331-339.

82. KOBAYASHI, Y., FUKUI, H. et M. TABATA. (1989). Effect of oxygen supply on berberine production in cell suspension cultures and immobilized cells of *Thalictrum minus*. *Plant Cell Report*, **8** : 255-258.

83. KOBAYASHI, Y., FUKUI, H. et M. TABATA. (1991). Effect of carbon dioxide and ethylene on berberine production and cell browning in *Thalictrum minus* cell cultures. *Plant Cell Report*, **9** : 496-499.

84. KNOBLOCH, K.H., BEUTNAGEL, G. et J. BERLIN. (1981). Influence of accumulated phosphate on culture growth and formation of cinnamoyl putrescines in medium-induced cell suspension cultures of *Nicotiana tabacum*. *Planta*, **153** : 582-585.

85. KNOBLOCH, K.H. et J. BERLIN. (1983). Influence of phosphate on the formation of the indole alkaloids and phenolic compounds in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. I. Comparison of enzymne activities and product accumulation. *Plant Cell Tissue Org Cult.*, **2** : 333-337.

86. KRÄMER, R. et G. SPRENGER. (1993) Metabolism, dans : *Biotechnology*, H.-J. Rehm et G. Reed, Vol 1, Biological Fundamentals, H. Sahm, 2ième édition, New-York, VCH, 47-110.

87. LANG, J.A., YOON, K.-H. et J.E. PRENOSIL. (1990). Effect of permeate flux rate on alkaloid production in a novel plant cell membrane reactor using *Coffea arabica* cells. *Biotechnol. Prog.*, **6** : 447-451.

88. LEATHERS, R.R., SMITH, M.A.L. et J. AITKEN-CHRISTIE. (1995). Automation of the bioreactor process for mass propagation and secondary metabolism. Dans : Automation and Environmental Control of Plant Tissue Culture, J. Aitken-Christie, T. Kozai, M.A.L. Smith, Amsterdam, Kluwer Academic Publishers, 187-214.

89. LEBRETON, J.D. et C. MILLIER. (1982). Modèles dynamiques déterministes définis par des équations différentielles. Dans : *Modèles dynamiques déterministes en biologie*. J.D. Lebreton et C. Millier, Paris, Masson, 13-57.

90. LECKIE, F., SCRAGG, A.H. et K.C. CLIFFE. (1991). An investigation into the role of initial $k_L a$ on the growth and alkaloid accumulation by cultures of *Catharanthus roseus*. *Biotechnol. Bioeng.*, **37** : 364-370.

91. LEE, C.W.T. M.L. SHULER. (1991). Different shake flask closures alter gas phase composition and ajmalicine production in *Catharanthus roseus* cell suspensions. *Biotechnol. Tech.*, **5** : 173-178.

92. LEE, J.M. (1992). *Biochemical Engineering*. Englewood Cliffs, NJ, Prentice Hall.

93. LEGAULT, GRYSOLE ET ASSOCIES INC. (1987). *Survol du marché de produits sélectionnés en vue de la production d'extraits végétaux. Étude de marché*. Centre Québécois de Valorisation de la Biomasse. Gouvernement du Québec.

94. LEHNINGER, A.L. (1985) *Principes de biochimie*. Traduction de P. Kamoun, Paris, Flammarion.

95. LINDSEY, K. et M.M. YEOMAN. (1983).. The relationship between growth rate, differentiation and alkaloid accumulation in cell cultures. *J. Exp. Bot.*, **34** : 1055-1065.

96. LOFTY, S., FLEURIET, A., RAMOS, T. et J.-J. MACHEIX. (1989). Biosynthesis of phenolic compounds in *Vitis vinifera* cell suspension cultures : Study on hydroxycinnamoyl CoA:ligase. *Plant Cell Report*, **8** : 93-96.

97. MACCARTHY, J.J., RATCLIFFE, D. et H.E. STREET. (1980). The effect of nutrient medium on the growth cycle of *Catharanthus roseus* G. Don cells grown in batch culture. *J. Exp. Bot.*, **31** : 1315-1324.

98. MANTELL, S.H., PEARSON, D.W., HAZELL, L.P. et H. SMITH. (1983). The effect of initial phosphate and sucrose levels on nicotine accumulation in batch suspension cultures of *Nicotiana tabacum* L. *Plant Cell Rep.*, **2** ; 73-77.

99. MARKAKIS, P. (1982). *Anthocyanins as Food Colors*. New-York, Academic Press.

100. MASSARANI, G.; PASSOS, M.L. et D.W. BARRETO. (1992). Production of Annatto concentrates in spouted beds. *Can. J. Chem. Eng.*, **70** : 954-959.

101. MAUREL, B. et A. PAREILLEUX. (1986). Carbon dioxide fixation and growth of heterotrophic cell suspensions of *Catharanthus roseus*. *J. Plant Physiol.*, **122** : 347-355.

102. MEIJER, J.J, TEN HOOPEN, H.J.G., LUYBEN, K.CH.A.M. et K.R. LIBBENGA. (1993). Effect of hydrodynamic stress on cultured plant cells: A literature survey. *Enzyme Microb. Technol.*, **15** : 234-238.

103. MILLER, C. (1982). Les courbes de réponses. Dans : *Modèles dynamiques déterministes en biologie*. J.D. Lebreton and C. Miller, Paris, Masson, 151-170.

104. MOORE, L. (1991). The natural vs. certified debate rages on. *Food Engineering*, August 1991, 69-72.

105. MOSER, A. (1988). *Bioprocess Technology. Kinetics and Reactors*. New-York, Springler-Verlag.

106. MURASHIGE, T. et F. SKOOG. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, **15**: 473-497.

107. NAGARAJAN, R.P., KESHAVARZ, E. et D.F. GERSON. (1989). Optimization of anthocyanin yield in a mutated carrot cell line (*Daucus carota*) and its implications in large scale production. *J. Ferm. Bioeng.*, **68**: 102-106.

108. NEWELL, J.A. et W.R. CURTIS. (1989). Optimization of secondary metabolite production in plant tissue culture combining nutrient limitation and fungal elicitation. *1989 AIChE Annual Meeting*, San Francisco, CA.

109. NICOLAS, Y., CORMIER, F. et C.B. DO (1994). Anthocyanin production in selected cell lines of grape (*Vitis vinifera* L.). *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, **30** : 171-174.

110. OOMS, G. Genetic engineering of plants and cultures. Dans : *Plant Biotechnology. Comprehensive biotechnology*, second supplement. M.W Fowler et G.S. Warren, New-York, Pergamon Press, 223-257.

111. PANDA, A.K., MISHRA, S. et V.S. BISARA. (1992). Alkaloid production by plant cell suspension cultures of *Holarrhena antidysenterica* : I. Effect of Major Nutrients. *Biotechnol. Bioeng.*, **39** : 1043-1051.

112. PAREILLEUX, A. et R. VINAS. (1983). Influence in the aeration rate on the growth yield in suspension cultures of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *J. Ferment. Technol.*, **61** : 429-433.

113. PAYNE, G.F., BRINGI, V., PRINCE, C. et M.L. SHULER. (1991). Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems. New-York, Hanser Publishers.

114. PAYNE, G.F., DAVISON, S.W. et J.L. TATE. (1990). Experimental constraints to studying the effects of dissolved oxygen and dissolved carbon dioxide on plant cell growth. *Dev. Ind. Microbiol.*, **31** : 293-301.

115. PÉPIN, M.-F., CHAVARIE, C. et J. ARCHAMBAULT. (1991). Growth and immobilization of *Trypterygium wilfordii* cultured cells. *Biotechnol. Bioeng.*, **38** : 1285-1291.

116. PÉPIN, M.-F., CHAVARIE, C., ARCHAMBAULT, J., CORMIER, F., CHAOUKI, F., DO, C.B. et C. MORESOLI. (1992). *Développement d'un procédé pour la production d'anthocyanes à partir de cellules de raisins culticées en bioréacteur. Rapport final.* CDT-P1500 (Diffusion restreinte). Centre de développement technologique. École Polytechnique de Montréal.

117. PÉPIN, M.-F., CORMIER, F., CHAVARIE, C. et J. ARCHAMBAULT. (1990). Production of anthocyanin by *Vitis vinifera* cell cultures. *VII International Congress on Plant Tissue and Cell Culture*, Amsterdam, June 1990.

118. PERRY, R.H., GREEN, D.W. et J.O. MALONEY. (1984). *Chemical Engineer's Handbook*. 6ième édition. Montréal, McGraw-Hill.

119. PETERSEN, M. et A.W. ALFERMANN. (1993). Plant cell cultures, dans : *Biotechnology*, H.-J. Rehm et G. Reed, ed. Vol 1, Biological Fundamentals, 2ième édition, H. Sahm, New-York, VCH, 577-614.

120. PIERIK, R.L.M. (1987). *In Vitro Culture of Higher Plants*. Dordrecht, Pays-Bas, Martinus Nijhoff Poblishers.

121. PINET, R. (1990). *Conception d'un système de contrôle d'oxygène dissous pour bioreacteurs*. Projet de fin d'études, Département de génie chimique, École Polytechnique de Montréal.

122. PRIOR, J.J.; CHRISTIE, P.D.; MURRAY, R.J.; ORME-JOHNSON, W.H. et C.L. COONEY. (1995). Continuous monitoring of nitrogenase activity in *Azotobacter vinelandii* fermentation using off-gas mass spectroscopy. *Biotechnol. Bioeng.*, **47** : 373-383.

123. RAWN, J.D. (1990). *Traité de biochimie*. C. François, trad., Montréal, Éditions du renouveau pédagogique.

124. REDENBAUGH, M.K. (1992). *Synseeds : Applications of Synthetic Seeds to Crop Improvement*. New-York, CRC Press.

125. RENNER, U. et E. BECK. (1988). Nitrate reductase activity of photoautotrophic suspension culture cells of *Chenopodium rubrum* is under the hierarchical regime of NO_3^-, NH_4^+ and light. *Plant Cell Physiol.*, **29** : 1123-1131.

126. RHO, D. et G. ANDRÉ. (1991). Growth and stoichiometry of a *Catharanthus roseus* cell suspension culture grown under nitrogen-limiting conditions. *Biotechnol. Bioeng.*, **38** : 579-587.

127. RHO, D., BÉDARD, C. et J. ARCHAMBAULT. (1990). Physiological aspects of surface-immobilized *Catharanthus roseus* cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **33** : 59-65.

128. RICARD, M., STEPHAN, M., LOUBET, E., BOBILLOT, J.-P., MARIE, D. et A. SAINT-DIZIER. (1970). *Atlas de biologie*. Paris, Stock.

129. RIDEAU, M. (1987). Optimisation de la production de métabolites par des cellules végétales *in vitro*. *Ann. Pharm. francaises*, **45** : 133-144.

130. ROBINS, R.J., PARR, A.J., RICHARDS, S.R. et M.J.C. RHODES. (1986). Studies of environmental features of immobilised plant cells, dans : *Secondary Metabolism in Plant Cell Cultures*. P. Morris, A.H. Scragg, A. Stafford, M.W. Fowler, Londres, Cambridge University Press.

131. ROKEM, J.S. et I. GOLDBERG. (1985). Secondary metabolites from plant cell suspension cultures: Methods for yield improvement. *Adv. Biotechnological Processes*, **4** : 241-274.

132. ROSE, D. et S.M. MARTIN. (1975). Effect of ammonium on growth of plant cells ((*pomoea* sp.) in suspension cultures. Can. J. Bot. **53** : 1942-1949.

133. ROYCE, P.N. (1992). Effect of changes in the pH and carbon dioxide evolution rate on the measured respiratory quotient of fermentations. *Biotechnol. Bioeng.*, **40** : 1129-1138.

134. ROYCE, P.N. et N.F. THORNHILL. (1991). Estimation of dissolved carbon dioxide concentrations in aerobic fermentations. *AIChE J.*, **37** : 1680-1686.

135. SAKANO, K. (1990). Proton/Phosphate stoichiometry in uptake off inorganic phosphate by cultured cells of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Plant Physiol.*, **93** : 479-483.

136. SCHIEL, D., JARCHOW-REDECKER, K., PIEHL, G.-W., LEHMANN, J. ET J. BERLIN. (1986). Increased formation of cynnamoyl putrescines by fedbatch fermentation of cell suspension cultures of *nicotiana tabacum. Plant Cell Rep.*, **3** : 18-20.

137. SCHLATMANN, J.E., FONK, H.J.G., TEN HOOPEN, H.J.G. et J.J. HEIJNEN. (1994). The negligeable role of carbon dioxide and ethylene in ajmalicine production by *Catharanthus roseus* cell suspensions. *Plant Cell Reports*, **14** : 157-160.

138. SCHLATMANN, J.E., NUUTILA, A.M., VAN GULIK, W.M., TEN HOOPEN, H.J.G., VERPOORTE, R. et J.J. HEIJNEN. (1993). Scale up of ajmalicine production by plant cell cultures of *Catharanthus roseus*. *Biotechnol. Bioeng.*, **41** : 253-262.

139. SCHMAUDER, H.-P. et P. DOEBEL. (1990). Plant cell cultivation as a biotechnological method. *Acta Biotechnol.*, **10** : 501-516.

140. SCHULTZ, J.S. (1964). Cotton closure as an aeration barrier in shaken flask fermentations. *Appl. Microbiol.*, **12** : 305-310.

141. SCRAGG, A.H. (1990). Fermentation system for plant cell, dans : *Secondary Products from Plant Cell Culture*, B.V. Charlwood et M.J.C. Rhodes, Oxford, Clarendon Press, 243-253.

142. SCRAGG, A.H. (1992). Bioractor for the mass cultivation of plant cells, dans : *Plant Biotechnology, Comprehensive Biotechnology* Second Supplement, Murry Moo-Young, New-York, Pergamon Press, 45-62.

143. SCRAGG, A.H., ALLAN, E.J. et F. LECKIE. (1987). Effect of shear on the viability of plant cell suspensions. *Enzyme Microb. Technol.*, **10** : 361-367.

144. SHIBASAKI, N., HIROSE, K., YONEMOTO, T. et T. TADAKI. (1992). Suspension culture of *Nicotiana tabacum* cells in a rotary-drum bioreactor. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, **53** : 359-363.

145. SHULER, M.L. et F. KARGI. (1992). *Bioprocess Engineering. Basic Concepts.* Englewood Cliffs, N.J., Prentice Hall.

146. SKIRVIN, R.M., CHU, M.C., MANN, M.L., YOUNG, H., SULLIVAN, J. et T. FERMANIAN. (1986). Stability of tissue culture medium pH as a function of autoclaving, time, and cultured plant material. *Plant Cell Rep.*, **5** : 292-294.

147. SMITH, F.A. et J.A. RAVEN. (1976). H^+ transport and regulation of cell pH. Dans : *Transport in plants II, part A: Cells.* U. Lüttge et M.G. Pitman, New-York, Springer-Verlag, 317-346.

148. SMITH, J.M., DAVISON, S.W. et G.F. PAYNE. (1990). Development of a strategy to control the dissolved concentrations of oxygen and carbon dioxide at constant shear in a plant cell bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.*, **35** : 1088-1101.

149. SMITH, M.A.L., REID, J.F., HANSSEN, A.C., LI, Z. et D.L. MADHAVI. (1995). Non-destructive machine vision analysis of pigment-producing cell cultures. *J. of Biotechnology*, **40** : 1-11.

150. SNAPE, J. B., THOMAS, N.H. et J.A. CALLOW. (1989). How suspension cultures of *Catharanthus roseus* respond to oxygen limitation: small-scale tests with applications to large-scale cultures. *Biotechnol. Bioeng.*, **34** : 1058-1062.

151. SONGSTAD, D.D., GILES, K.L., PARK, J., NOVAKOWSKI, D., EPP, D., FRIESEN, L. et I. ROEWER. (1989). Effect of ethylene production on sanguinarine production from *Papaver somniferum* cell cultures. *Plant Cell Rep.*, **8** : 463-466.

152. SPEAR, K. (1986). Developments in food colouring: the natural alternatives. *TIBTech.*, **6** : 283-288.

153. SRINIVASAN, V. et D.D.Y. RYU. (1993). Improvement of shikonin productivity in *Lithospernum erythrorhizon* cell culture by alternating carbon and nitrogen feeding strategy. *Biotechnol. Bioeng.*, **42** : 793-799.

154. STEPAN-SARKISSIAN, G. et M.W. FOWLER. (1986). Carbohydrate source, biomass productivity and natural product yield in cell suspension cultures, dans : *Carbohydrate Metabolism in Cultured Cells*, Morgan, I. et J. Michael, New-York, Plenum Press, 151-181.

155 STEPHANOPOULOS, G. (1984). *Chemical Process Control : An Introduction to Theory and Practice.* Englewood Cliffs, N.J., Prentice Hall.

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

157. TATE, J. L. et G.F. PAYNE. (1991). Plant cell growth under different levels of oxygen and carbon dioxide. *Plant Cell Rep.*, **10** : 22-25.

158. TATICEK, R., MOO-YOUNG, M. et R.L. LEGGE. (1990). Effect of bioreactor configuration on substrate uptake by cell suspension cultures of the plant *Eschscholtzia californica. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **33** : 280-286.

159. TSAI, S.P. et Y.H. LEE. (1990). A model for ennergy-sufficient culture growth. *Biotechnol. Bioeng.*, **35** : 138-145.

160. TREAT, W.J., ENGLER, C.R. E.J. SOLTES. (1989). Culture of photomixotrophic soybean and pine in a modified fermentor using a novel impeller. *Biotechnol. Bioeng.*, **34** : 1191-1202.

161. TRIBE, L.A., BRIENS, C.L. et A. MARGARITIS. (1995). Determination of the volumetric mass transfer coefficient ($k_L a$) using the dynamic 'gas out-gas in' method : analysis of errors caused by dissolved oxygen probes. *Biotechnol. Bioeng.*, **46** : 388-392.

162. ULBRICH, B., WIESNER, W. et H. ARENS. (1985). Large scale production of rosemaric acid from plant cell cultures of *Coleus Blumei*, dans : *Primary and secondary metabolism in plant cell cultures*. Neumann, K.-H., Barz, W et E. Reinhard, New-York, Springler-Verlag, 293-303.

163. UOZUMI, N., KOHKETSU, K., KONDO, O., HONDA, H. et T. KOBAYASHI. (1991). Fed-batch culture of hairy root using fructose as a carbon source. *J. Ferm. Bioeng.*, **72** : 457-460.

164. VAN GULIK, W.M., MEIJER, J.J., TEN HOOPEN, H.J.G., LUYBEN, K.CH.A.M. et K.R. LIBBENGA. (1989). Growth of a *Catharanthus roseus* cell suspension culture in a modified chemostat under glucose-limiting conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **30** : 270-275.

165. VAN GULIK, W.M., TEN HOOPEN, H.J.G. et J.J. HEIJNEN. (1992). Kinetics and stoichiometry of growth of plant cell cultures of *Catharanthus roseus* and *Nicotiana tabacum* in batch and continous fermentors. *Biotechnol. Bioeng.*, **40** : 863-874.

166. VAN GULIK, W.M., TEN HOOPEN, H.J.G. et J.J. HEIJNEN. (1993). A structured model describing carbon and phosphate limited growth of *Catharanthus roseus* plant cell suspensions in batch and chemostat culture. *Biotechnol. Bioeng.*, **41** : 771-780.

167. VAN'T RIET, K. et J. TRAMPER. (1991). *Basic Reactor Design.* New-York, Marcel Deccker Inc.

168. WALLIN, B.K. et B.J. SMITH. (1977). Grape anthocyanins as foor colouring : sources compared, *IFFA*, May-June 1977

169. WARREN, G.S. (1992). The cell biology of plant cell culture systems, dans : *Plant Biotechnology. Comprehensive biotechnology*, second supplement. M.W Fowler et G.S. Warren, New-York, Pergamon Press, 1-17.

170. WARREN, G.S. (1992). Cell culture and recombinant DNA technology in plant pathology, dans : *Plant Biotechnology. Comprehensive biotechnology*, second supplement. M.W Fowler et G.S. Warren, New-York, Pergamon Press, 283-292.

171. WEAST, R.C. (1987). *Handbook of Chemistry and Physics*. 68ième édition, Boca Raton, CRC Press Inc.

172. WEATHERBURN, M.W., (1967). Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *J. Anal. Chem.*, **39** : 971-974.

173. WENZEL, G. (1992). Application of unconventional techniques in classical plant production, dans : *Plant Biotechnology. Comprehensive biotechnology*, second supplement. M.W Fowler et G.S. Warren, New-York, Pergamon Press, 259-281.

174. WILLIAMS, P.D. et F. MAVITUNA. (1992). Immobilized plant cells. Dans : Plant Biotechnology. Comprehensive biotechnology, second supplement. M.W Fowler et G.S. Warren, New-York, Pergamon Press, 63-78.

175. WOCHOK, Z.S. (1992). The commercial pathway for agricultural biotechnology, dans : *Plant Biotechnology and Development*. P.N. Gresshoff, Ann Arbor, CRC Press, 147-154.

176. YAMAKAWA, T., KATO, S., ISHIDA, K., KODAMA, T. et Y. MINODA. (1983). Production of anthocyanins by *Vitis* cells in suspension cultures. *Agric. Biol. Chem.*, **47** : 2185-2191.

177. YAMAMOTO, Y., KINOSHITA, Y., WATANABE, S. et Y. YAMADA. (1989). Anthocyanin production in suspension cultures of high-producing cells of *Euphorbia millii*. *Agric. Biol. Chem.*, **53** : 417-423.

178. YANG, S.F. Biosynthesis and action of ethylene. *Hort Science*, **20** : 41-45.

179. YOKOI, H., KOGA, J., YAMAMURA, K., SEIKE, Y. et H. TANAKA. (1993). High density cultivation of plant cells in a new aeration-agitation type fermentor, Maxblend Fermentor®. *J. Ferment. Bioeng.*, **75** : 48-52.

180. ZHONG, J.-J., YOSHIDA, M., FUJIKAMA, K., SEKI, T. et T. YOSHIDA. (1993). Enhancement of anthocyanin production by *Perilla frutescens* cells in a stirred bioreactor with internal light irradiation. *J. Ferment. Bioeng.*, **75** : 299-303.

181. ZHONG, J.-J., FUJIKAMA, K., SEKI, T. et T. YOSHIDA. (1994). A quantitative analysis of shear effects on cell suspension and cell sulture of *Perilla frutescens* in bioreactors. *Biotechnol. Bioeng.*, **44** : 649-654.

ANNEXES

A1. PROCÉDURES EXPÉRIMENTALES

PES-P001 Solutions (I, Mo, Cu, Co) micronutriments B5 223

PES-P002 Solutions micronutriments B5 224

PES-P003 Solutions macronutriments B5 225

PES-P005 Solutions concentrées vitamines B5 226

PES-P010 Solutions concentrées de kinétine 227

PES-P011 Solutions concentrées d'α-naphthaleneacétique (NAA) 228

PES-P013 Suivi de la croissance : pH, PCV, masse humide, masse sèche, viabilité, pigmentation, anthocyanes 229

PES-P014 Vabilité des cellules de plantes : coloration au diacétate de fluorescine 234

PES-P015 Comptes cellulaires 235

PES-P016 Analyses de NH_4 par colorimétrie 236

PES-P017 Analyses de PO_4 par colorimétrie 239

Biopro

PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL STANDARD:P001-v2 **SOLUTION (I, Mo, Cu, Co)** **MICRONUTRIMENTS-B5**	LOT: DATE: PRÉPARÉ PAR:
RÉFÉRENCE: Wetter L.R., Constabel F., Plant tissue culture méthods, ed. National Research Concil of Canada	
RÉDIGÉ PAR: Céline Allard	date: 6 novembre 1992
VÉRIFIÉ PAR: Marie-France Pépin	version-2: 8 février 1993

©BIOPRO 1992

CAPACITÉ : 1 L
CONCENTRATION : 1000 * (1mL L^{-1})

PRÉPARATION DE LA SOLUTION (I,Mo,Cu,Co) B5 :

1. Peser exactement les composés du tableau selon les proportions indiquées.
2. Dans un ballon jaugé 1-L, mélanger dans l'ordre chacun des composés du tableau dans de l'eau déionisée.
3. Augmenter le volume de la solution à 1 L.
4. Entreposer dans une bouteille.
5. Etiqueter les contenants. Inscrire le nom de la solution, le numéro du lot, la date de fabrication, la concentration et vos initiales.

TABLEAU #P001-v2 : SOLUTION (I,Mo,Cu,Co) B5 (1000 *) dans 1 L

Composés	no catalogue ; no lot	pesées exactes (g)	pesées visées (g)
KI			7.500
$Na_2MoO_4.2H_2O$			2.500
$CuSO_4.5H_2O$			0.250
$CoCl_2.6H_2O$			0.250

Biopro

©BIOPRO 1992

PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL STANDARD:P002-v2	LOT:
MICRONUTRIMENTS-B5	DATE:
	PRÉPARÉ PAR:
RÉFÉRENCE: Wetter L.R., Constabel F., Plant tissue culture méthods, ed. National Research Concil of Canada	
RÉDIGÉ PAR: Céline Allard	date: 6 novembre 1992
VÉRIFIÉ PAR: Marie-France Pépin	version-2: 8 février 1993

CAPACITÉ : 1 L
CONCENTRATION : 100 * (10 mL L^{-1})

PRÉPARATION DE LA SOLUTION MICRONUTRIMENTS B5 :

1. Peser exactement les composés du tableau selon les proportions indiquées.
2. Dans un ballon jaugé 1 L , mélanger dans l'ordre chacun des composés du tableau dans de l'eau déionisée.
3. Augmenter le volume de la solution à 1 L.
4. Entreposer dans une bouteille.
5. Etiqueter les contenants. Inscrire le nom de la solution, le numéro du lot, la date de fabrication, la concentration et vos initiales.

TABLEAU #P002-v2 : **SOLUTION MÈRE MICRONUTRIMENTS B5 (100 *) dans 1 L**

Composés	no catalogue ; no lot	pesées exactes (g)	pesées visées (g)
Solution (I,Mo,Cu,CO) B5			10 mL
H_3BO_3			0,300 g
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$			0,200 g
$MnSO_4 \cdot H_2O$			1,000 g
EDTA disodium salt$\cdot 2H_2O$			3,725 g
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$			2,780 g

Biopro

©BIOPRO 1992

PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL STANDARD:P003-v2 **MACRONUTRIMENTS-B5**	LOT: DATE: PRÉPARÉ PAR:
RÉFÉRENCE: Wetter L.R., Constabel F., Plant tissue culture méthods, ed. National Research Concil of Canada	
RÉDIGÉ PAR: Céline Allard VÉRIFIÉ PAR: Marie-France Pépin	date: 6 novembre version-2: 8 février

CAPACITÉ : 1 L
CONCENTRATION : 20 * (50 mL L^{-1})

PRÉPARATION DE LA SOLUTION MACRONUTRIMENTS B5 :

1. Peser exactement les composés du tableau selon les proportions indiquées.
2. Dans un ballon jaugé 1-L, mélanger dans l'ordre chacun des composés du tableau dans de l'eau déionisée.
3. Augmenter le volume de la solution à 1 L.
4. Entreposer dans une bouteille.
5. Etiqueter les contenants. Inscrire le nom de la solution, le numéro du lot, la date de fabrication, la concentration et vos initiales.

TABLEAU #P003-v2 : SOLUTION MÈRE MACRONUTRIMENTS B5 (20 *) dans 1 L

Composés	no catalogue ; no lot	pesées exactes (g)	pesées visées (g)
KNO_3			50,00 g
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$			3,00 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$			5,00 g
$(NH_4)_2SO_4$			2,68 g
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$			3,00 g

Biopro

©BIOPRO 1992

PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL STANDARD:P005-v2	LOT:
VITAMINES-B5	DATE:
	PRÉPARÉ PAR:
RÉFÉRENCE: Wetter L.R., Constabel F., Plant tissue culture méthods, ed. National Research Concil of Canada	
RÉDIGÉ PAR: Céline Allard	date: 6 novembre 1992
VÉRIFIÉ PAR: Marie-France Pépin	version-2: 8 février 1993

CAPACITÉ : 1 L
CONCENTRATION : 100 * (10 mL L^{-1})

PRÉPARATION DE LA SOLUTION DE VITAMINES POUR B5 :

1. Peser exactement les composés du tableau selon les proportions indiquées.
2. Dans un ballon jaugé 1 L , mélanger dans l'ordre chacun des composés du tableau dans de l'eau déionisée.
3. Augmenter le volume de la solution à 1 L.
4. Entreposer dans une bouteille.
5. Etiqueter les contenants. Inscrire le nom de la solution, le numéro du lot, la date de fabrication, la concentration et vos initiales.

TABLEAU #P005-v2 : **SOLUTION MÈRE DE VITAMINES POUR B5 (100 *) dans 1 L**

Composés	no catalogue ; no lot	pesées exactes (g)	pesées visées (g)
Mio-inositol			10,0 g
Acide nicotinique			0,1 g
Pyridoxine•HCl			0,1 g
Thyamine•HCl			1,0 g

Biopro

©BIOPRO 1992

PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL STANDARD:P010-v2 **KINETINE**	LOT:
	DATE :
	PRÉPARÉ PAR:
RÉFÉRENCE: Wetter L.R., Constabel F., Plant tissue culture méthods, ed. National Research Concil of Canada	
RÉDIGÉ PAR: Céline Allard	date: 6 novembre 1992
VÉRIFIÉ PAR: Marie-France Pépin	version-2: 8 février 1993

CAPACITÉ : 100 mL
CONCENTRATION : 250 µg mL^{-1}

PRÉPARATION DE LA SOLUTION:

1. Préchauffer à environ 40 °C environ 100 mL d'eau osmosée.
2. Peser un contenant d'un capacité de 100mL, dans lequel sera entreposée la solution, avec un barreau magnétique.
3. Peser exactement 0.02500 mg de kinétine sur un balance analytique.
4. Dans un bécher de 25 mL, dissoudre dans un volume d'environ 2 à 4 mL d'un solution de 0.5 N HCl en chauffant légèrement si nécessaire.
5. Diluer graduellement avec l'eau. Tranvaser dans le contenant de 100 mL. Continuer à diluer en mélangeant constamment. Augmenter le volume de la solution jusqu'à obtenir 100 g de solution.
6. Retirer le barreau magnétique. Inscrire le nom de la solution, le numéro du lot, la date de fabrication, la concentration et vos initiales. Entreposer au réfrigérateur.

TABLEAU #P010-v2 : **SOLUTION KINETINE 250 µg mL^{-1}**

Composés	no catalogue ; no lot	pesées exactes (g)	pesées visées (g)
Kinétine			0,025 g
Eau déionisée			100 g

Biopro

©BIOPRO 1992

PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL STANDARD:P011-v2 ACIDE α-NAPHTHALENEACETIQUE	LOT: DATE : PRÉPARÉ PAR:
RÉFÉRENCE: Wetter L.R., Constabel F., Plant tissue culture méthods, ed. National Research Concil of Canada	
RÉDIGÉ PAR: Marie-France Pépin	date: 19 novembre 1992
VÉRIFIÉ PAR: Marie-France Pépin	version-2: 8 février 1993

CAPACITÉ : 100 mL
CONCENTRATION : 250 µg mL^{-1}

PRÉPARATION DE LA SOLUTION:

1. Préchauffer à environ 40 °C environ 100 mL d'eau osmosée.
2. Peser un contenant d'un capacité de 100mL, dans lequel sera entreposée la solution, avec un barreau magnétique.
3. Peser exactement 0.02500 mg d'acide α-Naphthaleneacetique sur un balance analytique.
4. Dans un bécher de 25 mL, dissoudre dans un volume d'environ 2 à 4 mL d'éthanol en chauffant légèrement si nécessaire.
5. Diluer graduellement avec l'eau. Tranvaser dans le contenant de 100 mL. Continuer à diluer en mélangeant constamment. Augmenter le volume de la solution jusqu'à obtenir 100 g de solution.
6. Retirer le barreau magnétique. Inscrire le nom de la solution, le numéro du lot, la date de fabrication, la concentration et vos initiales. Entreposer au réfrigérateur.

TABLEAU #P011-v2 : SOLUTION acide α-Naphthaleneacetique 250 µg mL^{-1}

Composés	no catalogue ; no lot	pesées exactes (g)	pesées visées (g)
NAA			0,025 g
Eau déionisée			100 g

Biopro

©BIOPRO 1992

PROCÉDURE EXPÉRIMENTALE STANDARDISÉE:

PES-P013.v1

TITRE: **SUIVI DE LA CROISSANCE: pH, PCV, MASSE HUMIDE, MASSE SÈCHE, VIABILITÉ, PIGMENTATION, ANTHOCYANES**

Suivi des cultures de *Vitis vinifera*

RÉDIGÉ PAR: Marie-France Pépin DATE: 19 novembre 1992

VÉRIFIÉ PAR: Marie-France Pépin version-1 : 19 novembre 1992

Les données à recueillir au cours du traitement des échantillons des cultures de cellules de *Vitis vinifera* doivent être compilées sur le formulaire de prise de données FPD P002 dont un exemple est annexé.

1. **Stériliser:**
   - des pipettes de 10 mL pour les échantillonnages des cultures en flacons agités
   - un flacon d'échatillonnage pour les cultures en bioréacteur lorsque celà est nécessaire

2. **Identifier:**
   - deux bouteilles d'échantillonnage d'une capacité d'environ 25 mL (destinées à entreposer un échantillon du milieu de culture et à effectuer l'extraction des anthocyanes);
   - un tube Eppendorf (destiné à entreposer un échantillon filtré pour la mesure des hydrates de carbone par HPLC);
   - une coupelle d'aluminium (destinée à la mesure de masse humide et de masse sèche).

3. **Calibrer** la sonde de pH.

4. **Peser** un tube à centrifugation jaugé d'une capacité de 15mL pour les cultures en flacons agités et de 50mL pour les cultures en bioréacteurs.
   Peser un tube à essai.
   Peser la coupelle d'aluminium sur une balance analytique.

5. **Pipetter** 10 mL d'une solution EtOH-1%HCl (85:15) dans une des deux bouteilles d'échantillonnage.

6. **Préparer** un filtre 0,45 µm dans un portoir Sweenex 2,5 cm.

7. **Prélever** stérilement un échantillon de culture d'environ 15mL pour les cultures en flacons agités directement dans le tube à centrifugation; d'environ 25 mL pour les

dans le flacon d'échantillonnage; d'environ 50 mL pour le réacteur de 5L dans un bécher propre.
Bien agiter. Avec un embout de pipette automatique tronqué, **aliquoter** environ 1 mL dans une éprouvette propre pour la détermination de la viabilité et de la pigmentation et environ 1 mL dans le tube à essai pour le compte cellulaire.
Transférer les échantillons des bioréacteurs dans les tubes à essais de 25 mL.

8. Mesurer le **pH** du milieu. Bien s'assurer que le pHmètre est remis en position "Stand by" après la prise de mesure.

9. **Peser** le tube à centrifuger et le tube à essai.

10. **Ajouter** 2 mL d'un solution d'oxyde de chrome (10% (m/v)) dans le tube à essai. **Incuber** dans une étuve à 60 °C 30 minutes.

11. **Centrifuger** le tube 3 minutes à 800g.

12. **Déterminer** le pourcentage de cellules pigmentées sous observation microscopique. Utiliser l'inversion de phase (1) et ouvrir le rhéostat au maximum.

    Déterminer le pourcentage de cellules viables (PES P0014).

13. Déterminer le **volume total du culot** et celui des **débris** cellulaire déposés à la surface du culot s'il y a lieu, après centrifugation, 3 min., 800g.

14. Dans un éprouvette propre, **filtrer** le surnageant sur une pellicule de Miracloth™. Retirer l'éprouvette de l'Erlenmeyer à filtration et réserver le filtrat. Rincer l'échantillon abondamment avec de l'eau déionisée. Recueillir les cellules dans les coupoles d'aluminium pré-pesées.

    Recueillir le filtrat. Filtrer à 0,45 µm entre 0,5 et 1 mL du filtrat dans le tube Eppendorf. Entreposer le reste du filtrat dans une bouteille d'échantilonnage. Congeler le tube Eppendorf, réfrigérer la bouteille d'échantillonnage sans délai.

15. Peser précisément sur une balance analytique la masse humide des cellules recueillies (H1); peser la masse humide des cellules recueillies après 45 secondes pour évaluer le taux d'évaporation (H2); réserver environ 100 mg de biomasse pour l'extraction des anthocyanes et peser la masse humide des cellules restantes (H3) après 45 secondes.

16. Sécher les cellules à 100°C jusqu'à stabilisation du poids (24 heures).

17. Sortir le tube à essais contenant les cellules digérées. Compter les cellules selon la procédure PES P0015 ou mettre le tube à essai au réfrigérateur.

CALCULS

Les calculs sont effectués dans un chiffrier Quattro: CUVÉE.wq1 pour les cultures en cuvée. Le fichier de base doit être modifié pour pouvoir traiter les données issues de cultures en mode cuvée alimentée. Une liste du contenu des cellules est annexée.

Les fichiers contenant les données sont identifiés comme suit dans le répertoire qui correspond au protocole expérimental:

\Fnn\DONNEES.wq1 pour les cultures en flacons agités

\Hnn\DONNEES.wq1 pour les cultures en bioréacteurs (incluant les échantillons des flacons contrôles

A4: ^TEMPS	A5: ^heure	A6:	((@DATEVALUE(Y6)+@TIMEVALUE(Z6))-(@DATEVALUE(Y6)+ @TIMEVALUE(Z6)))*24
B4: ^TEMPS	B5: ^jour	B6:	($A6/24)
C4: ^PCV		C6:	(AI6/(AE6-AD6))
D4: ^PCVvia		D6:	((AI6-AJ6)/(AE6-AD6))
E4: ^WW	E5: ^g/L	E6:	((AL6-AK6)/(AE6-AD6))*1000
F4: ^alpha	F5: ^g/L	F6:	(E6/C6/1000)
G4: ^DW	G5: ^g/L	G6:	(AO6-AK6)*(AM6-AK6))/((AN6+(AL6-AM6)*AM6/AL6-AK6) *(AE6-AD6))*1000
H4: ^VIA	H5: ^%	H6:	(AP6)
I4: ^PIGMENT	I5: ^%	I6:	(AQ6)
J4: ^ACY	J5: ^mg/L	J6:	10*AW6*AV6*(AM6-AK6)/(98.2*(AM6-(AN6+(AL6-AM6)*AM6/AL6)) *0.001*(AE6-AD6))
K4: ^ACY	K5: ^mg/dw	K6:	(J6/G6)
L4: ^ACY	L5: ^mg/ww	L6:	(J6/E6)
M4: ^Cell/mL		M6:	(AT6+AU6)*((AG6-AF6)+AR6)/(2*0.00165*AS6*(AG6-AF6))
N4: ^erreur	N5: ^cell/mL	N6:	@ABS((AT6-AU6)*((AG6-AF6)+AR6)/(0.00165*AS6*(AG6-AF6)))
O4: ^VOL ECHAN	O5: ^mL	O6:	(AC6-AB6)
P4: ^pH		P6:	(AH6)
Q4: ^CHO	Q5: ^g/L	Q6:	+R6+S6+T6
R4: ^SUC	R5: ^g/L	R6:	+AX6*(1-$C6*$F6)
S4: ^GLC	S5: ^g/L	S6:	+AY6*(1-$C6*$F6)
T4: ^FRC	T5: ^g/L	T6:	+AZ6*(1-$C6*$F6)
U4: ^NH4	U5: ^mM	U6:	+BA6*(1-$C6*$F6)
V4: ^NO3	V5: ^mM	V6:	+BB6*(1-$C6*$F6)
W4: ^PO4	W5: ^mM	W6:	+BC6*(1-$C6*$F6)
X4: ^IDENT.		X6:	^C1.1
Y4: ^DATE		Y6:	@DATE(92,6,4)
Z4: ^HEURE		Z6:	@TIME(11,15,0)
AA4: ^VOL HRI			
AB4: ^AVANT	BA5: ^mM		
AC4: ^APRES	BB5: ^mM		

AD4: ^T.VIDE BC5: ^mM
AE4: ^T.PLEIN
AF4: ^E.VIDE
AG4: ^E.PLEINE
AH4: ^pH
AI4: ^CULOT_C
AJ4: ^DEBRIS
AK4: ^C.VIDE
AL4: ^HUM1
AM4: ^HUM2
AN4: ^HUM3
AO4: ^SEC
AP4: ^VIA
AQ4: ^PIG
AR4: ^CHROME
AS4: ^DIL_C
AT4: ^COMPTE1
AU4: ^COMPTE2
AV4: ^DIL_A
AW4: ^ABS
AX4: ^SUC
AY4: ^GLC
AZ4: ^FRC
BA4: ^NH4 BA5: ^mM
BB4: ^NO3 BB5: ^mM
BC4: ^PO4 BC5: ^mM

Biopro

FORMULAIRE DE PRISE DE DONNÉES: **FPD-P002.v1** Suivi de la croissance (Vitis vinifera)	Références: PES-P013.v1 PES-P014.v1 PES-P015.v1 PO-_____ Page /
RÉDIGÉ PAR: Marie-France Pépin VÉRIFIÉ PAR: Marie-France Pépin	DATE: 20 novembre 199 version-1 : 20 novembre 199

©BIOPRO 1992

IDENTIFICATION						
DATE						
HEURE						
MASSE FLACON, avant éch.						
, après éch.						
MASSE TUBE À CENTRIFUGER, vide						
. plein						
MASSE TUBE À ESSAI, avant						
. après						
pH						
VOLUME DU CULOT, centrifugé						
. débris						
MASSE COUPELLE, vide						
. humide 1						
. humide 2						
. humide 3						
. sèche						
VIABILITÉ						
PIGMENTATION						
Ajout d'oxyde de chrome						
DILUTION						
COMPTE CELLULAIRE, 1/2						
. 3/4						

Biopro

©BIOPRO 1992

PROCÉDURE EXPÉRIMENTALE STANDARDISÉE: PES-P014.v1

TITRE: **VIABILITÉ DES CELLULES DE PLANTES**
Coloration au diacétate de fluorescine

RÉFÉRENCE: Journal of Histochemistry and Cytochemistry, **33**: 77-79, 1985

RÉDIGÉ PAR: Marie-France Pépin DATE: 19 novembre 1992

VÉRIFIÉ PAR: version-1 : 19 novembre 1992

PRÉPARATION DE LA SOLUTION MÈRE:

Solution de diacétate de fluorescine

- **Dissoudre** 5 mg de diacétate de fluorescine par mL d'acétone
- **Étiquetter**: indiquer la date de préparation ainsi que la date d'expiration
- Conserver au réfrégirateur à l'abris de la lumière. Stabilité de la solution 6 mois.

DÉTERMINATION VISUELLE DE LA VIABILITÉ DES CELLULES:

- **Allumer** le bloc d'alimentation de la lampe à fluorescence.
- **Mélanger** 5 µL de la solution FDA à environ 1 mL d'un échantillon de suspension cellulaire.
- **Évaluer** les proportions de cllules viables et totales par observation mivroscopique. Les cellules mortes sont visibles sous un fond de lumière incandescente, le rhéostat au minimum.
- **Éteindre la lampe à fluorescence.**
- Remplir le **cahier d'utilisation** du microscope.

REMARQUES

- Les anthocyanes masquent la coloration de la fluorescine.
- Le coeur des amas celluaire est généralement mort.

Biopro

PROCÉDURE EXPÉRIMENTALE STANDARDISÉE: PES-P015.v1	
TITRE: COMPTES CELLULAIRES **Digestion à l'oxyde de chrome**	
RÉDIGÉ PAR: Marie-France Pépin	DATE: 19 novembre 1992
VÉRIFIÉ PAR: Marie-France Pépin	version-1 : 19 novembre 1992

©BIOPRO 1992

Précautions: Porter des gants et des lunettes de sécurité

PRÉPARATION DE LA SOLUTION MÈRE

Solution d'oxyde de chrome

- **Dissoudre** 10 g de CrO_3 pour 100 mL d'eau.
- **Étiquetter**, identifier clairement, indiquer la concentration, ajouter des **recommandations** minimales quant à la manipulation

DÉTERMINATION VISUELLE DU NOMBRE DE CELLULES

- **Mélanger** 2 mL de la solution d'acide chromique à environ 1 mL d'un échantillon de suspension cellulaire dans un tube à essai. Si la suspension est très concentrée, augmenter le volume de la solution ajouté (FPD-P002). **Prendre garde de bien fermer le tube.**
- **Incuber** dans une étuve à 60°C **30 minutes.**
- **Diluer** avec de l'eau déionisée pour pouvoir compter de 100 à 200 cellules par surface sur une cellule Foch-Rosentall. Noter la dilution (FDP-P002).
- **Évaluer** le nombre de cellules par unité de volume sur une cellule Fuch-Rosentall par observation microscopique en contraste de phase.
- **Éteindre la lampe du microscope.**

REMARQUES

Les couches de cellules sont difficiles à distinguer. De petits amas cellulaires facilitent la mesure. Avec le microscope Zeiss que nous utilisons le contraste de phase se trouve en position 1 et 2.

Biopro

©BIOPRO 1992

PROCÉDURE EXPÉRIMENTALE STANDARDISÉE : PES-P016.v1

TITRE: **ANALYSE DE NH_4+ PAR COLORIMÉTRIE**
culture de cellules de plantes - MS et B5

RÉFÉRENCE: Anal. Chem. 39: 971-974. 1967.

RÉDIGÉ PAR: Marie-France Pépin DATE: 23 novembre 1992

VÉRIFIÉ PAR: version-1 : 23 novembre 1992

PRÉCAUTIONS: **Porter des gants. Dans la mesure du possible effectuer les opérations impliquant le phénol sous une hotte chimique.**

Disposer des solutions dans les contenants à récupération prévus à cette fin.

PRÉPARATION DES RÉACTIFS:

#1 Peser 10 g de phénol
Peser 50 mg de sodium nitroferricyanide dihydrate
Dissoudre dans de l'eau déionisée. Compléter à 1 L dans un ballon jaugé.
Aliquoter dans des bouteilles ambres. Conserver à 4 °C

#2 Peser 5 g de NaOH.
Dissoudre dans environ 1 L d'eau déionisée.
Ajouter 8 mL de NaOCl.
Compléter à 1 L dans un ballon jaugé.

PRÉPATION DES STANDARDS:

Préparer une solution de 1 mM de $(NH_4)_2SO_4$ avec de l'eau déionisée.

La remplacer tous les mois.

Dans des éprouvettes propres, pipetter 1 mL d'eau déionisée. Dans la première éprouvette, pipetter 1 mL de la solution standard. Bien mélanger. Pipetter 1 mL de cette solution et la mélanger à l'eau de la seconde éprouvette. Répéter autant de fois que nécessaire pour obtenir les concentrations de l'ordre de celles présentes dans le milieu.

ANALYSE COLORIMÉTRIQUE:

Faire les analyses en duplica. Préparer environ quarante éprouvettes à la fois.

- Dans une éprouvette de 13 mm,

  pipetter 40 µL d'échantillon, de standard ou d'eau déionisée servant d'échantillon blanc pour le milieu MS (concentration maximale de 20 mM NH_4) ou

  pipetter 150 µL d'échantillon, de standard ou d'eau déionisée servant d'échantillon blanc pour le milieu B5 (concentration maximale de 2 mM NH_4)

- **Ajouter** 2,5 mL du réactif #1 à l'aide d'une dispensette.
- **Ajouter** 2,5 mL du réactif #2 à l'aide d'une dispensette.
- **Mélanger** chacune des éprouvettes avec le Vortex.
- **Incuber** 30 minutes à la température de la pièce.
- **Arrêter la réaction en refroidissant dans un bain d'eau froide**.
- **Calibrer le spectrophotomètre** (Séquoia Turner):
  - → Ajuster la longueur d'onde à 630 nm; s'assurer que le filtre est adéquat.
  - → Mettre l'appareil en position de lecture de transmittance (bouton d'extrême gauche).
  - → Insérer l'éprouvette contenant le blanc dans l'appareil.
  - → Maintenir le bouton "zero" enfoncé et ajuster le zéro de l'appareil (deuxième bouton). Relâcher le bouton.
  - → Ajuster le 100% de transmittance à l'aide du troisième bouton à partir de la gauche.
  - → Mettre l'appareil en position de lecture d'absorbance.
- Prendre les lectures d'absorbance avant 30 minutes.
- Après les analyses, disposer du contenu des éprouvettes dans les contenants de récupération.
- Rincer abondamment les éprouvettes à l'eau courante, à l'eau osmosée puis à l'eau déionisée. Sécher dans une étuve dans un portoir bien identifié. **N'utiliser que du savon sans phosphate.** S'assurer que les éprouvettes ne sont utilisées que pour les analyses.

TRAITEMENT DES RÉSULTATS

La coloration varie linéairement avec la concentration. Effectuer une régression linéaire sur les résultats. Typiquement, la courbe de calibration devrait être similaire à celle présentée plus bas.

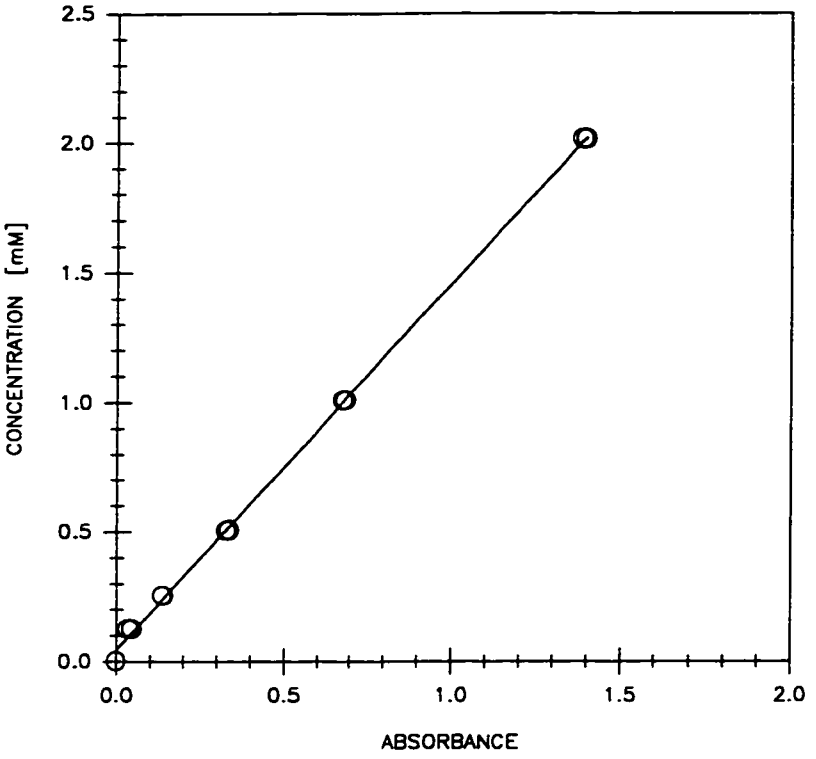


Figure (PES_P016.V1)-1. Courbe typique d'étalonnage.

Biopro

©BIOPRO 1992

PROCÉDURE EXPÉRIMENTALE STANDARDISÉE :
PES-P017.v1

TITRE: **ANALYSE DE PO_4 PAR COLORIMÉTRIE**
culture de cellules de plantes - MS et B5

RÉFÉRENCE: Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 16ième édition, 1985, p. 448.

RÉDIGÉ PAR: Marie-France Pépin — DATE: 23 novembre 1992
VÉRIFIÉ PAR: Marie-France Pépin — version-1 : 23 novembre 1992

PRÉCAUTIONS: Porter des gants.

PRÉPARATION DES RÉACTIFS:

#1 **H_2SO_4 5N**
Diluer 70 mL de H_2SO_4 concentré dans de l'eau déionisée jusqu'à un volume de 500mL.

#2 **Potassium antimonyl tartrate solution**
Dissoudre 1,3715 g $K(SbO)C_4H_4 \cdot ½H_2O$ dans 400 mL d'eau déionisée.
Augmenter le volume de la solution à 500 mL dans un ballon jaugé.
Entreposer dans le noir dans une bouteille de verre.

#3 **Ammonium molybdate solution**
Dissoudre 10 g $(NH_4)_6\ Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ dans 200 mL d'eau déionisée.
Augmenter le volume de la solution à 250 mL dans un ballon jaugé.
Entreposer dans le noir dans une bouteille de verre.

#4 **Acide ascorbique, 0,1M**
Dissoudre 1,76 g d'acide ascorbique dans 100 mL d'eau déionisée dans un contenant réservé à cet effet. Assurer vous qu'il ne contient aucune trace de contaminant.
La solution n'est pas stable plus d'une semaine à 4°C.

PRÉPATION DES STANDARDS:

Préparer une solution de 1 mM de KH_2PO_4 avec de l'eau déionisée.

La remplacer tous les mois.

Dans des éprouvettes propres, pipetter 1 mL d'eau déionisée. Dans le première éprouvette, pipetter 1 mL de la solution standard. Bien mélanger. Pipetter 1 mL de cette solution et la mélanger à l'eau de la seconde éprouvette. Répéter autant de fois que nécessaire pour obtenir les concentrations de l'ordre de celles présentes dans le milieu.

PRÉPARATION DE LA SOLUTION DE RÉACTIFS

Pour obtenir 100 mL de réactif combinés, les mélanger dans l'ordre et les proportions suivantes en mélangeant après chaque addition dans une bouteille de verre réservée à cette fin. Les réactifs doivent au préalable être à la température de la pièce. S'assurer que tous les accessoires utilisés soient exempts de toute trace de contaminant.

50 mL réactif #1
5 mL réactif #2
15 mL réactif #3
30 mL réactif #4

Le mélange est stable pour une période de 4 heures.

ANALYSE COLORIMÉTRIQUE:

Faire les analyses en duplica. Préparer environ quarante éprouvettes à la fois.

- Dans une éprouvette de 13 mm,
  - **pipetter** 150 µL d'échantillon, de standard ou d'eau déionisée servant d'échantillon blanc.
  - **Ajouter** 4,9 mL d'eau déionisée à l'aide d'une dispensette.
  - **Ajouter** 800 µL du réactif.
- **Mélanger** chacune des éprouvettes avec le Vortex.
- **Incuber** 10 minutes à la température de la pièce.
- **Utiliser le spectrophotomètre** (Séquoia Turner):
  - Ajuster la longueur d'onde à 880 nm; s'assurer que le filtre est adéquat.
  - Mettre l'appareil en position de lecture de transmittance (bouton d'extrême gauche).
  - Insérer l'éprouvette contenant le blanc dans l'appareil.
  - Maintenir le bouton "zero" enfoncé et ajuster le zéro de l'appareil (deuxième bouton). Relâcher le bouton.
  - Ajuster le 100% de transmittance à l'aide du troisième bouton à partir de la gauche.
  - Mettre l'appareil en position de lecture d'absorbance.
- Prendre les **lectures** d'absorbance **avant 30 minutes**.
- **Rincer** abondamment les éprouvettes à l'eau courante, à l'eau osmosée puis à l'eau déionisée. Sécher dans une étuve dans un portoir bien identifié. **N'utiliser que du savon sans phosphate.** S'assurer que les éprouvettes ne sont utilisées que pour les analyses.

TRAITEMENT DES RÉSULTATS

La coloration varie linéairement avec la concentration. Effectuer une régression linéaire sur les résultats. Typiquement, la courbe de calibration devrait être similaire à celle présentée plus bas.

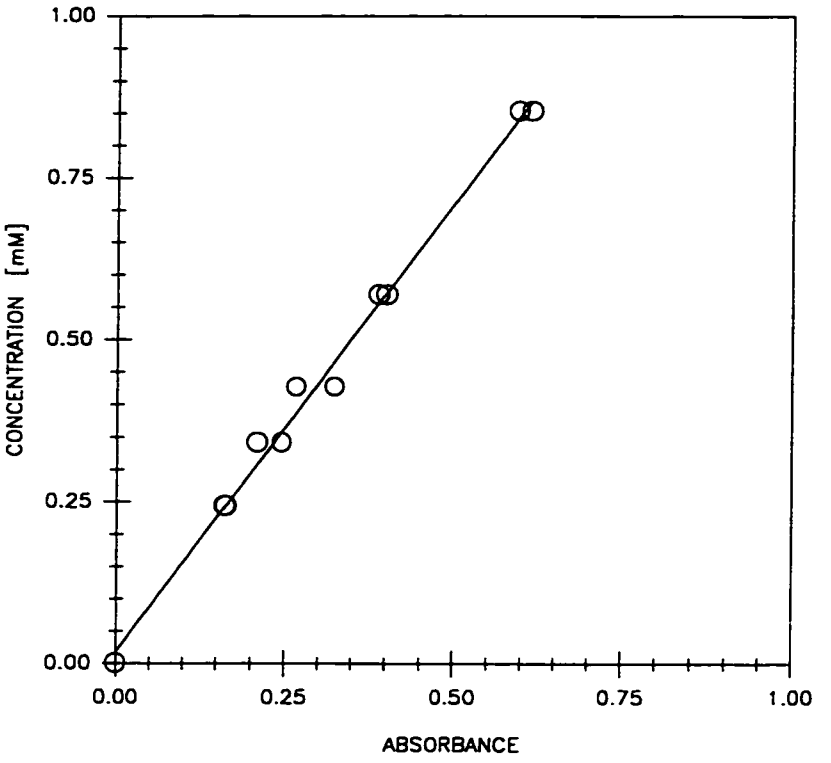


Figure (PES_P017.V1)-1. Courbe typique d'étalonnage.

A2. CULTURES EN FLACONS AGITÉS

Des cultures en flacons agités ont été effectuées parallèlement à toutes les cultures en bioréacteurs comme cultures témoins. Les résultats issus de ces cultures accompagnent ceux des cultures en bioréacteurs présentés aux annexes 3 et 4. Les résultats présentés ici sous forme de courbes évolutives sont ceux analysés spécifiquement dans le chapitre 3. Ils se démarquent des autres cultures témoins en flacons par la disponibilité de données pour le compte cellulaire.

A2.1 CONDITIONS EXPÉRIMENTALES ET PRÉSENTATION DES RÉSULTATS

Les expériences rapportées ont été effectuées avec les lignées VVG105 et VVG111. Les cellules de ces lignées sont cultivées sans apport de lumière. Les conditions expérimentales décrites dans les chapitres (2 et 3) ont été utilisées sans modifications. Selon la codification adoptée pour les bioréacteurs, ces cultures correspondent aux expériences H09ctr, H10ctr, H11ctr pour la lignée VVG105 et aux expériences H27ctr, H29ctr et H31ctr pour la lignée VVG111. Un des flacons témoins de la série VVG111 était muni d'une sonde à OD permettant ainsi de compléter l'information contenue dans les courbes de croissance (x_{MS}, x_{MH}, PCV, x_t), de production d'anthocyanes, de consommation de nutriments (NH_4, NO_3, PO_4, saccharose, glucose, fructose), de pH et, pour certaines conditions expérimentales, de conductivité du milieu de culture.

Les cellules de la lignée VVG105 utilisées pour les cultures témoins avaient été sous-cultivées 53, 58 et 64 fois depuis leur sélection sur cals par l'équipe du CRDA. Leur pigmentation était faible et la production d'anthocyanes ne dépassait plus les 60 mg Acy L^{-1}. Les cellules de la lignée VVG111 étaient plus productives avec des concentrations finales d'anthocyanes atteignant 200 mg Acy L^{-1}. Les cultures présentées ici ont été effectuées avec des cellules des sous-cultures VVG111 sc20, sc27 et sc31. Ces cellules croissaient surtout en amas d'un diamètre d'environ 2 mm et étaient initialement difficiles à échantillonner avec une pipette à

large ouverture. Des cellules de la sous-culture sc21 ont donc été filtrées à travers une passoire dont les ouvertures étaient de 1 mm, mises en cultures et soumises à l'entretien régulier afin d'obtenir une suspension fine de cellules. Le suffixe Dxx accolé au nombre de sous-cultures depuis l'établissement de la lignée désigne le nombre de sous-cultures depuis la sélection par filtration des amas cellulaires les plus fins. Les courbes en flacons produites au chapitre 3 représentent le comportement des cellules VVG111 sc31(D10).

A2.2 RÉSULTATS ET CALCULS

Les résultats expérimentaux sont présentés sous forme graphique dans les figures qui suivent. Les références aux fichiers de résultats sont indiquées. Ces fichiers ont été générés sur SigmaPlot® version 5.0 (Jandel Scientific).

A2.2.1 Courbes et indicateurs de croissance

Les courbes de croissance des six cultures en flacons représentée par x_{MS}, x_{MH}, PCV, et x_ℓ, et traitées au chapitre 3 ici sont présentées aux figures A2.1, 2.3, 2.5, 2.7, 2.13 et 2.20. La masse des cellules, x_{MS}/x_ℓ, ainsi que le rapport MH/MS y sont aussi présentés. Une série de lignes verticales, décrites au tableau A2.1, ponctuent ces courbes pour indiquer les événements signifiants dans l'évolution de ces cultures en cuvée. On y constate que la masse spécifique des cellules demeure relativement constante jusqu'à ce que la prolifération cellulaire ralentisse et que le rapport masse humide sur masse sèche augmente par la suite (Tableau A2.2). Cette augmentation du rapport MH/MS indique une expansion de la biomasse associée à

Tableau A2.1 Identifications des indicateurs graphiques des courbes de croissance

·····	moment approximatif de limitation en NH_4 dans le milieu extracellulaire
------	moment approximatif de limitation en PO_4 dans le milieu extracellulaire
– – – –	moment correspondant à la mesure de OD_{min} (OUR_{max})
——·——	limite(s) de la période où la concentration totale d'hydrates de carbone atteint ~0

Tableau A2.2 Taux d'augmentation du rapport biomasse humide sur biomasse sèche et masse sèche spécifique des cellules.

	taux augmentation MH/MS g MH g^{-1} MS d^{-1}	Masse sèche spécifique des cellules µg MS $cellule^{-1}$
VVG105 sc53	1.8 ± 0.1*	3.7 ± 2.3*
VVG105 sc58	0.95 ± 0.29	4.3 ± 2.1
VVG105 sc64	1.7 ± 0.1	2.1 ± 0.7
VVG111 sc20	nd	3.7 ± 1.3
VVG111 sc27	0.97 ± 0.32	2.2 ± 0.5
VVG111 sc31	0.82 ±0.28	3.5 ± 1.0

*déviation standard ou erreur sur l'estimé

l'accumulation d'eau dans les cellules. Les changements graduels de composition chimique du milieu de culture se traduisent par une diminution de la pression osmotique qui peut en grande partie expliquer ce comportement. Les mesures de conductivité et les concentrations résiduelles d'hydrates de carbone peuvent être converties en leur équivalent en concentration de NaCl et exprimés en termes de pression osmotique. Ainsi, tel qu'illustré aux figures A2.16 et A2.23, on peut tenter d'établir une relation entre le PCV, la biomasse humide, le rapport MH/MS et la pression osmotique. Ces tendances représentent l'effet normal de l'augmentation de la turgescence des cellules en réponse au changement de pression osmotique du milieu extérieur. Notons ici que les erreurs sur la pression osmotique proviennent de l'addition des variations de mesures d'hydrates de carbone.

Les mesures de pH et de conductivité du milieu effectuées sur les cultures de cellules VVG111 sont présentées aux figures A2.9, A2.15 et A2.22. Les mesures de pH des cultures de cellules VVG105 sont présentées avec les mesures de consommation de nutriment et d'assimilation d'oxygène. Comme nous l'avons abordé au chapitre 3, le pH du milieu

extracellulaire diminue d'environ 5,4 au moment de l'inoculation jusqu'à 4,5 pendant la consommation de l'ion ammonium pour ensuite se rétablir progressivement autour de pH 6. Les mesures de conductivité et de la concentration en NO_3 de milieu extracellulaire sont aussi corrélées.

A2.2.2 Consommation de nutriments

L'hydrolyse du saccharose était complétée entre les deuxième et troisième jours de culture. Le taux spécifique d'hydrolyse varie selon la lignée cellulaire de 1,6 g saccharose g^{-1} MS d^{-1} pour VVG105 (sc53) à 7.2 ± 1.1 (n=3) pour les trois séries d'expériences effectuées avec VVG111. Lorsque les cultures ont été poursuivies suffisamment longtemps pour que tous les hydrates de carbones soient complètement consommés, la viabilité des cultures a fléchi jusqu'à 10%. Les ions ammonium et phosphate étaient complètement consommés dans les quatre premiers jours de culture. Comme le montrent les figures A2.2, A2.4, A2.6, A2.8, A2.14 et A2.21, les cinétiques d'assimilation de NH_4 et de PO_4 diffèrent pour les deux lignées étudiées.

A2.2.3 Production d'anthocyanes

Les rendements en anthocyanes demeurent constants en cours de culture (Tableau A2.3). En effet, une analyse de variance ne permet pas de rejeter l'hypothèse que les rendements varient en fonction du temps. De plus, les graphiques des résidus ne permettent pas non plus d'identifier un biais en fonction du temps.

Cependant, pour les deux lignées cellulaires, les rendements en anthocyanes varient avec le temps. Cette variation peut être exprimée en fonction du nombre de sous-cultures effectuées depuis la sélection de la souche (Tableau A2.3). Il est intéressant de constater que pour les deux lignées les rendements diminuent au même taux. De plus, les ordonnées à l'origine qui correspondent théoriquement au rendement lors de la sélection sont aussi les mêmes (VVG105: Y_0= 22,20±1,7 mg Acy g^{-1} MS; VVG111: Y_0= 20,78±0,93 mg Acy g^{-1} MS). Bien que ces valeurs soient obtenues d'une extrapolation très loin de l'origine, elles suggèrent que le

Tableau A2.3 Rendements en anthocyanes sur la biomasse sèche et humide des lignées VVG105 et 111 cultivées en flacons agités.

Lignée	Sous-culture	$Y_{Acy/MS}$	Diminution de rendement
	sc	mg Acy g^{-1} MS	mg Acy g^{-1} MS SC^{-1}
	sc53	5,03±0,50 (n=17)	
VVG105	sc58	3,12±0,56 (n=20)	-0,33±0,03 (n=3)
	sc64	1,44±0,57 (n=16)	
	sc20	14,17±2,89 (n=31)	
VGG111	sc27	11,52[a]±0,86 (n=35)	-0,34±0,03 (n=3)
	sc31	10,55[a]±2,28 (n=29)	

* ± intervalle de confiance 95%

[a] ne sont pas significativement différents d'après un test de Student

programme de sélection de souches sur cals qui a permis d'obtenir une forte productivité devrait être appuyé d'un programme de maintien de productivité en milieu liquide.

A2.2.4 Assimilation d'oxygène

Les taux de croissance faibles (de l'ordre de 0,25 d^{-1}) et les valeurs observées des taux d'assimilation d'oxygène (OUR, oxygen uptake rate) chez les cellules de plantes (de l'ordre de 0,04 à 3,0 mmol O_2 L^{-1} h^{-1}) permettent de supposer un régime pseudo-permanent entre la concentration d'OD dans le milieu de culture, la pression partielle d'oxygène au-dessus du liquide dans le flacon et celle à l'extérieur de celui-ci. Une analyse d'ordre de grandeur des termes des équations

$$\frac{dOD}{dt} = k_L a \left(OD^* - OD\right) - q_{O_2} \cdot x \qquad (A1)$$

$$\frac{dOD}{dt} = OTR - OUR \tag{A2}$$

montre que dans les flacons agité pour un k_La de 18 h^{-1} (chapitre 3), l'OTR (= k_La (OD^*-OD) = 18,0 h^{-1} · (0,253 mmol O_2 L^{-1} - 0) est au maximum de l'ordre de 4,5 mmol O_2 L^{-1} h^{-1} alors qu'un estimé de l'ordre de grandeur de *d*OD/*d*t donne 0,001 mmol O_2 L^{-1} h^{-1} (figures A2.8, .14, .21). Ainsi

$$\frac{dOD}{dt} \approx 0 \approx OTR - OUR \tag{A3}$$

et l'équation (A1) devient

$$q_{O_2} = \frac{k_La\left(OD^* - OD\right)}{x}. \tag{A4}$$

Il apparaît donc qu'en faisant l'hypothèse que le k_La ne varie pas de façon significative au cours de la culture, q_{O_2} peut être estimé à partir des données de concentration en OD si l'on dispose d'un bon estimé de la biomasse.

Pour obtenir une représentation continue des courbes de croissance de la biomasse sèche et de la prolifération cellulaire, x_{MS} et x_ϵ, ainsi que des estimés du taux spécifique de croissance observé, μ_{obs}, les données de croissance des cultures de cellules VVG111 sc27(D6) et sc31(D10) ont été lissées mathématiquement. La croissance de la biomasse a été représentée à l'aide d'une équation logistique:

$$x = \frac{x_{max}}{1 + \left(\frac{x_{max} - x_0}{x_0}\right) \cdot \exp\left(-\mu_{max} \cdot (t - t_0)\right)} \tag{A5}$$

Les paramètres de l'équation décrivant la biomasse, x_{max} et μ_{max}., ont été évalués par la méthode Marquardt-Levenberg telle qu'implantée dans SigmaPlot®. Un estimé du taux de croissance observé, μ_{obs}, peut alors être obtenu en évaluant subséquemment:

$$\frac{dx}{dt} = \mu_{max} \cdot x \cdot \left(1 - \frac{x}{x_{max}}\right) \tag{A6}$$

et

$$\mu_{obs} = \frac{1}{x} \cdot \frac{dx}{dt} \tag{A7}$$

Les comparaisons de la représentation des courbes de croissance obtenues avec les résultats expérimentaux dans les figures A2.11, A2.18 et A2.25 justifient l'utilisation d'un modèle logistique. On y remarque que l'utilisation du modèle de croissance classique de premier ordre

$$\mu = \frac{1}{x}\frac{dx}{dt} = \text{constante} \tag{A8}$$

ne permet pas de bien représenter la courbe de croissance notamment son inflexion systématique autours du moment où OUR_{max} atteint un maximum (Figures A2.10, A2.17 et A2.24).

De plus, le point d'inflexion et l'allure de la première dérivée telle que calculée à partir de l'équation 6 se comparent bien à un estimé de la dérivée obtenu par dérivation numérique:

$$f_i' = \frac{\left(\frac{f_{i+1}}{h_{i+1}^2} - \frac{f_{i-1}}{h_i^2}\right)}{\left(\frac{1}{h_{i+1}} + \frac{1}{h_{i-1}}\right)} - f_i \cdot \left(\frac{1}{h_{i+1}} - \frac{1}{h_{i-1}}\right), \tag{A9}$$

où

$$h_{i+1} = t_{i+1} - t_i, \tag{A10}$$

appliquée aux résultats expérimentaux. La faible fréquence d'échantillonnage et l'erreur de mesure des paramètres représentant la croissance de la biomasse ne permettent cependant pas d'obtenir des estimés fiables des dérivées par cette méthode. La prolifération cellulaire, elle, est mieux représentée par morceaux: une fonction exponentielle sur une première section de la courbe de croissance s'étendant du jour 0 au jour 6 environ et une fonction linéaire décroissante sur une deuxième section.

Ces évaluations de x_{MS} et de x_ϵ permettent de calculer $(q_{O2})_{MS}$ et $(q_{O2})_\epsilon$ et de les représenter en fonction du temps, de la concentration en OD et du taux de croissance spécifique. Ainsi, en se référant aux figures A2.18, A2.19, A2.25, A2.26, on constate que les taux spécifiques d'assimilation d'oxygène calculés sont de 0,40 à 0,65 mmol O_2 g^{-1} MS h^{-1} pour les 7 premiers jours de culture. Vers le 10ième jour, $(q_{O2})_{MS}$ se stabilise autours de 0,02 à 0,04 mmol O_2 g^{-1} MS h^{-1}. Ces valeurs sont du même ordre de grandeur que celles généralement rapportées pour les cultures de cellules de plantes, ces dernières oscillant entre 0,7 et 0,04 mmol O_2 g^{-1} MS h^{-1} selon que les mesures sont prises au début ou à la fin des cultures. L'erreur de mesure sur les comptes cellulaires est beaucoup plus importante que pour la masse sèche et rend difficile l'interprétation de l'assimilation d'OD en terme de taux spécifique d'assimilation par cellule. Les $(q_{O2})_\epsilon$ estimés pour les cuvées VVG111 sc20, sc27(D6) et sc31(D10) sont de 1,0 à 2,0 µmol O_2 10^{-6} cellule h^{-1} au cours des 5 à 6 premiers jours de culture pour ensuite diminuer jusqu'à 0,4 à 0,8 µmol O_2 10^{-6} cellule h^{-1} (figures A2.12, A2.19, et A2.26). Les estimés de $(q_{O2})_\epsilon$ demeurent constants jusqu'à ce que la concentration d'OD atteigne un minimum et que l'OUR soit maximal. Ces estimés ne semblent pas varier non plus avec la concentration d'OD dans le flacon. Le mode d'opération en cuvée oblige à interpréter avec prudence cette observation.

Les estimés de $(q_{O2})_\epsilon$ ne semblent pas varier avec la concentration d'OD, mais plutôt demeurer constants jusqu'à ce que la concentration d'OD atteigne son minimum marquant ainsi un moment où l'OUR est maximal.

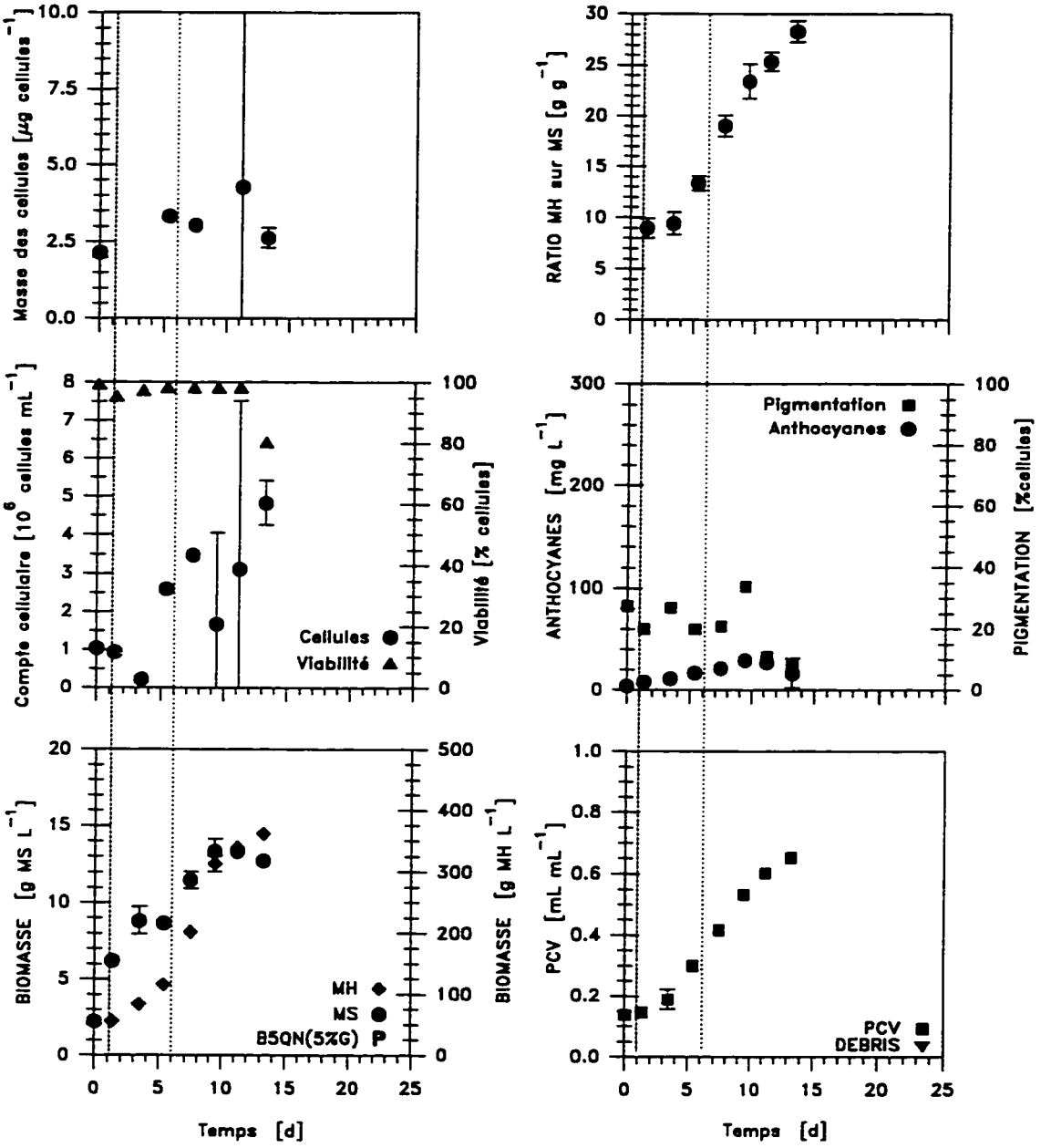


Figure A2.1 Consommation de nutriments, croissance de la biomasse et production d'anthocyanes de cultures en cuvée et en flacons agités de cellules VVG105 sc53. Culture témoin de la cuvée en bioréacteur H09

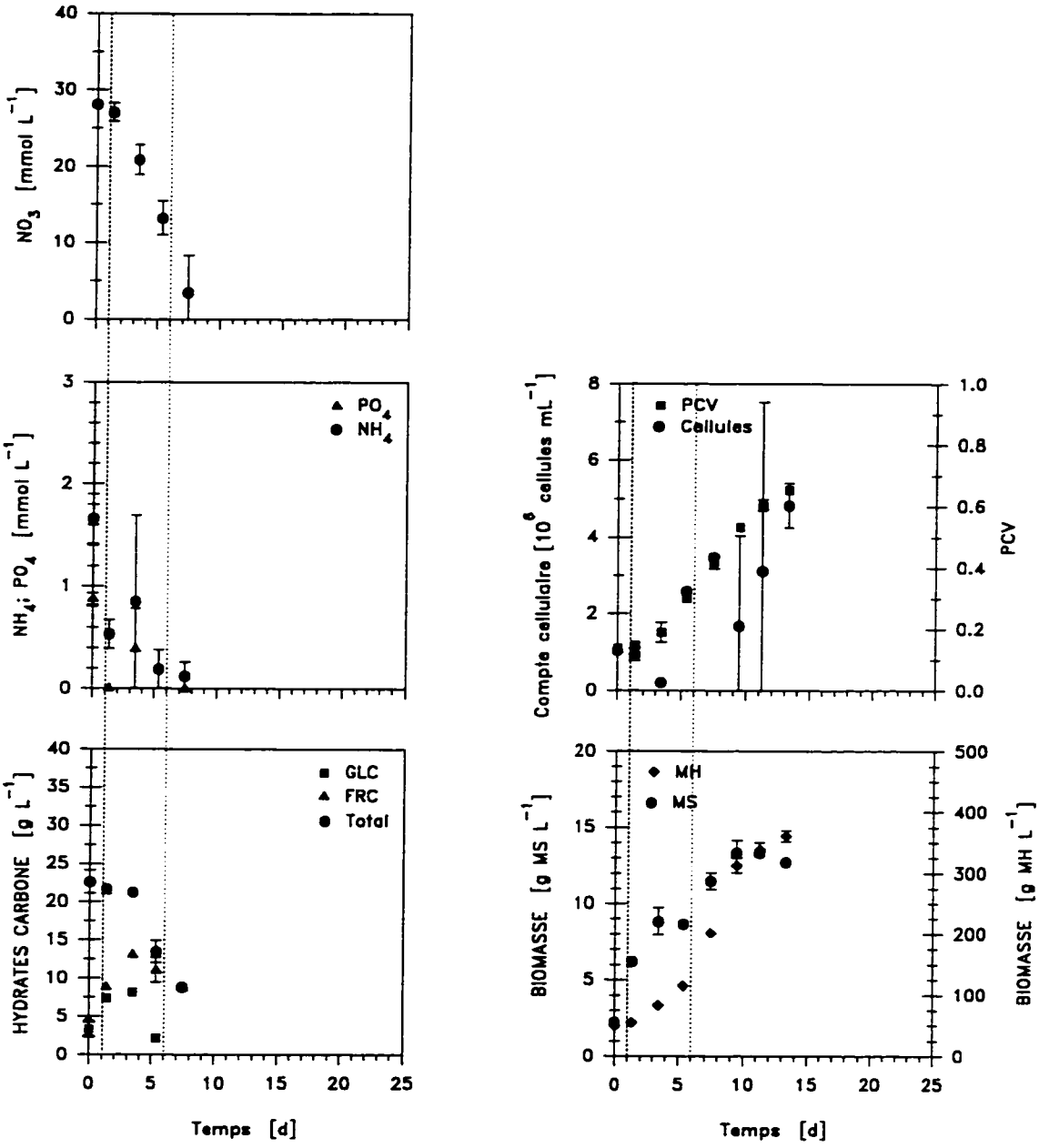


Figure A2.2 Croissance de la biomasse, prolifération cellulaire et viabilité, production d'anthocyanes, masse des cellules et ratio masse humide sur masse sèche de cultures en cuvée et en flacons agités de cellules VVG105 sc53. Culture témoin de la cuvée en bioréacteur H09

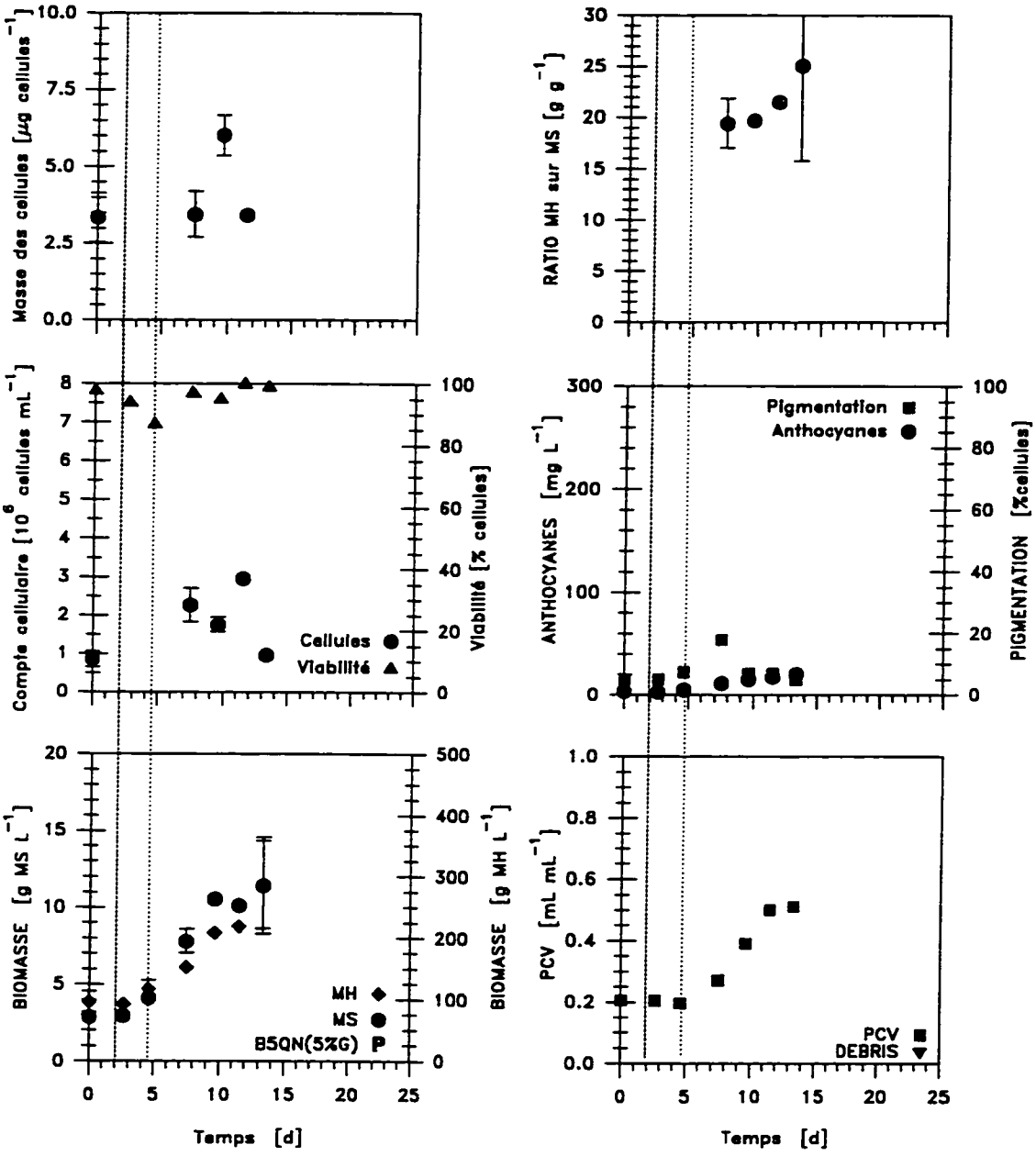


Figure A2.3 Croissance de la biomasse, prolifération cellulaire et viabilité, production d'anthocyanes, masse des cellules et ratio masse humide sur masse sèche de cultures en cuvée et en flacons agités de cellules VVG105 sc58. Culture témoin de la cuvée en bioréacteur H10.

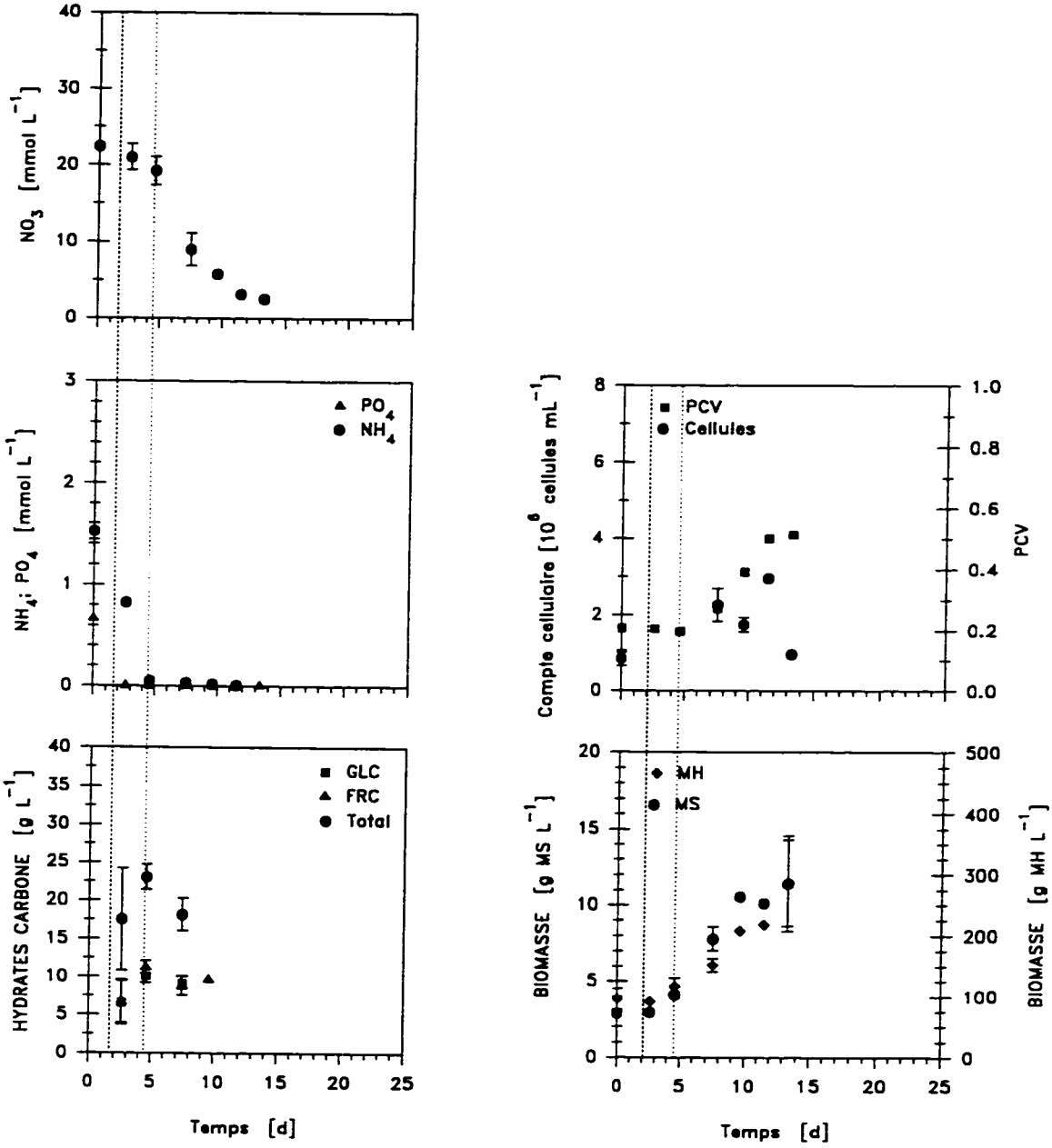


Figure A2.4 Consommation de nutriments, croissance de la biomasse et production d'anthocyanes de cultures en cuvée et en flacons agités de cellules VVG105 sc58. Culture témoin de la cuvée en bioréacteur H10.

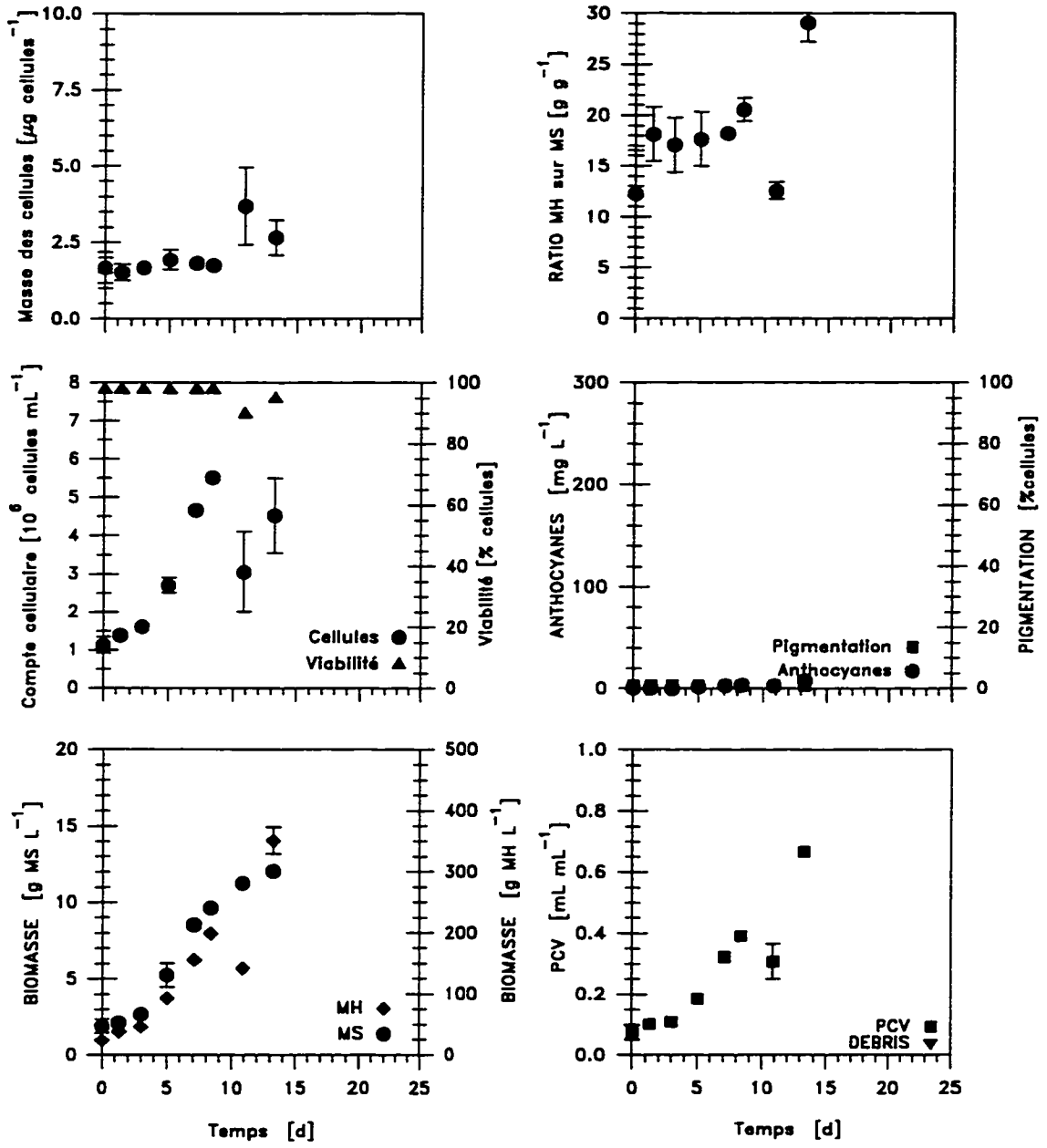


Figure A2.5 Croissance de la biomasse, prolifération cellulaire et viabilité, production d'anthocyanes, masse des cellules et ratio masse humide sur masse sèche de cultures en cuvée et en flacons agités de cellules VVG105 sc64. Culture témoin de la cuvée en bioréacteur H11.

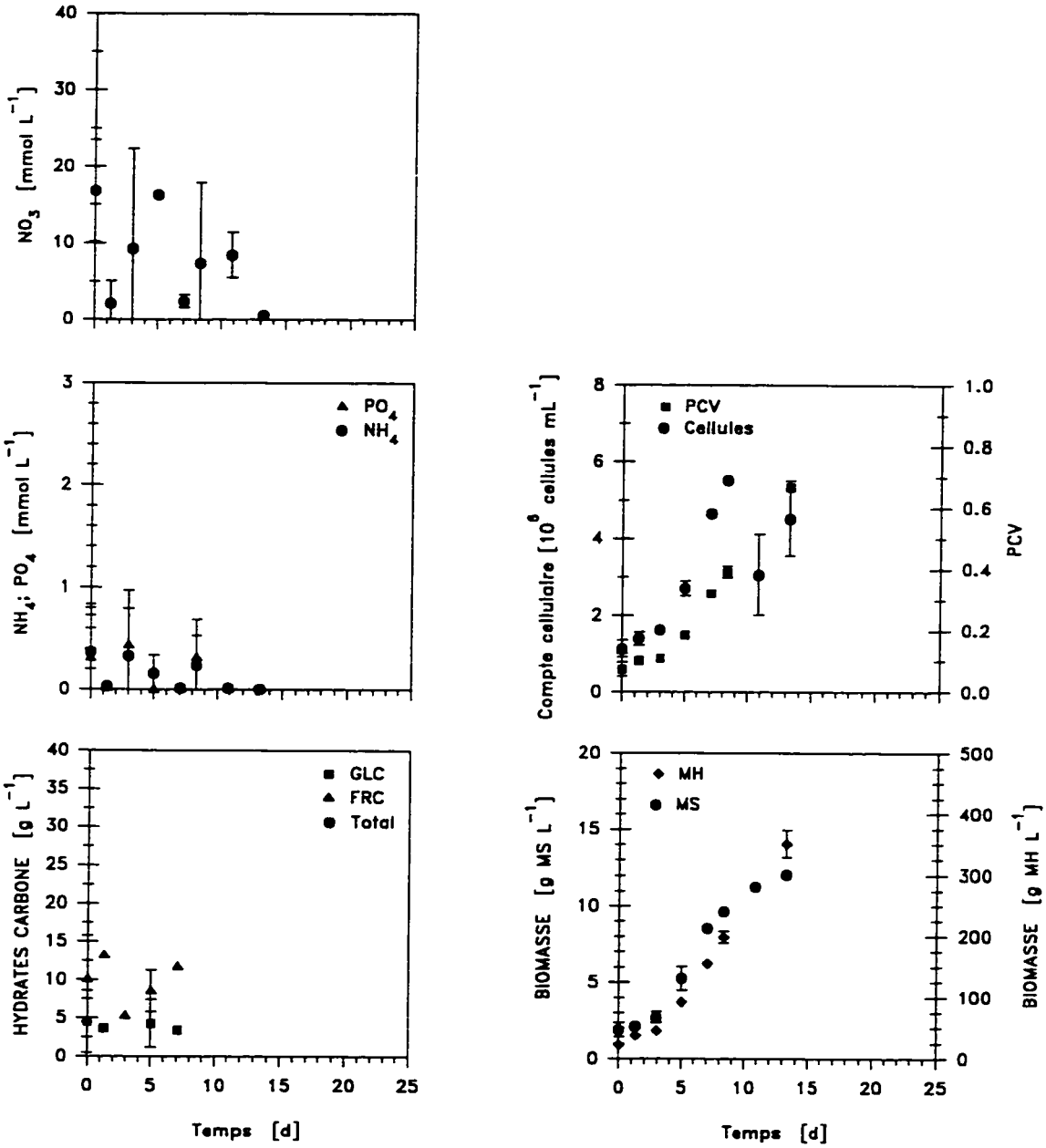


Figure A2.6 Consommation de nutriments, croissance de la biomasse et production d'anthocyanes de cultures en cuvée et en flacons agités de cellules VVG105 sc64. Culture témoin de la cuvée en bioréacteur H11.

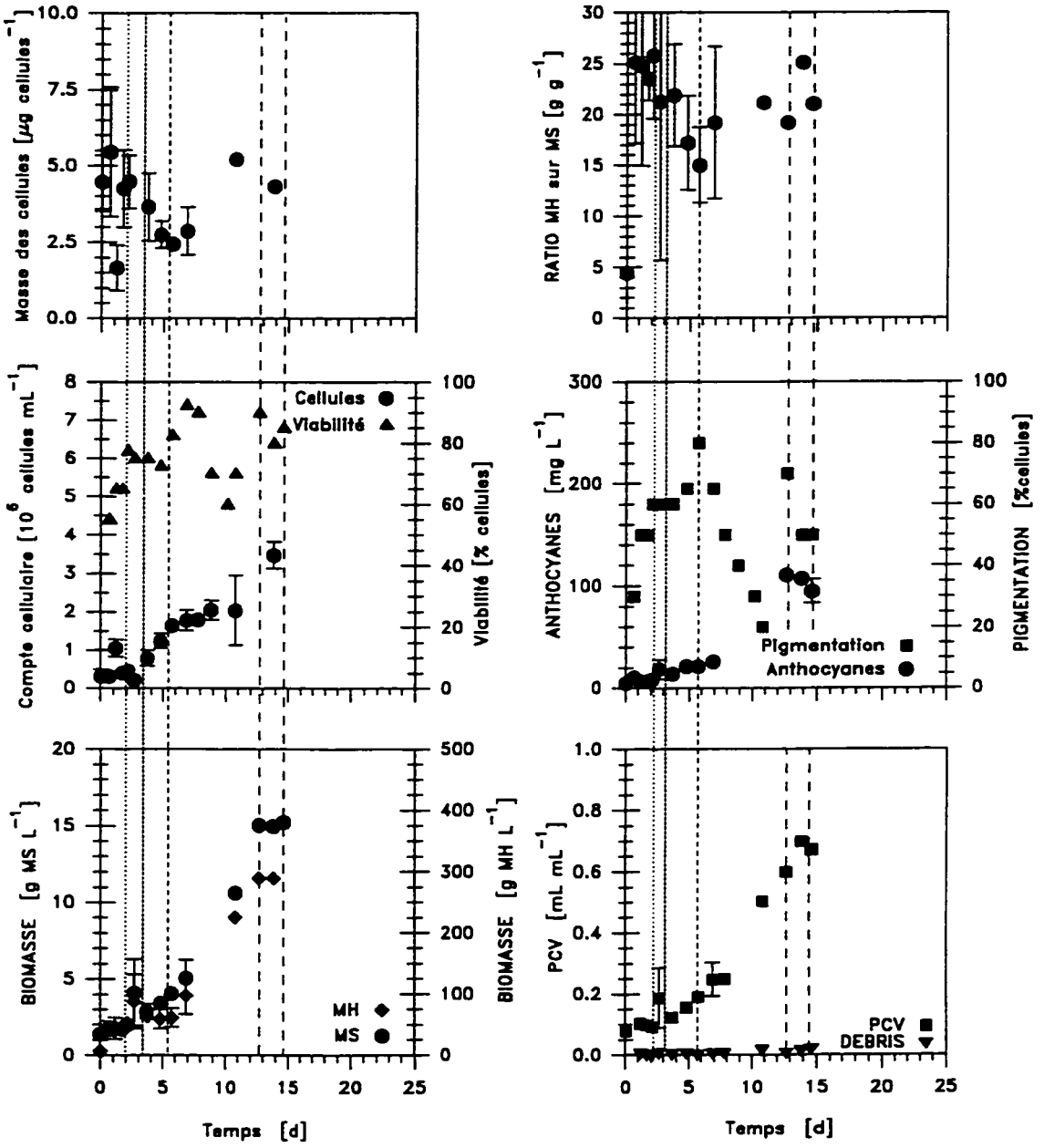


Figure A2.7 Croissance de la biomasse, prolifération cellulaire et viabilité, production d'anthocyanes, masse des cellules et ratio masse humide sur masse sèche de cultures en cuvée et en flacons agités de cellules VVG111 sc20. Culture témoin des cuvées en bioréacteurs H27 et H28.

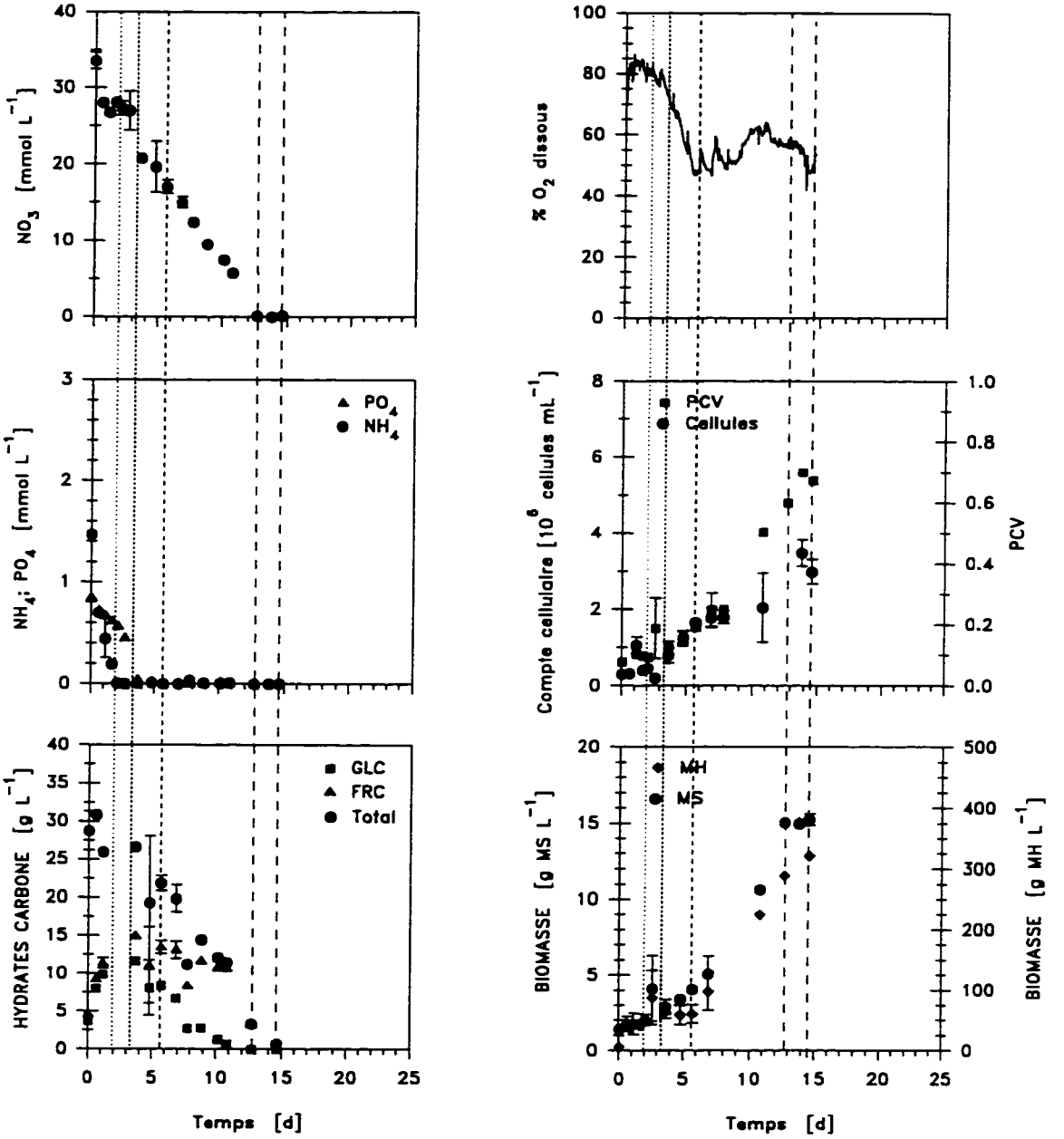


Figure A2.8 Consommation de nutriments, assimilation d'oxygène, croissance de la biomasse et prolifération cellulaire de cultures en cuvée et en flacons agités de cellules VVG111 sc20. Culture témoin des cuvées en bioréacteurs H27 et H28.

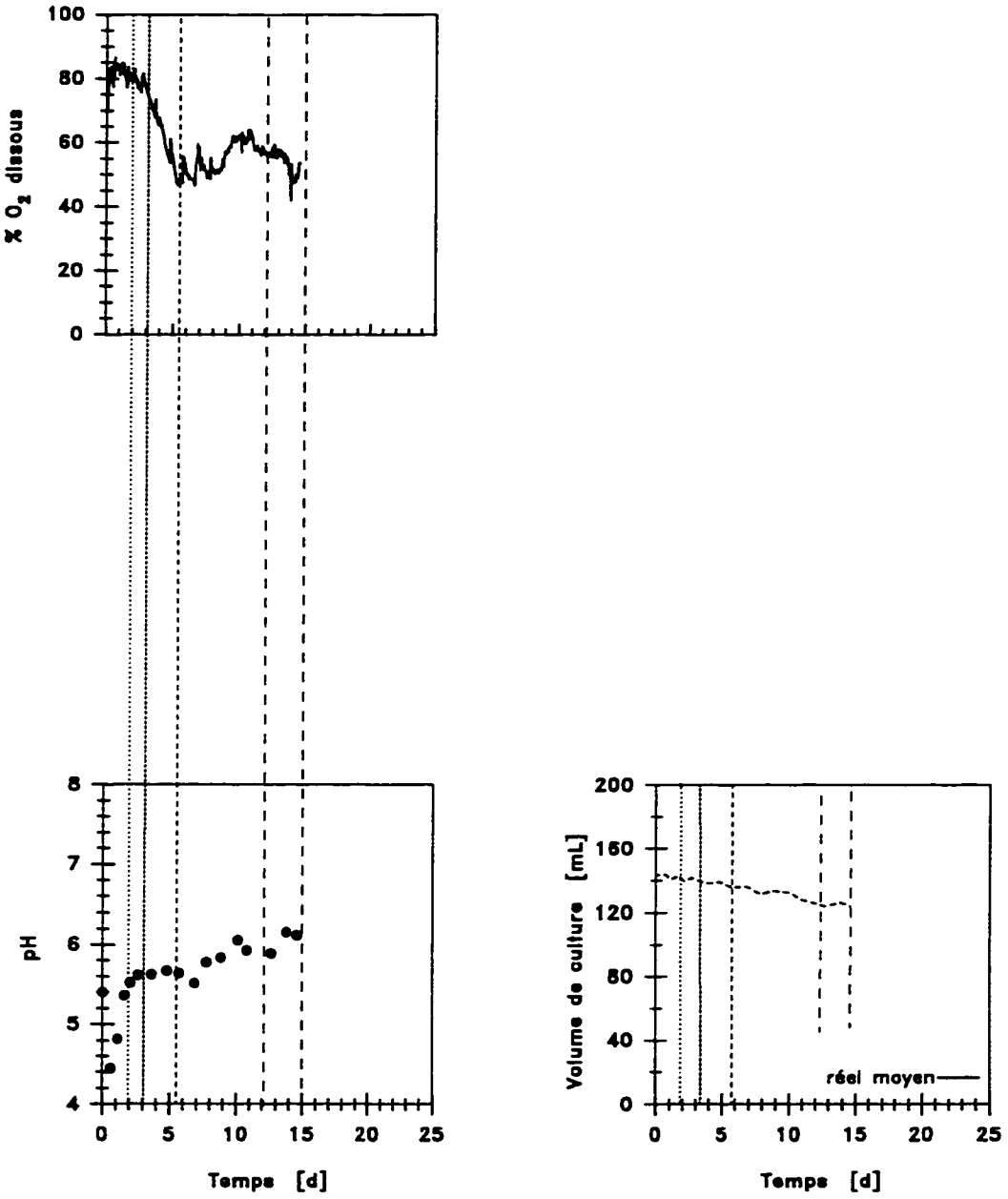


Figure A2.9 Suivi du pH, de la conductivité, de l'OD et du volume de culture de cultures en cuvée et en flacons agités de cellules VVG111 sc20. Culture témoin des cuvées en bioréacteurs H27 et H28.

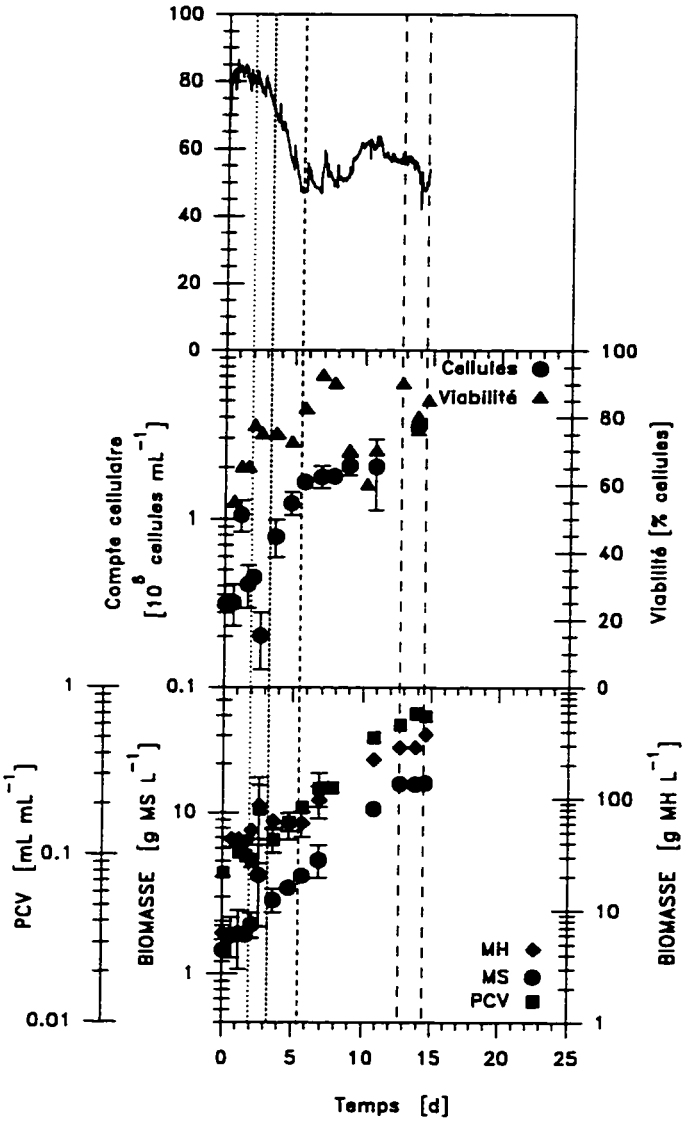


Figure A2.10 Suivi de l'OD et représentation exponentielle des courbe de croissance de cultures en cuvée et en flacons agités de cellules VVG111 sc20. Culture témoin des cuvées en bioréacteurs H27 et H28.

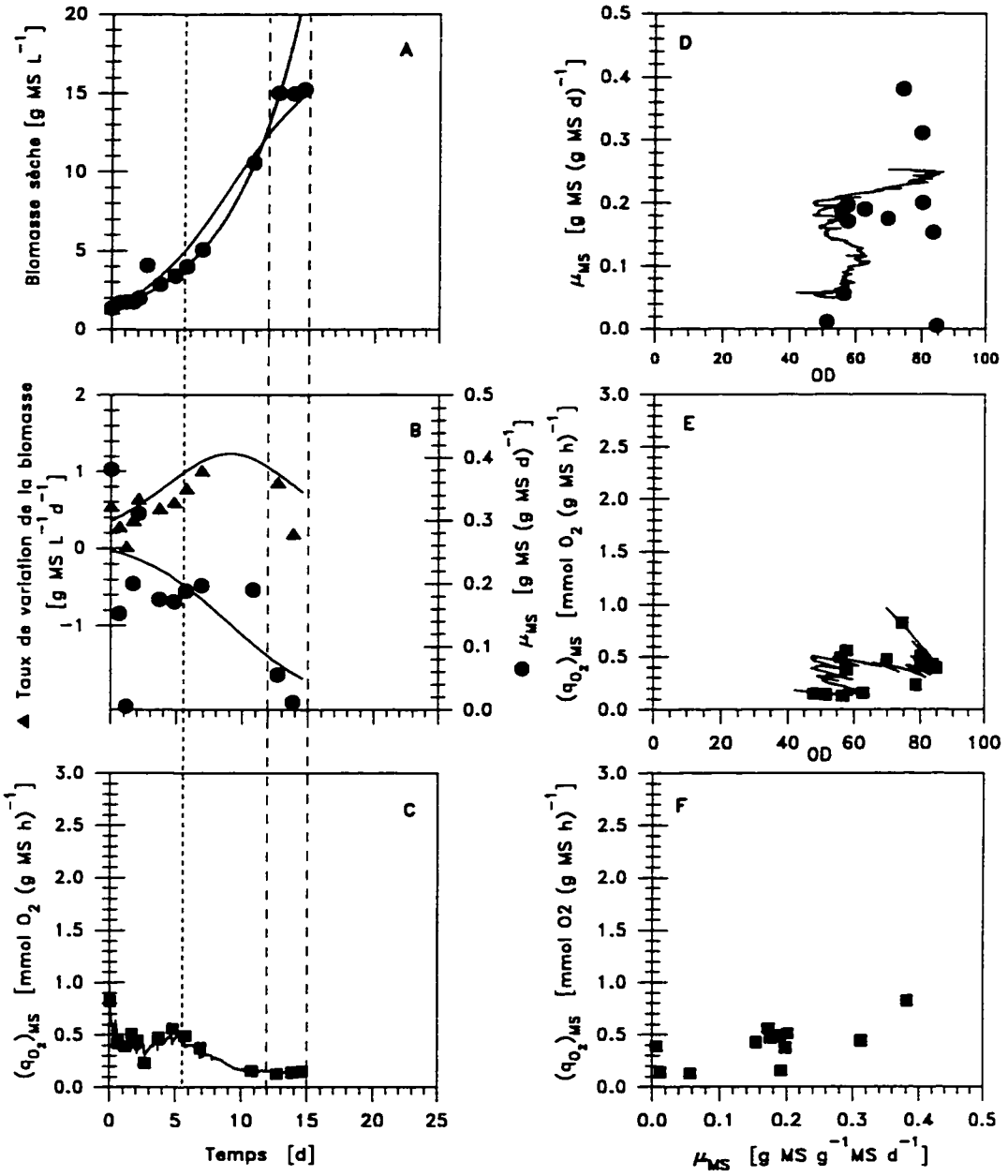


Figure A2.11 Taux spécifique de croissance et d'assimilation d'O_2 évalués sur la base de la biomasse sèche de cultures en cuvée et en flacons agités de cellules VVG111 sc20. Culture témoin des cuvées en bioréacteurs H27 et H28; symboles : mesures ou dérivées à partir des mesures; traits pleins: modèle logistique ou paramètre évalués à partir de ce modèle.

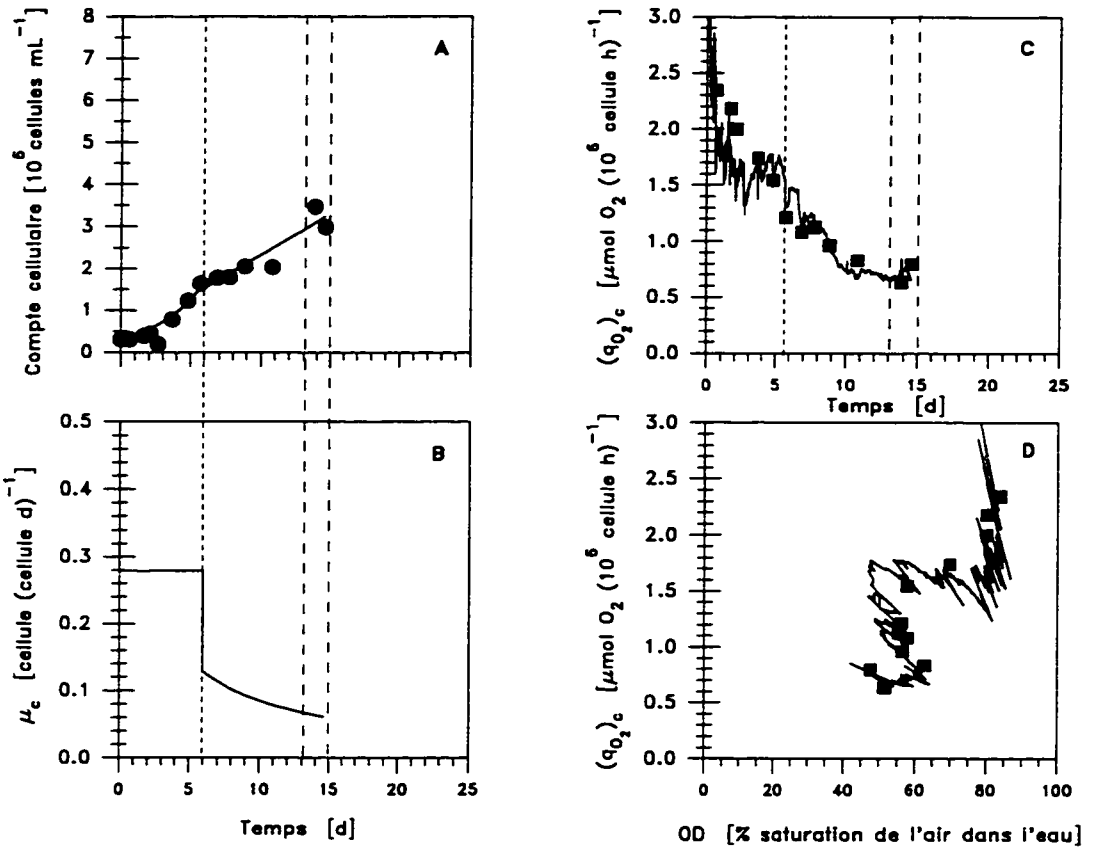


Figure A2.12 Taux spécifique de croissance et d'assimilation d'O_2 évalués sur la base du compte cellulaire de cultures en cuvée et en flacons agités de cellules VVG111 sc20. Culture témoin des cuvées en bioréacteurs H27 et H28; symboles : mesures ou calculs basés sur les mesures de biomasses; traits pleins : représentation mathématique de la courbe de croissance évaluée à partir de ce modèle.

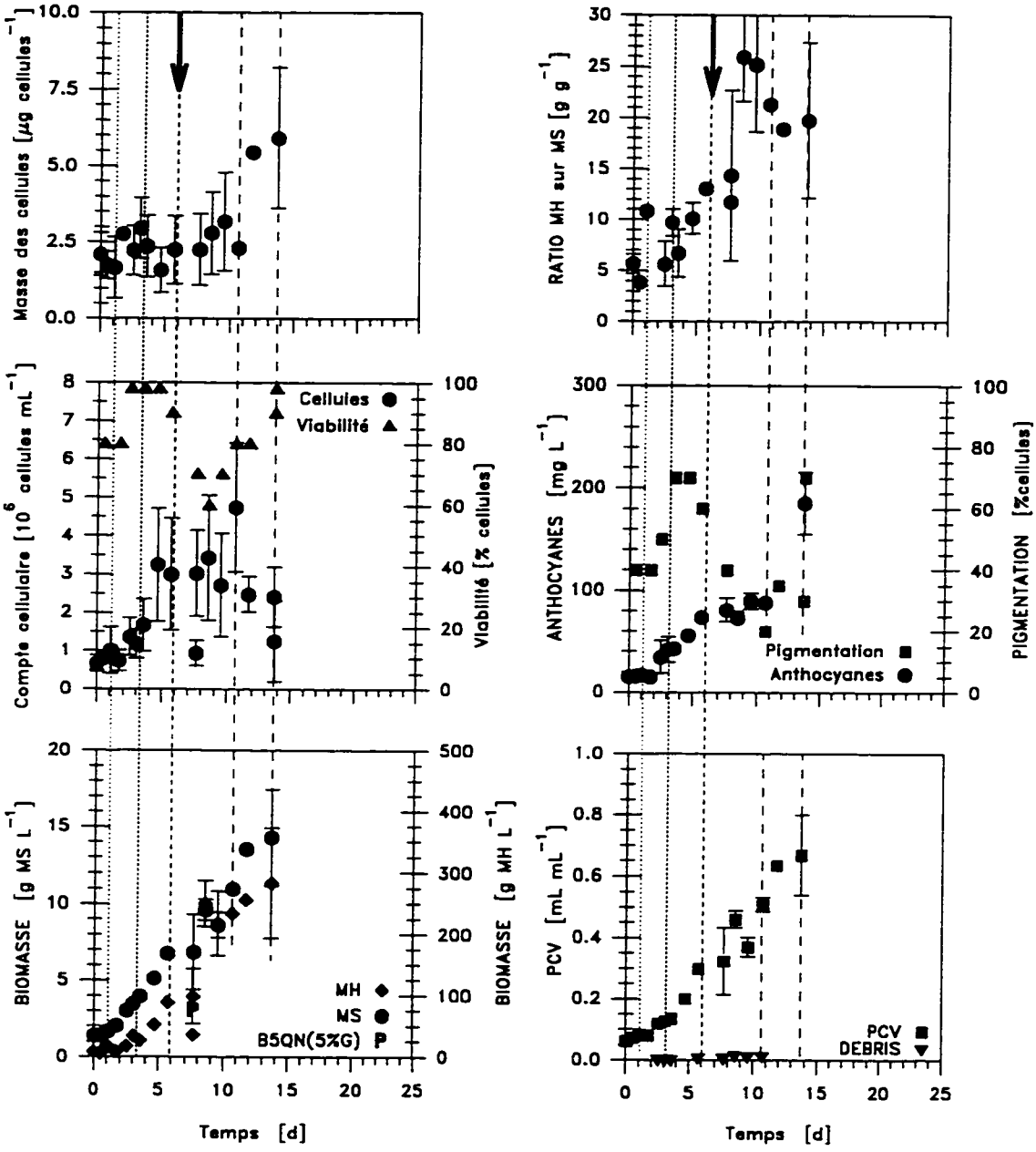


Figure A2.13 Croissance de la biomasse, prolifération cellulaire, production d'anthocyanes, masse des cellules et ratio masse humide sur masse sèche de cultures en cuvée et en flacons agités de cellules VVG111 sc27(D6). Culture témoin de la cuvée en bioréacteur H30.

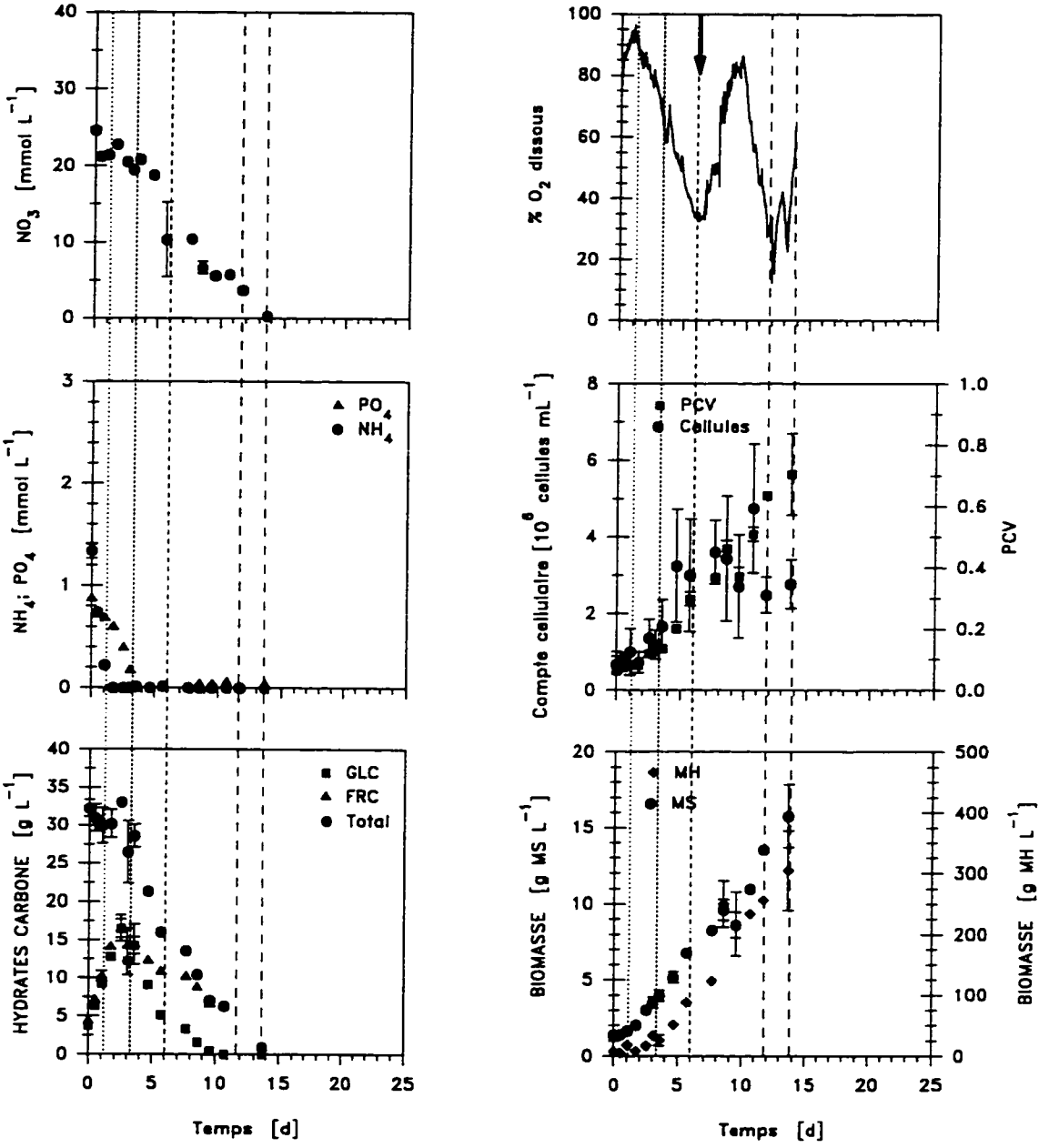


Figure A2.14 Consommation de nutriments, assimilation d'oxygène, croissance de la biomasse et prolifération cellulaire de cultures en cuvée et en flacons agités de cellules VVG111 sc27(D6). Culture témoin de la cuvée en bioréacteur H29.

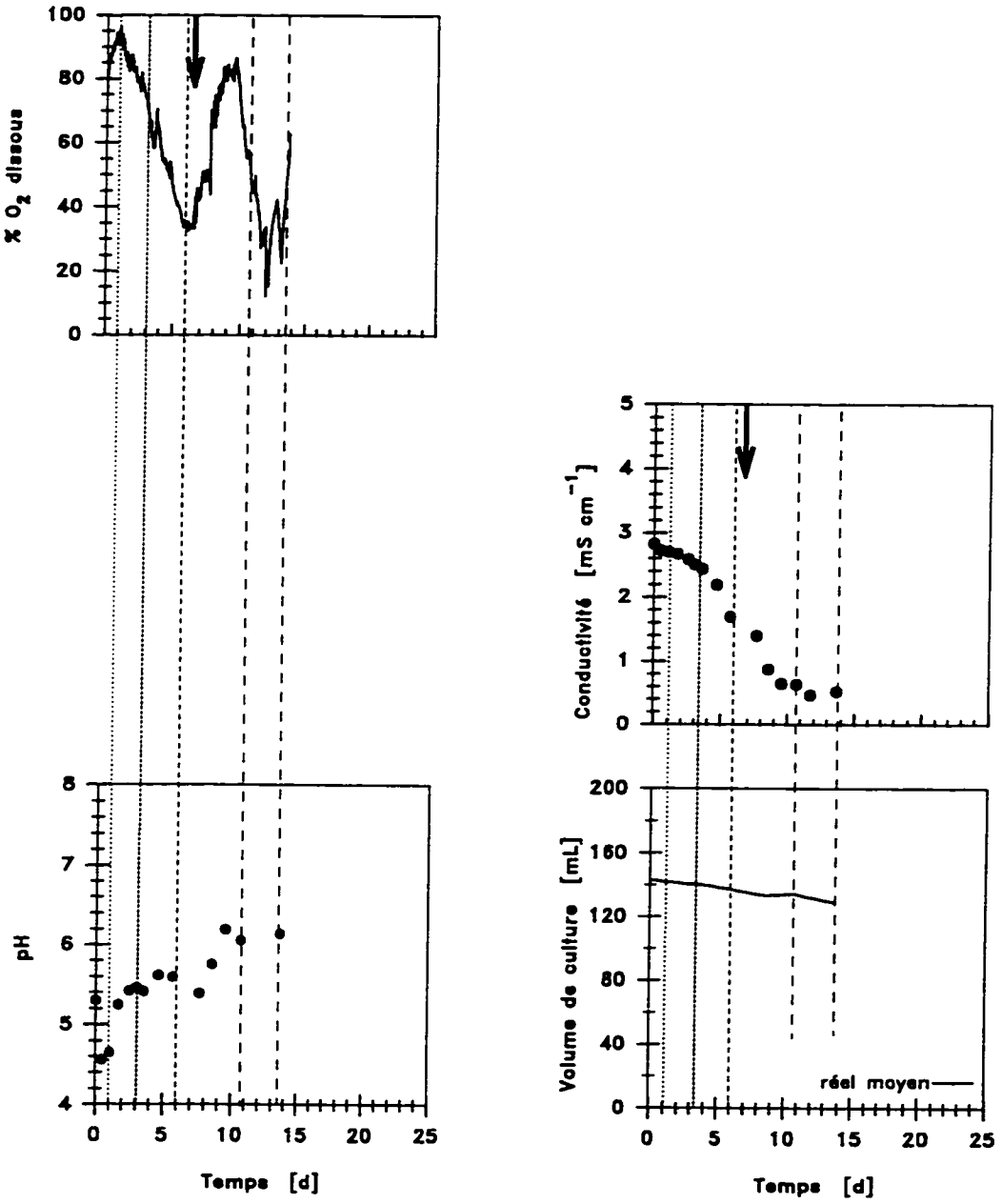


Figure A2.15 Suivi du pH, de la conductivité, de l'OD et du volume de culture de cultures en cuvée et en flacons agités de cellules VVG111 sc27(D6). Culture témoin de la cuvée en bioréacteur H30.

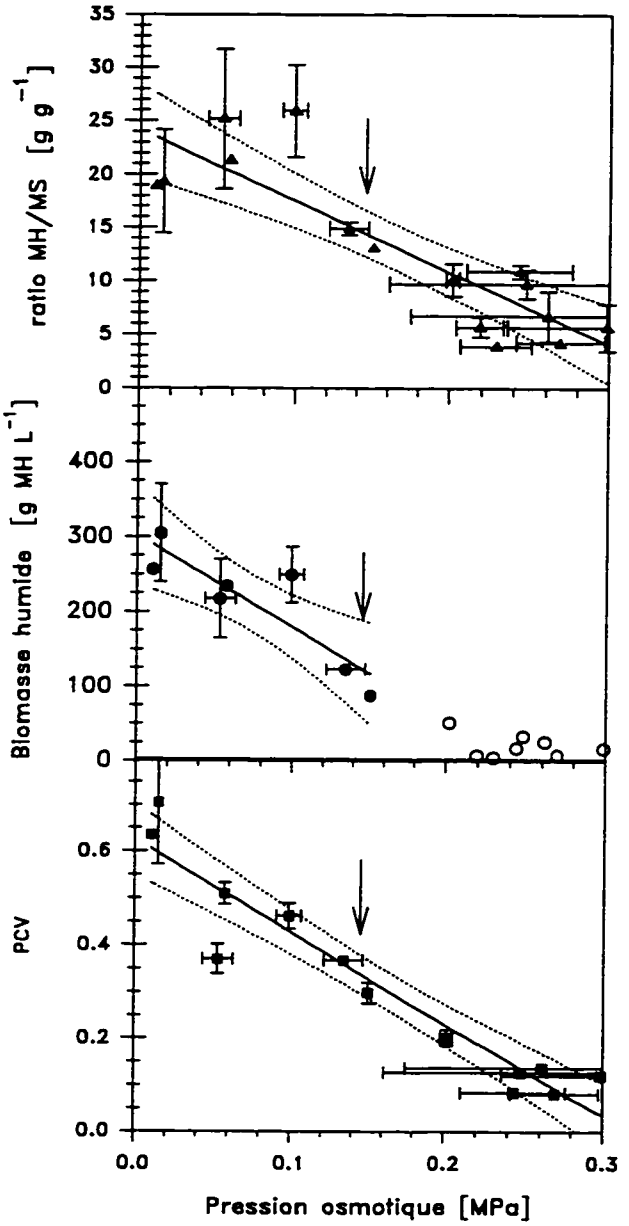


Figure A2.16 Relation entre le PCV, la biomasse humide, le rapport MH/MS et l'osmosité du milieu pour la culture VVG111 sc27(D6). Culture témoin de la cuvée en bioréacteur H30. La flèche indique le moment où OUR est maximum; les lignes pointillées représentent l'intervalle de confiance à 95%.

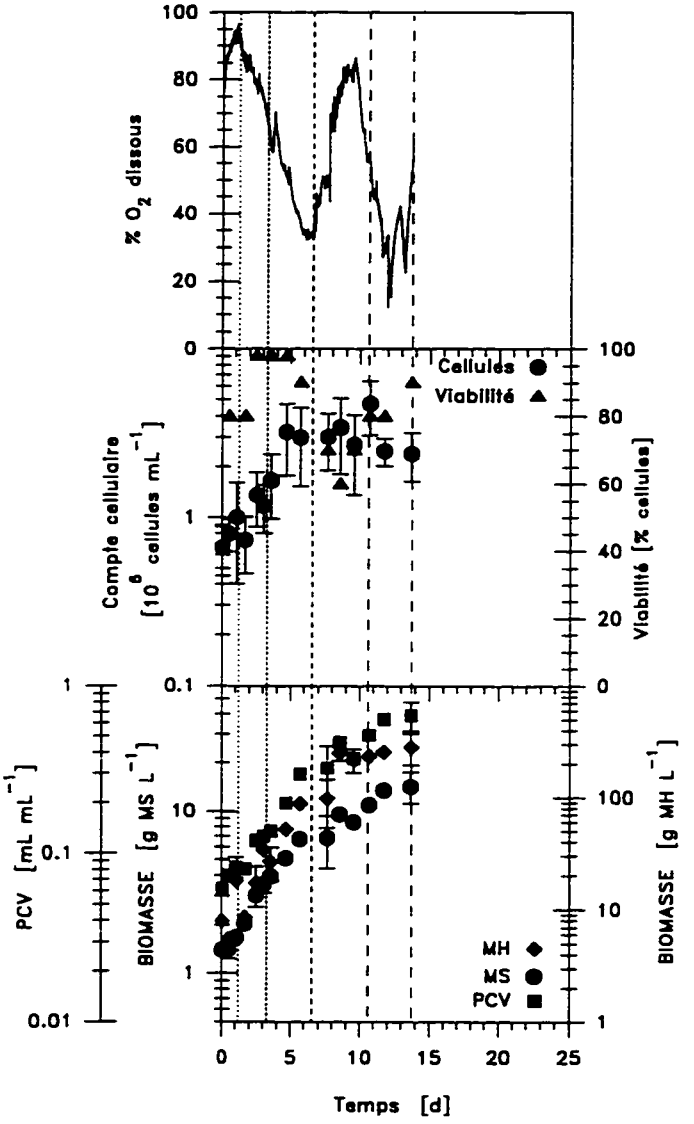


Figure A2.17 Suivi de l'OD et représentation exponentielle des courbe de croissance de cultures en cuvée et en flacons agités de cellules VVG111 sc27(D6). Culture témoin de la cuvée en bioréacteur H30.

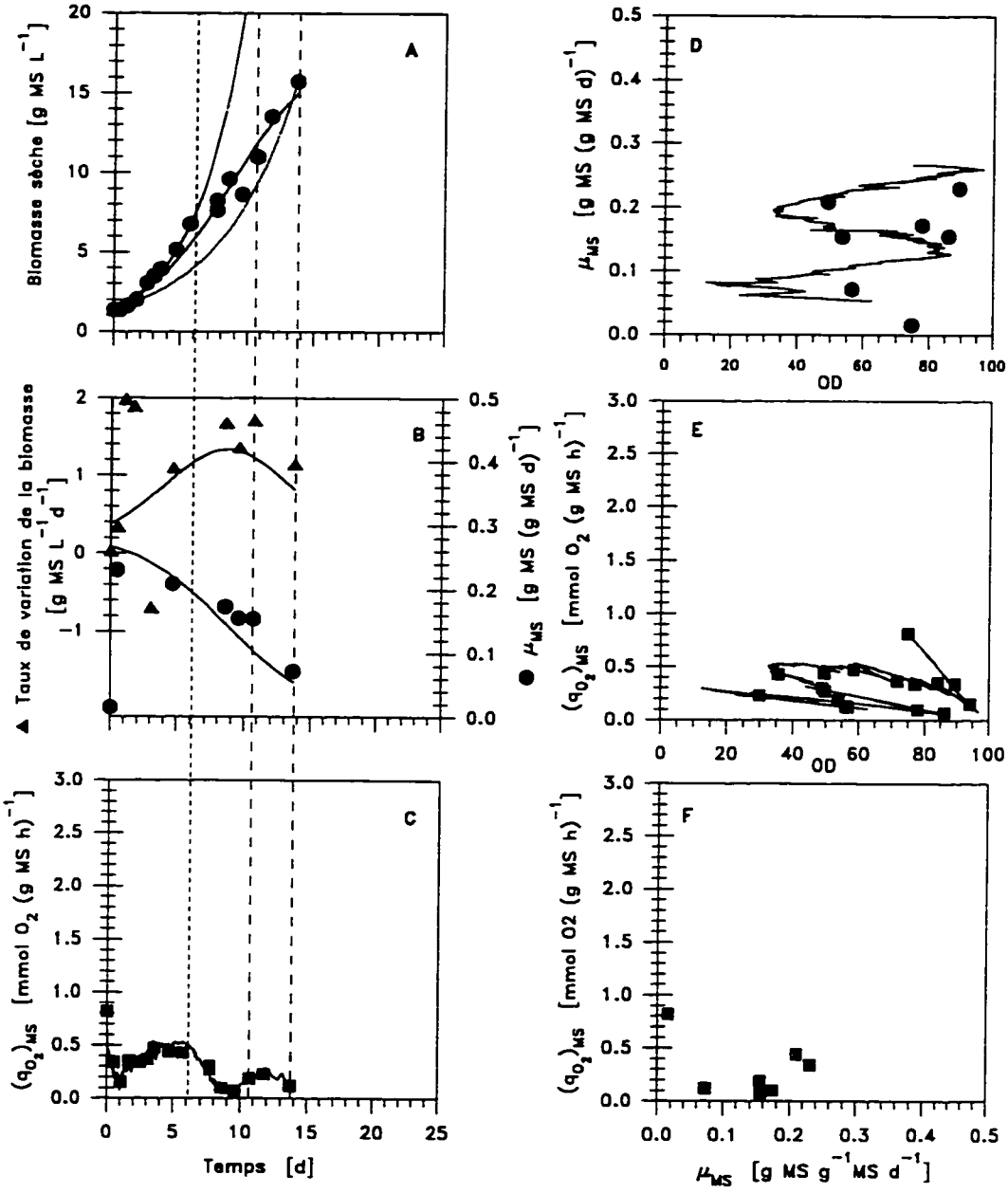


Figure A2.18 Taux spécifique de croissance et d'assimilation d'O_2 évalués sur la base de la biomasse sèche de cultures en cuvée et en flacons agités de cellules VVG111 sc27(D6). Culture témoin de la cuvée en bioréacteur H30; symboles : mesures ou dérivées à partir des mesures; traits pleins: modèle logistique ou paramètre évalués à partir de ce modèle.

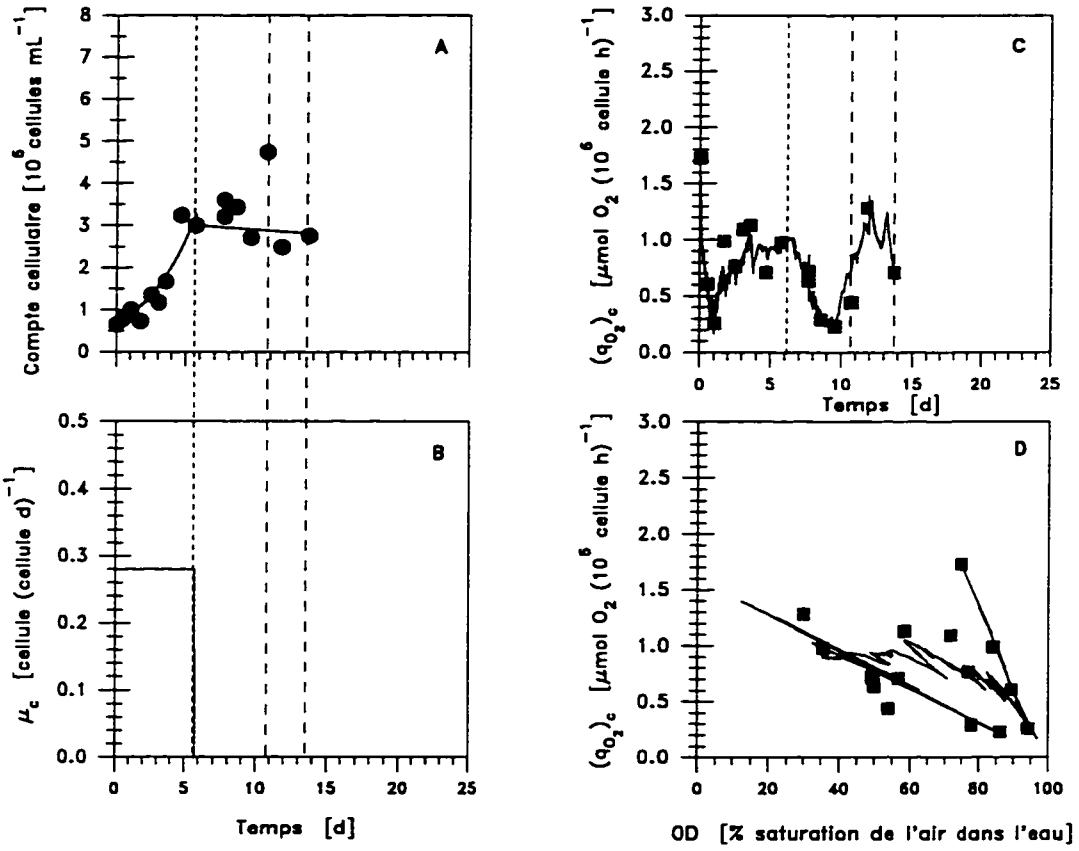


Figure A2.19 Taux spécifique de croissance et d'assimilation d'O_2 évalués sur la base du compte cellulaire de cultures en cuvée et en flacons agités de cellules VVG111 sc27(D6). Culture témoin de la cuvée en bioréacteur H30; symboles : mesures ou calculs basés sur les mesures de biomasses; traits pleins : représentation mathématique de la courbe de croissance évaluée à partir de ce modèle.

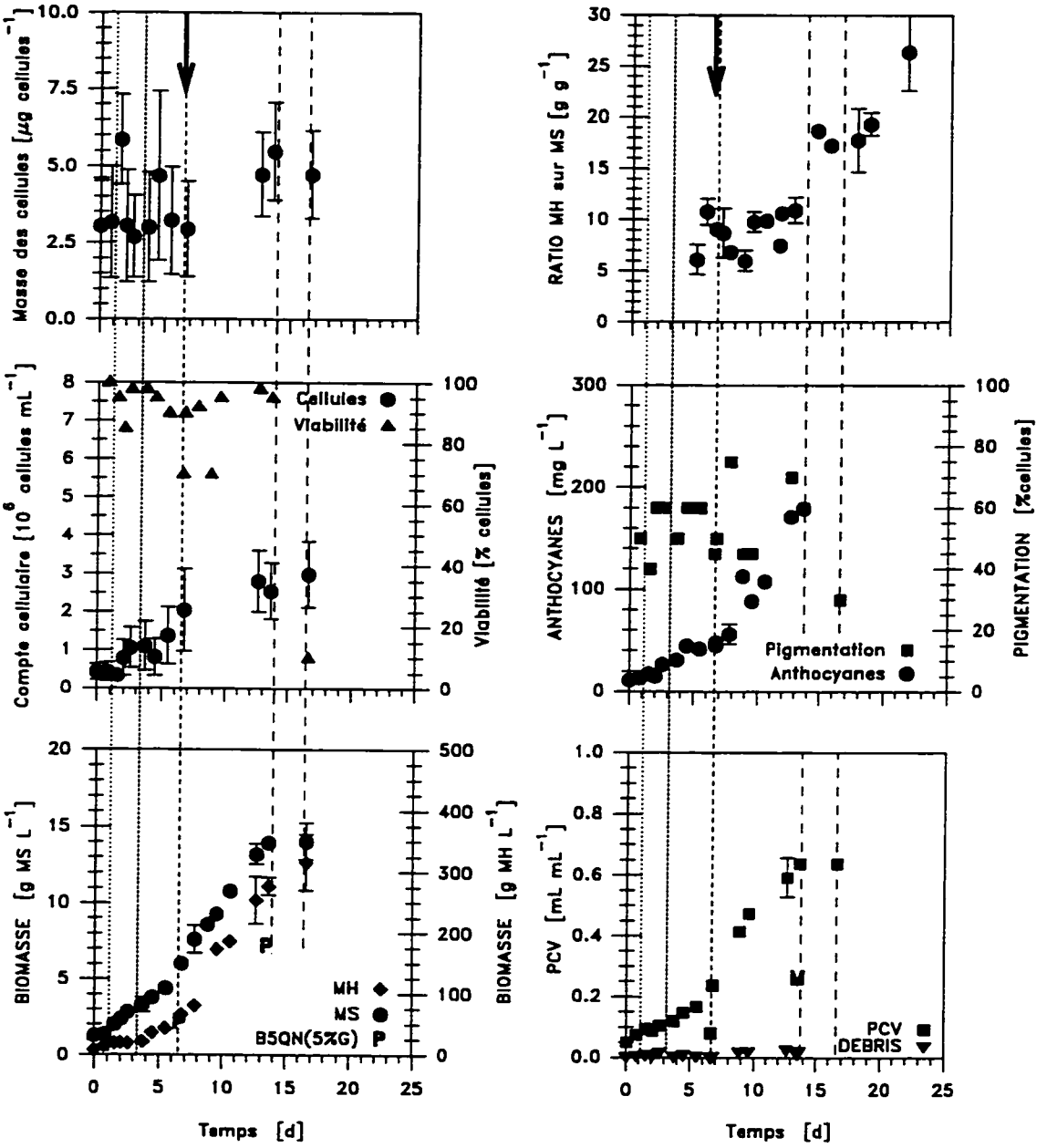


Figure A2.20 Croissance de la biomasse, prolifération cellulaire, production d'anthocyanes, masse des cellules et ratio masse humide sur masse sèche de cultures en cuvée et en flacons agités de cellules VVG111 sc31(D10). Culture témoin des cuvées en bioréacteurs H31 et H32.

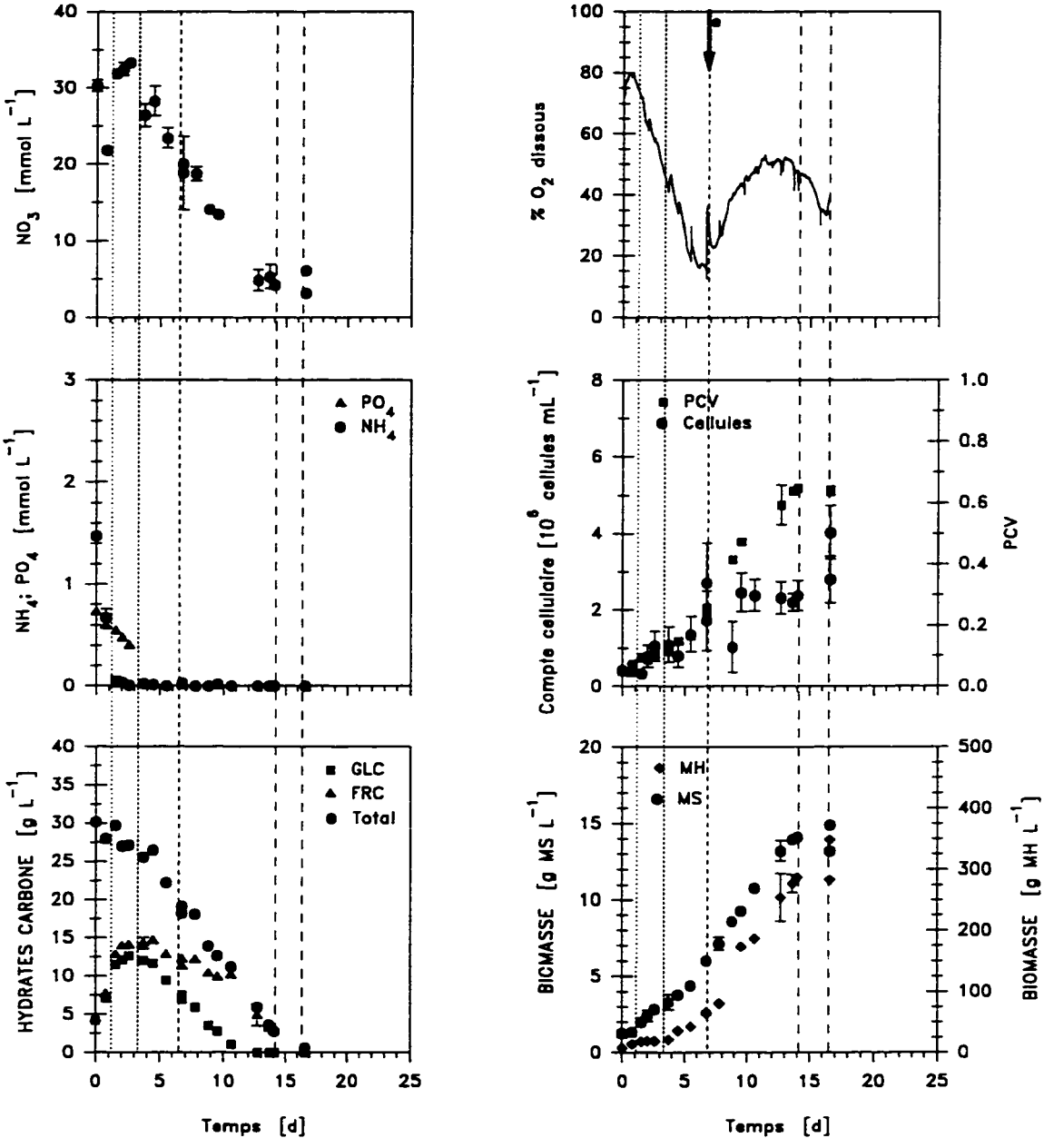


Figure A2.21 Consommation de nutriments, assimilation d'oxygène, croissance de la biomasse et prolifération cellulaire de cultures en cuvée et en flacons agités de cellules VVG111 sc31(D10). Culture témoin des cuvées en bioréacteurs H31 et H32.

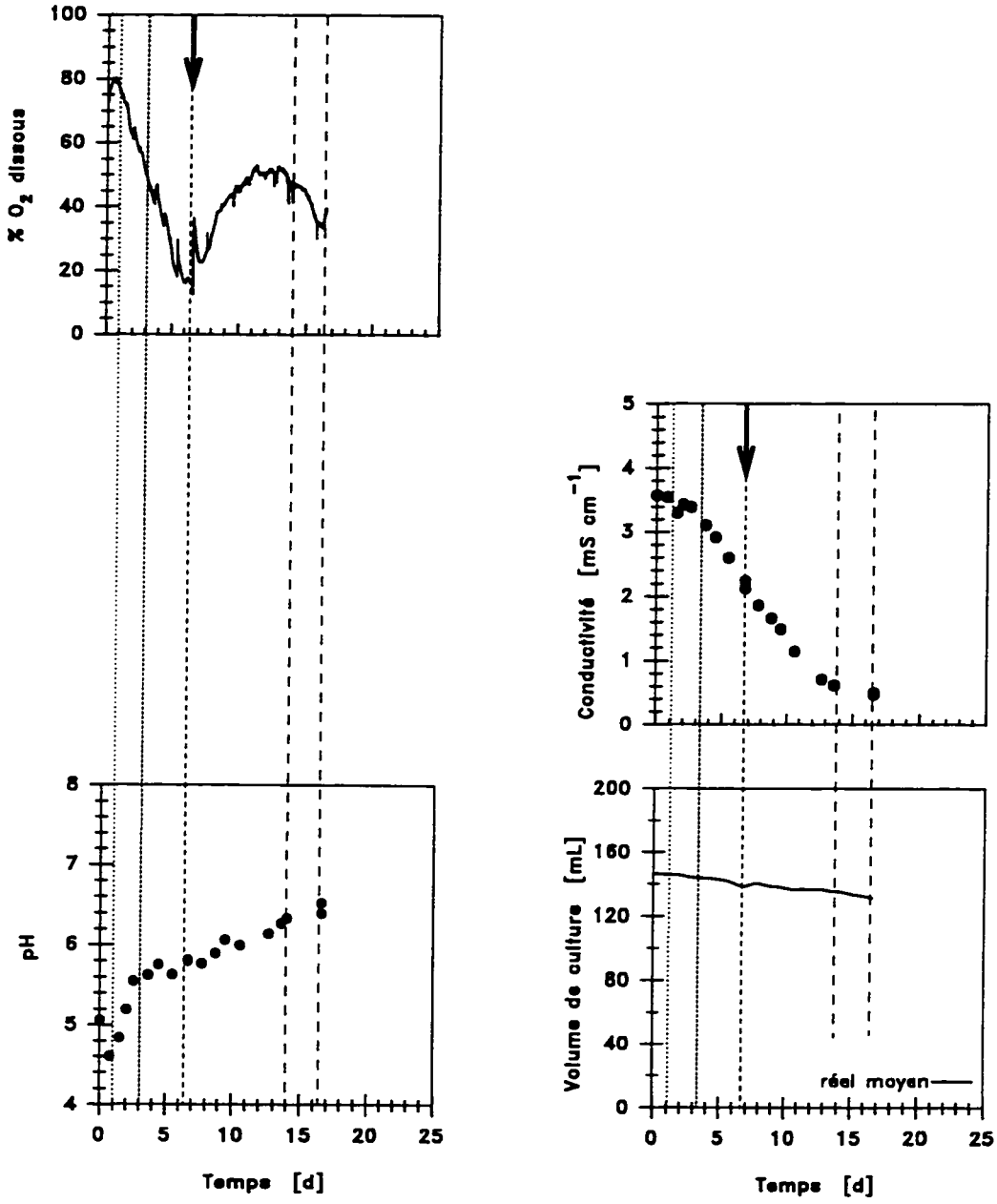


Figure A2.22 Suivi du pH, de la conductivité, de l'OD et du volume de culture de cultures en cuvée et en flacons agités de cellules VVG111 sc31(D10). Culture témoin des cuvées en bioréacteurs H31 et H32.

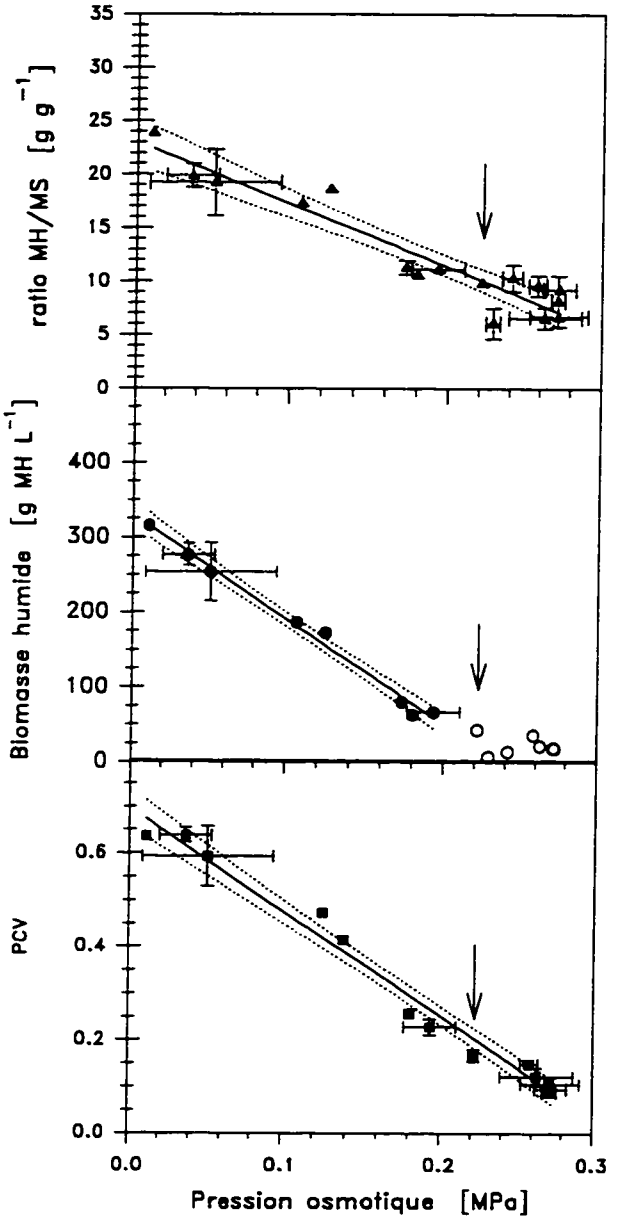


Figure A2.23 Relation entre le PCV, la biomasse humide, le rapport MH/MS et l'osmosité du milieu pour la culture VVG111 sc31(D10). Culture témoin des cuvées en bioréacteur H31 et H32. La flèche indique le moment où OUR est maximum; les lignes pointillées représentent l'intervalle de confiance à 95%.

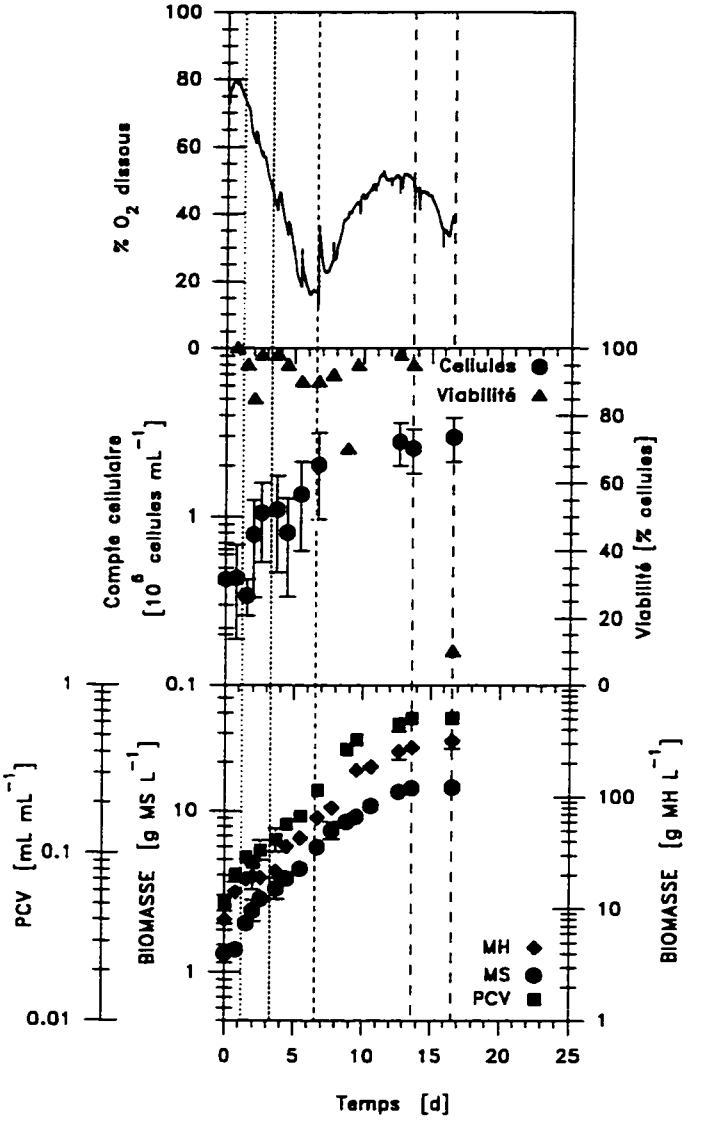


Figure A2.24 Suivi de l'OD et représentation exponentielle des courbe de croissance de cultures en cuvée et en flacons agités de cellules VVG111 sc31(D10). Culture témoin des cuvées en bioréacteurs H31 et H32.

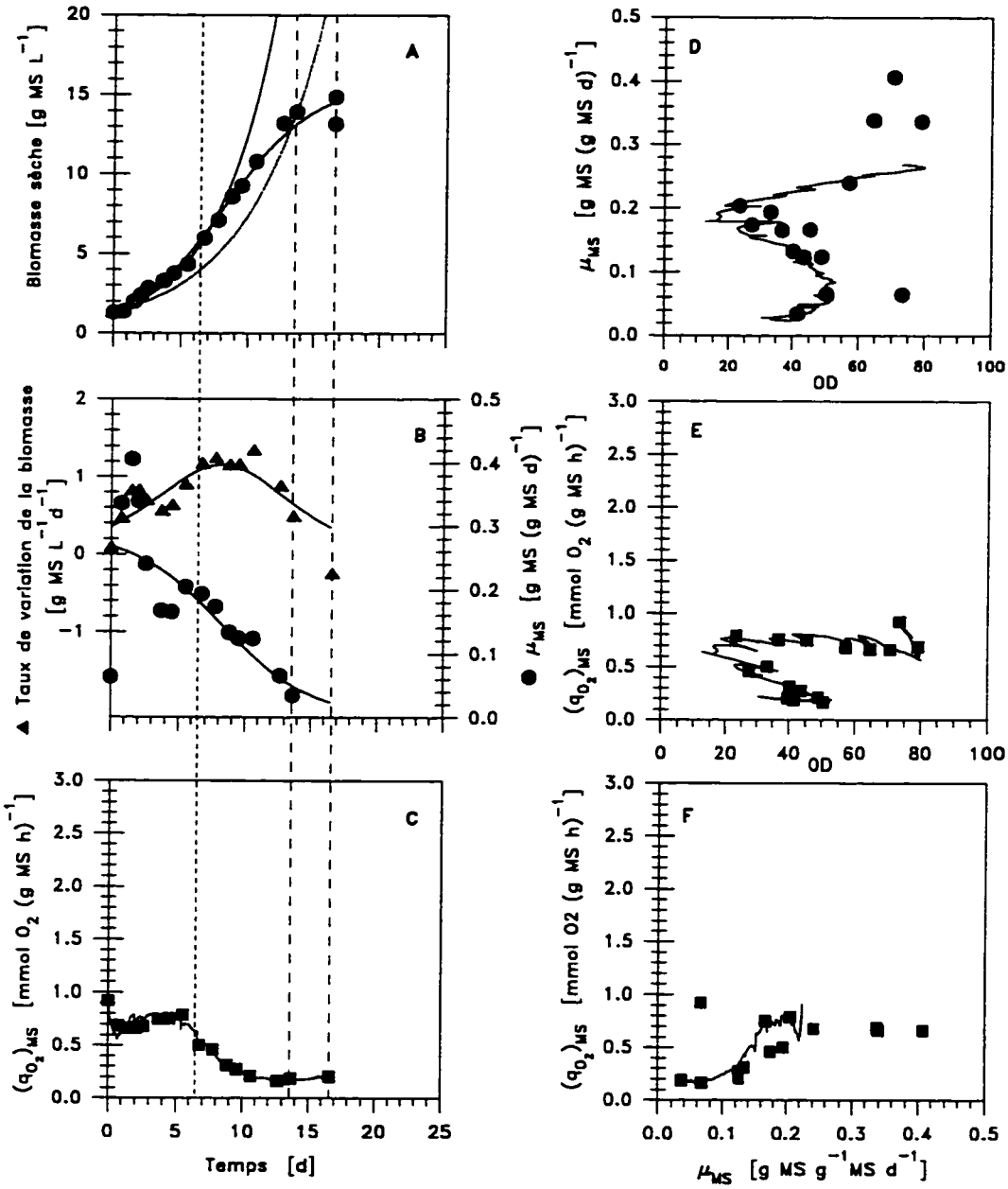


Figure A2.25 Taux spécifique de croissance et d'assimilation d'O_2 évalués sur la base de la biomasse sèche de cultures en cuvée et en flacons agités de cellules VVG111 sc31(D10). Culture témoin des cuvées en bioréacteurs H31 et H32; symboles : mesures ou dérivées à partir des mesures; traits pleins: modèle logistique ou paramètre évalués à partir de ce modèle.

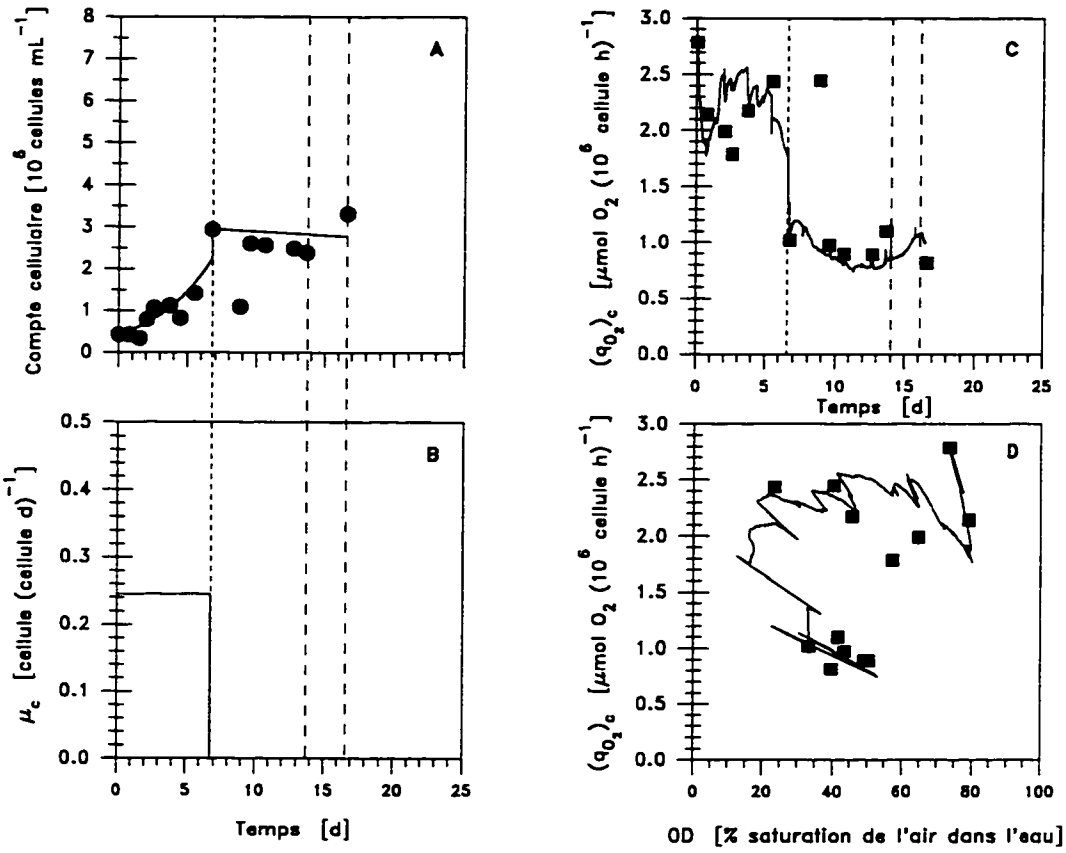


Figure A2.26 Taux spécifique de croissance et d'assimilation d'O_2 évalués sur la base du compte cellulaire de cultures en cuvée et en flacons agités de cellules VVG111 sc31(D10). Culture témoin des cuvées en bioréacteurs H31 et H32; symboles : mesures ou calculs basés sur les mesures de biomasses; traits pleins : représentation mathématique de la courbe de croissance évaluée à partir de ce modèle.

A3. CULTURES EN BIORÉACTEURS AVEC CONTRÔLE DE LA CONCENTRATION D'OXYGÈNE DISSOUS

Des cultures en cuvée en bioréacteurs ont été effectuées dans les bioréacteurs à double ruban hélicoïdal afin d'étudier l'effet de la concentration d'OD sur la croissance des cellules de *Vitis vinifera*. Les résultats présentés ici sous forme de courbes évolutives sont ceux analysés spécifiquement dans le chapitre 4. Des cultures en flacons agités ont été effectuées parallèlement à toutes les cultures en bioréacteurs comme cultures témoins. Certaines de ces cultures ont été l'objet d'une analyse plus poussée au chapitre 3 ainsi que dans l'annexe 2.

A3.1 CONDITIONS EXPÉRIMENTALES ET PRÉSENTATION DES RÉSULTATS

Les lignées cellulaires VVG12, VVG105, VVG109 et VVG111 ont été cultivées dans les conditions décrites au chapitre 2 (Tableau 2.1). Un index détaillé des figures représentant la progression de divers paramètres décrivant l'état de toutes ces cultures est présenté au tableau A3.1. Des lignes verticales jalonnent les graphes mettant de l'emphase sur les moments où le milieu est épuisé en NH_4, en PO_4 et en hydrates de carbones, et où l'OUR atteint un maximum selon la nomenclature présentée au tableau A2.1, page 243.

Rappelons que pour les flacons témoins la mesure de pH est celle du surnageant après décantation de la biomasse. Lorsque des mesures de pH ont été faites en ligne dans les bioréacteurs, elles sont représentées par un trait continu. Les mesures du pH du surnageant des échantillons soutirés des bioréacteurs sont représentés par des cercles pleins. Le volume des cultures en flacons agités correspond au volume moyen de tous les flacons témoins d'une même expérience compte tenu de l'échantillonnage périodique et de la perte de volume par évaporation. Pour les bioréacteurs, le volume réel correspond au volume de culture dans le bioréacteur compte

tenu de l'évaporation du liquide et de l'échantillonnage alors que le volume dit 'équivalent' néglige l'effet de l'échantillonnage puisque celui-ci est homogène. Toutes les concentrations sont exprimées par unité de volume initial de culture et les mesures de concentrations de nutriments ont été corrigées pour considérer le volume occupé par la biomasse. Ainsi, les concentrations sont rapportées sur une base comparable. Les barres d'erreur correspondent à la déviation standard des mesures pour les échantillons répétés des cultures en flacons agités.

À l'exception des cultures effectuées dans le milieu B5QN (cuvées H24 à H26), le milieu deculture des flacons témoins était le même que celui utilisé pour les cultures en bioréacteurs, permettant ainsi la comparaison des indices d'augmentation de la biomasse sèche.

Toutes les cultures effectuées sont représentées mis à part une culture où la sonde d'OD a fait défaut (H14, VVG12 sc58). La cuvée H16 (VVG12 sc60) montrait plusieurs signes de mauvais fonctionnement. Un milieu de culture brunâtre typique d'une production de phénols ou, dans le cas de production d'anthocyanes, d'une lyse cellulaire et d'une oxydation du produit, a été observé. Aucune contamination n'était observable au microscope en cours de culture. Pour la cuvée H15 (VVG105 sc58), la présence d'azote dans le système d'alimentation gazeuse causée par la commande d'une injection d'azote dans un réacteur opéré simultanément n'a pas permis de maintenir adéquatement la consigne de concentration d'OD à 70%. La concentration d'OD a été maintenue à 70% les trois premiers jours de la culture pour se stabiliser par la suite à 40% d'OD.

Tableau A3.1 Index des figures représentants les résultats des cultures en cuvée en bioréacteurs

Cuvée	Flacons témoins			Bioréacteurs			
	Croissance Viabilité Acy Rapport MH/MS	Nutriments OD Croissance	Comparaison Indices augmentation biomasse	Croissance Viabilité Acy Masse spécifique des cellules Rapport MH/MS	OD OUR Vitesse d'agitation pH Conductivité Volume	Nutriments q_{O2} Croissance	q_{O2} Croissance
	Fig. *page*	Fig. *page*	Fig. *page*	Fig. *page*	Fig. *page*	Fig. *page*	Fig. *page*
H09	A2.1, *250*	A2.2, *251*	A3.10, *295*	A3.11, *296*	A3.12, *297*	A3.13, *298*	A3.14, *299*
H10	A2.3, *252*	A2.4, *253*	A3.5, *290*	A3.6, *291*	A3.7, *292*	A3.8, *293*	A3.9, *294*
H11	A2.5, *254*)	A2.6, *255*	A3.15, *300*	A3.16, *301*	A3.17, *302*	A3.18, *303*	A3.19, *304*
H12	A3.45, *330*	A3.46, *331*	A3.47, *332*	A3.48, *333*	A3.49, *334*	A3.50, *335*	A3.51, *336*
H13				A3.20, *305*	A3.21, *306*	A3.22, *307*	A3.23, *308*
H15				A3.31, *316*	A3.32, *317*	A3.33, *318*	A3.34, *319*
H16	A3.24, *309*	A3.25, *310*	A3.26, *311*	A3.27, *312*	A3.28, *313*	A3.29, *314*	A3.30, *315*
H17	A3.24, *309*	A3.25, *310*	A3.40, *325*	A3.41, *326*	A3.42, *327*	A3.44, *329*	A3.43, *328*
H18	A3.24, *309*	A3.25, *310*	A3.35, *320*	A3.36, *321*	A3.37, *322*	A3.38, *323*	A3.39, *324*
H20	A3.52, *337*	A3.53, *338*	A3.54, *339*	A3.55, *340*	A3.56, *341*	A3.57, *342*	A3.58, *343*
H21	A3.52, *337*	A3.53, *338*	A3.59, *344*	A3.60, *345*	A3.61, *346*	A3.62, *347*	A3.63, *348*
H22	A3.52, *337*	A3.53, *338*	A3.64, *349*	A3.65, *350*	A3.66, *351*	A3.67, *352*	A3.68, *353*
H24	A3.69, *354*	A3.70, *355*		A3.71, *356*	A3.72, *357*	A3.73, *358*	A3.74, *359*
H25	A3.69, *354*	A3.70, *355*		A3.75, *360*	A3.76, *361*	A3.77, *362*	A3.78, *363*
H26	A3.69, *354*	A3.70, *355*		A3.79, *364*	A3.80, *365*	A3.81, *366*	A3.82, *367*
H28	A2.7, *256*	A2.8, *257*	A4.6, *379*	A4.7, *380*	A4.8, *381*	A4.9, *382*	A4.10, *383*

Comme l'indique le relargage dans le milieu de culture d'ions NH_4 (Figure A3.18), la culture H11 (VVG105 sc50) a subi les contrecoups d'une brève panne du système de contrôle qui a occasionné un arrêt de l'aération et de l'agitation et provoqué une chute de la concentration d'OD. Le contrôle a été rapidement rétabli bien que des erreurs de manipulations ait empêché l'enregistrement des variables mesurées. Le déficit d'aération n'a pas engendré de baisse notable de la concentration de biomasse ou de la concentration cellulaire. Toutefois, elle a vraisemblablement été la cause d'une lyse cellulaire puisque la concentration mesurée d'ion NH_4 dans le milieu de culture a augmenté à 0,6 mmol NH_4 L^{-1} dès la fin de la panne, le NH_4 libéré provenant de la réduction des ions nitrate en ions ammonium par les cellules. Le taux apparent de réassimilation de ces ions d'environ 0,1 mmol NH_4 L^{-1} d^{-1}, a été quatre fois moins élevé qu'en début de culture, 0,4 mmol NH_4 L^{-1} d^{-1}, indiquant que le stress subi a résulté en une lyse d'une partie de la population cellulaire, probablement étalée sur une période de 2 à 3 jours.

A3.2 RÉSULTATS ET CALCULS

A3.2.1 Viabilité

La proportion des débris cellulaires n'a jamais dépassé 1 à 2% du volume de la biomasse sauf pour la cuvée H16 (VVG12, sc60) qui, comme il a été indiqué plus haut, a montré plusieurs autres signes de sénescence. La viabilité de toutes les cultures est demeurée élevée et relativement constante. La liste des viabilités initiales, minimales et moyennes de toutes les cuvée est présentée au tableau A3.2 : la viabilité moyenne a varié entre 89 et 97% alors que la valeur minimale de viabilité observée était de 60%. La viabilité des cellules isolées était toujours élevée à environ 95% à 100%. Contrairement aux cuvées présentées à l'annexe 2, les cultures en cuvée en bioréacteurs n'ont pas été poursuivies suffisamment longtemps pour obtenir un échantillon après l'épuisement complet de la source d'hydrates de carbone. Il n'est donc pas possible de confirmer l'effet négatif de cet épuisement sur la viabilité observé avec les flacons agités des lignées VVG105 et 111. Seules les viabilités des cultures effectuées à une concentration d'OD de 10%

Tableau A3.2 Viabilité des cultures en cuvée en bioréacteurs

Lignée cellulaire	OD [%]	Milieu de culture	Cuvée	Viabilité [%]				nombre de mesures
				Initiale	minimale	moyenne	intervalle confiance 95%	
VVG105 sc58	10	B5	H10	98	86	94	5,8	7
sc53	30		H09	98	95	97	1,2	9
sc64	50		H11	98	70	95	6,4	10
VVG12 sc58	10	B5DN	H13	ND	85	94	5,4	6
sc58	70_{4d}-40		H15	ND	92	96	2,4	6
sc60	30		H16	95	40	69	19	7
sc60	42		H18	95	60	89	8,0	5
sc60	50		H17	95	70	91	8,6	7
sc57	90		H12	90	70	93	5,4	11
sc64	20	B5	H20	98	70	94	9,7	5
sc64	30		H21	95	70	89	13,6	5
sc64	70		H22	98	80	93	8,9	5
VVG109 sc37	54	B5QN	H24	99	95	97	1,5	6
sc37	60		H25	99	95	97	1,8	6
sc37	NC		H26	95	85	94	6,0	6
VVG111 sc20	50	B5	H28	40	40	77	12	9

SC Sans contrôle de l'OD
ND Non disponible

ou de celle effectuée sans contrôle de la concentration d'oxygène, résultant en des concentrations d'OD demeurant sous 10%, ont décliné, y compris pour les amas de moins de 100µm, indiquant qu'une concentration d'oxygène dissous de 10% ou moins est limitante.

A3.2.2 Hydrolyse du saccharose

La consommation des hydrates de carbone est précédée d'une hydrolyse du saccharose initialement présent dans le milieu de culture. Le taux spécifique d'hydrolyse du saccharose (q_h) en glucose et en fructose, calculés pour les lignées VVG12, VVG105 et VVG111 sont présentés au tableau A3.3. Comme pour les cultures en flacons agités, la consommation de l'ion nitrate, elle, est très faible tant que l'ion ammonium est présent dans le milieu.

Tableau A3.3 Taux spécifiques d'hydrolyse du saccharose

Lignée	Milieu de culture	q_h ± intervalle de confiance 95% [g g^{-1} MS d^{-1}]
VVG105	B5	1,8 ± 0,7
VVG12	B5QN	3,1 ± 0,5
VVG111	B5	6,9 ± 0,7
Toutes lignées et conditions confondues		4,9 ± 1,0

A3.2.3 Oxygénation des amas cellulaires

Les cellules de *V. vinifera* ont tendance à croître en amas. Cette tendance a surtout été observée lors des trois à quatre premiers repiquages suivant le transport sans agitation des flacons de nouvelles lignées cellulaires du CRDA à Polytechnique. La croissance en amas, surtout lorsque les amas sont denses et par opposition aux agrégats lâches, peut avoir des répercussions importantes puisqu'elle peut entraîner la présence de limitation locale en oxygène.

Certaines cultures ont été effectuées avec des cultures contenant encore de gros amas cellulaires: c'est le cas notamment de la première cuvée effectuée avec la lignée VVG12 (90% d'OD) pour laquelle, de mémoire, les amas atteignaient 3mm et le diamètre moyen devait être environ de 2mm. À l'autre extrême, le plan expérimental comportait des cultures à faible concentration d'OD (10%) qui ont pu subir des limitations locales en oxygène. Ainsi, il est pertinent de vérifier cette possibilité.

Considérant la concentration d'OD dans le réacteur, OD_b, maintenue constante par l'action du contrôleur et homogène dans tout le réacteur, et la croissance de la biomasse lente par rapport aux taux d'assimilation d'O_2, on pose un profil de concentration d'OD établi tel qu'illustré à la figure A3.1.

Le bilan de masse de l'oxygène à l'intérieur de l'amas pour un terme réactif d'ordre 0 (où q_{O_2} est considéré constant et indépendant de la concentration d'OD) donne : [167]

$$OD(r) = OD_i - \frac{\overline{q_{O_2}}\ \overline{\rho_x}}{6 \cdot \mathcal{D}} \left(R^2 - r^2 - \frac{2R_0^3}{r} + \frac{2R_0^3}{R} \right) \qquad \text{(A11)}$$

où r représente une position arbitraire à l'intérieur de l'amas cellulaire;

R, le rayon moyen de l'amas;

R_0, le rayon tel que à $r = R_0$, $dOD/dt = 0$ et $OD = OD_\alpha$;

OD_i, la concentration d'OD à l'interface amas-liquide;

$\overline{\rho_x}$, la masse volumique des cellules permet d'exprimer le taux spécifique d'assimilation d'oxygène, q_{O_2}, sur une base volumique; elle est évaluée par la relation

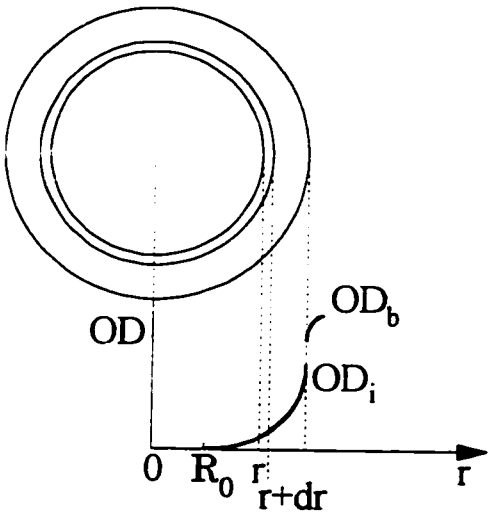


Figure A3.1 Profil de concentration d'OD autour d'un amas cellulaire.

$\overline{\rho_x} = \overline{x_{MS}/(0{,}5 \cdot PCV)}$ et varie typiquement de 40 à 60 g MS L^{-1} de biomasse pour la phase exponentielle des cultures en flacons agités;

et $\mathcal{D}$, la diffusivité effective de l'oxygène dans les amas, assimilée à la diffusivité de l'O_2 dans l'eau, $2{,}5 \cdot 10^{-9}$ m^2 s^{-1}, [118] puisque les membranes cellulaires n'opposent pas de résistance au transfert d'O_2.

Le bilan de masse à l'extérieur de l'amas est le suivant :

$$N_{O_2} = k_s a_s (OD_b - OD_i) = \overline{q_{O_2}}\ \overline{\rho_x} \tag{A12}$$

où N_{O_2} représente le flux d'oxygène à la surface des amas;

k_s, le coefficient de transfert d'O_2 à l'interface liquide-solide;

et a_s, la surface spécifique des amas.

Cette surface spécifique est définie par la relation :

$$a_s = \frac{\text{Surface externe}}{\text{Volume effectif}} = \frac{3R^2}{R^3 - R_0^3}. \tag{A13}$$

Faisant l'hypothèse d'une vitesse relative nulle entre les amas et le liquide, le coefficient de transfert est estimé à partir du nombre de Sherwood, égal à 2 dans ces conditions de mélange, et définit comme suit : [48]

$$Sh = \frac{k_s(2R)}{\mathcal{D}} = 2. \tag{A14}$$

Substituant les équations (A13) et (A14) dans l'équation (A12), on obtient une expression de la concentration d'OD à l'interface en fonction de la concentration d'OD dans la masse du liquide :

$$OD_i = OD_b - \frac{\overline{q_{O_2}}\ \overline{\rho_x}}{6\mathcal{D}}\left(\frac{2R^3 - 2R_0^3}{R}\right) \tag{A15}$$

Ainsi, remplaçant OD_i dans l'équation (A11) par l'expression qui la décrit dans l'équation (A15), la concentration d'OD en fonction de la position dans l'amas est donnée par la relation :

$$OD(r) = OD_i - \frac{\overline{q_{O_2}\,\rho_x}}{6 \cdot \mathcal{D}} \left(2R^2 - \frac{2R_0^3}{R} + R^2 - r^2 - \frac{2R_0^3}{r} + \frac{2R_0^3}{R} \right) \tag{A16}$$

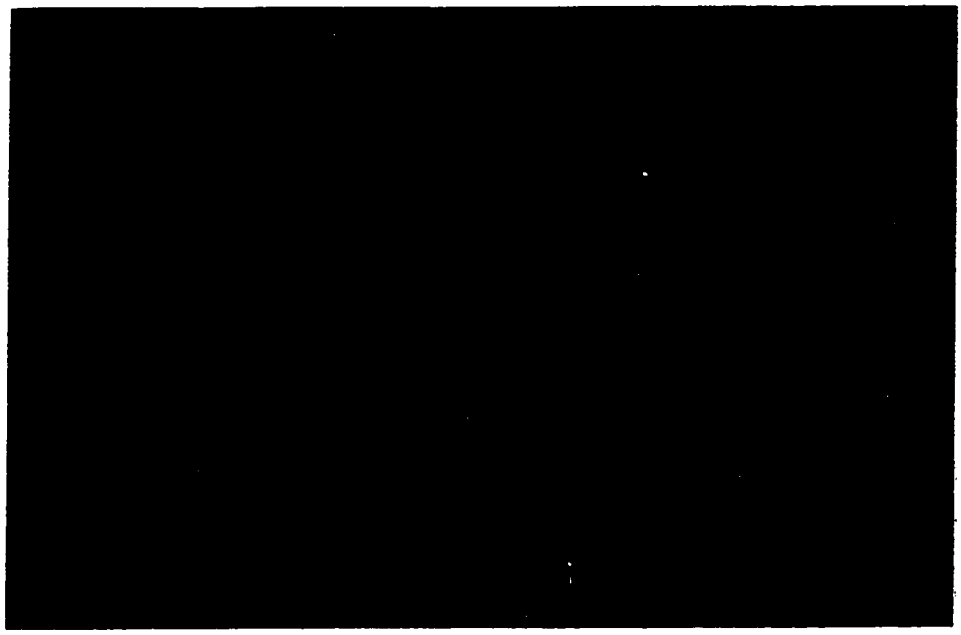
Nous sommes intéressés à évaluer la proportion du volume des amas cellulaire qui est oxygénée pour diverses concentration d'OD dans le bioréacteur et sur une plage de taux spécifiques d'assimilation d'O_2. Pour une cinétique d'ordre 0, représentant des conditions extrêmes par rapport à une cinétique d'ordre 1 ou de type Michaelis-Menten, l'efficacité représente le ratio du volume des particules sphériques dans lequel le substrat est présent sur leur volume total et est définit par :

$$\eta = 1 - \left(\frac{R_0}{R} \right)^3. \tag{A17}$$

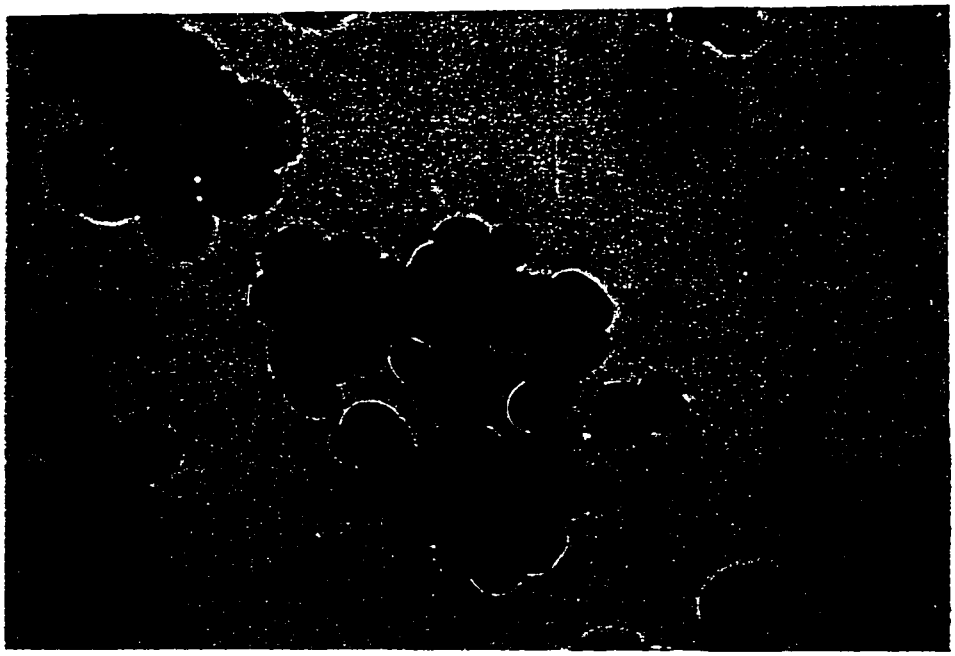
Or, R_0 a été défini de telle façon que à $r = R_0$, $dOD/dt = 0$ et $OD(r) = OD_{cr}$. En substituant ces valeurs dans l'équation (16) et en la remaniant, il est possible d'exprimer R_0/R en fonction de paramètres connus :

$$\frac{R_0}{R} = \sqrt{1 - \frac{2 \cdot \mathcal{D} \cdot (OD_b - OD_{cr})}{\overline{q_{O_2}}\ \overline{\rho_x} \cdot R^2}} \tag{A18}$$

La distribution des diamètres des amas cellulaires n'a pas été mesurée. Par contre, comme l'illustre les photos présentées à la figure A3.2, lorsque les cellules croissent en amas ou en agrégats, ceux-ci sont d'un diamètre de l'ordre de 100 à 300 µm. Certains amas cependant étaient plus volumineux et, comme nous l'avons évoqué plus haut, pour la cuvée effectuée à 90% d'OD avec la lignée VVG12 le diamètre moyen était plutôt de l'ordre de 2 mm.



100 µm



100 µm

Figure A3.2 Amas cellulaires typiques de V. vinifera. Photographies au microscope optique en contraste de phase. Lignée cellulaire VVG111.

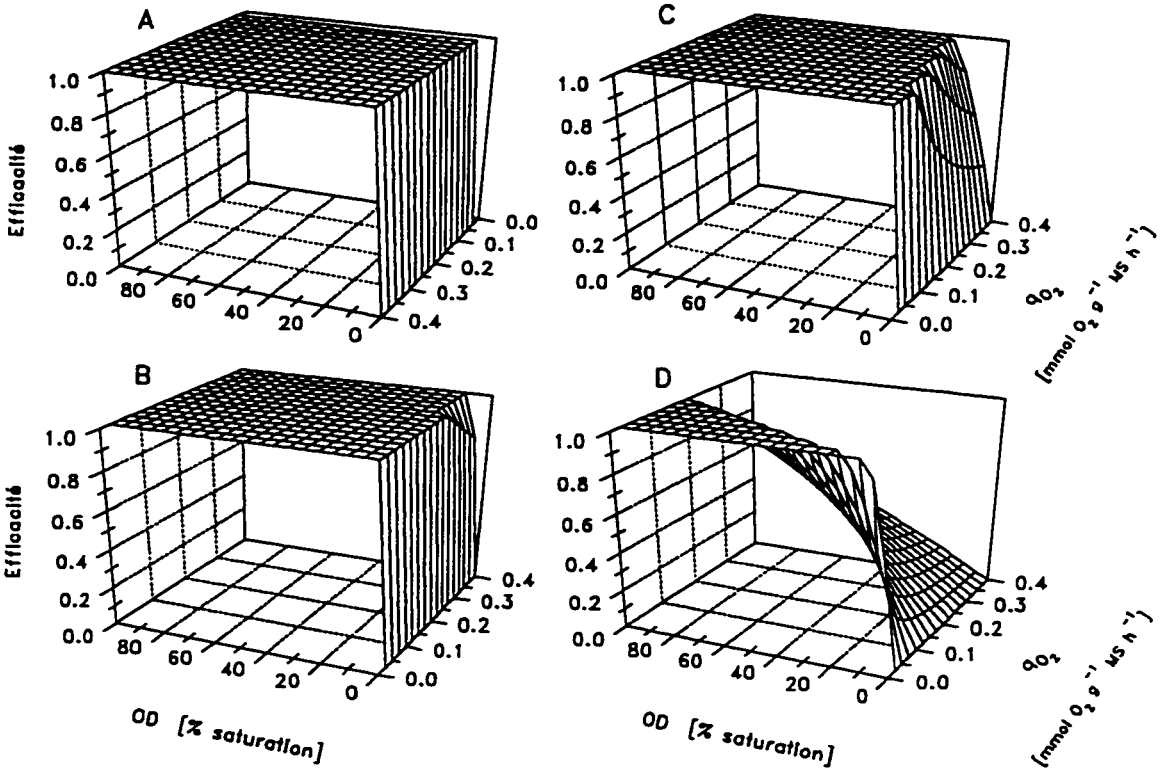


Figure A3.3 Proportion aérée des amas cellulaires de divers diamètres en fonction de la concentration d'OD et du taux spécifique d'assimilation d'O_2. Diamètres : A, 100µm; B, 300µm; C, 500µm; D, 1500µm.

La figure A3.3 présente l'efficacité calculée en fonction de la concentration d'OD maintenue dans le milieu pour des diamètre de 100, 300, 500 et 1500 µm et considérant que 5% d'OD constitue une concentration critique. La plage de taux spécifiques d'assimilation d'O_2 utilisée est de 0 à 0,4 mmol O_2 (g MS h)$^{-1}$, qui est le taux maximum mesuré au cours des cultures, alors que les taux mesurés pour les cuvée effectuées à 10% et à 90% d'OD qui sont celles qui motivent cette vérification atteignaient au maximum 0,15 mmol O_2 (g MS h)$^{-1}$. On constate que pour des diamètres de 100 et de 300 µm les efficacités sont égales à 1 pour des concentrations d'OD_b de 10% et plus, mais que pour des amas cellulaires de 500 µm, une concentration d'OD_b inférieure à 20% ne peut plus supporter des $(q_{O_2})_{MS}$ plus grand que 0,2 mmol O_2 (g MS h^{-1}).

Afin de pouvoir mieux relier chaque concentration d'OD maintenue dans les cultures au diamètre limite des amas pour lesquels la concentration au centre devrait être au minimum égale à

OD_{cr} compte tenu des taux spécifiques mesurés d'assimilation d'O_2, un courbe des diamètres maximum a été construite en posant $R_0 = 0$ dans l'équation (A18) tel que :

$$D_{lim} = 2 \cdot R = 2 \sqrt{\frac{2 \cdot \mathcal{D} \cdot (OD_b - OD_{cr})}{\overline{q_{O_2}}\ \overline{\rho_x}}}. \qquad (A19)$$

En fixant la masse volumique de la biomasse au maximum de sa plage et en considérant une concentration critique d'OD, les valeurs calculées de D_{lim} sont minimisées. La figure A3.4 permet de visualiser la valeur de ces diamètres pour chacune des conditions d'oxygénation testées. On constate que, de façon générale, seule la concentration de 10% d'OD est susceptible de poser problème en plus des conditions particulières de la culture effectuée à 90% d'OD.

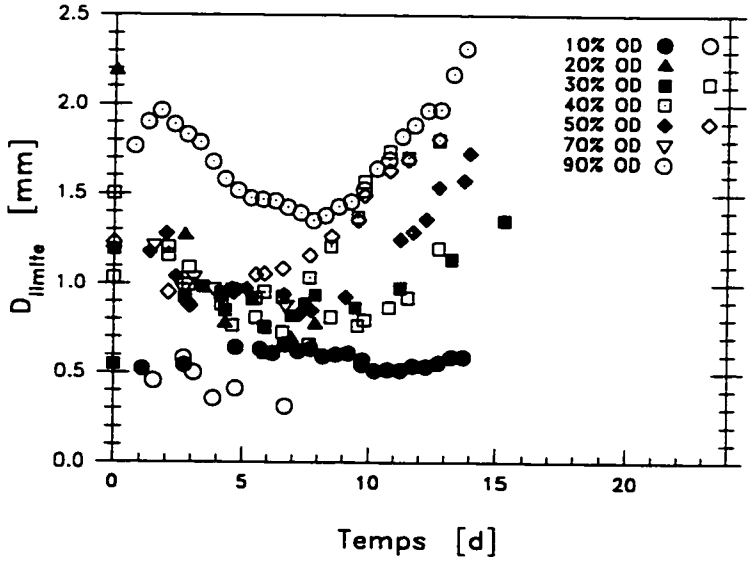


Figure A3.4 ***Diamètre limite pour une oxygénation adéquate des amas cellulaires pour chaque concentration d'OD testée en bioréacteur en fonction des taux spécifiques d'assimilation d'O_2 maximal mesurés. Base de calcul: $\rho_x = 40\ g\ mL^{-1}$; région délimitée par les lignes pointillées : grosseur des amas observés (à l'exception de la culture à 90% d'OD)***

Pour ces deux cas particuliers, une évaluation plus précise des diamètres limites peut être obtenue en utilisant directement les valeurs de OUR et de PCV pour éliminer de la représentation du taux de réaction l'imprécision d'une valeur moyenne de $\overline{\rho_x}$ et réduire le nombre de données expérimentales utilisées de 3 à 2 dans la relation :

$$\overline{q_{O_2}}\ \overline{\rho_x} = \left(\frac{OUR_{mesuré}}{(x_{MS})_{lissé}}\right)\overline{\left(\frac{x_{MS}}{0{,}5 \cdot PCV}\right)} = \frac{OUR}{0{,}5 \cdot PCV}, \qquad \text{(A20)}$$

et en substituant cette évaluation de $\overline{q_{O_2}}\ \overline{\rho_x}$ dans les équations (A17) et (A19). Le tableau A3.4 présente les diamètres limites ainsi que la proportion du volume oxygéné d'amas typiques pour les deux cultures visées. On constate qu'à aucun moment il ne devrait avoir existé des conditions de limitation locale en oxygène qui auraient réduit la proportion de la biomasse oxygénée et diminué dans une proportion inverse le taux spécifique de croissance de la biomasse sèche. Ainsi, relativement à la disponibilité de l'oxygène, la variation observée des taux spécifiques de croissance de la biomasse en fonction de la concentration d'OD (Figure 4.4) n'est pas un artefact.

Tableau A3.4 Diamètre limite et efficacité des cultures à 10% et 90% d'OD

	VVG12, 10%OD	VVG12, 90%OD
Diamètre maximal des amas	200 µm	2000 µm
$(q_{O_2}\ \rho_x)_{maximum}$	~10 mmol O_2 L^{-1} h^{-1}	~10 mmol O_2 L^{-1} h^{-1}
Diamètre limite	300 µm	1250 µm
Efficacité	1	0,52

OD_{cr} = 5%

La faiblesse des diffusivités des autres nutriments des cultures de cellules végétales par rapport à celle de l'O_2 [171] est largement compensées par des taux spécifiques de consommation d'environ un ordre de grandeur plus faible que $(q_{O_2})_{MS}$ (1-2 mmol O_2 g MS^{-1} h^{-1} pour environ 0,03 mmol NH_4 g MS $^{-1}$ h^{-1} et 0,5 mmol Glc g MS $^{-1}$ h^{-1}). Ainsi, aucune limitation diffusionnelle n'est à prévoir pour les autres nutriments.

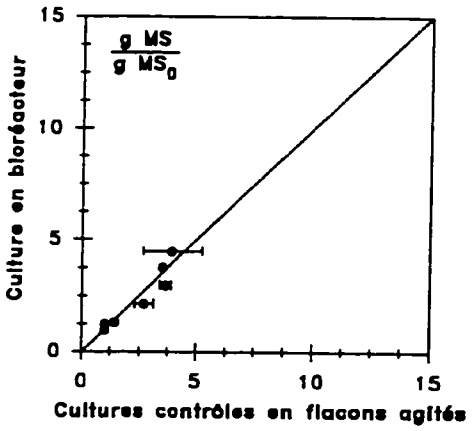


Figure A3.5 Comparaison des indices d'augmentation de la biomasse sèche d'une culture en cuvée contrôlée à 10% d'OD avec ses cultures témoins en flacons agités. Milieu de culture: B5, lignée VVG105 sc58.

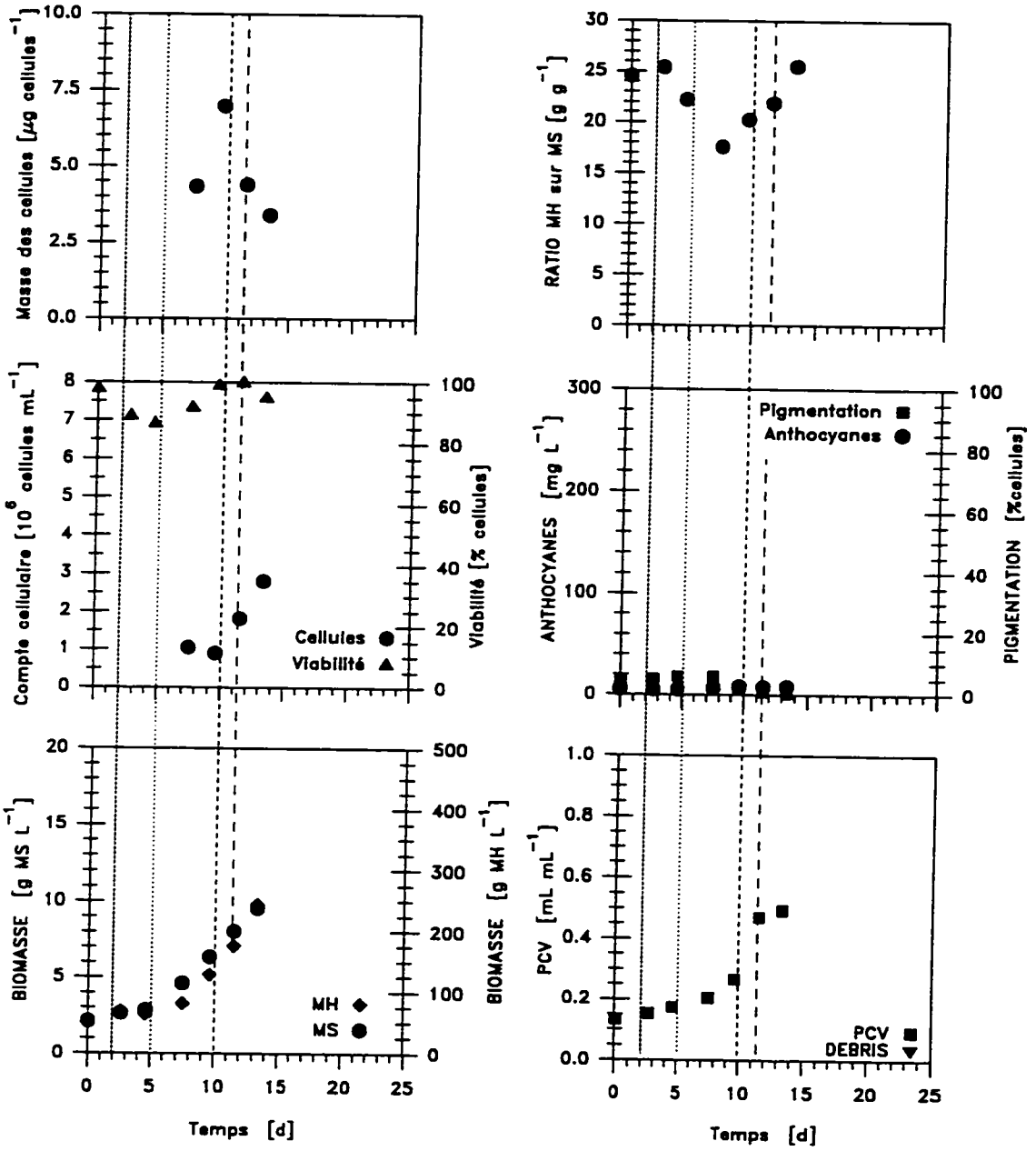


Figure A3.6 Indicateurs de croissance, production d'anthocyanes, masse spécifique des cellules et ratio de la biomasse humide sur la biomasse sèche d'une culture en cuvée contrôlée à 10% d'OD. Milieu de culture B5, lignée VVG105 sc58.

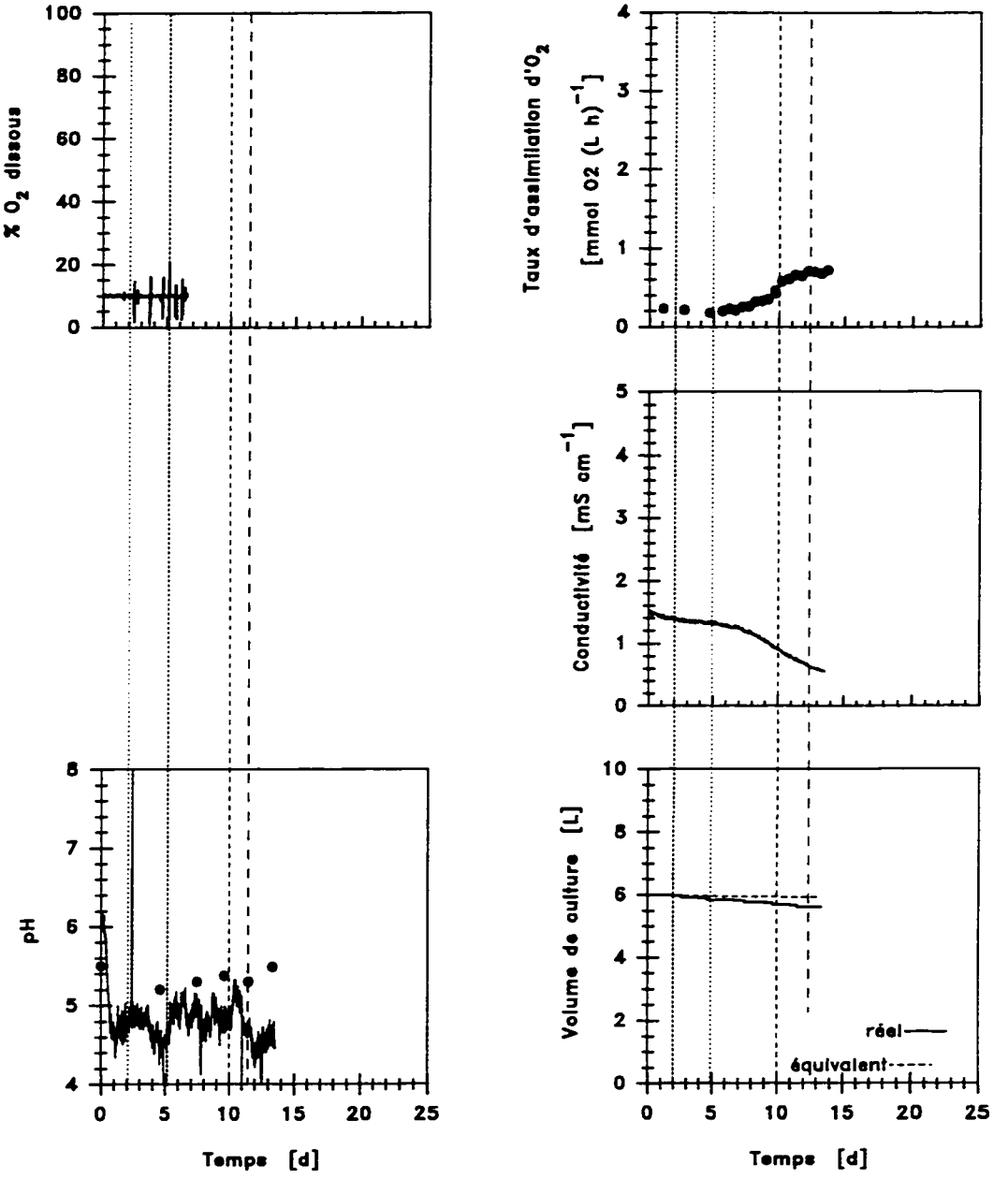


Figure A3.7 Vitesse d'agitation, concentration d'OD, taux volumique d'assimilation d'oxygène, conductivité du milieu de culture et volume de culture d'une cuvée contrôlée à 10% d'OD. Milieu de culture B5, lignée VVG105 sc58.

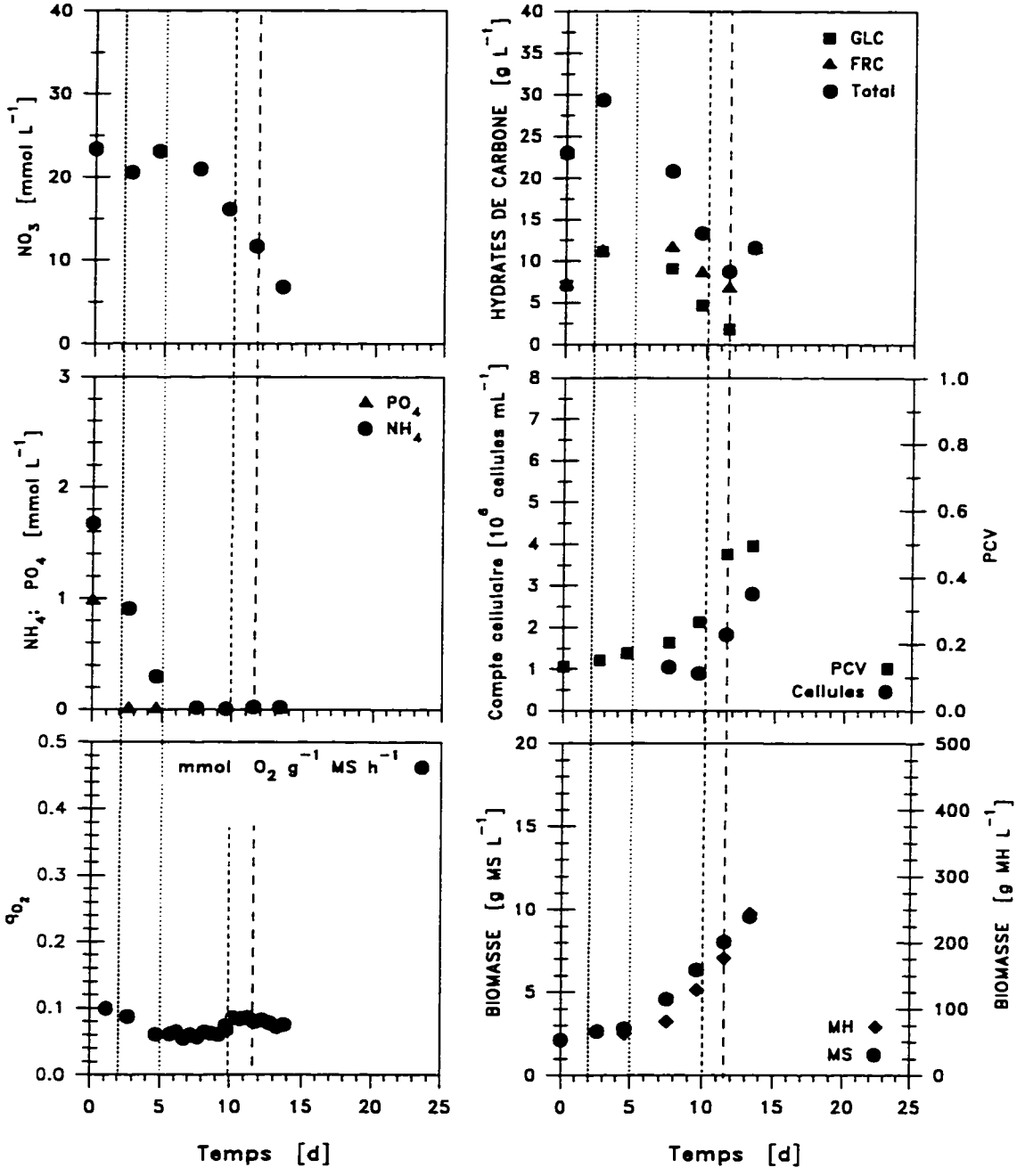


Figure A3.8 Consommation de nutriments et croissance de la biomasse d'une cuvée contrôlée à 10% d'OD Milieu de culture B5, lignée VVG105 sc58.

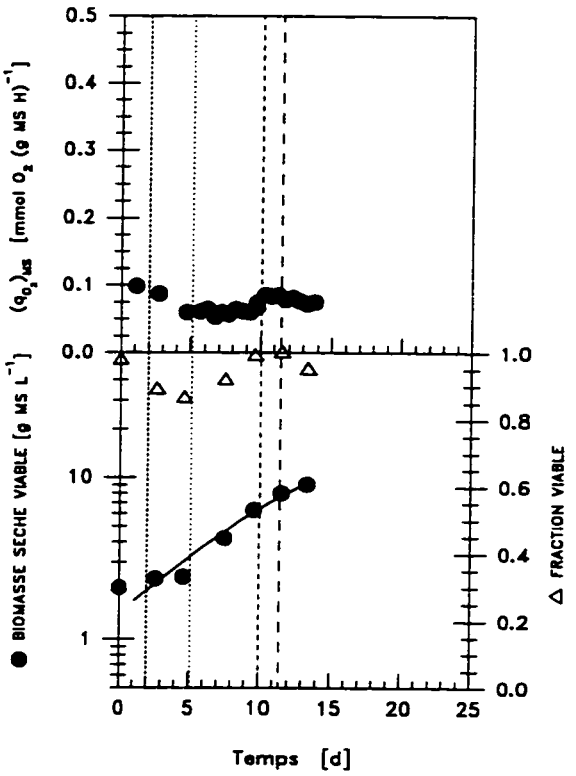


Figure A3.9 Taux spécifique d'assimilation d'O_2 et croissance de la biomasse d'une cuvée contrôlée à 10% d'OD Milieu de culture B5, lignée VVG105 sc58.

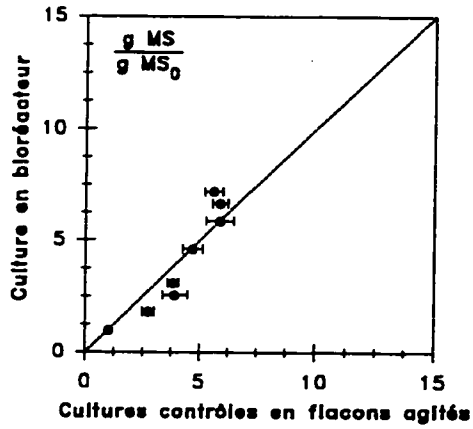


Figure A3.10 Comparaison des indices d'augmentation de la biomasse sèche d'une culture en cuvée contrôlée à 30% d'OD avec ses cultures témoins en flacons agités. Milieu de culture: B5, lignée VVG105 sc53.

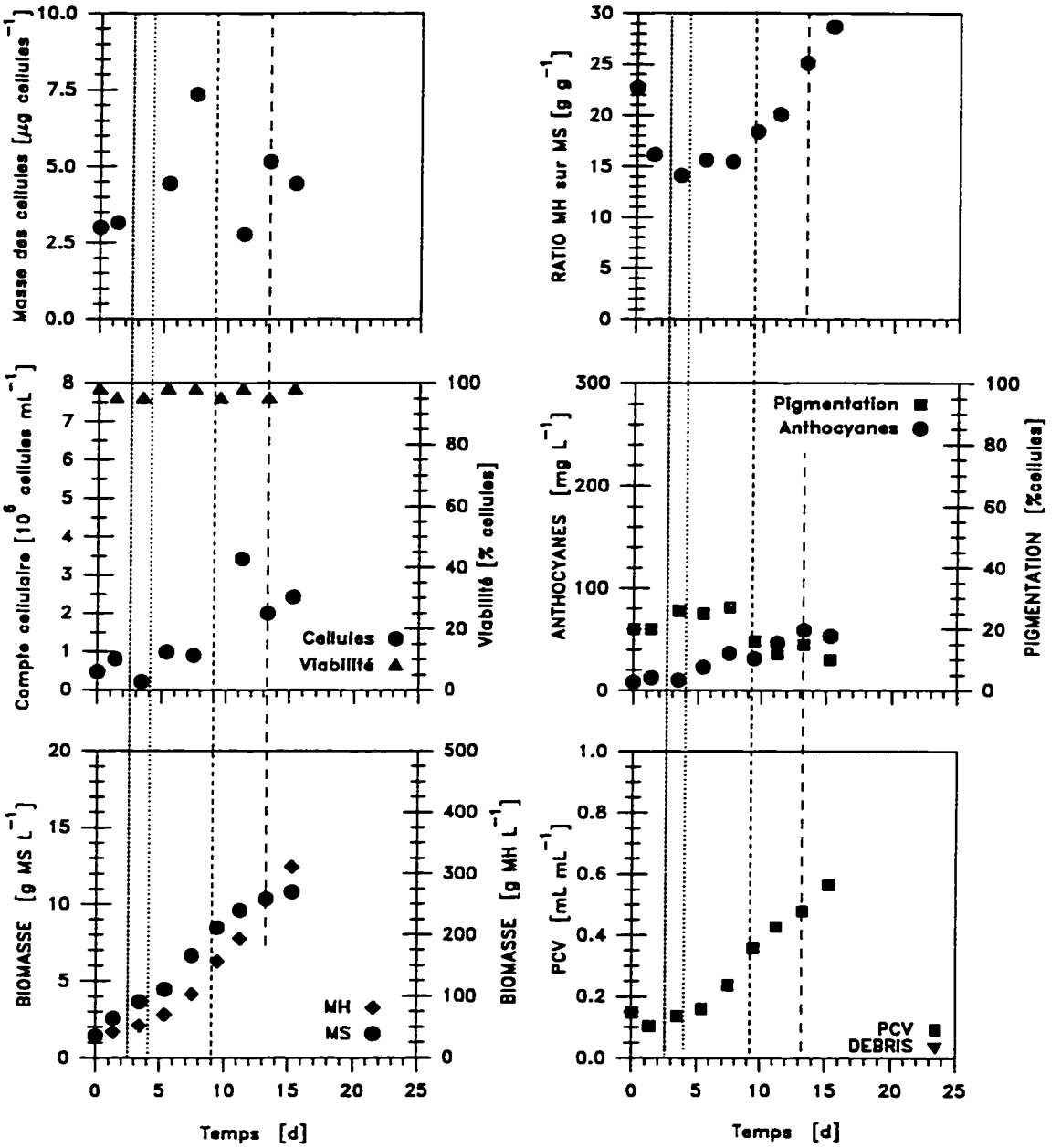


Figure A3.11 Indicateurs de croissance, production d'anthocyanes, masse spécifique des cellules et ratio de la biomasse humide sur la biomasse sèche d'une culture en cuvée contrôlée à 30% d'OD. Milieu de culture: B5, lignée VVG105 sc53.

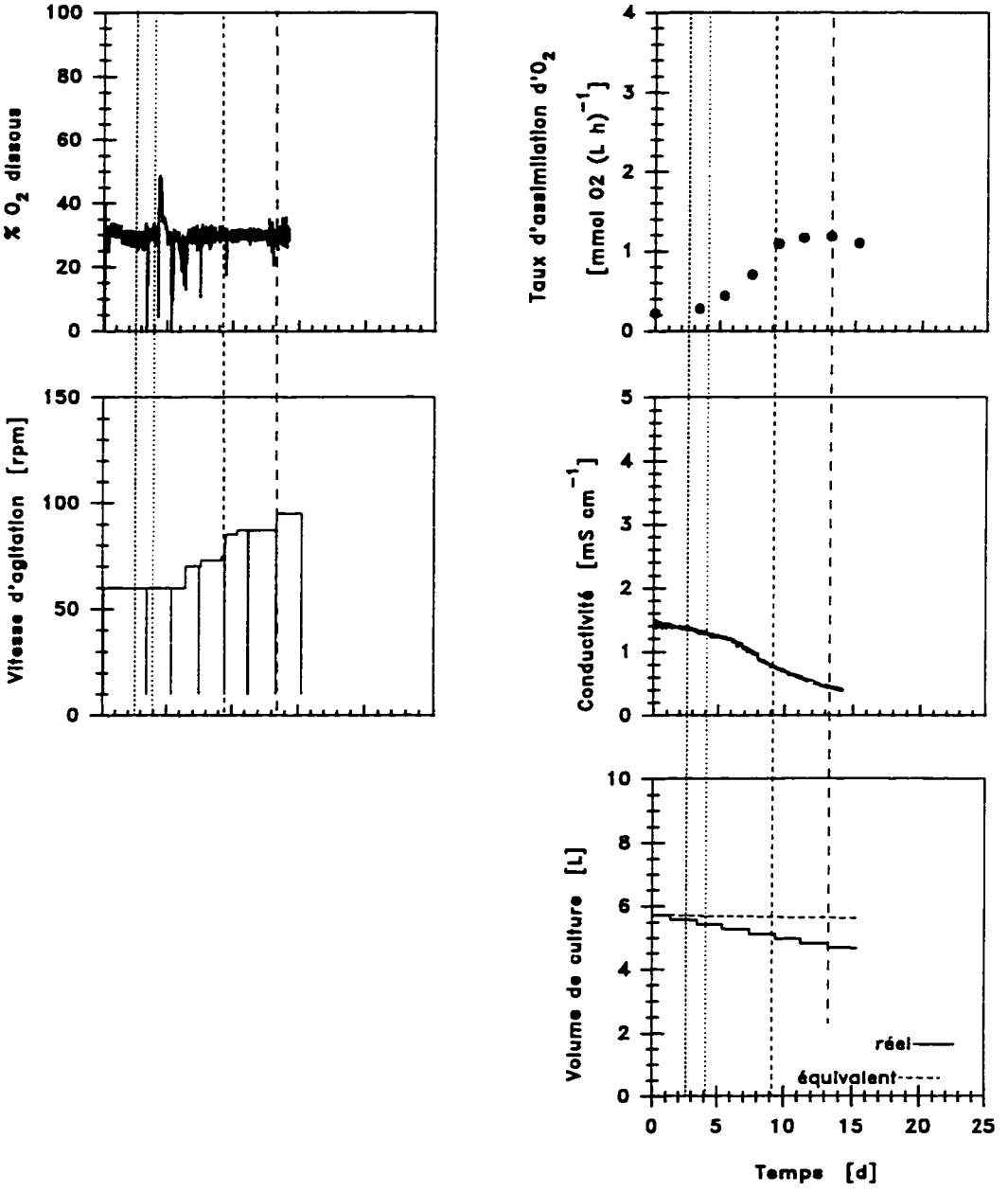


Figure A3.12 Vitesse d'agitation, concentration d'OD, taux volumique d'assimilation d'oxygène, conductivité du milieu de culture et volume de culture d'une cuvée contrôlée à 30% d'OD Milieu de culture: B5, lignée VVG105 sc53.

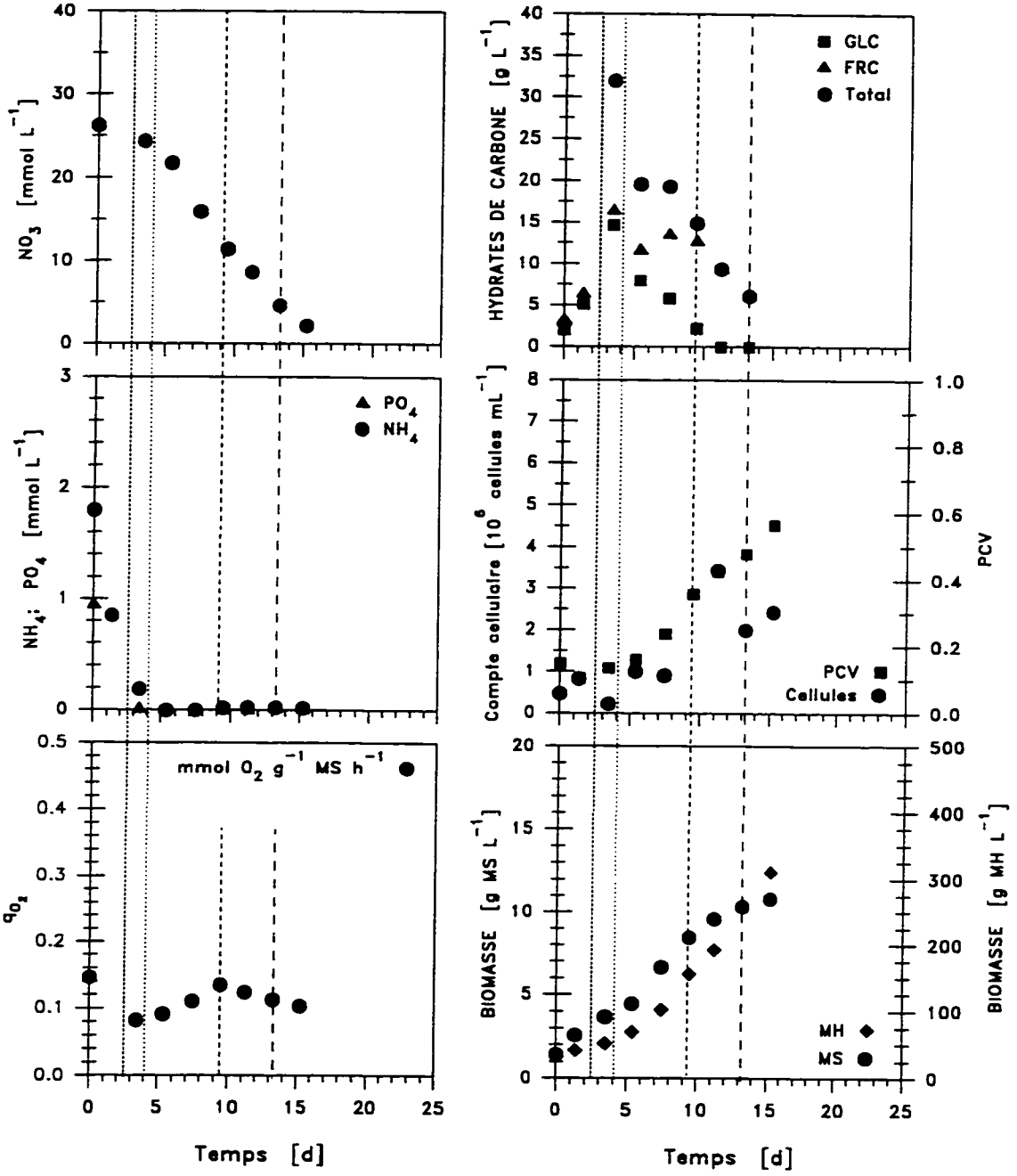


Figure A3.13 Consommation de nutriments et croissance de la biomasse d'une cuvée contrôlée à 30% d'OD Milieu de culture B5, lignée VVG105 sc53.

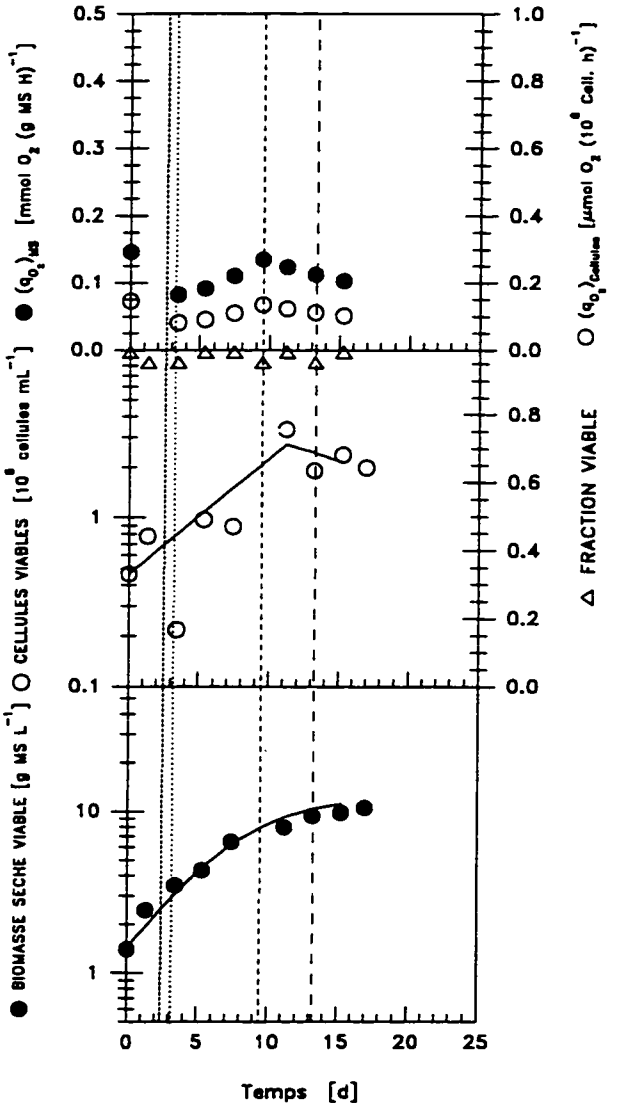


Figure A3.14 Taux spécifique d'assimilation d'O_2, prolifération cellulaire et croissance de la biomasse et d'une cuvée contrôlée à 30% d'OD Milieu de culture B5, lignée VVG105 sc53.

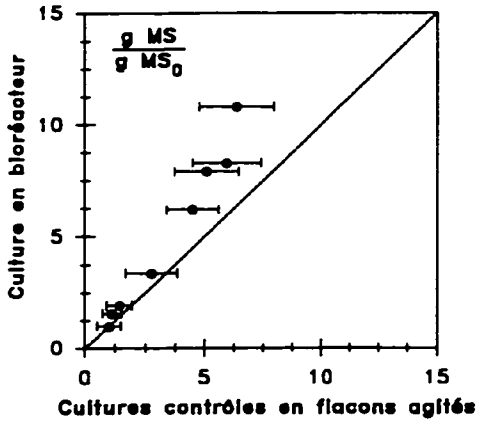


Figure A3.15 Comparaison des indices d'augmentation de la biomasse sèche d'une culture en cuvée contrôlée à 50% d'OD avec ses cultures témoins en flacons agités. Milieu de culture: B5, lignée VVG105 sc64.

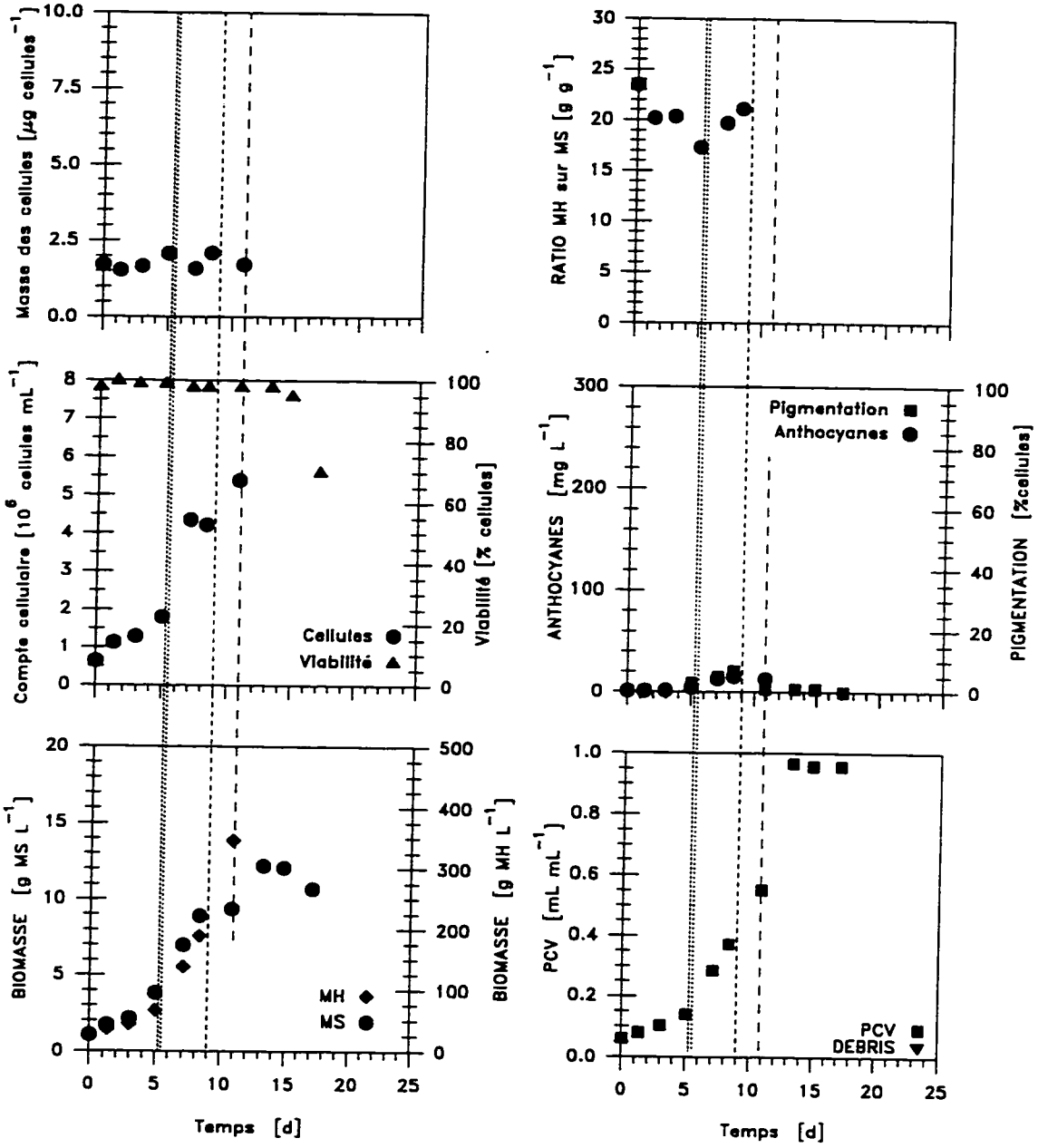


Figure A3.16 Indicateurs de croissance, production d'anthocyanes, masse spécifique des cellules et ratio de la biomasse humide sur la biomasse sèche d'une culture en cuvée contrôlée à 50% d'OD. Milieu de culture: B5, lignée VVG105 sc64.

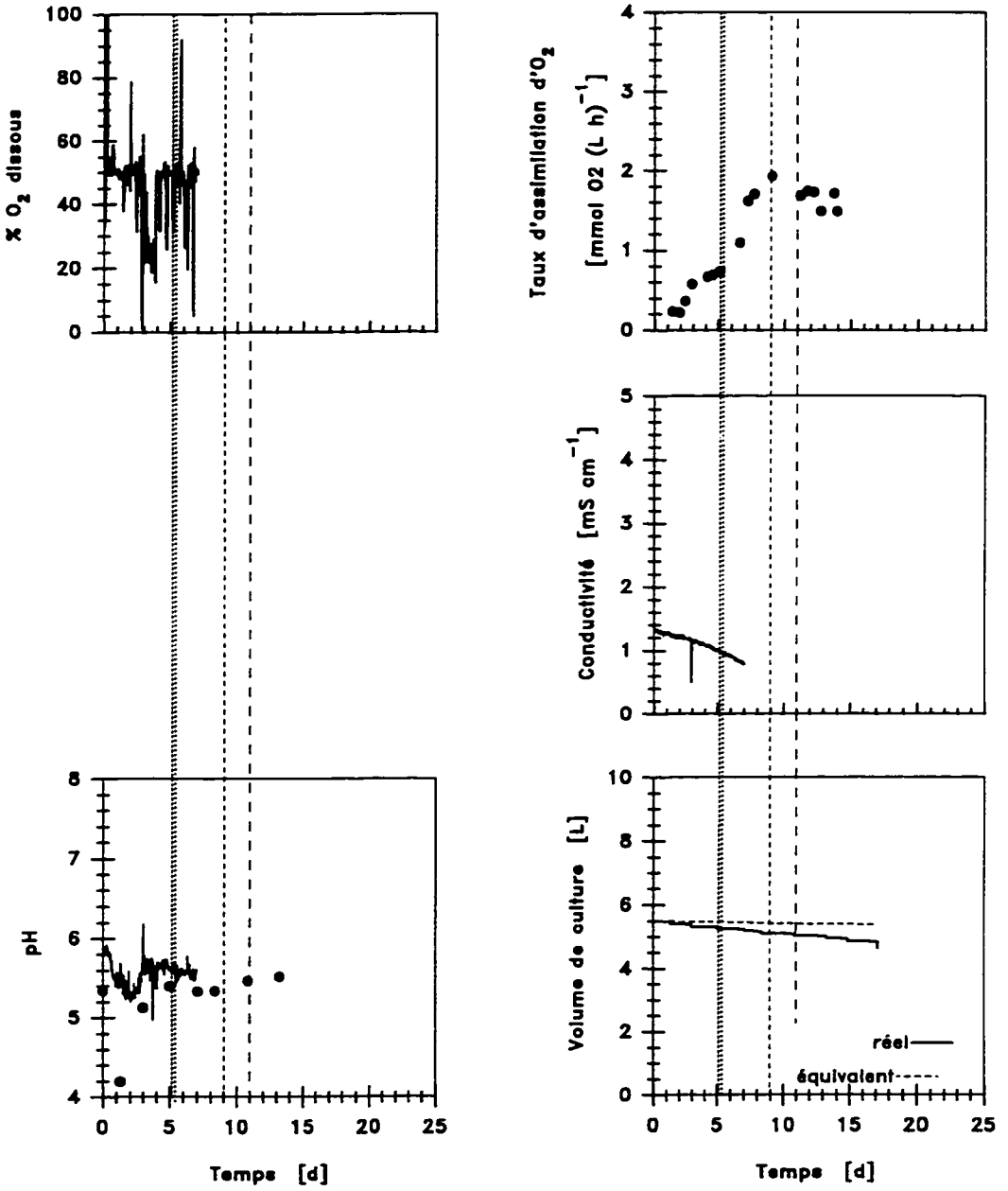


Figure A3.17 Vitesse d'agitation, concentration d'OD, taux volumique d'assimilation d'oxygène, conductivité du milieu de culture et volume de culture d'une cuvée contrôlée à 50% d'OD Milieu de culture: B5, lignée VVG105 sc64.

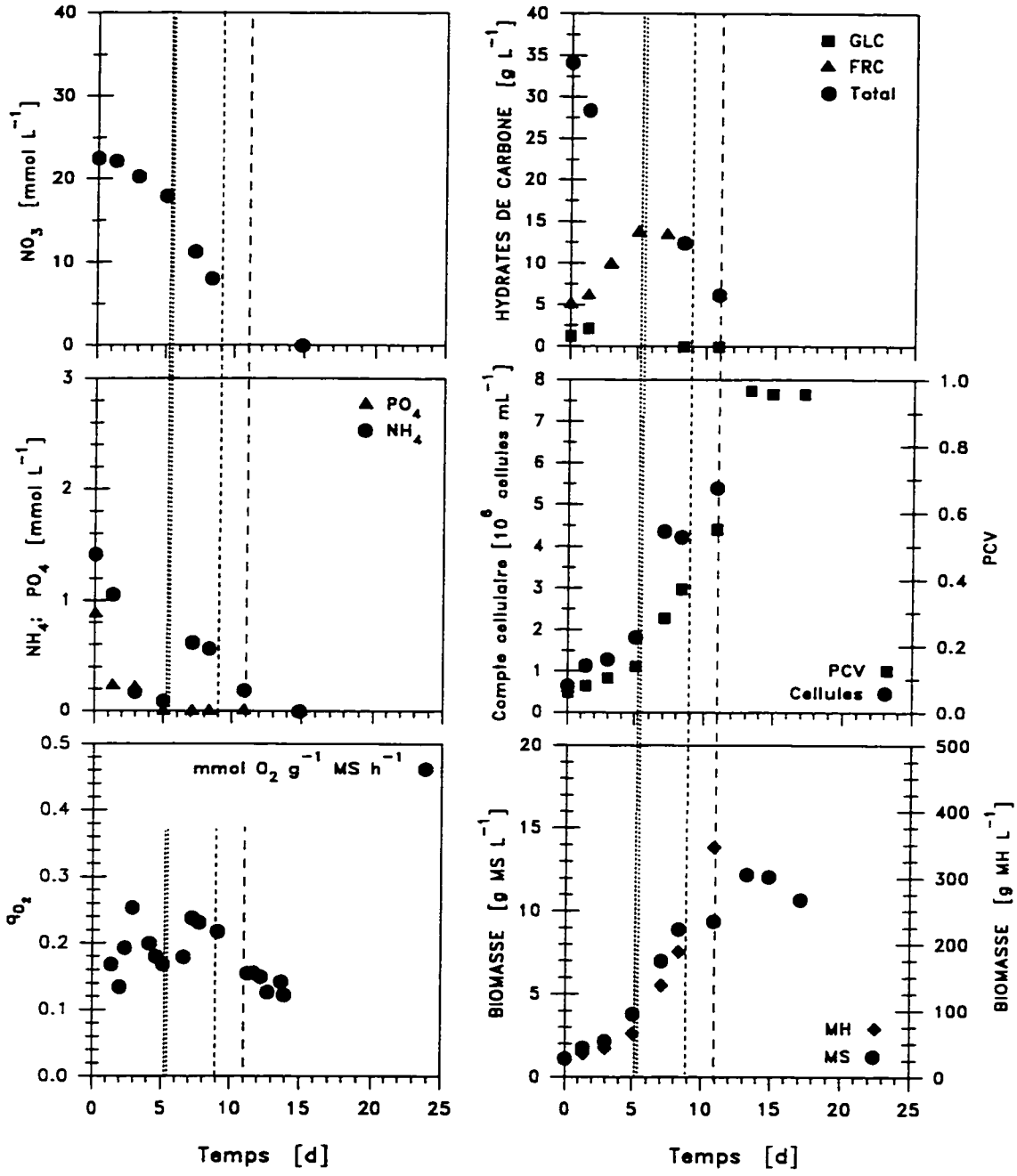


Figure A3.18 Consommation de nutriments et croissance de la biomasse d'une cuvée contrôlée à 50% d'OD Milieu de culture: B5, lignée VVG105 sc64.

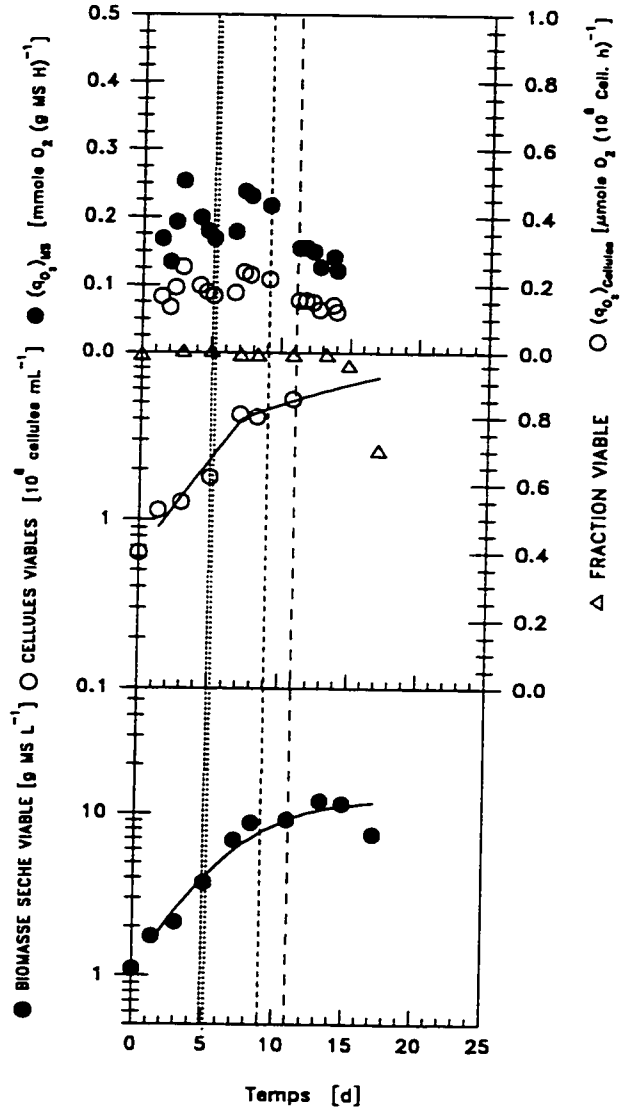


Figure A3.19 Taux spécifique d'assimilation d'O_2, croissance de la biomasse et prolifération cellulaire d'une cuvée contrôlée à 50% d'OD Milieu de culture B5, lignée VVG105 sc64.

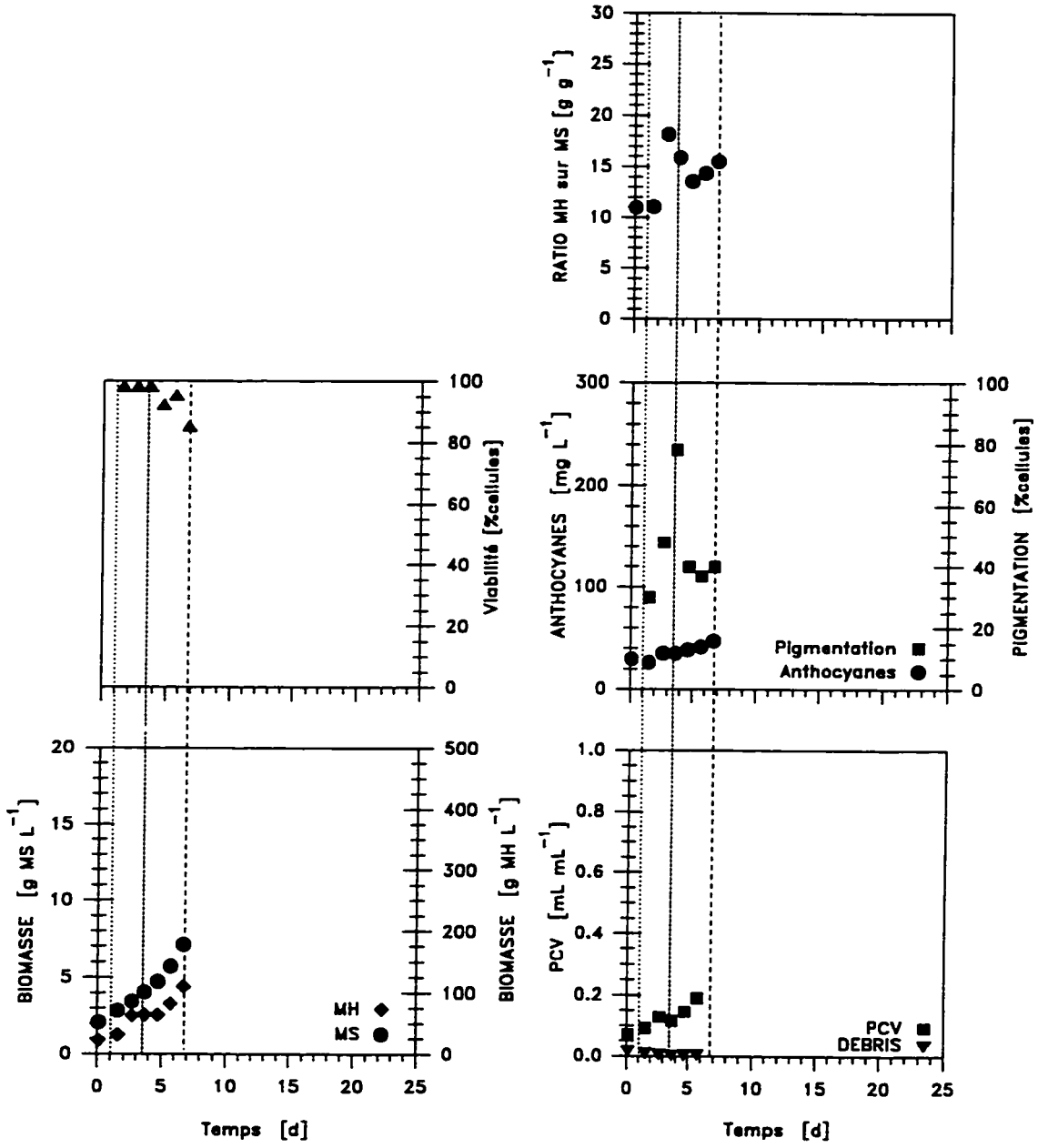


Figure A3.20 Indicateurs de croissance, production d'anthocyanes, masse spécifique des cellules et ratio de la biomasse humide sur la biomasse sèche d'une culture en cuvée contrôlée à 10% d'OD. Milieu de culture: B5DN, lignée VVG12 sc58.

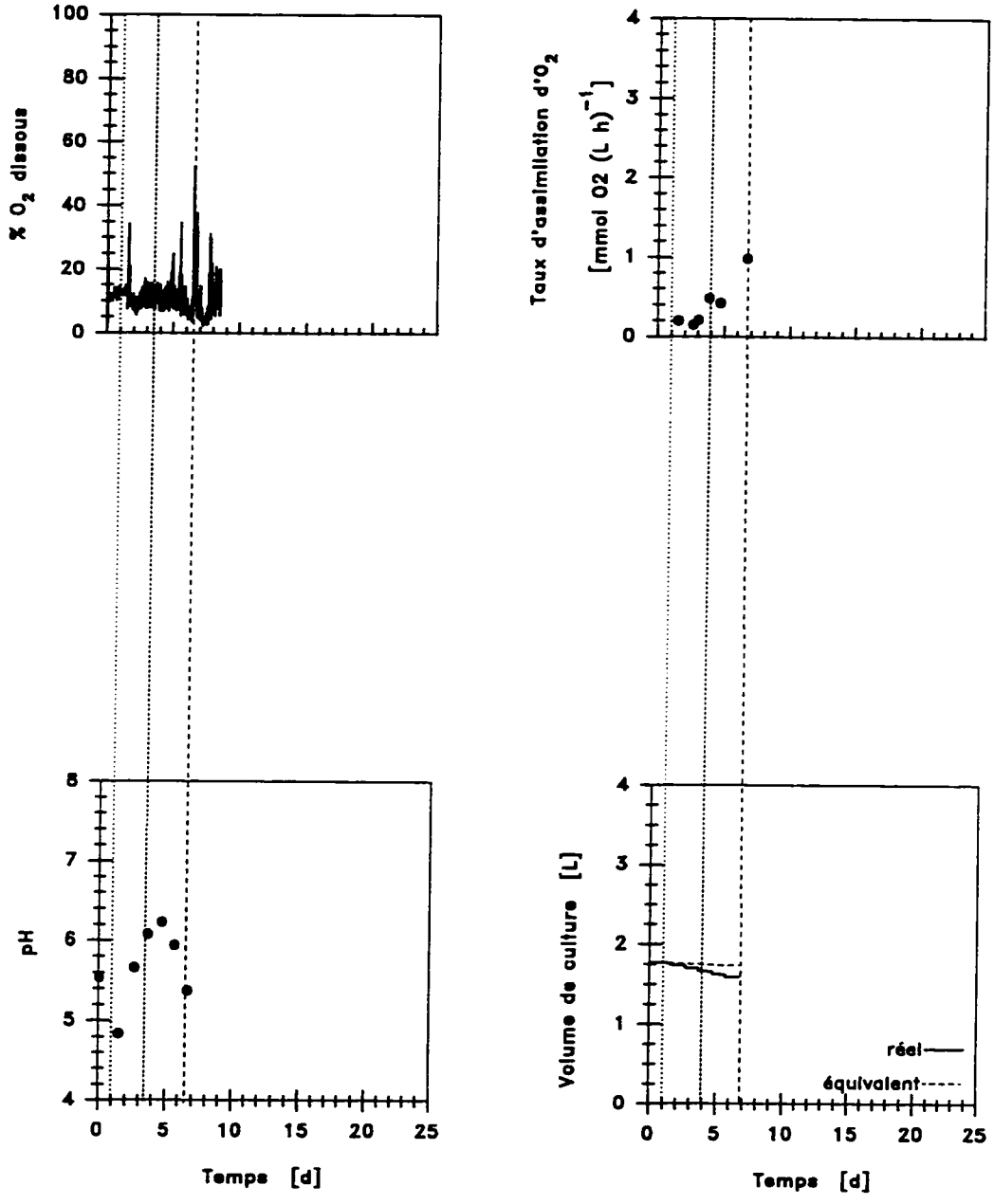


Figure A3.21 Vitesse d'agitation, concentration d'OD, taux volumique d'assimilation d'oxygène, conductivité du milieu de culture et volume de culture d'une cuvée contrôlée à 10% d'OD Milieu de culture: B5DN, lignée VVG12 sc58.

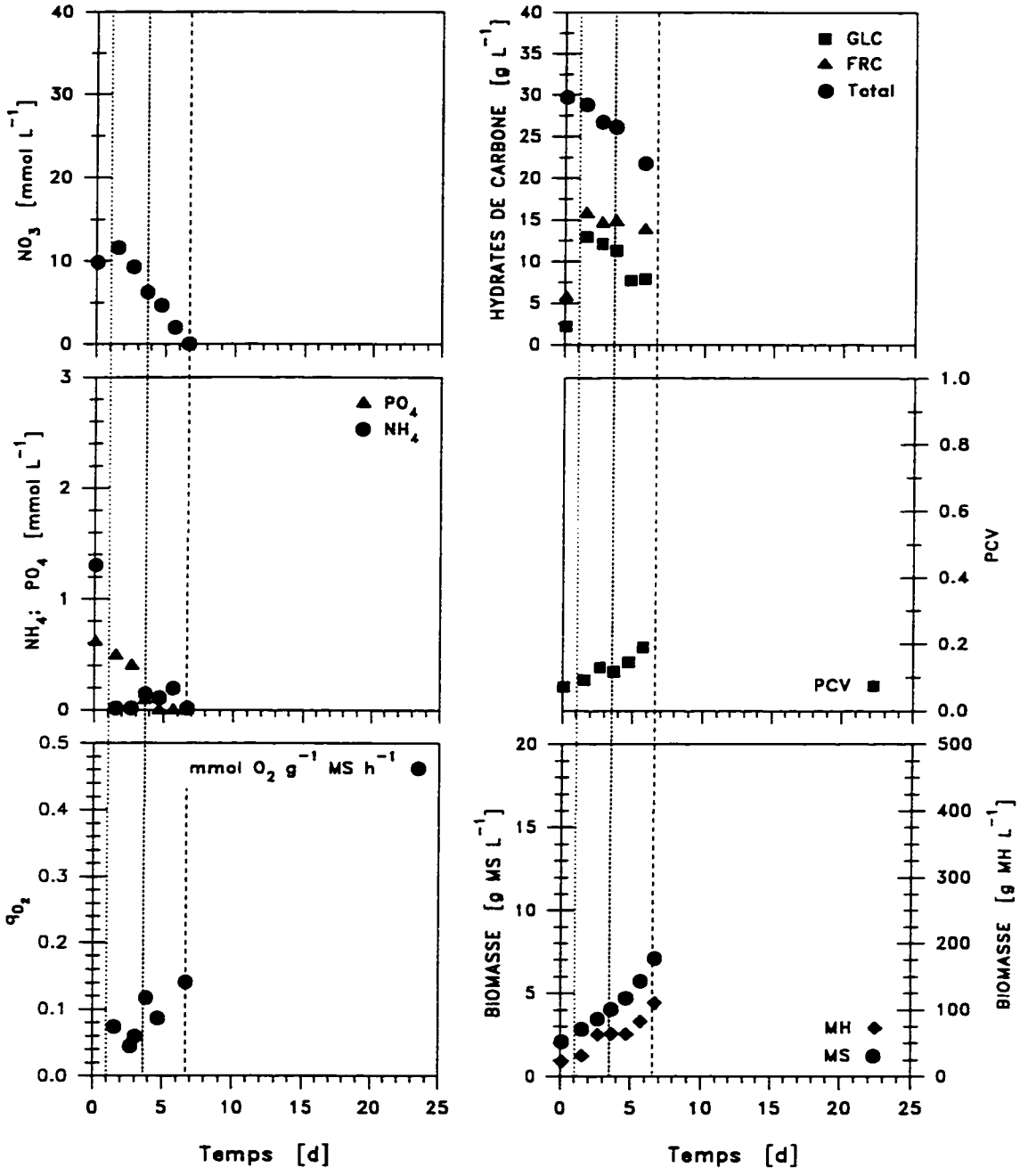


Figure A3.22 Consommation de nutriments et croissance de la biomasse d'une cuvée contrôlée à 10% d'OD Milieu de culture: B5DN, lignée VVG12 sc58.

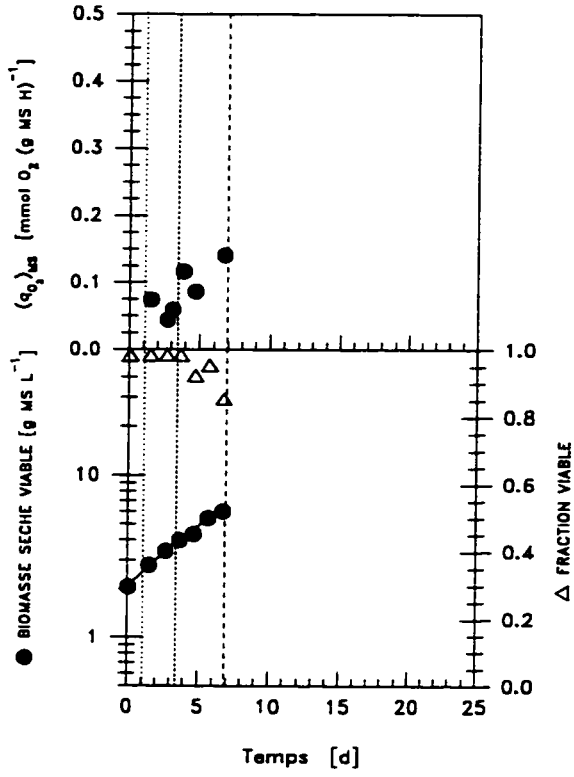


Figure A3.23 Taux spécifique d'assimilation d'O_2 et croissance de la biomasse d'une cuvée contrôlée à 10% d'OD Milieu de culture B5, lignée VVG12 sc58.

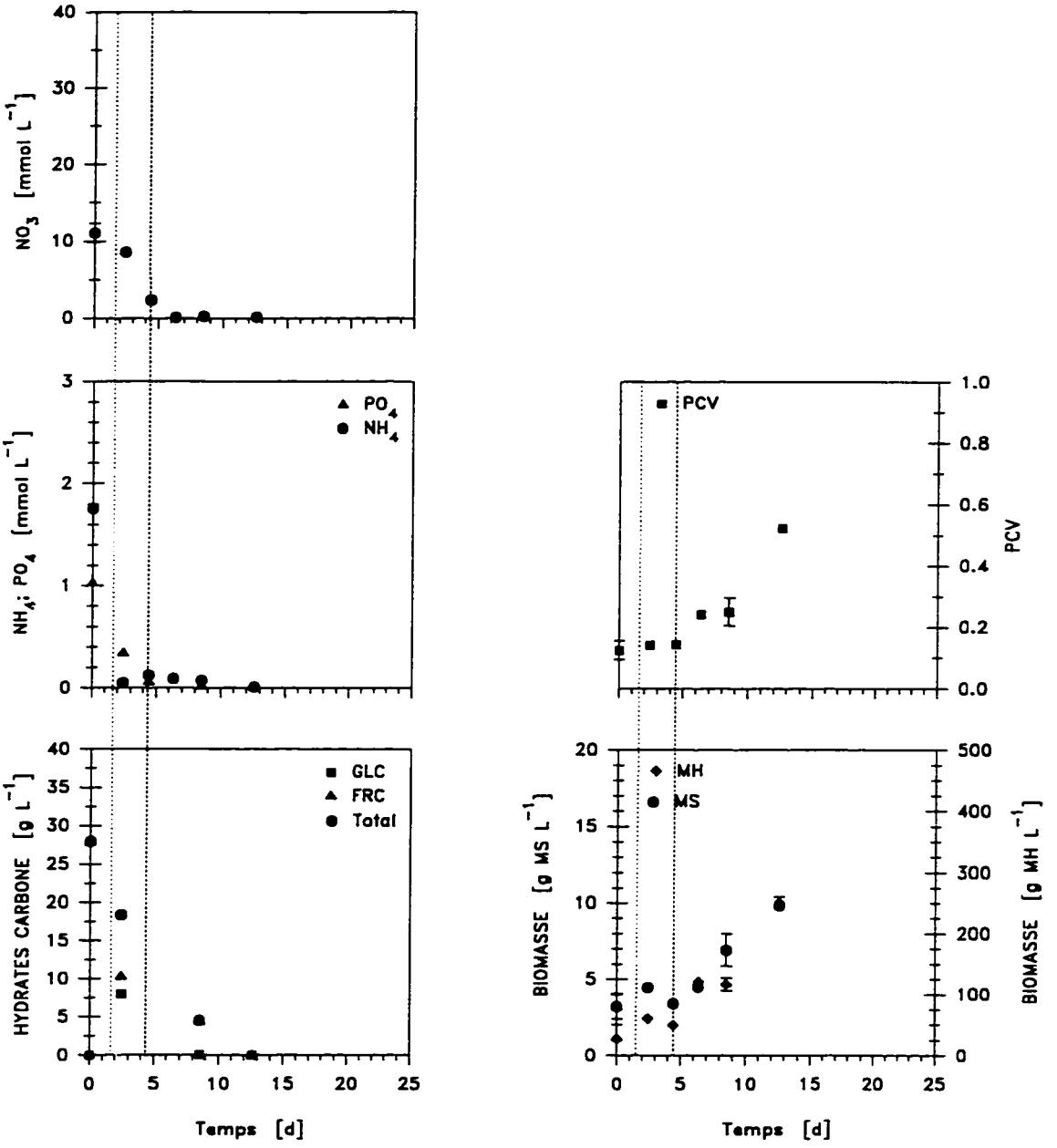


Figure A3.24 Consommation de nutriments, croissance de la biomasse et production d'anthocyanes de cultures en cuvée en flacons agités. Milieu de culture B5DN, lignée VVG12 sc60, cultures témoins des cuvées en bioréacteur H16, H17 et H18.

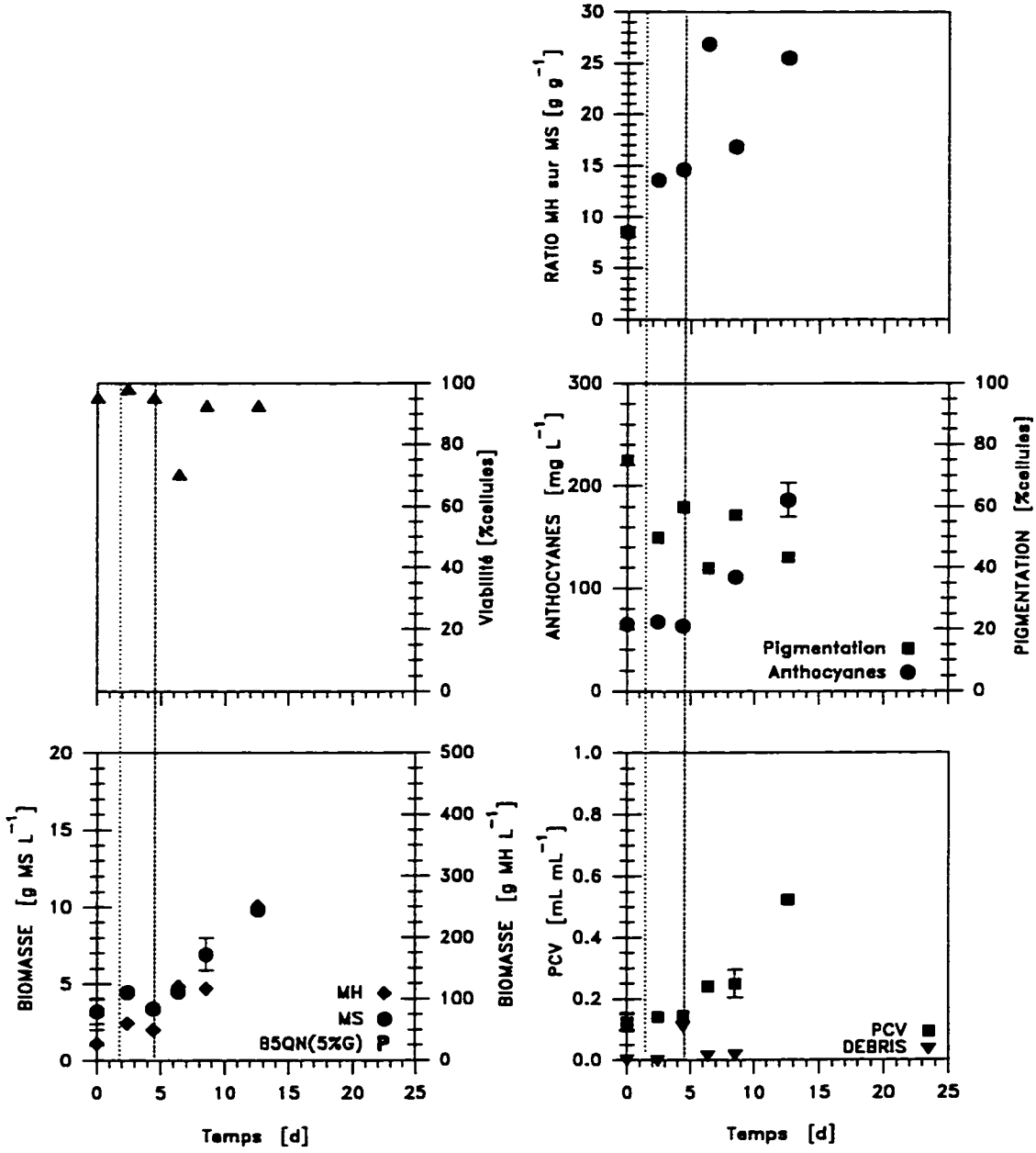


Figure A3.25 Croissance de la biomasse, prolifération cellulaire et viabilité, production d'anthocyanes, masse des cellules et ratio masse humide sur masse sèche de cultures en cuvée et en flacons agités de cellules VVG12 sc60. Milieu de culture B5DN, culture témoin des cuvées en bioréacteurs H16, H17 et H28.

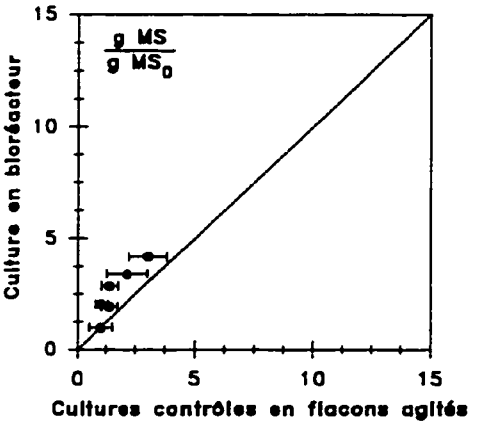


Figure A3.26 Comparaison des indices d'augmentation de la biomasse sèche d'une culture en cuvée contrôlée à 30% d'OD avec ses cultures témoins en flacons agités. Milieu de culture: B5DN, lignée VVG12 sc60.

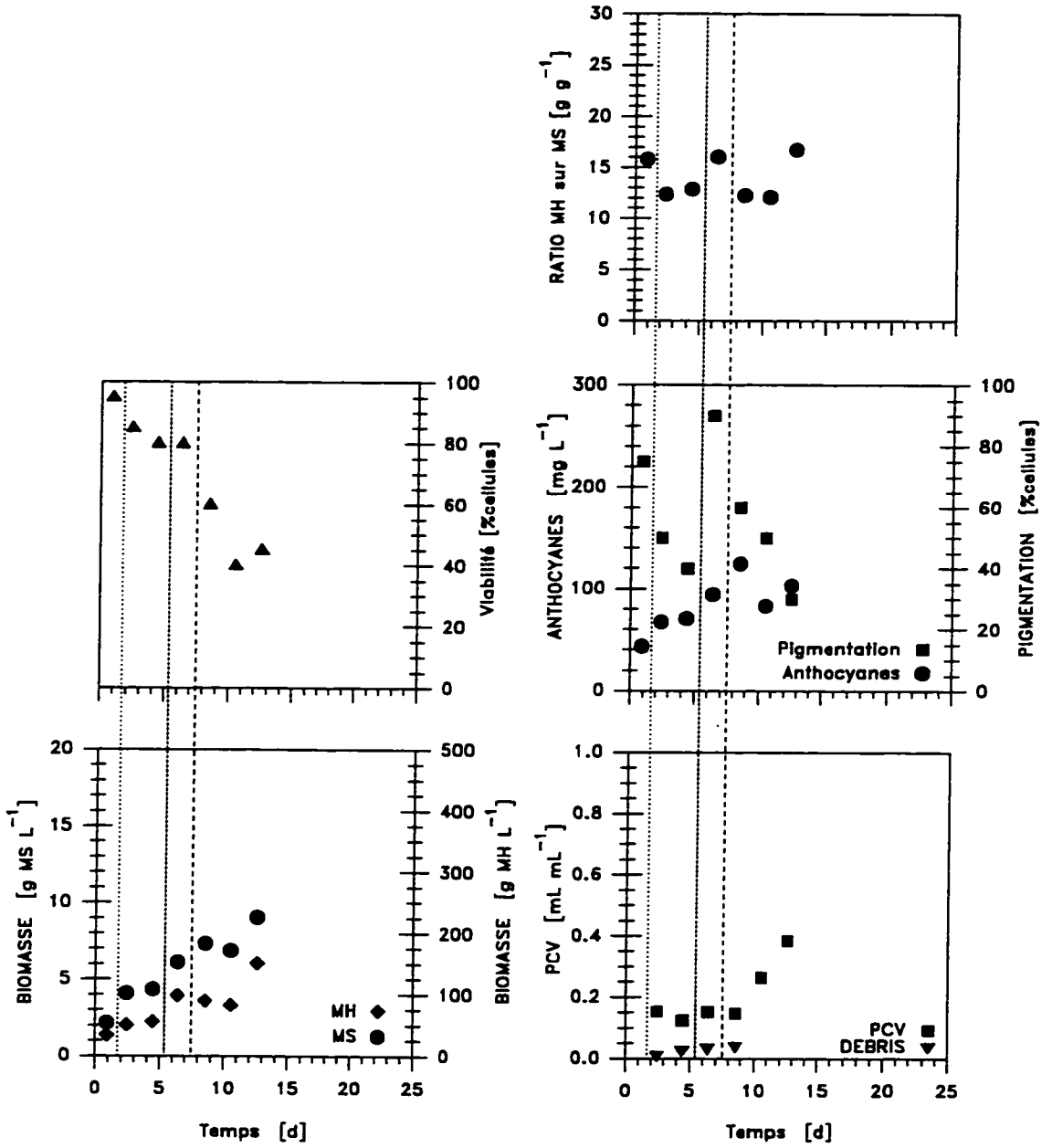


Figure A3.27 Indicateurs de croissance, production d'anthocyanes, masse spécifique des cellules et ratio de la biomasse humide sur la biomasse sèche d'une culture en cuvée contrôlée à 30% d'OD. Milieu de culture: B5DN, lignée VVG12 sc60.

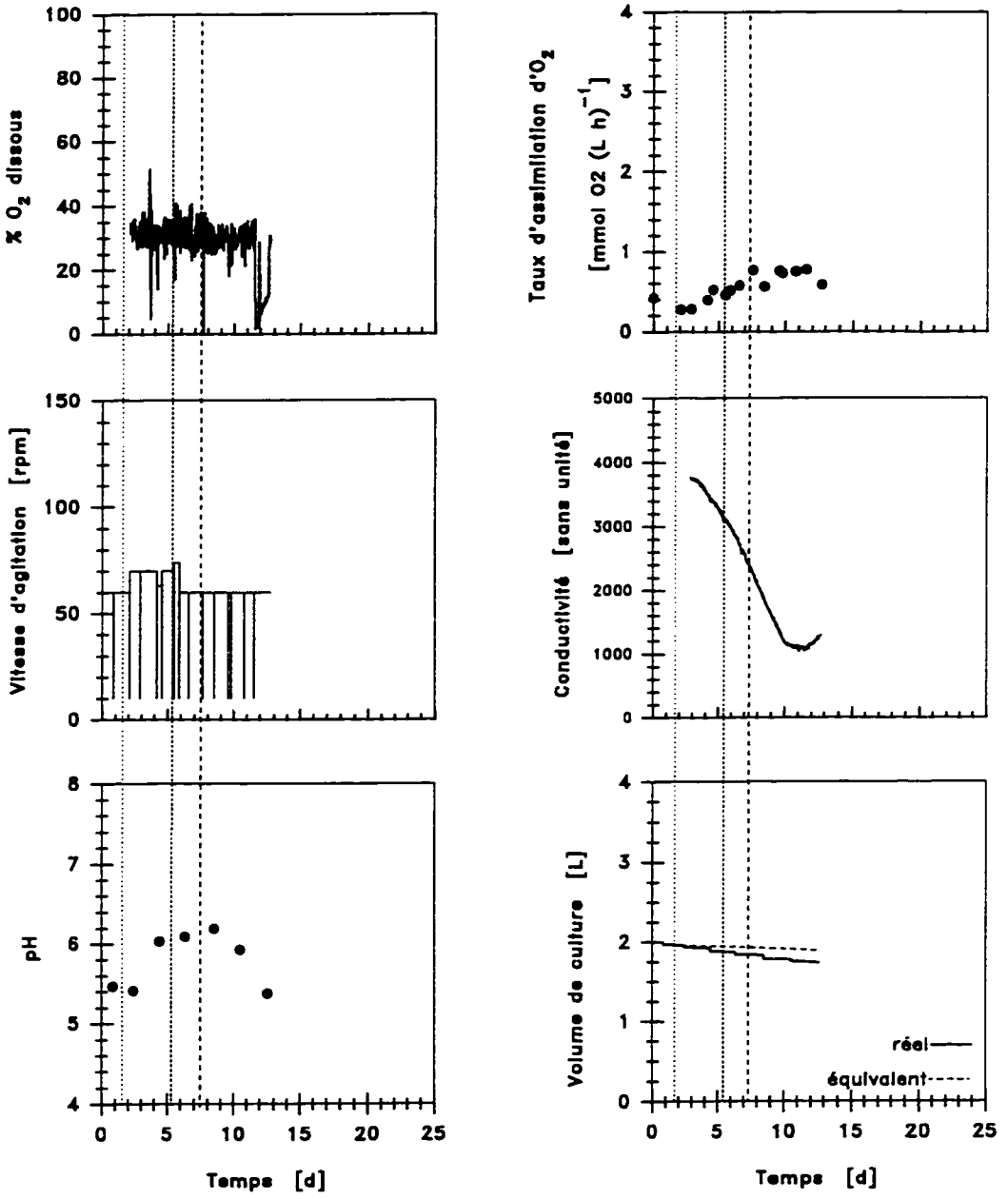


Figure A3.28 Vitesse d'agitation, concentration d'OD, taux volumique d'assimilation d'oxygène, conductivité du milieu de culture et volume de culture d'une cuvée contrôlée à 30% d'OD Milieu de culture: B5DN, lignée VVG12 sc60.

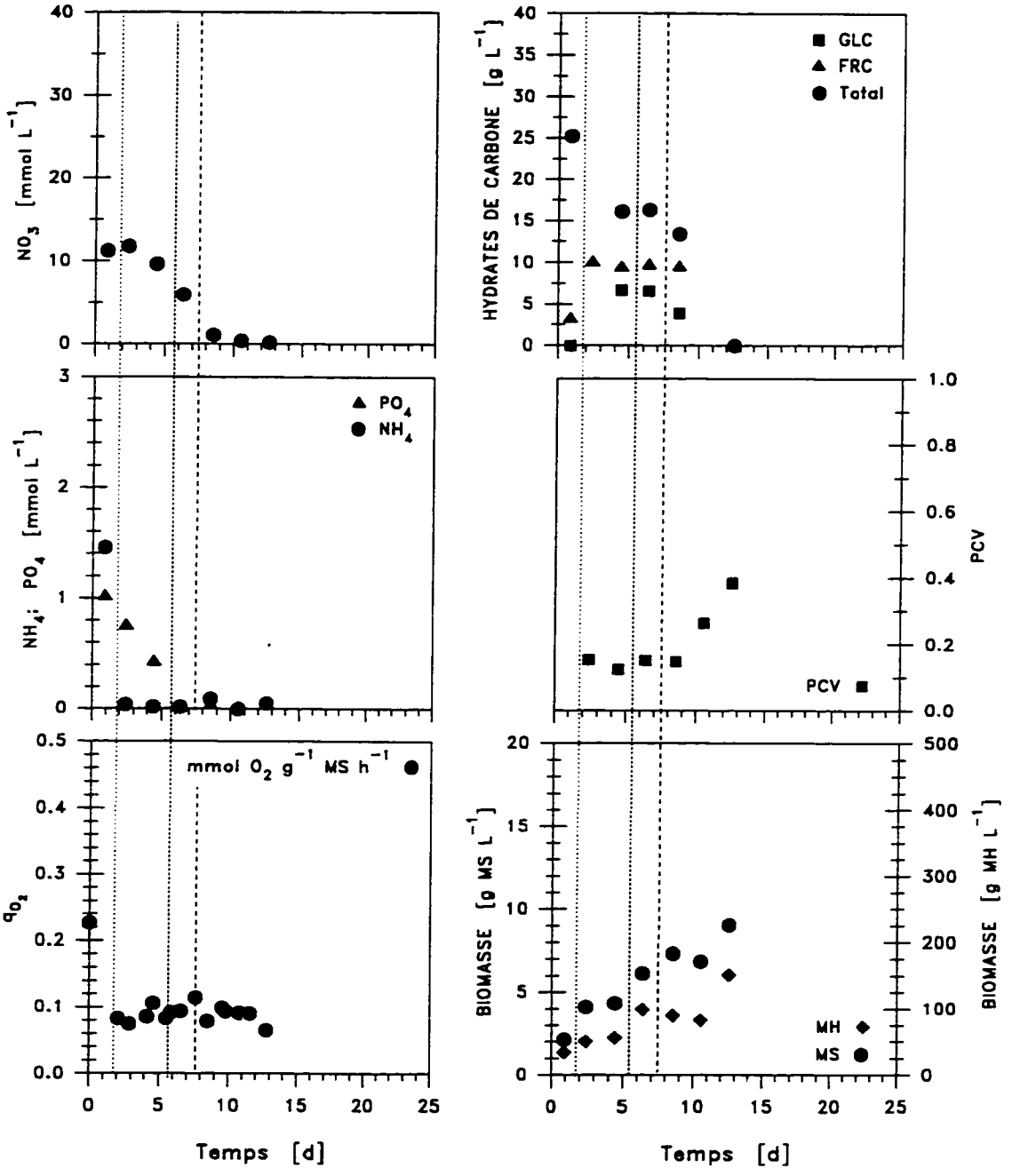


Figure A3.29 Consommation de nutriments et croissance de la biomasse d'une cuvée contrôlée à 30% d'OD Milieu de culture: B5DN, lignée VVG12 sc60.

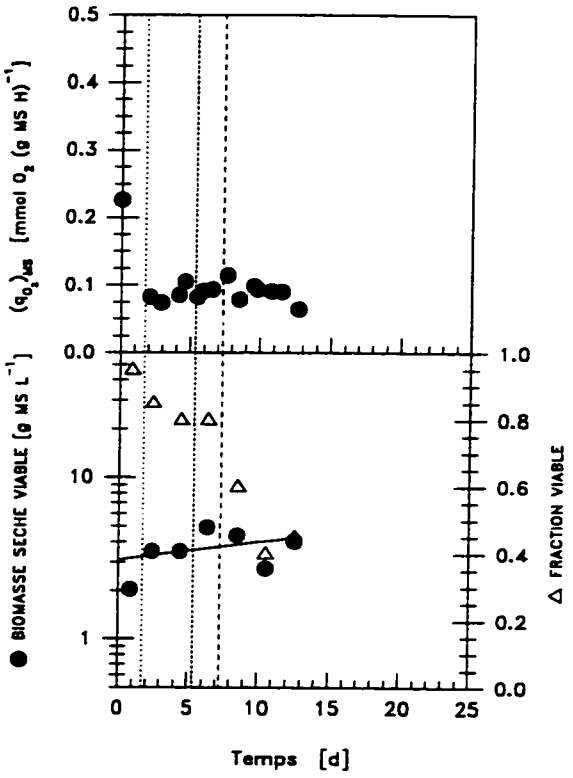


Figure A3.30 Taux spécifique d'assimilation d'O_2 et croissance de la biomasse d'une cuvée contrôlée à 30% d'OD Milieu de culture B5, lignée VVG12 sc60.

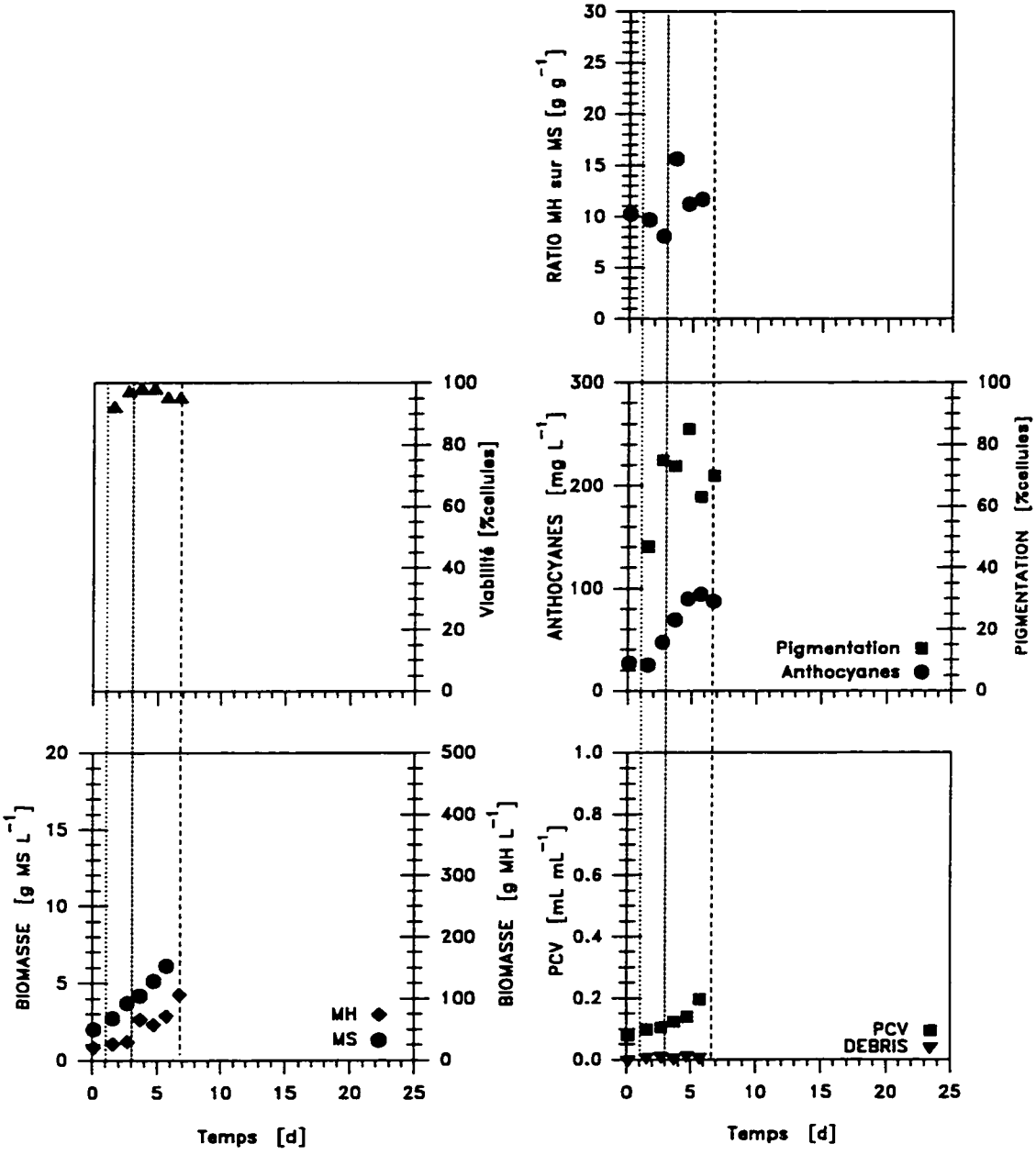


Figure A3.31 Indicateurs de croissance, production d'anthocyanes, masse spécifique des cellules et ratio de la biomasse humide sur la biomasse sèche d'une culture en cuvée contrôlée entre 40 et 70% d'OD. Milieu de culture: B5DN, lignée VVG12 sc58.

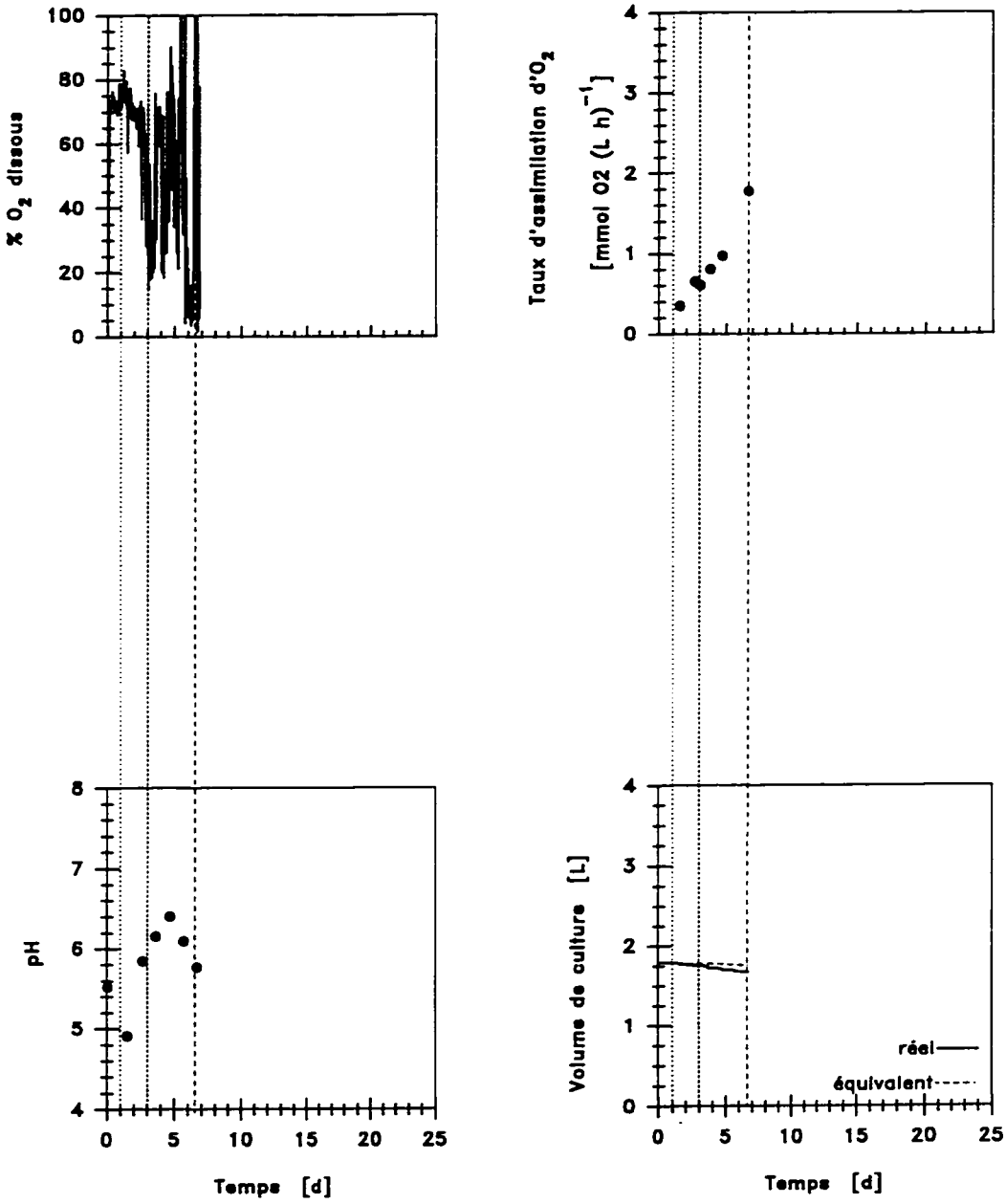


Figure A3.32 Vitesse d'agitation, concentration d'OD, taux volumique d'assimilation d'oxygène, conductivité du milieu de culture et volume de culture d'une cuvée contrôlée entre 40 et 70% d'OD Milieu de culture: B5DN, lignée VVG12 sc58.

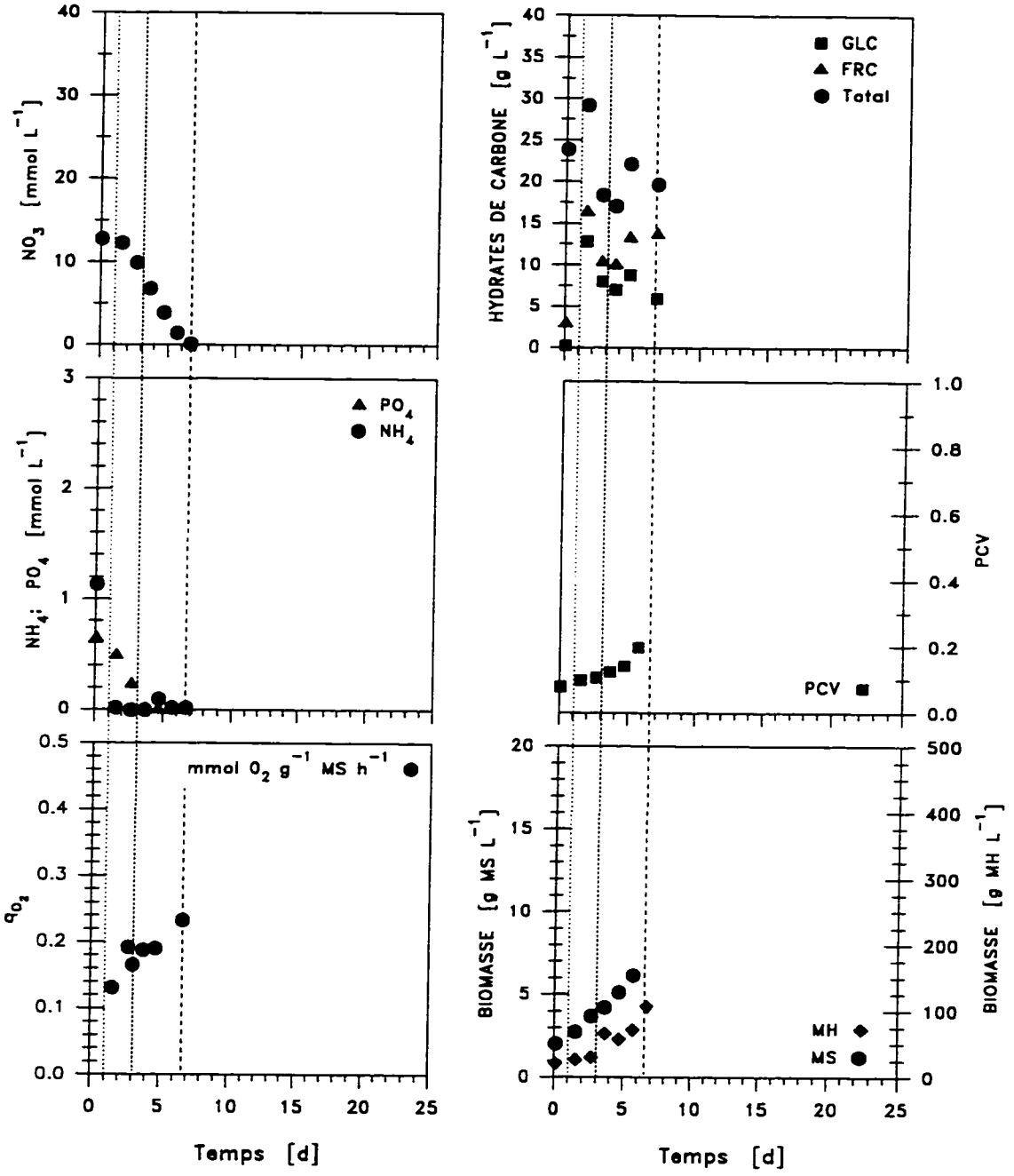


Figure A3.33 Consommation de nutriments et croissance de la biomasse d'une cuvée contrôlée entre 40 et 70% d'OD Milieu de culture: B5DN, lignée VVG12 sc58.

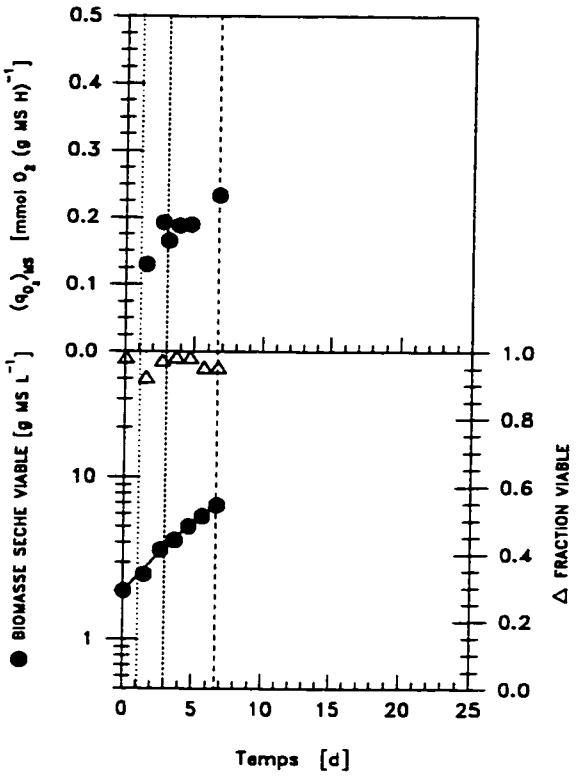


Figure A3.34 Taux spécifique d'assimilation d'O_2 et croissance de la biomasse d'une cuvée contrôlée entre 40 et 70% d'OD Milieu de culture B5, lignée VVG12 sc58.

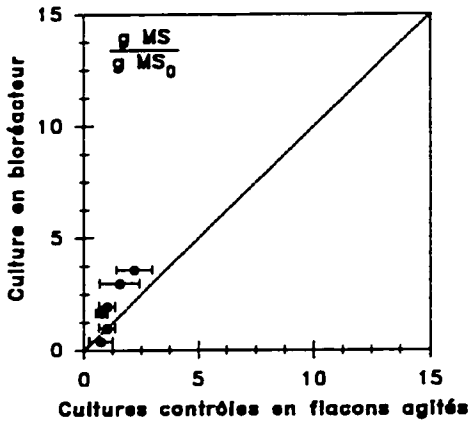


Figure A3.35 Comparaison des indices d'augmentation de la biomasse sèche d'une culture en cuvée contrôlée à 42% d'OD avec ses cultures témoins en flacons agités. Milieu de culture: B5DN, lignée VVG12 sc60.

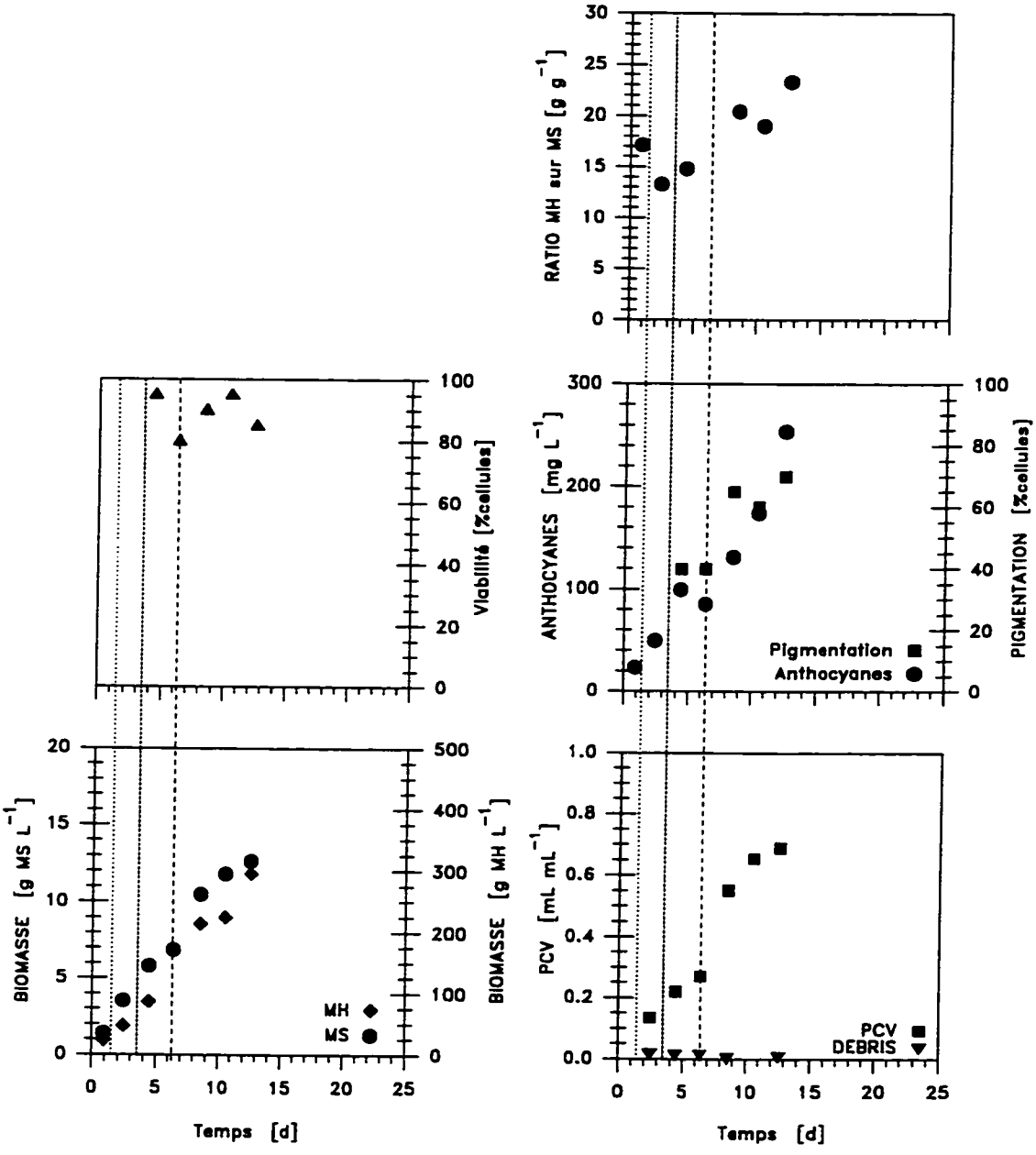


Figure A3.36 Indicateurs de croissance, production d'anthocyanes, masse spécifique des cellules et ratio de la biomasse humide sur la biomasse sèche d'une culture en cuvée contrôlée à 42% d'OD. Milieu de culture: B5DN, lignée VVG12 sc60.

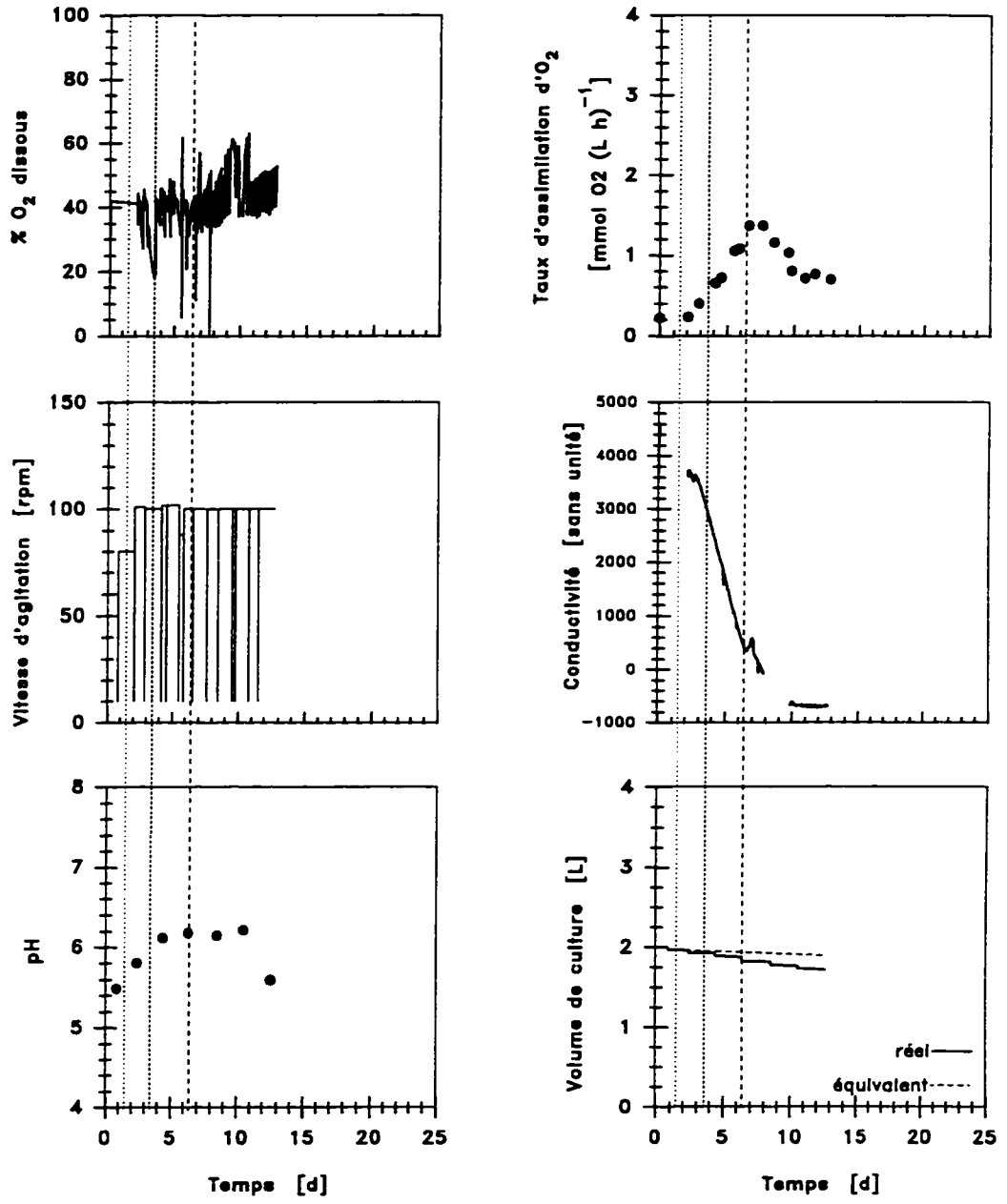


Figure A3.37 Vitesse d'agitation, concentration d'OD, taux volumique d'assimilation d'oxygène, conductivité du milieu de culture et volume de culture d'une cuvée contrôlée à 42% d'OD Milieu de culture: B5DN, lignée VVG12 sc60.

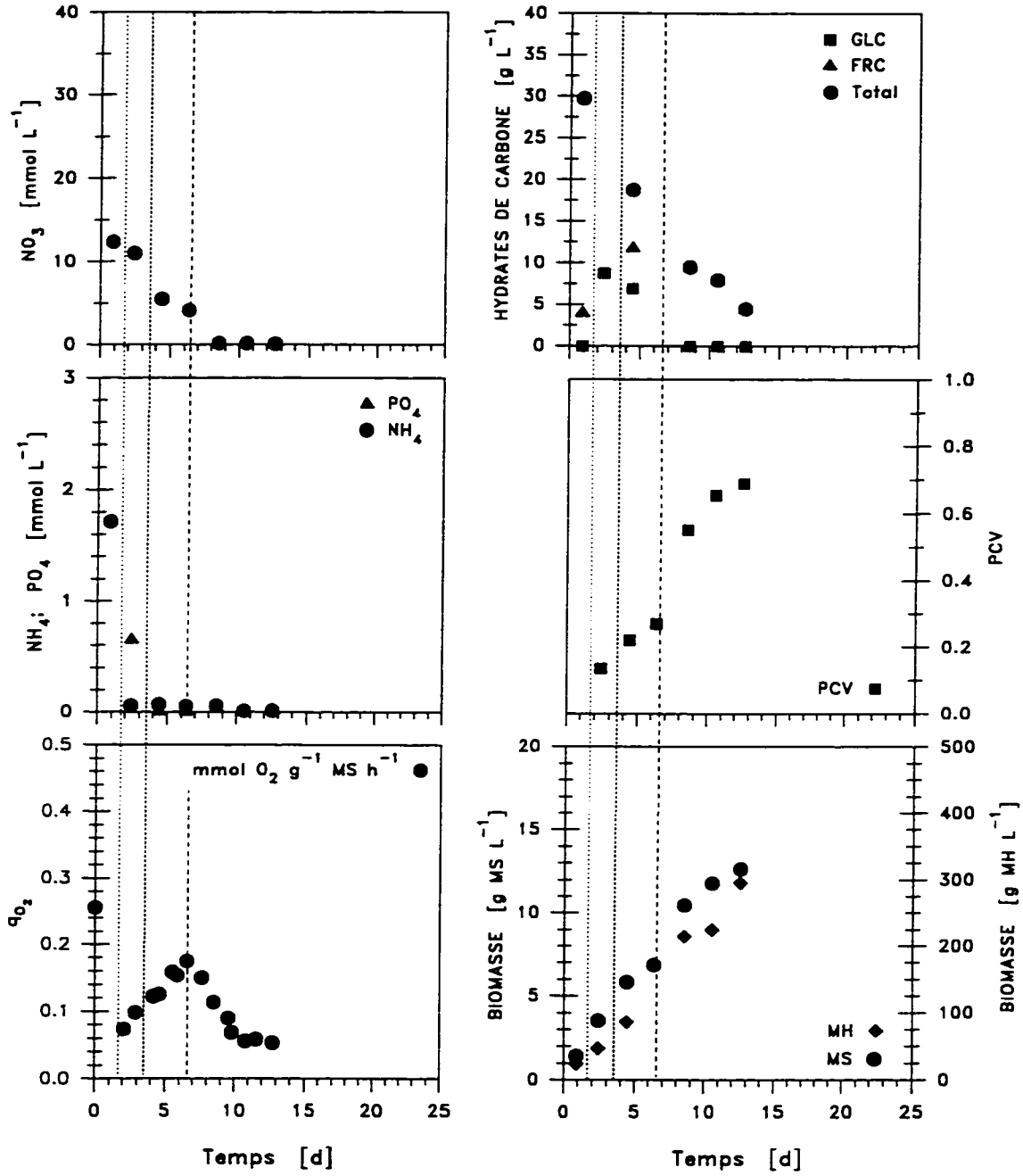


Figure A3.38 Consommation de nutriments et croissance de la biomasse d'une cuvée contrôlée à 42% d'OD Milieu de culture: B5DN, lignée VVG12 sc60.

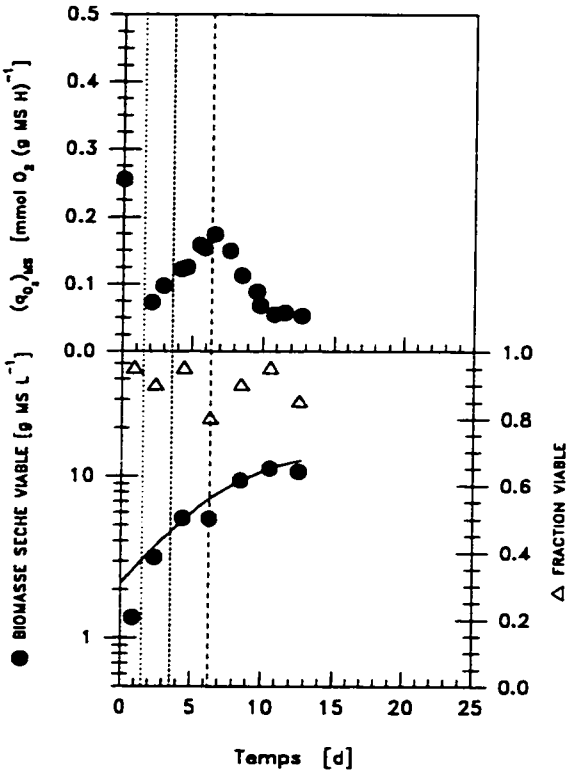


Figure A3.39 Taux spécifique d'assimilation d'O_2 et croissance de la biomasse d'une cuvée contrôlée à 42% d'OD Milieu de culture B5, lignée VVG12 sc60.

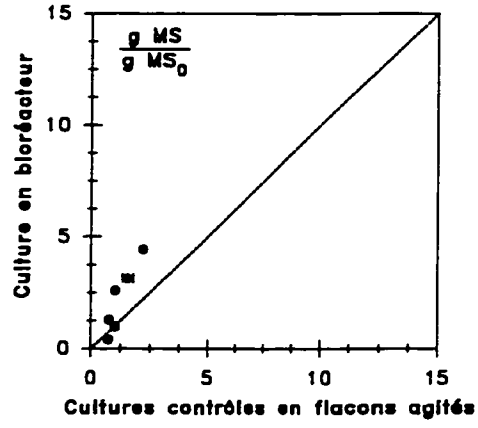


Figure A3.40 Comparaison des indices d'augmentation de la biomasse sèche d'une culture en cuvée contrôlée à 50% d'OD avec ses cultures témoins en flacons agités. Milieu de culture: B5DN, lignée VVG12 sc60.

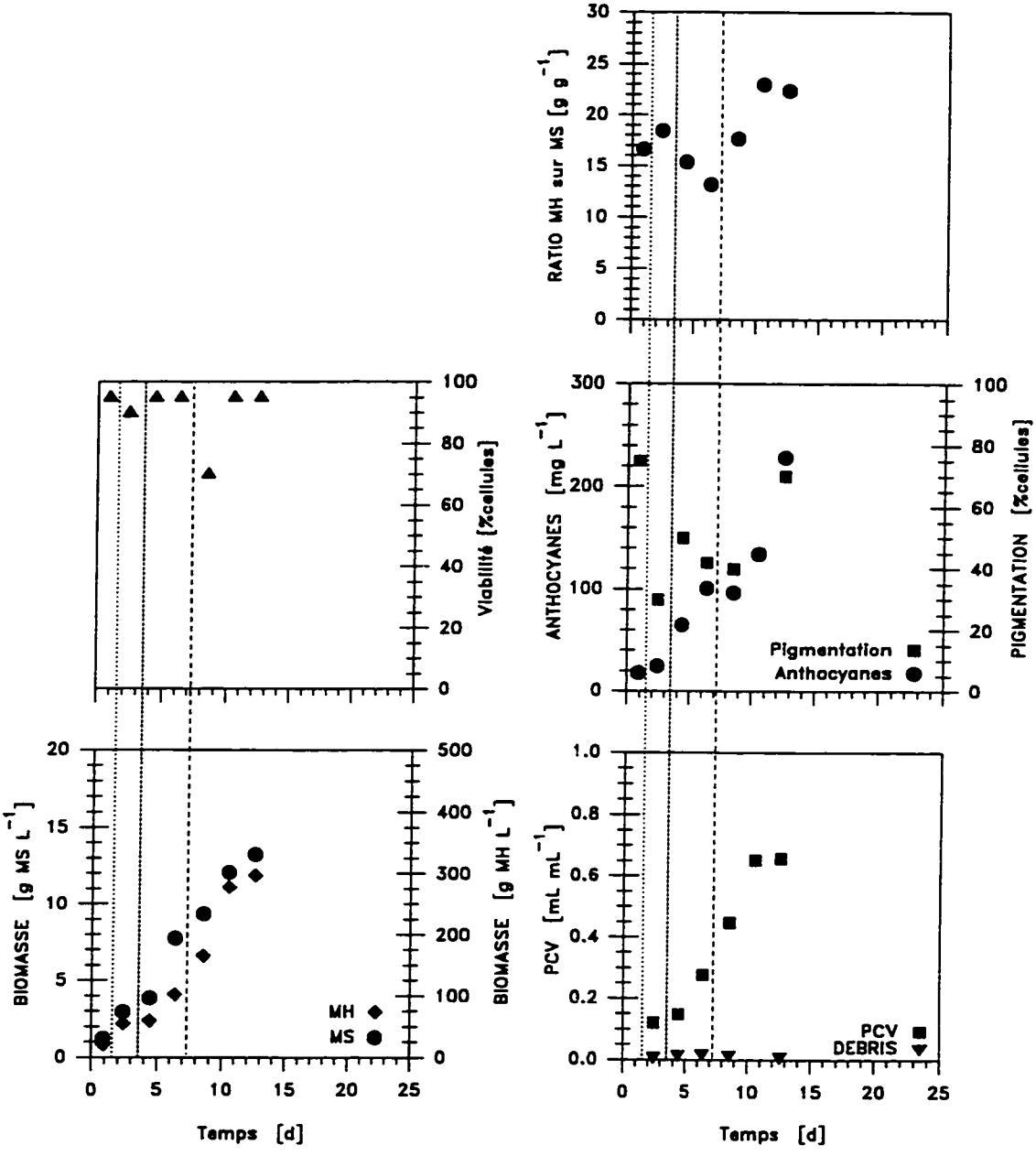


Figure A3.41 Indicateurs de croissance, production d'anthocyanes, masse spécifique des cellules et ratio de la biomasse humide sur la biomasse sèche d'une culture en cuvée contrôlée à 50% d'OD. Milieu de culture: B5DN, lignée VVG12 sc60.

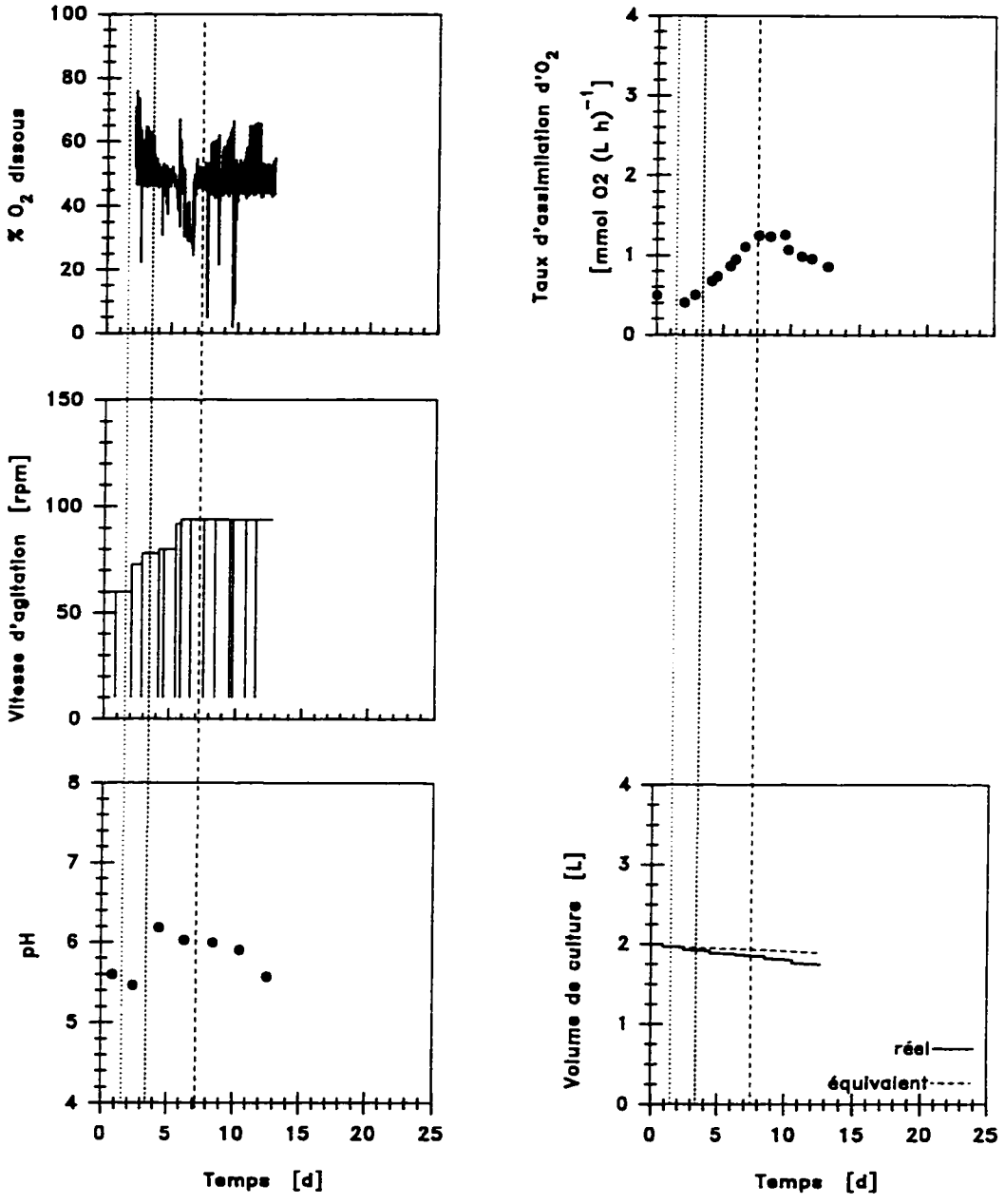


Figure A3.42 Vitesse d'agitation, concentration d'OD, taux volumique d'assimilation d'oxygène, conductivité du milieu de culture et volume de culture d'une cuvée contrôlée à 50% d'OD Milieu de culture: B5DN, lignée VVG12 sc60.

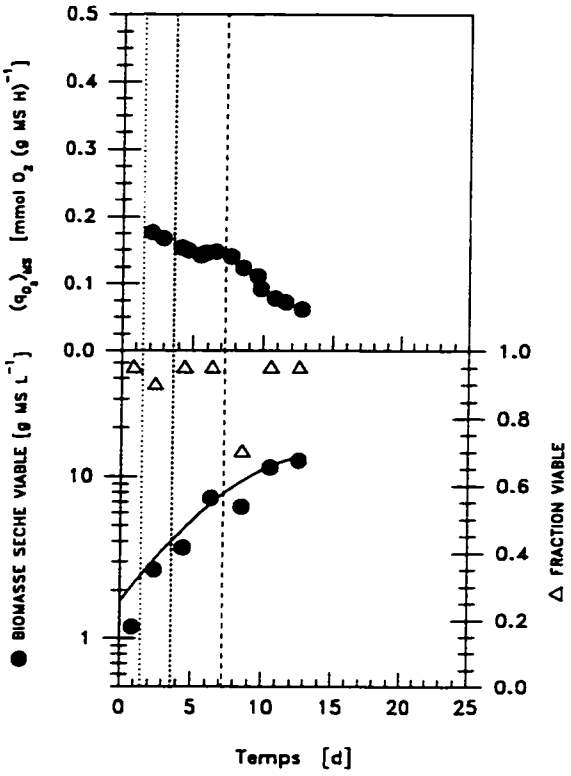


Figure A3.43 Taux spécifique d'assimilation d'O_2 et croissance de la biomasse d'une cuvée contrôlée à 50% d'OD Milieu de culture B5, lignée VVG12 sc60.

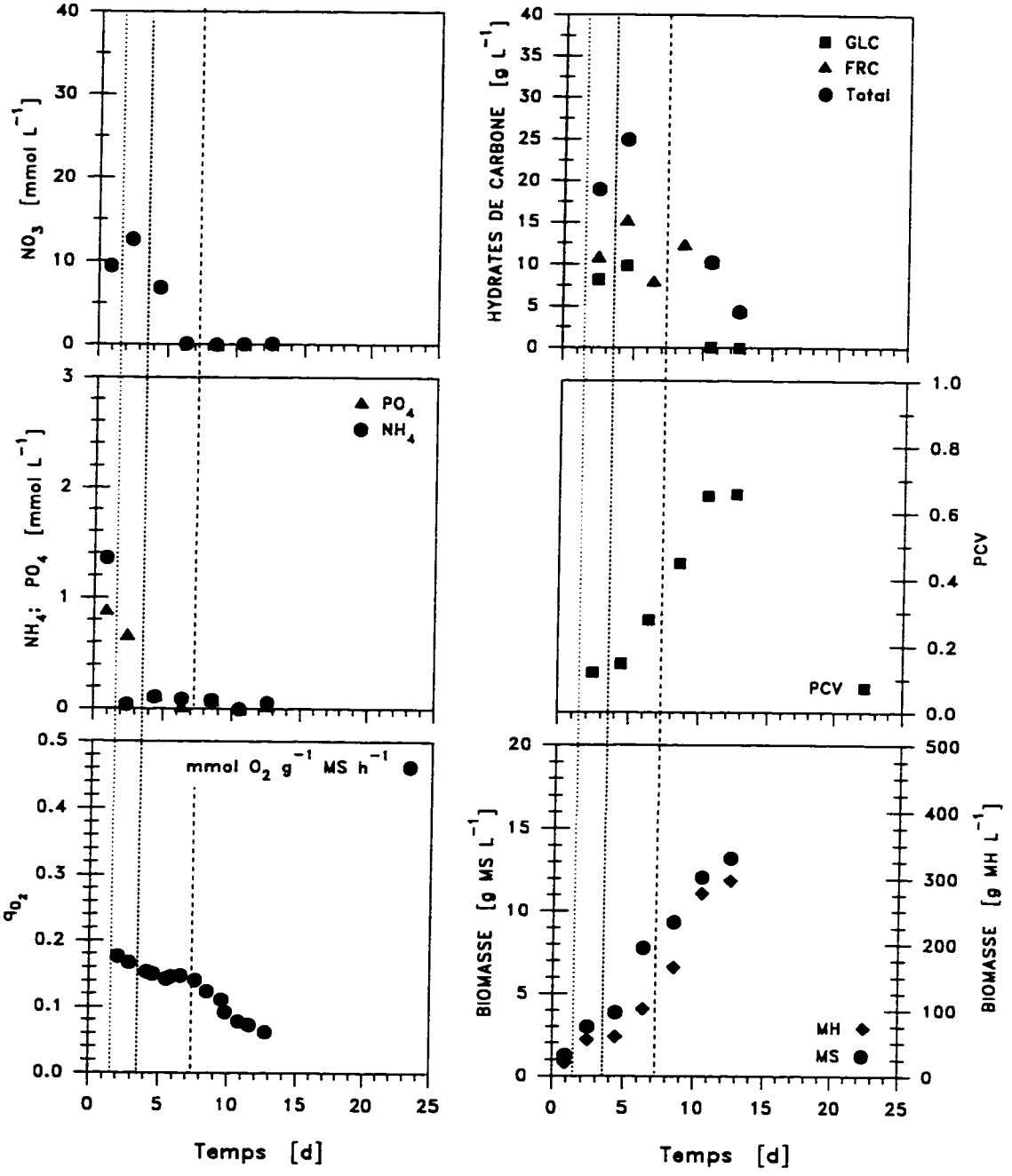


Figure A3.44 Consommation de nutriments et croissance de la biomasse d'une cuvée contrôlée à 50% d'OD Milieu de culture: B5DN, lignée VVG12 sc60.

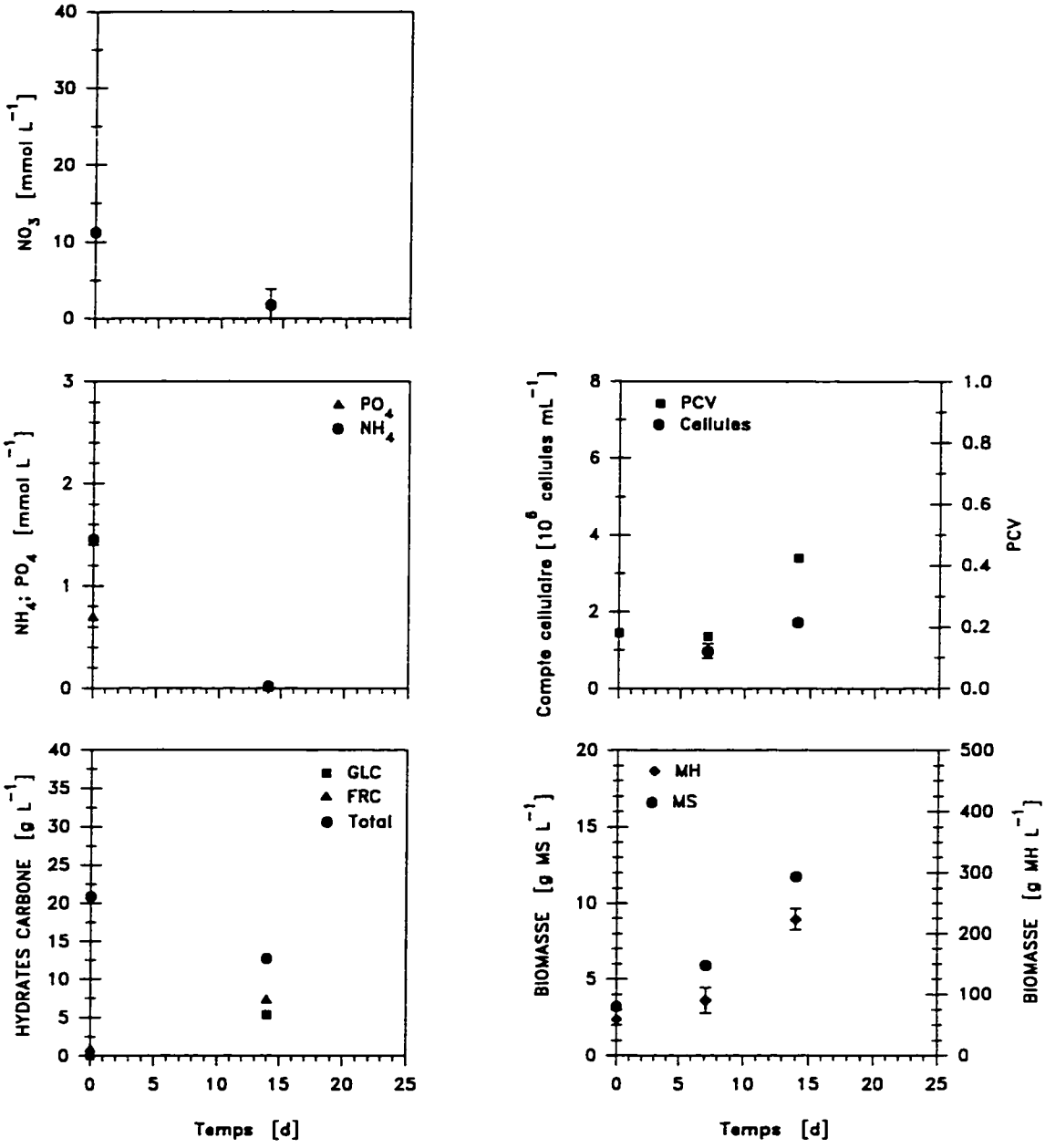


Figure A3.45 Croissance de la biomasse, prolifération cellulaire et viabilité, production d'anthocyanes, masse des cellules et ratio masse humide sur masse sèche de cultures en cuvée et en flacons agités de cellules VVG12 sc57. Milieu de culture B5DN, culture témoin de la cuvée en bioréacteurs H12.

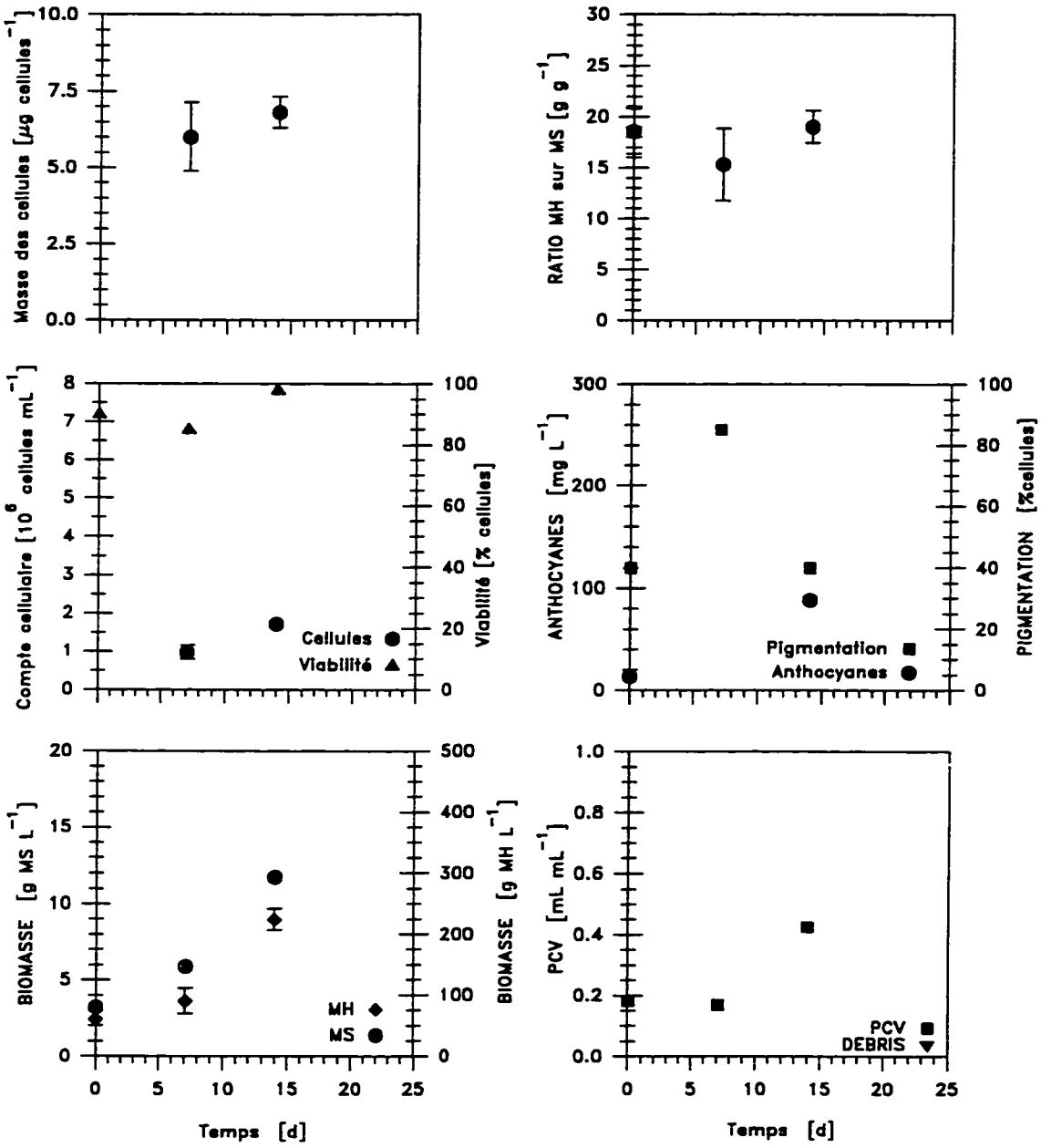


Figure A3.46 Croissance de la biomasse, prolifération cellulaire et viabilité, production d'anthocyanes, masse des cellules et ratio masse humide sur masse sèche de cultures en cuvée et en flacons agités de cellules VVG12 sc57. Milieu de culture B5DN, culture témoin de la cuvée en bioréacteurs H12.

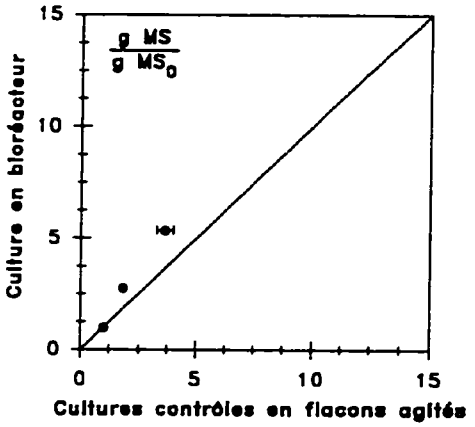


Figure A3.47 Comparaison des indices d'augmentation de la biomasse sèche d'une culture en cuvée contrôlée à 90% d'OD avec ses cultures témoins en flacons agités. Milieu de culture: B5DN, lignée VVG12 sc57.

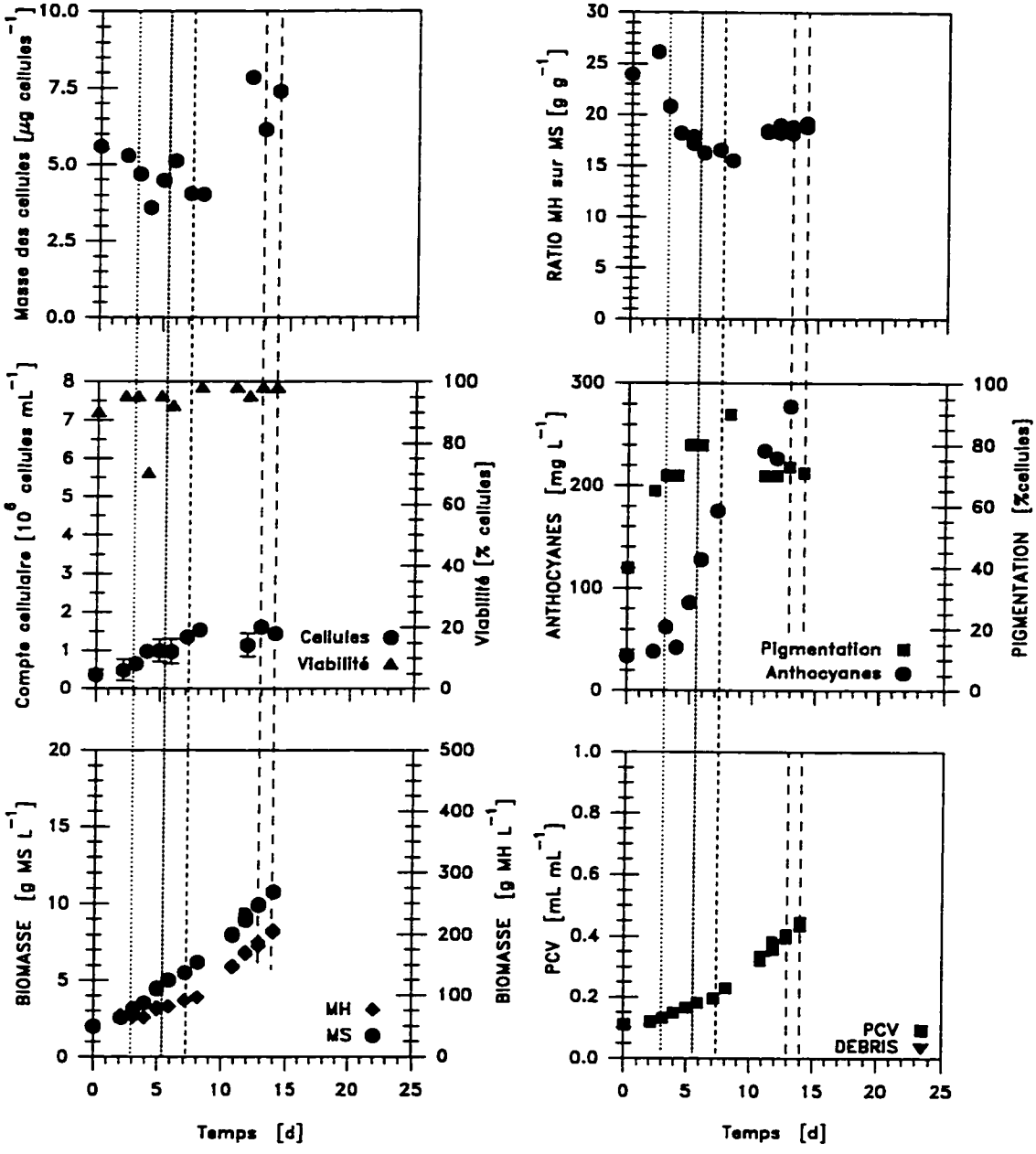


Figure A3.48 Indicateurs de croissance, production d'anthocyanes, masse spécifique des cellules et ratio de la biomasse humide sur la biomasse sèche d'une culture en cuvée contrôlée à 90% d'OD. Milieu de culture: B5DN, lignée VVG12 sc57.

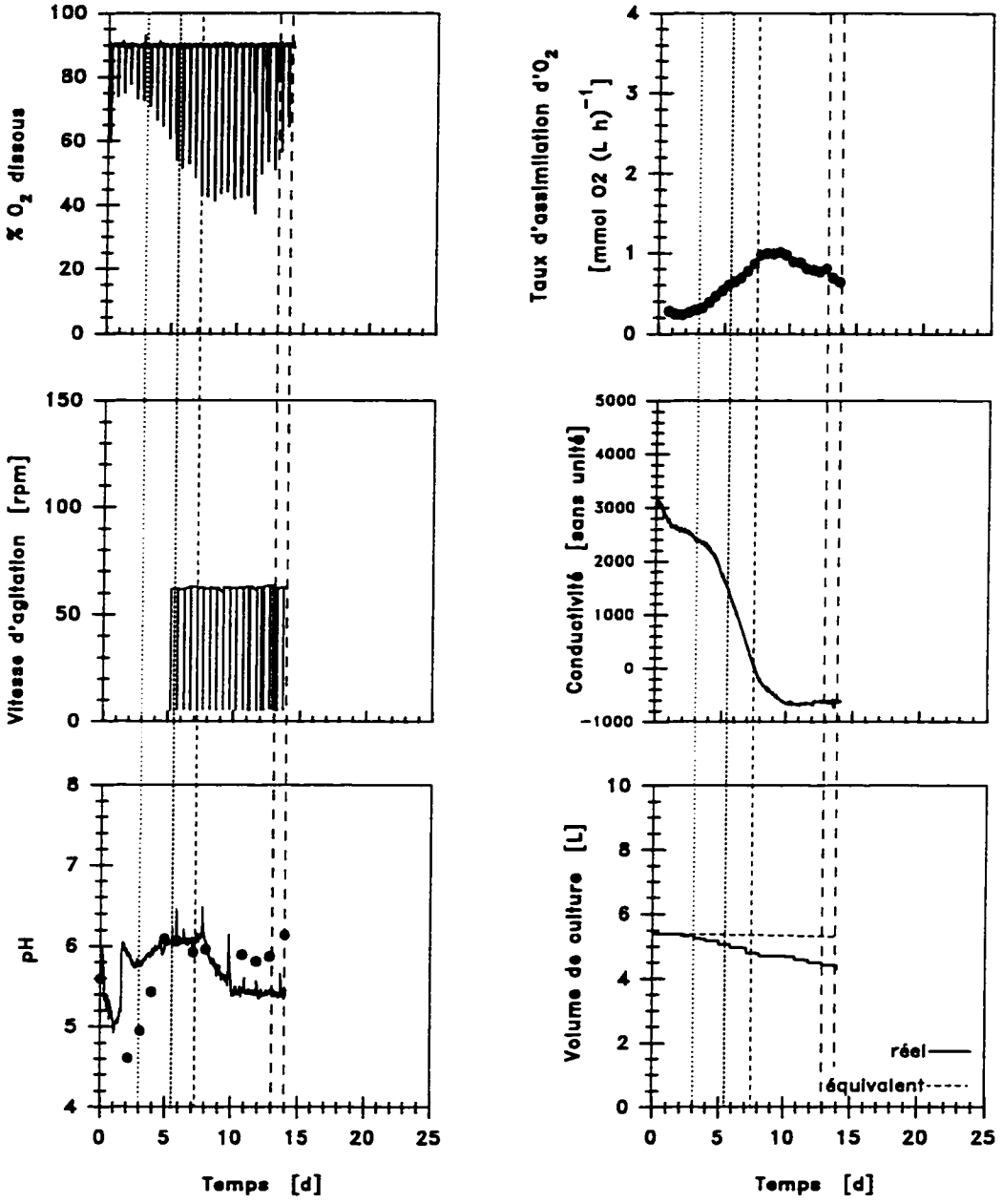


Figure A3.49 Vitesse d'agitation, concentration d'OD, taux volumique d'assimilation d'oxygène, conductivité du milieu de culture et volume de culture d'une cuvée contrôlée à 90% d'OD Milieu de culture: B5DN, lignée VVG12 sc57..

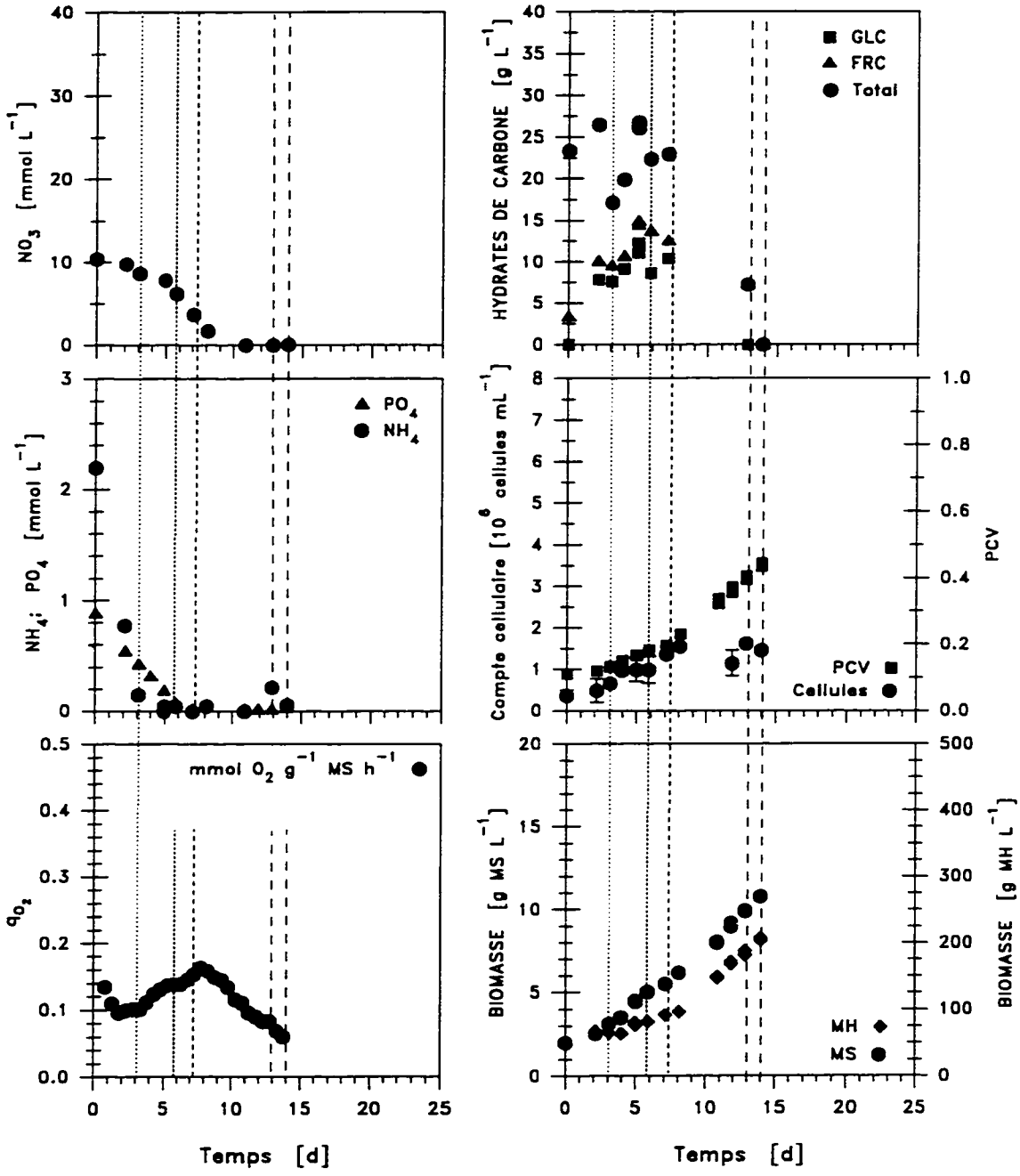


Figure A3.50. Consommation de nutriments et croissance de la biomasse d'une cuvée contrôlée à 90% d'OD Milieu de culture: B5DN, lignée VVG12 sc57.

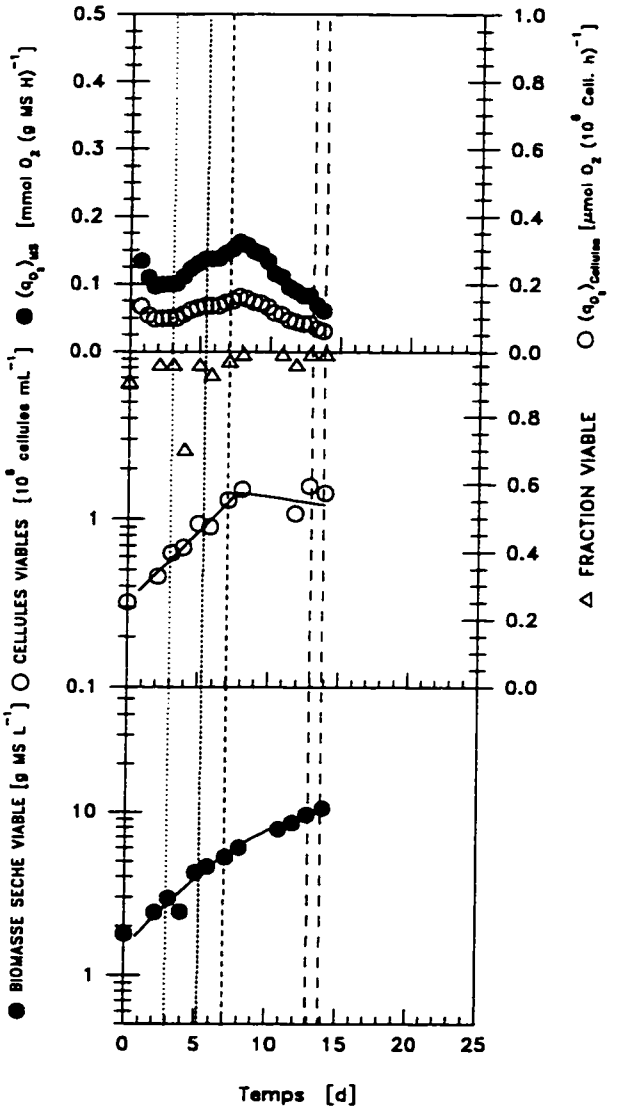


Figure A3.51 Taux spécifique d'assimilation d'O_2 et croissance de la biomasse d'une cuvée contrôlée à 90% d'OD Milieu de culture B5, lignée VVG12 sc57.

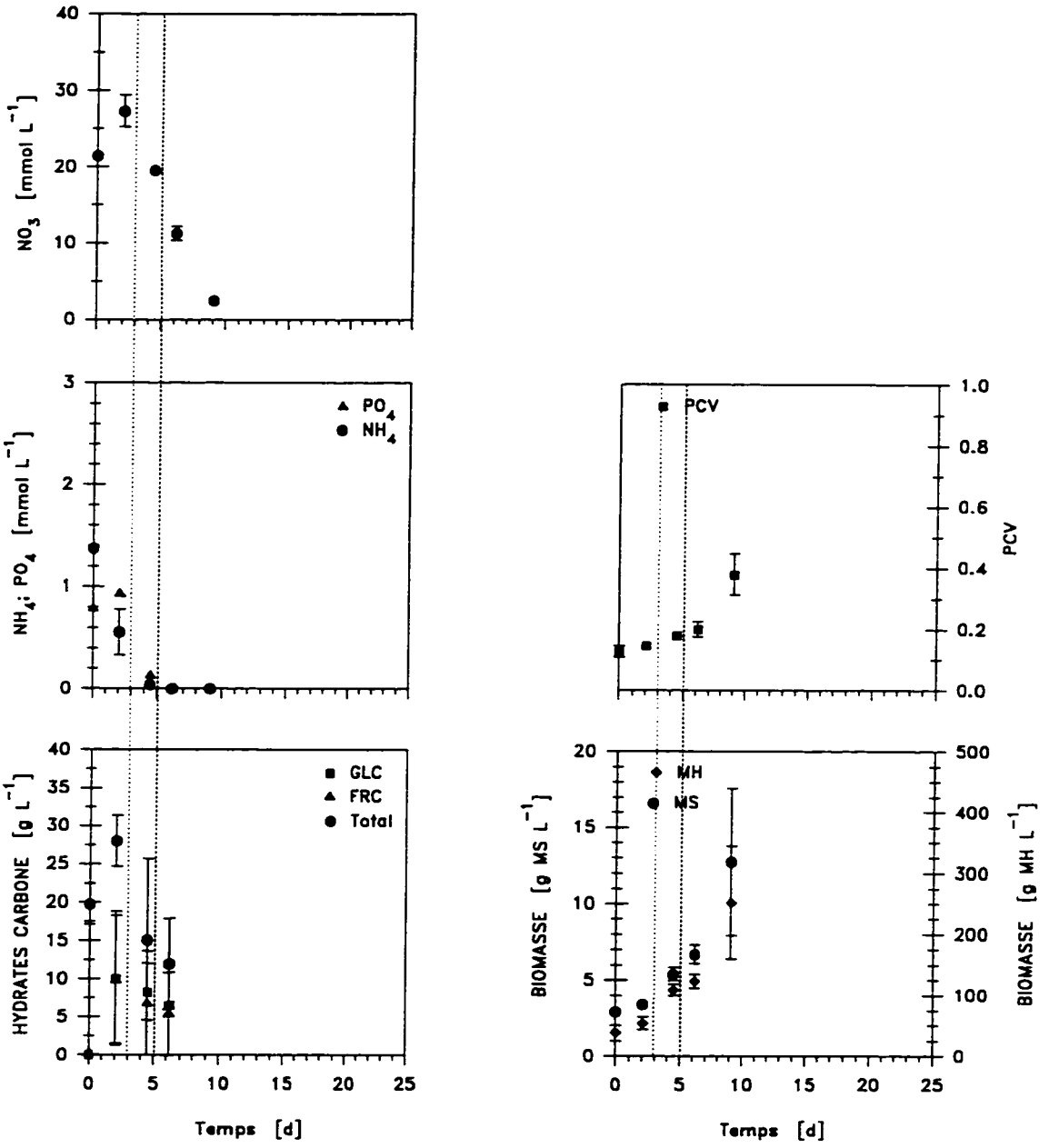


Figure A3.52 Consommation de nutriments, croissance de la biomasse et production d'anthocyanes de cultures en cuvée en flacons agités. Milieu de culture B5, lignée VVG12 sc64, cultures témoins des cuvées en bioréacteur H20, H21 et H22.

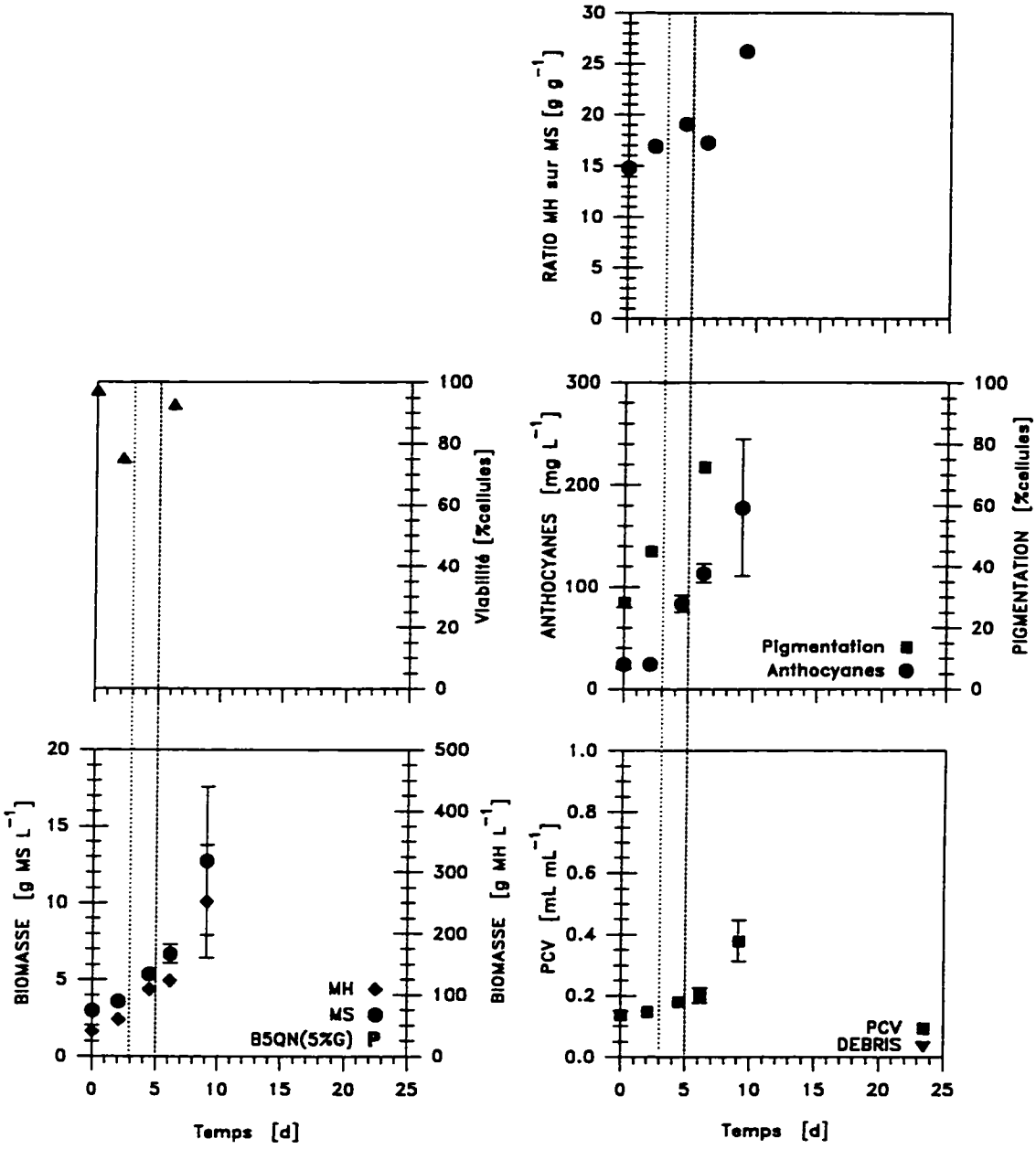


Figure A3.53 Croissance de la biomasse, prolifération cellulaire et viabilité, production d'anthocyanes, masse des cellules et ratio masse humide sur masse sèche de cultures en cuvée et en flacons agités de cellules VVG12 sc64. Milieu de culture B5, culture témoin des cuvées en bioréacteurs H20, H21 et H22.

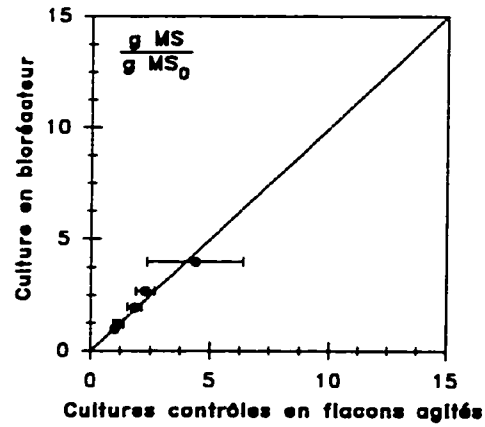


Figure A3.54 Comparaison des indices d'augmentation de la biomasse sèche d'une culture en cuvée contrôlée à 20% d'OD avec ses cultures témoins en flacons agités. Milieu de culture: B5, lignée VVG12 sc64.

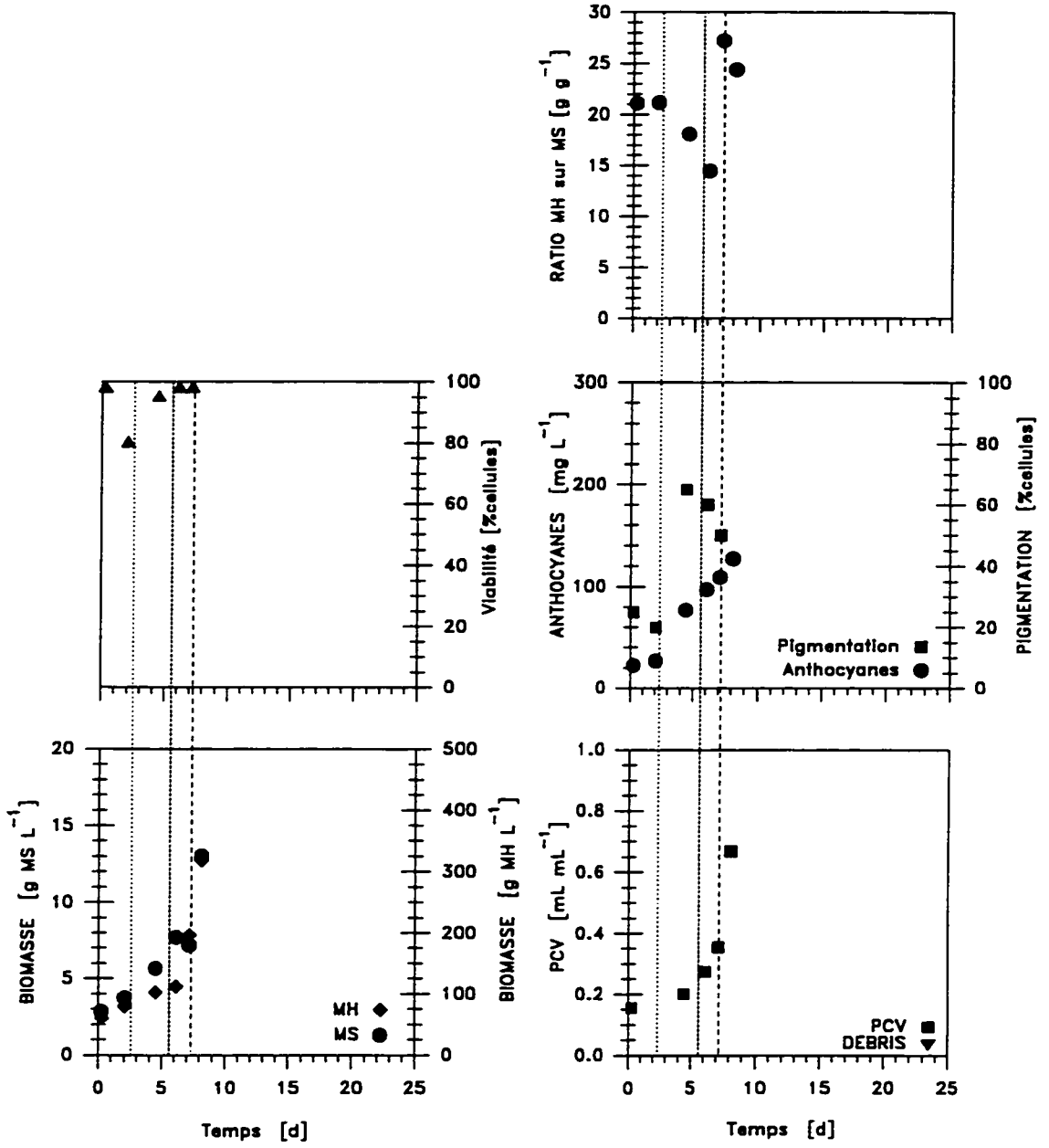


Figure A3.55 Indicateurs de croissance, production d'anthocyanes, masse spécifique des cellules et ratio de la biomasse humide sur la biomasse sèche d'une culture en cuvée contrôlée à 20% d'OD. Milieu de culture: B5, lignée VVG12 sc64.

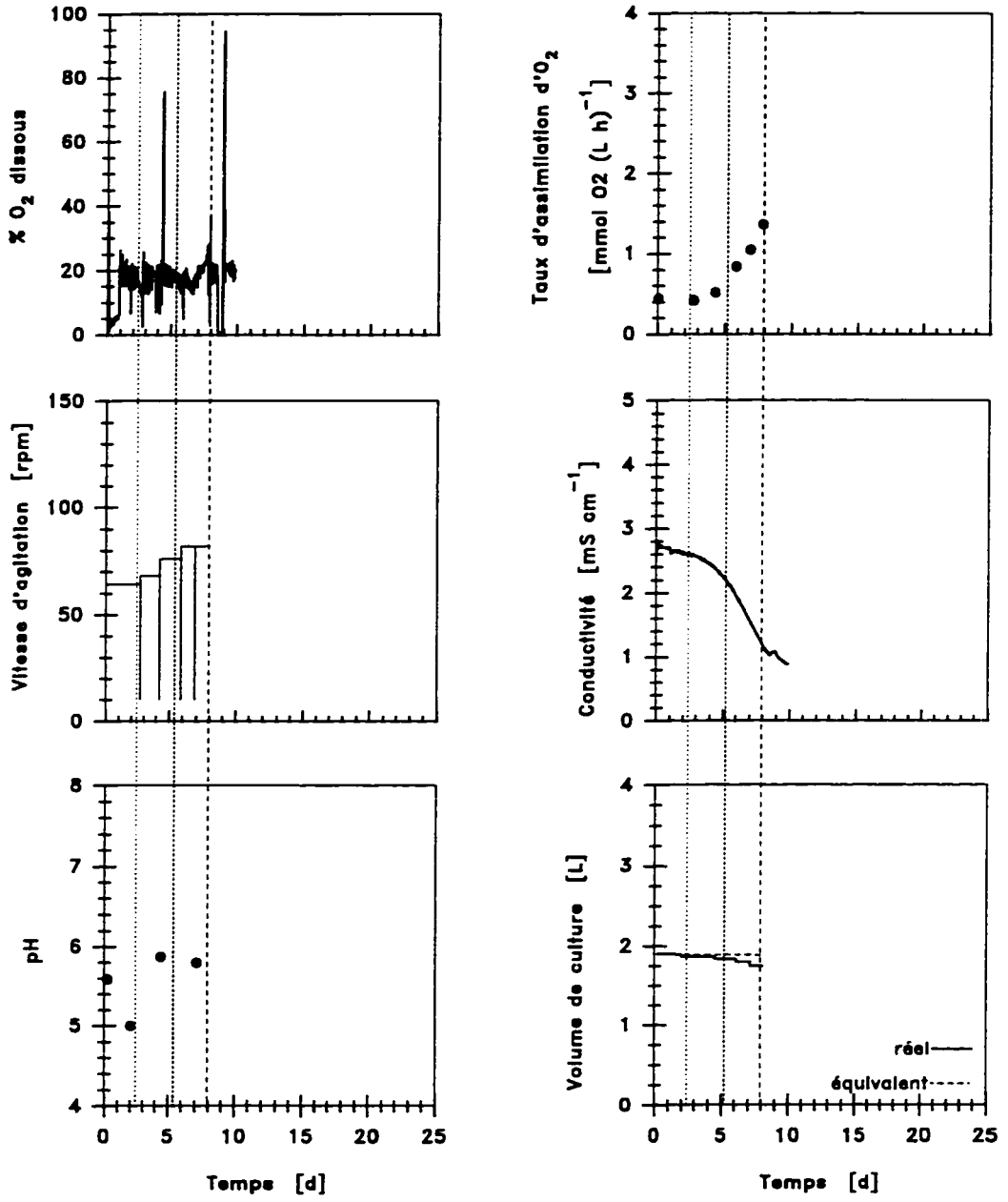


Figure A3.56 Vitesse d'agitation, concentration d'OD, taux volumique d'assimilation d'oxygène, conductivité du milieu de culture et volume de culture d'une cuvée contrôlée à 20% d'OD Milieu de culture: B5, lignée VVG12 sc64.

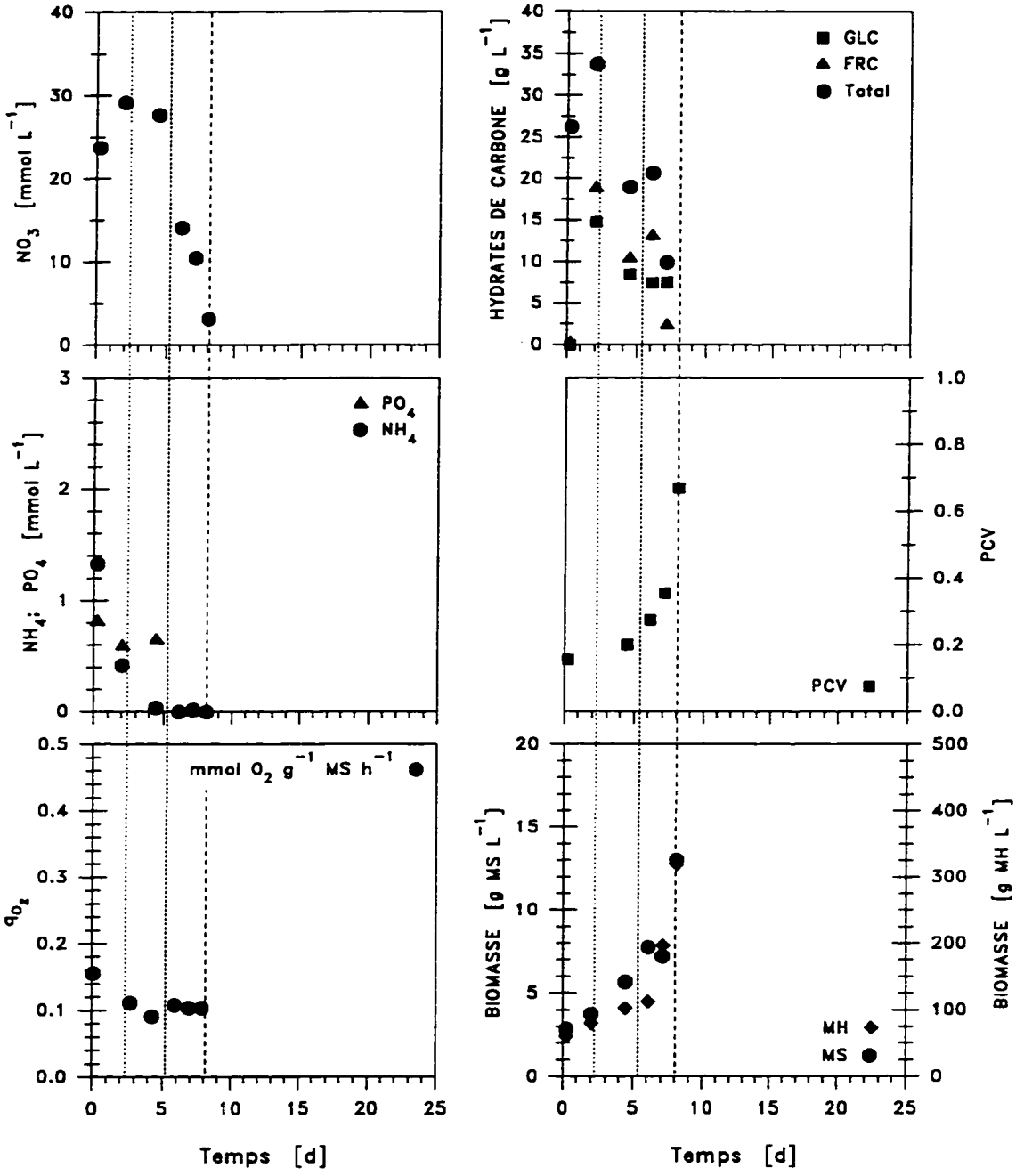


Figure A3.57 Consommation de nutriments et croissance de la biomasse d'une cuvée contrôlée à 20% d'OD Milieu de culture: B5, lignée VVG12 sc64.

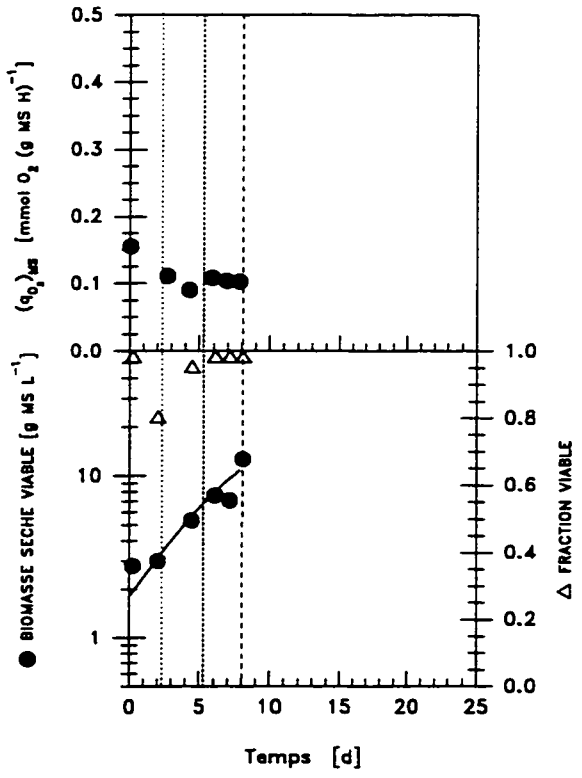


Figure A3.58 Taux spécifique d'assimilation d'O_2 et croissance de la biomasse d'une cuvée contrôlée à 20% d'OD Milieu de culture B5, lignée VVG12 sc64.

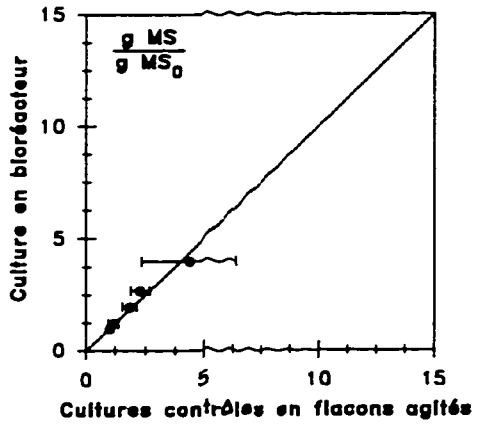


Figure A3.59 Comparaison des indices d'augmentation de la biomasse sèche d'une culture en cuvée contrôlée à 50% d'OD avec ses cultures témoins en flacons agités. Milieu de culture: B5, lignée VVG12 sc64.

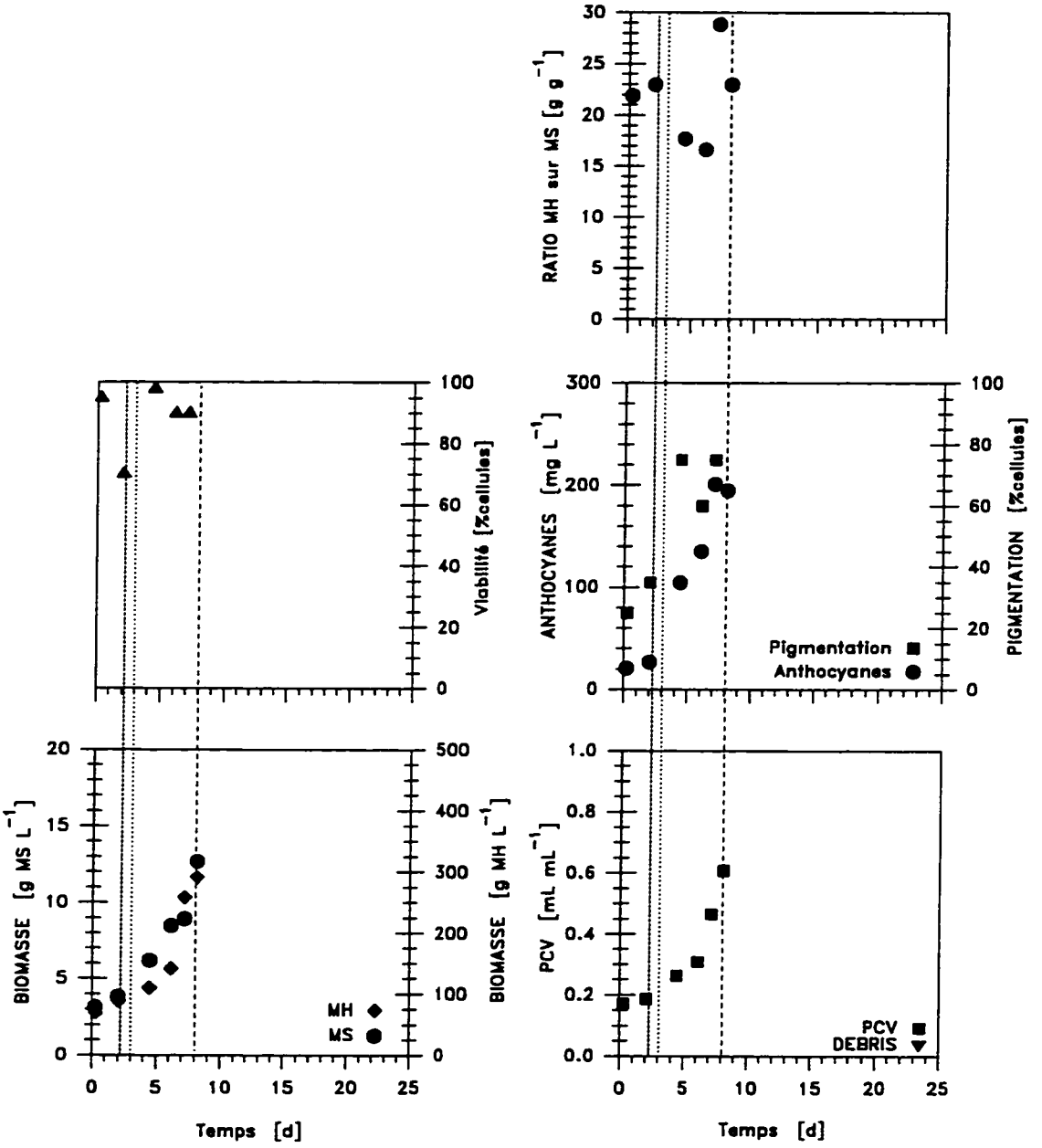


Figure A3.60 Indicateurs de croissance, production d'anthocyanes, masse spécifique des cellules et ratio de la biomasse humide sur la biomasse sèche d'une culture en cuvée contrôlée à 50% d'OD. Milieu de culture: B5, lignée VVG12 sc64.

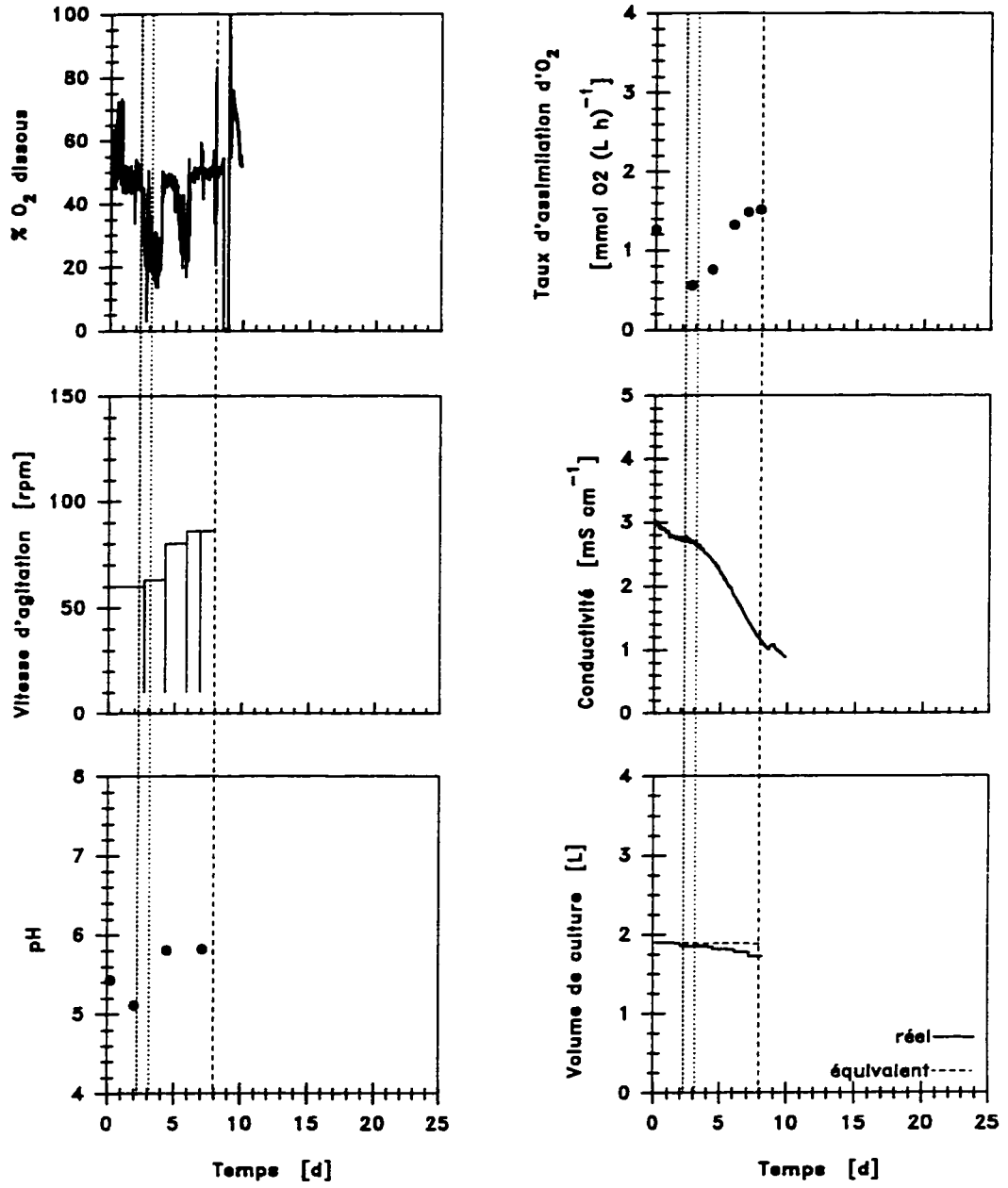


Figure A3.61 Vitesse d'agitation, concentration d'OD, taux volumique d'assimilation d'oxygène, conductivité du milieu de culture et volume de culture d'une cuvée contrôlée à 50% d'OD Milieu de culture: B5, lignée VVG12 sc64.

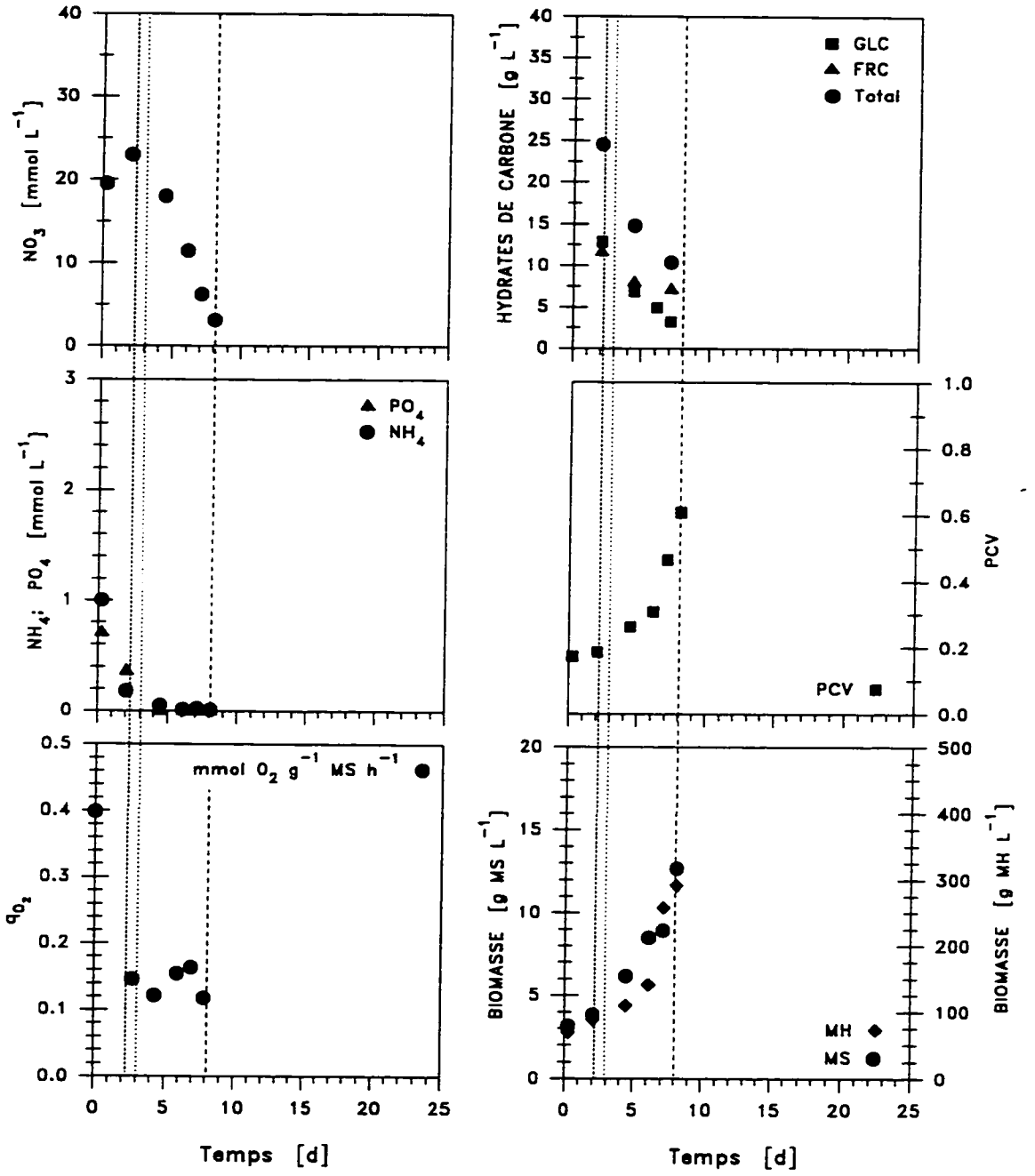


Figure A3.62 Consommation de nutriments et croissance de la biomasse d'une cuvée contrôlée à 50% d'OD Milieu de culture: B5, lignée VVG12 sc64.

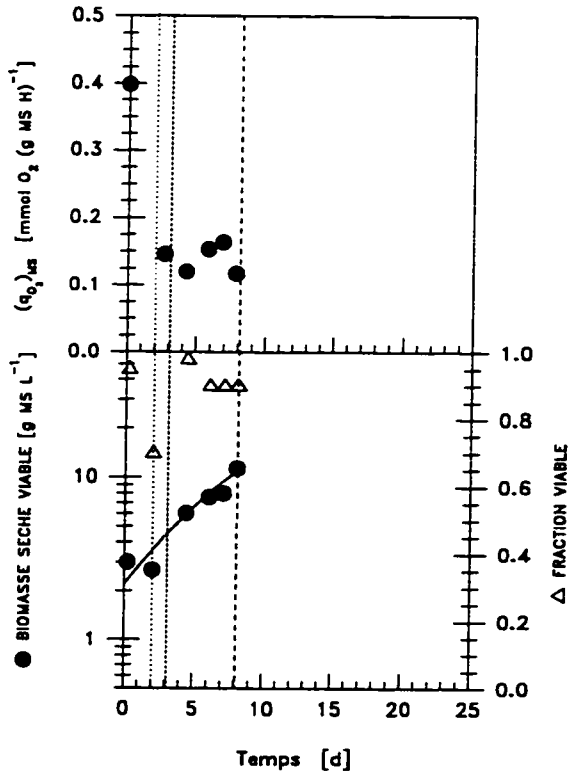


Figure A3.63 Taux spécifique d'assimilation d'O_2 et croissance de la biomasse d'une cuvée contrôlée à 50% d'OD Milieu de culture B5, lignée VVG12 sc64.

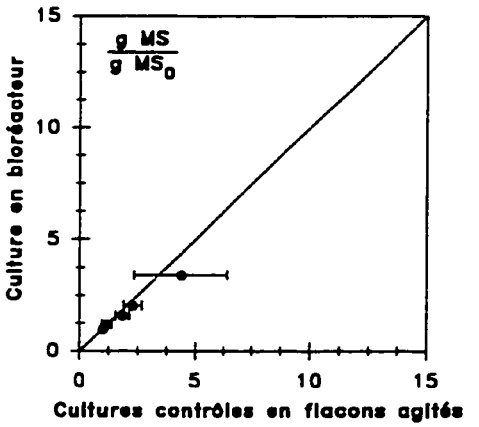


Figure A3.64 Comparaison des indices d'augmentation de la biomasse sèche d'une culture en cuvée contrôlée à 70% d'OD avec ses cultures témoins en flacons agités. Milieu de culture: B5, lignée VVG12 sc64.

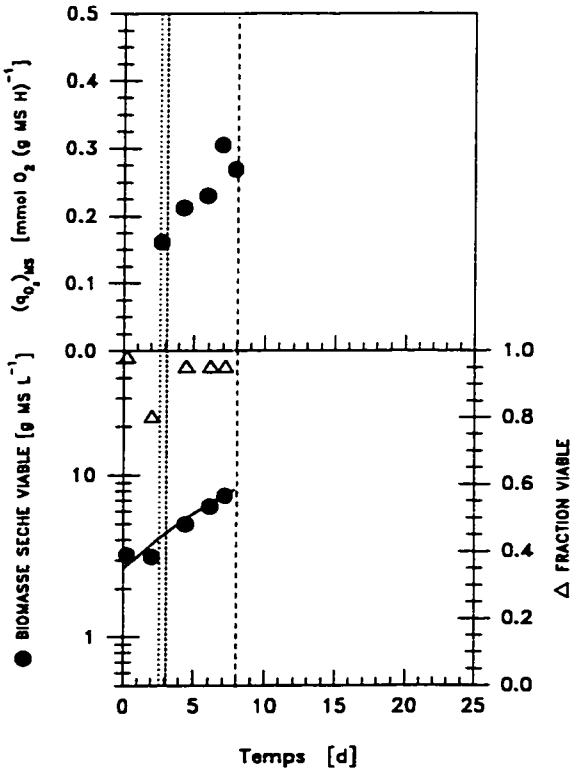


Figure A3.65 Indicateurs de croissance, production d'anthocyanes, masse spécifique des cellules et ratio de la biomasse humide sur la biomasse sèche d'une culture en cuvée contrôlée à 70% d'OD. Milieu de culture: B5, lignée VVG12 sc64.

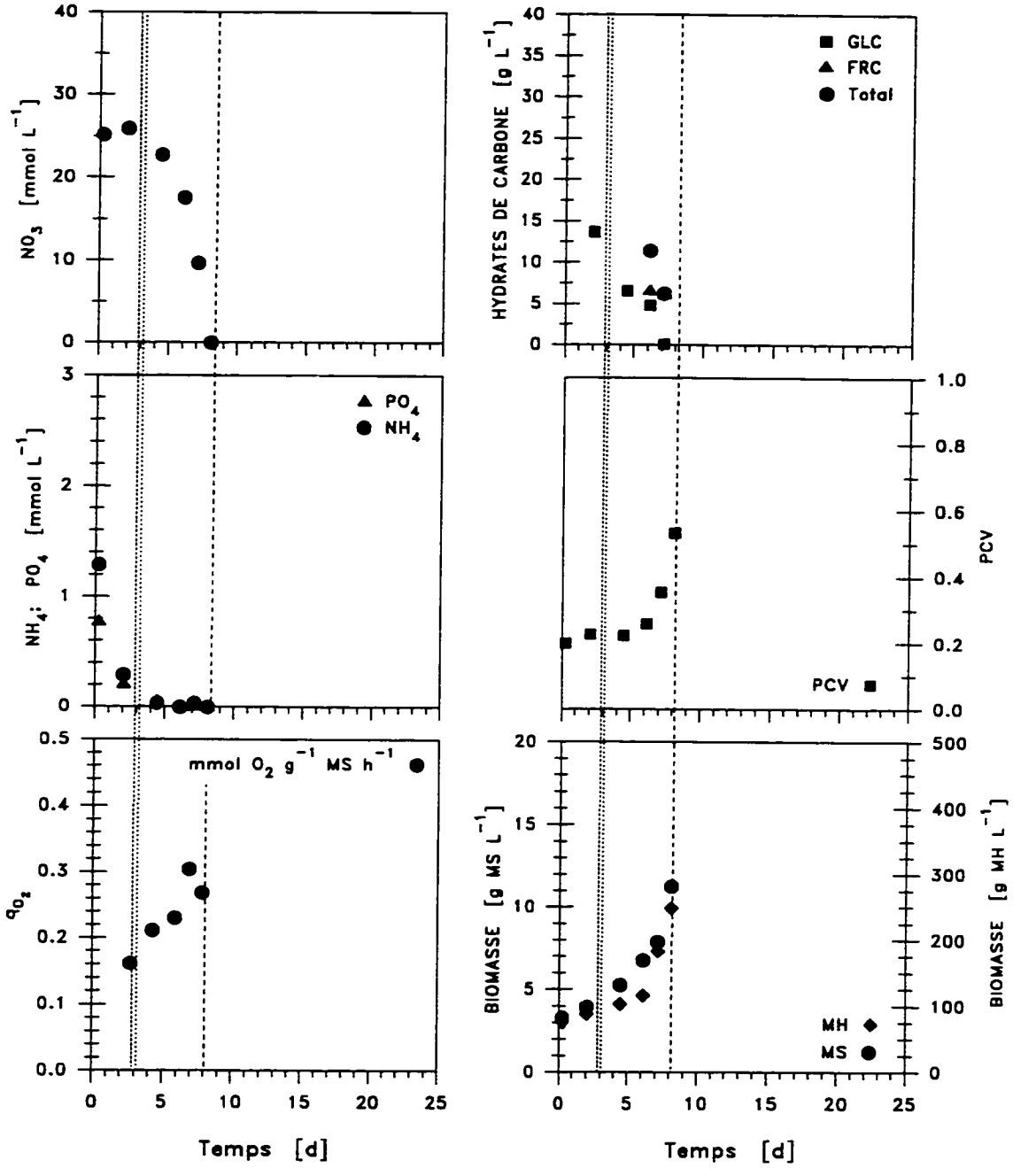


Figure A3.66 Vitesse d'agitation, concentration d'OD, taux volumique d'assimilation d'oxygène, conductivité du milieu de culture et volume de culture d'une cuvée contrôlée à 70% d'OD Milieu de culture: B5, lignée VVG12 sc64.

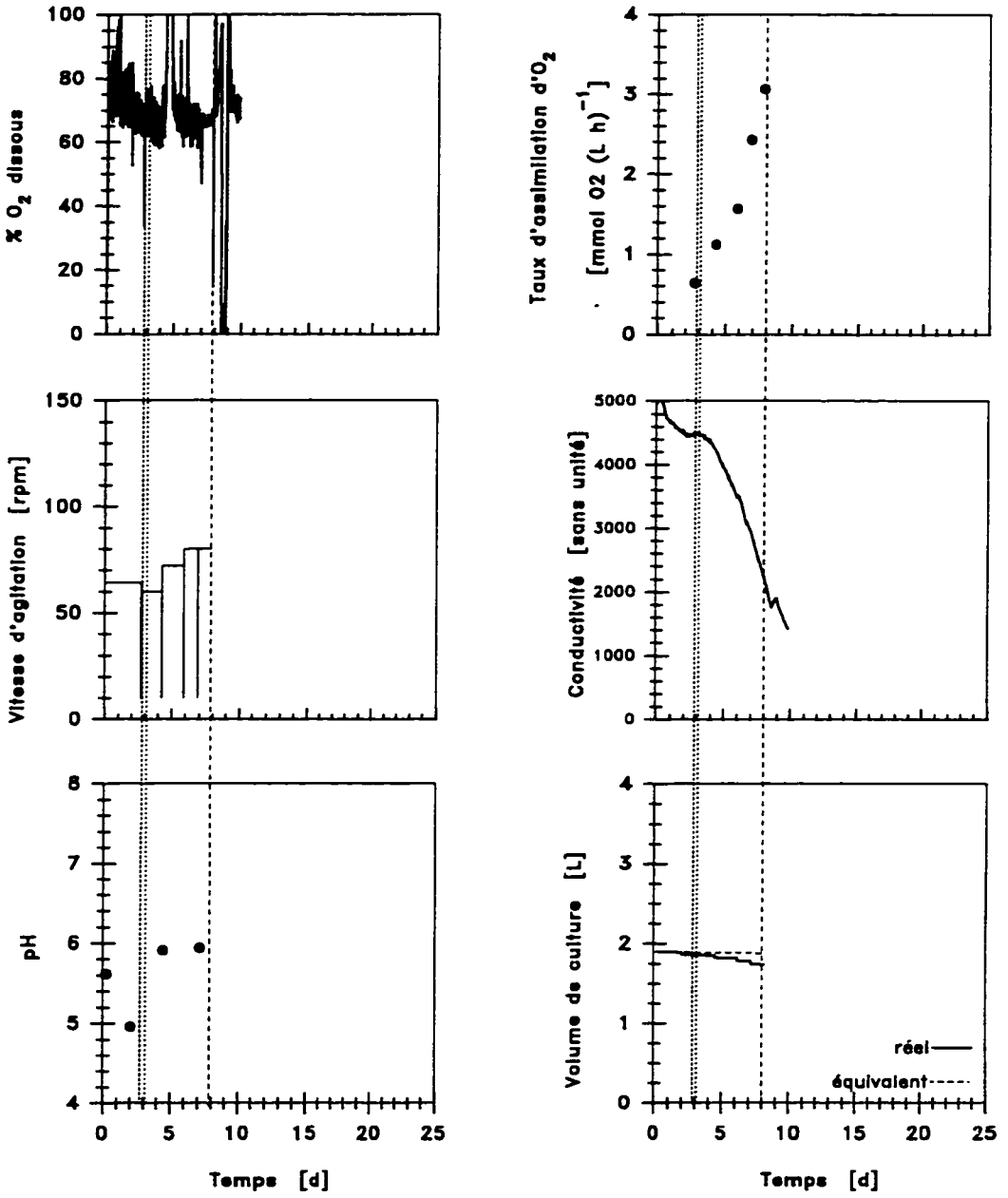


Figure A3.67 Consommation de nutriments et croissance de la biomasse d'une cuvée contrôlée à 70% d'OD Milieu de culture: B5, lignée VVG12 sc64.

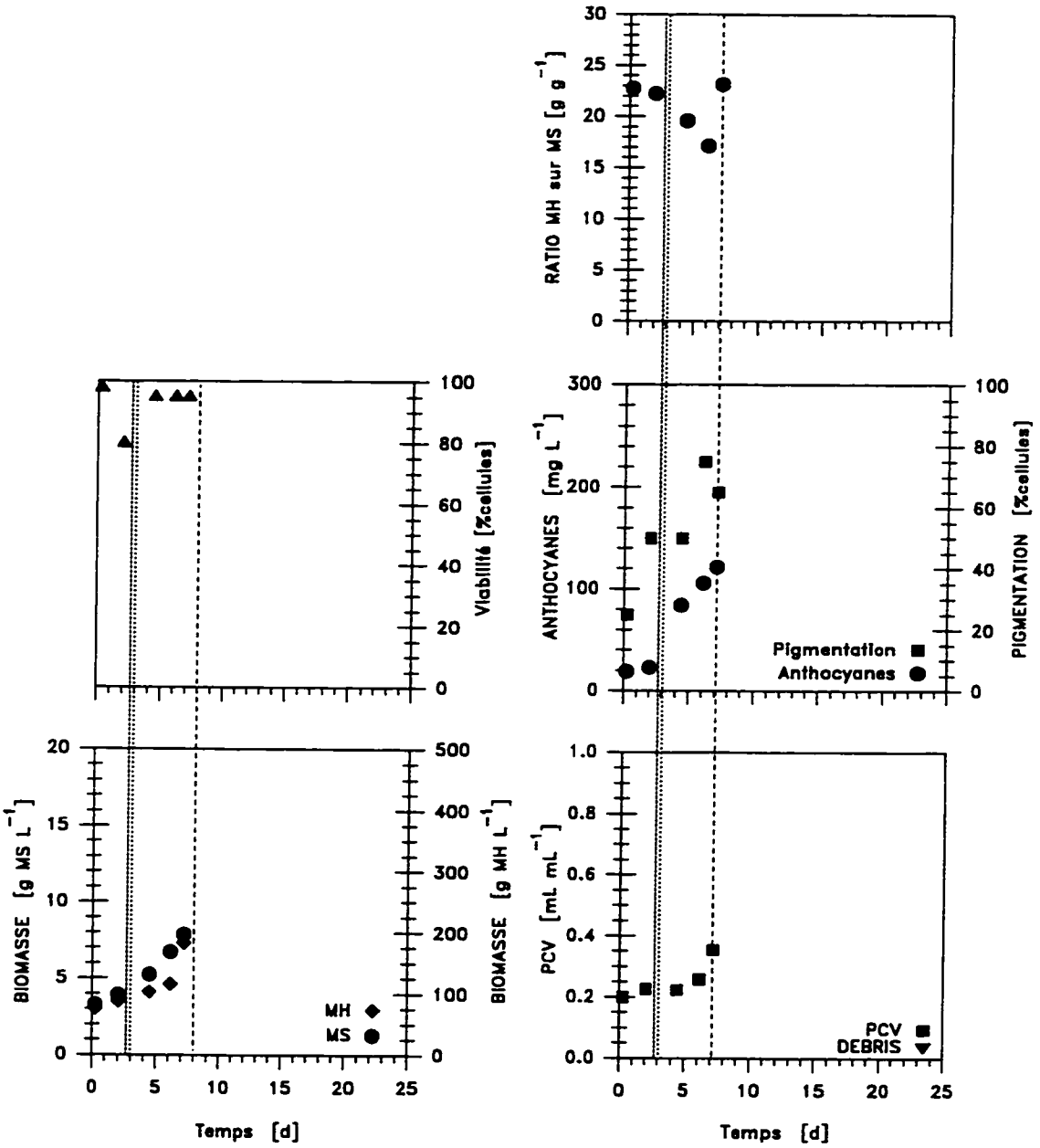


Figure A3.68 Taux spécifique d'assimilation d'O_2 et croissance de la biomasse d'une cuvée contrôlée à 70% d'OD Milieu de culture B5, lignée VVG12 sc64.

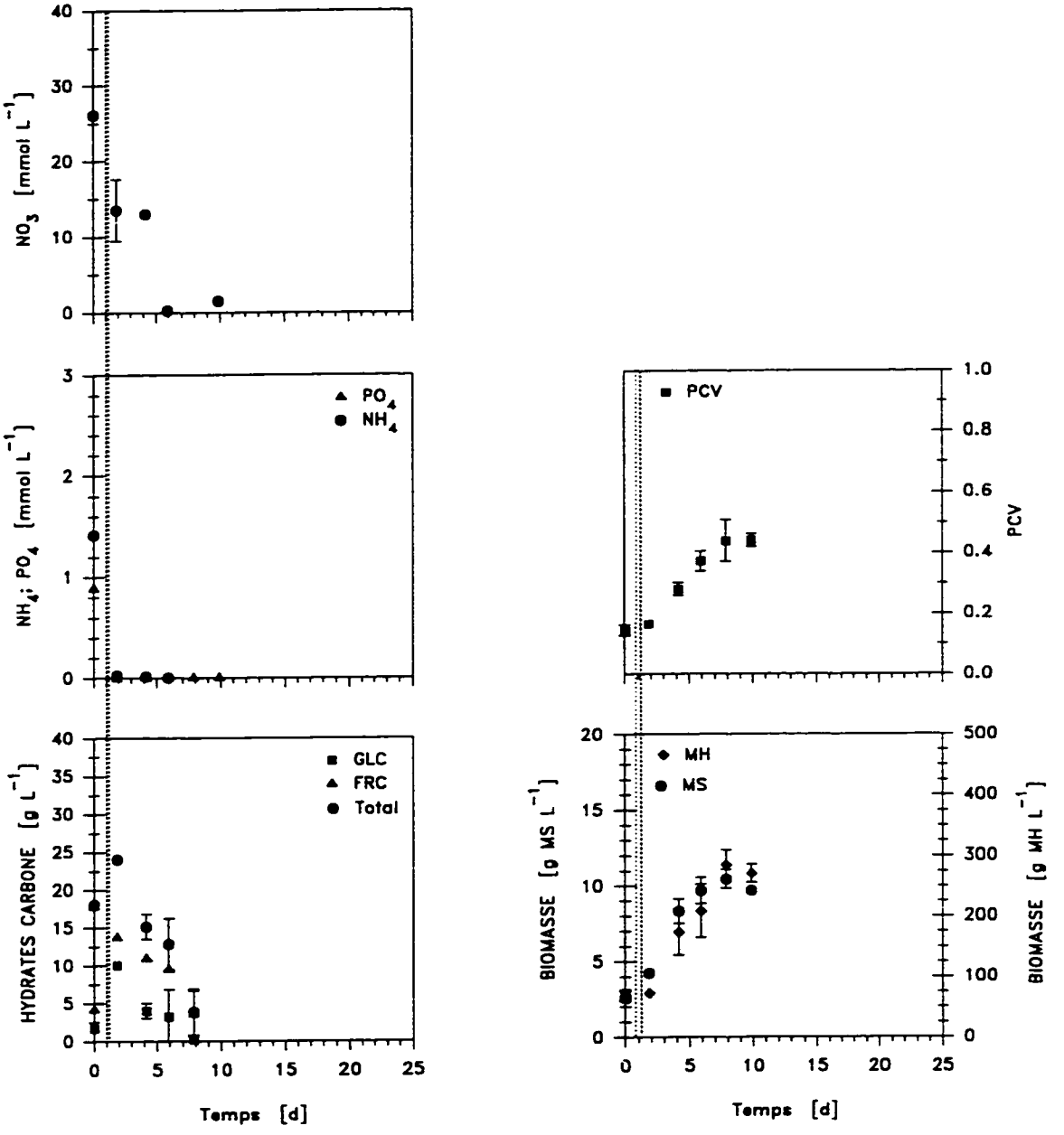


Figure A3.69 Consommation de nutriments, croissance de la biomasse et production d'anthocyanes de cultures en cuvée en flacons agités. Milieu de culture B5, lignée VVG109 sc37, cultures témoins des cuvées en bioréacteur H24, H25 et H26.

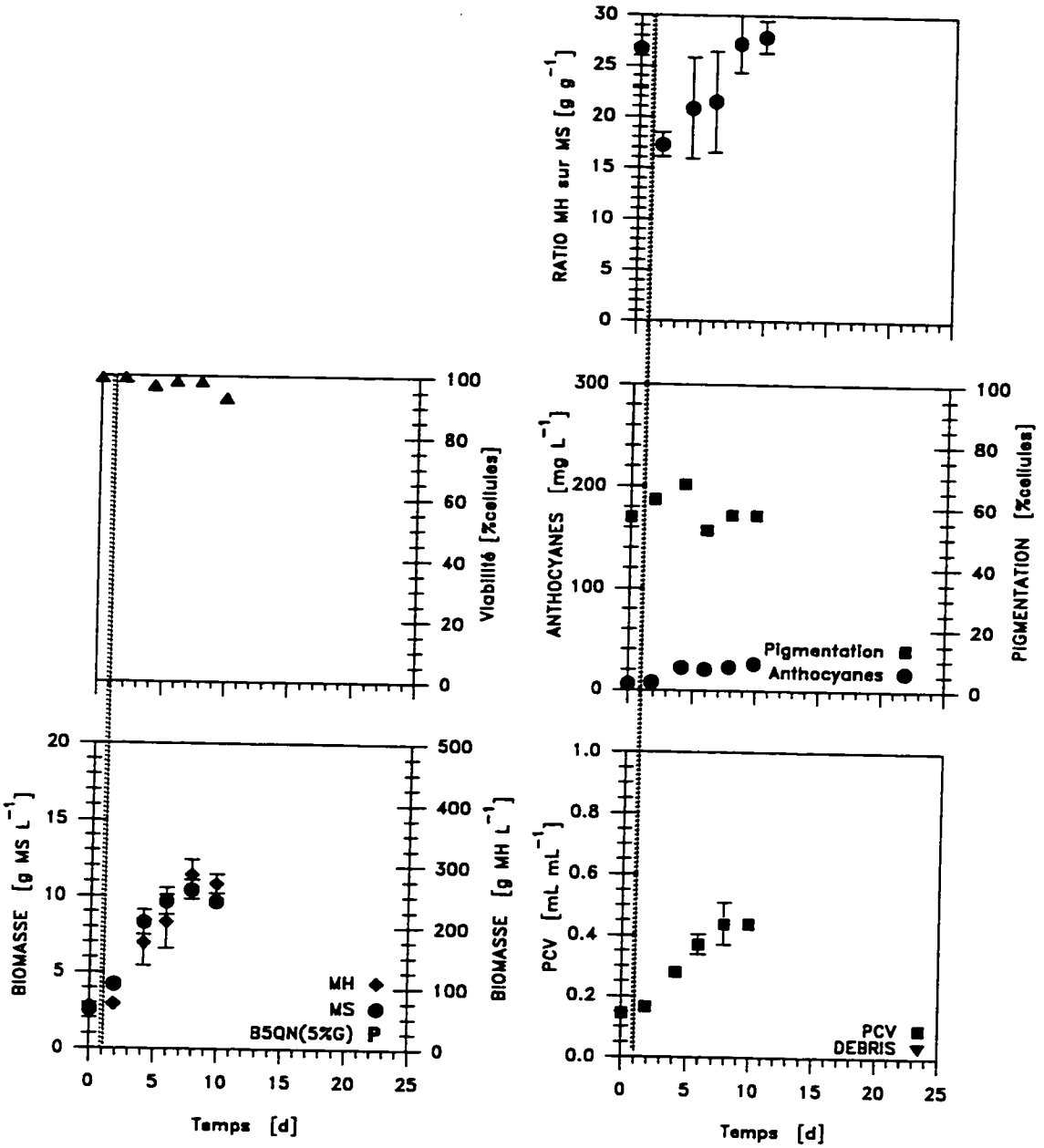


Figure A3.70 Croissance de la biomasse, prolifération cellulaire et viabilité, production d'anthocyanes, masse des cellules et ratio masse humide sur masse sèche de cultures en cuvée et en flacons agités de cellules VVG109 sc37. Milieu de culture B5, culture témoin des cuvées en bioréacteurs H24, H25 et H26.

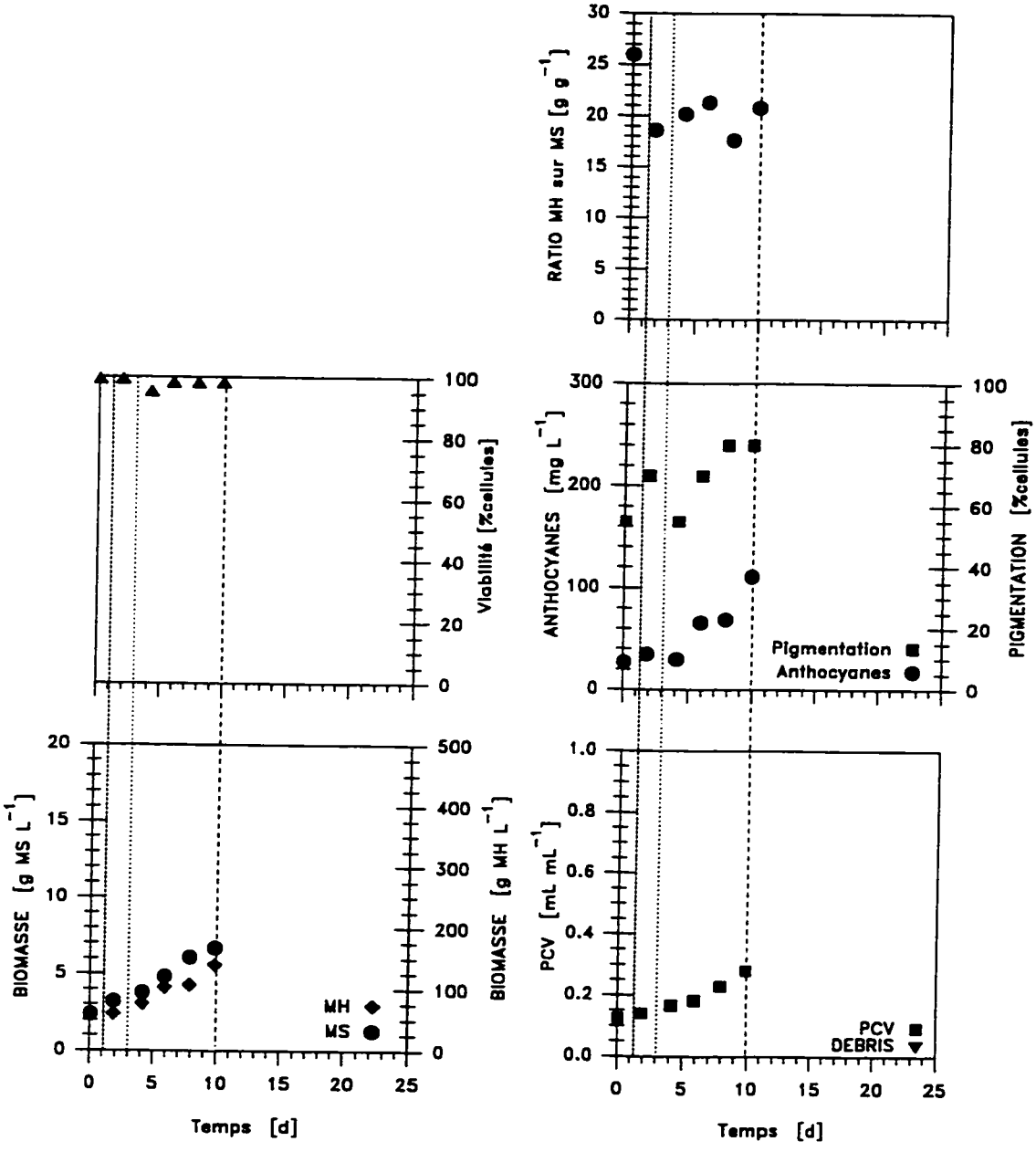


Figure A3.71 Indicateurs de croissance, production d'anthocyanes, masse spécifique des cellules et ratio de la biomasse humide sur la biomasse sèche d'une culture en cuvée contrôlée à 54% d'OD. Milieu de culture: B5QN, lignée VVG109 sc37.

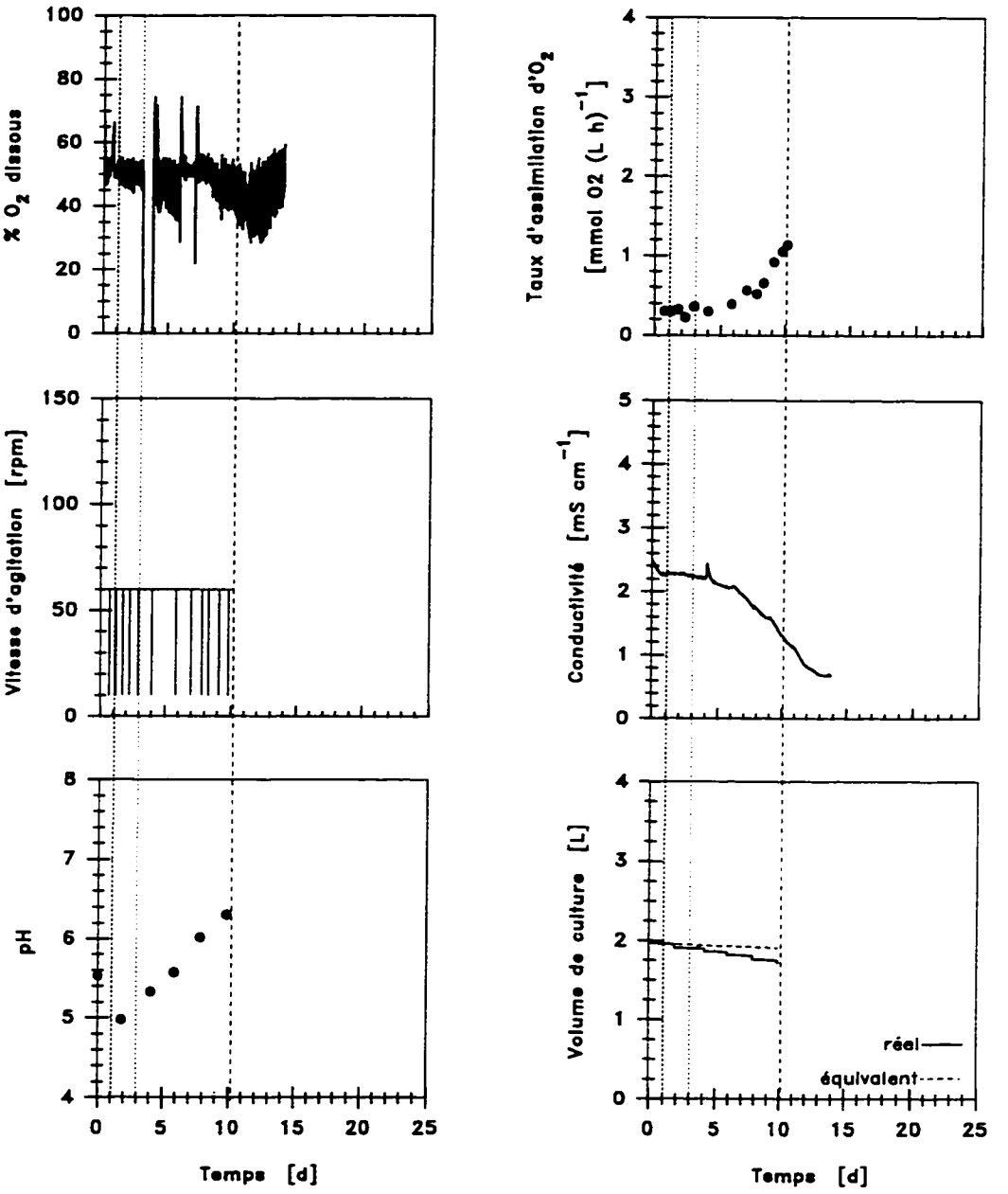


Figure A3.72 Vitesse d'agitation, concentration d'OD, taux volumique d'assimilation d'oxygène, conductivité du milieu de culture et volume de culture d'une cuvée contrôlée à 54% d'OD Milieu de culture: B5QN, lignée VVG109 sc37.

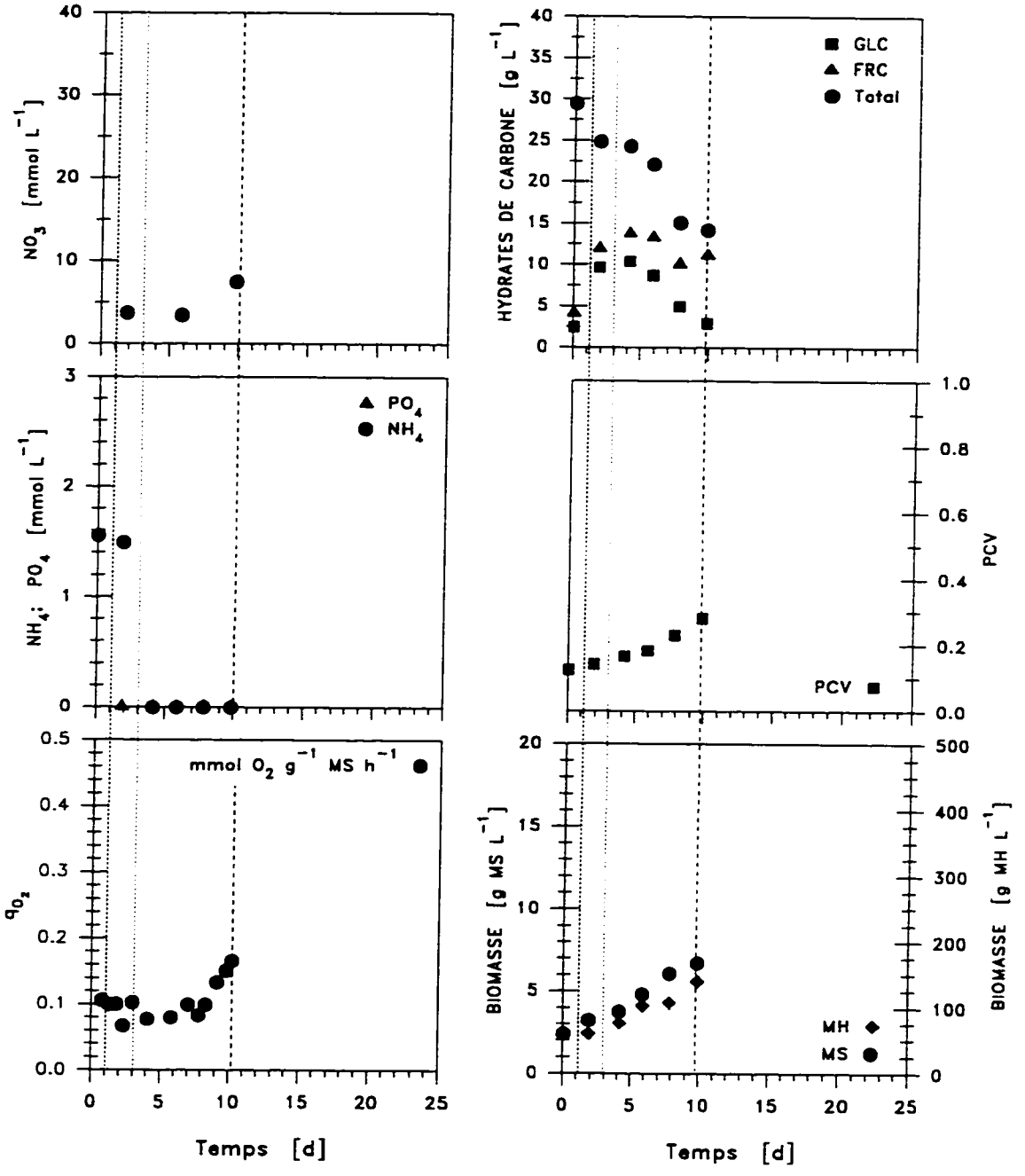


Figure A3.73 Consommation de nutriments et croissance de la biomasse d'une cuvée contrôlée à 54% d'OD Milieu de culture: B5QN, lignée VVG109 sc37.

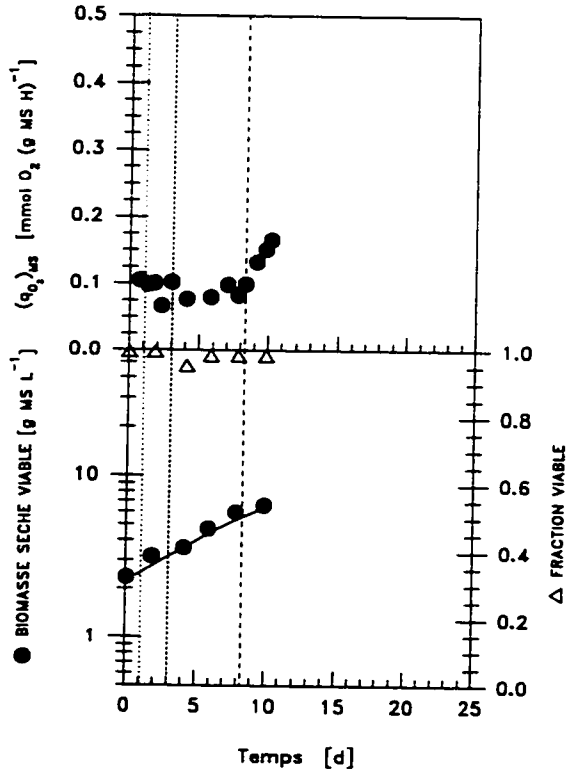


Figure A3.74 Taux spécifique d'assimilation d'O_2 et croissance de la biomasse d'une cuvée contrôlée à 54% d'OD Milieu de culture B5, lignée VVG109 sc37.

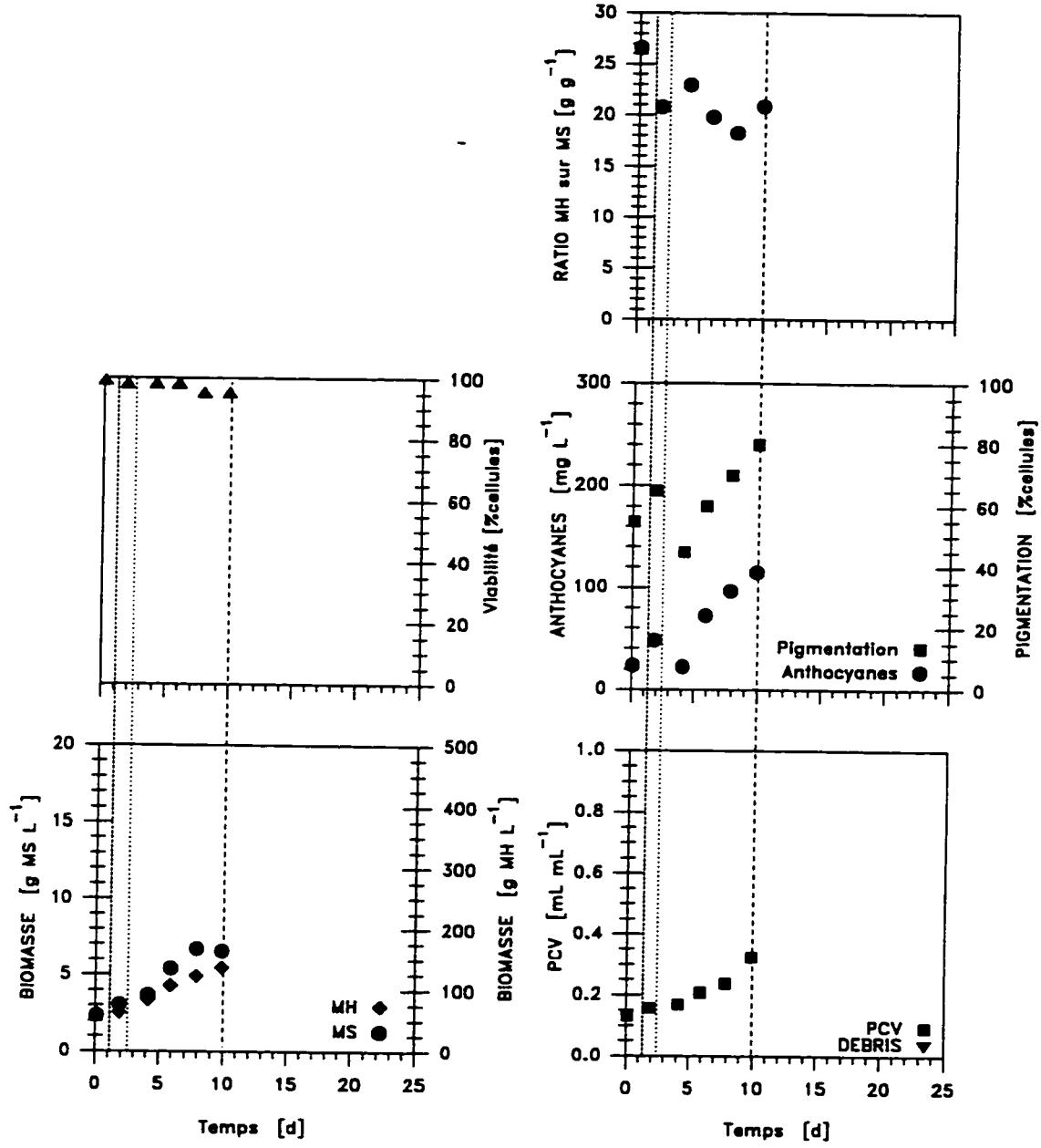


Figure A3.75 Indicateurs de croissance, production d'anthocyanes, masse spécifique des cellules et ratio de la biomasse humide sur la biomasse sèche d'une culture en cuvée contrôlée à 60% d'OD. Milieu de culture: B5QN, lignée VVG109 sc37.

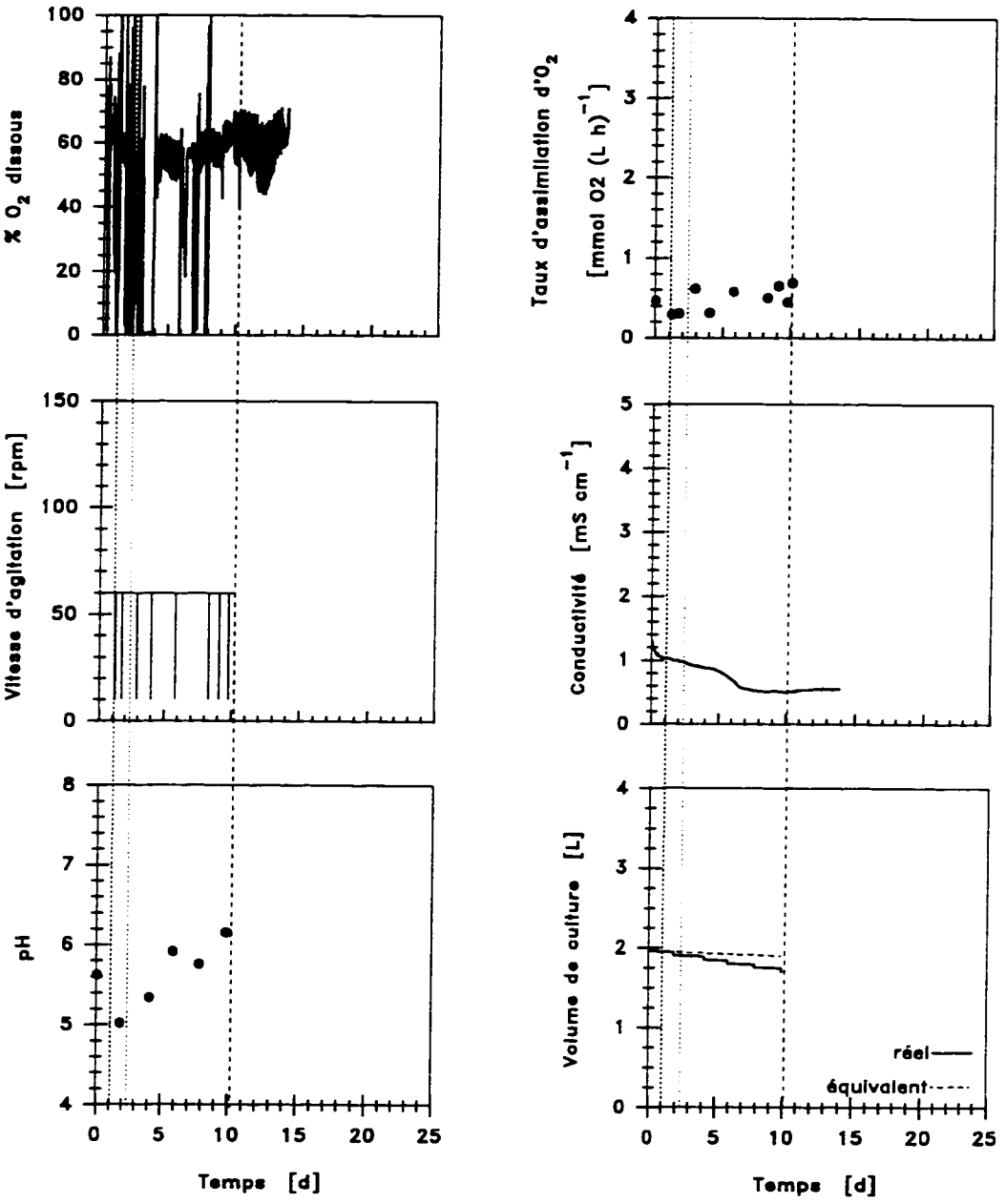


Figure A3.76 Vitesse d'agitation, concentration d'OD, taux volumique d'assimilation d'oxygène, conductivité du milieu de culture et volume de culture d'une cuvée contrôlée à 60% d'OD Milieu de culture: B5QN, lignée VVG109 sc37.

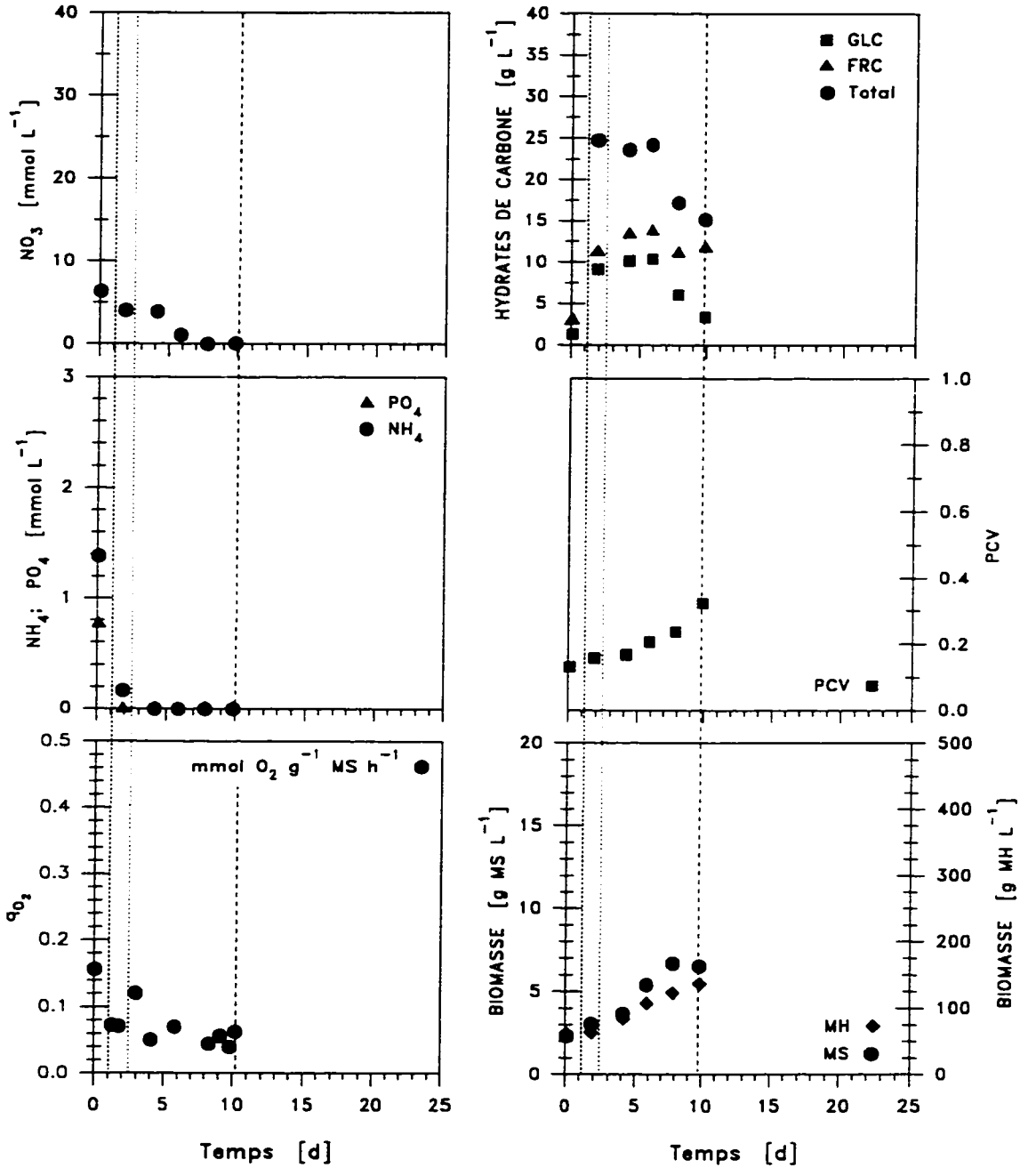


Figure A3.77 Consommation de nutriments et croissance de la biomasse d'une cuvée contrôlée à 60% d'OD Milieu de culture: B5QN, lignée VVG109 sc37.

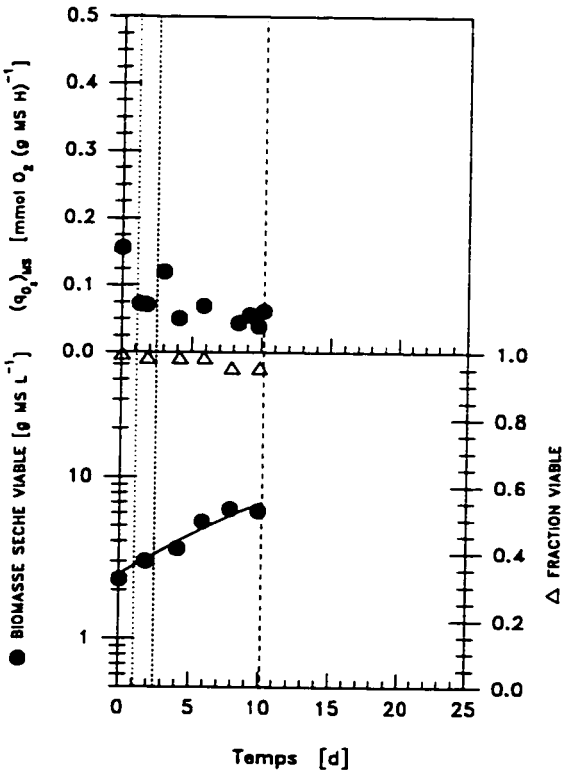


Figure A3.78 Taux spécifique d'assimilation d'O_2 et croissance de la biomasse d'une cuvée contrôlée à 60% d'OD Milieu de culture B5, lignée VVG109 sc37.

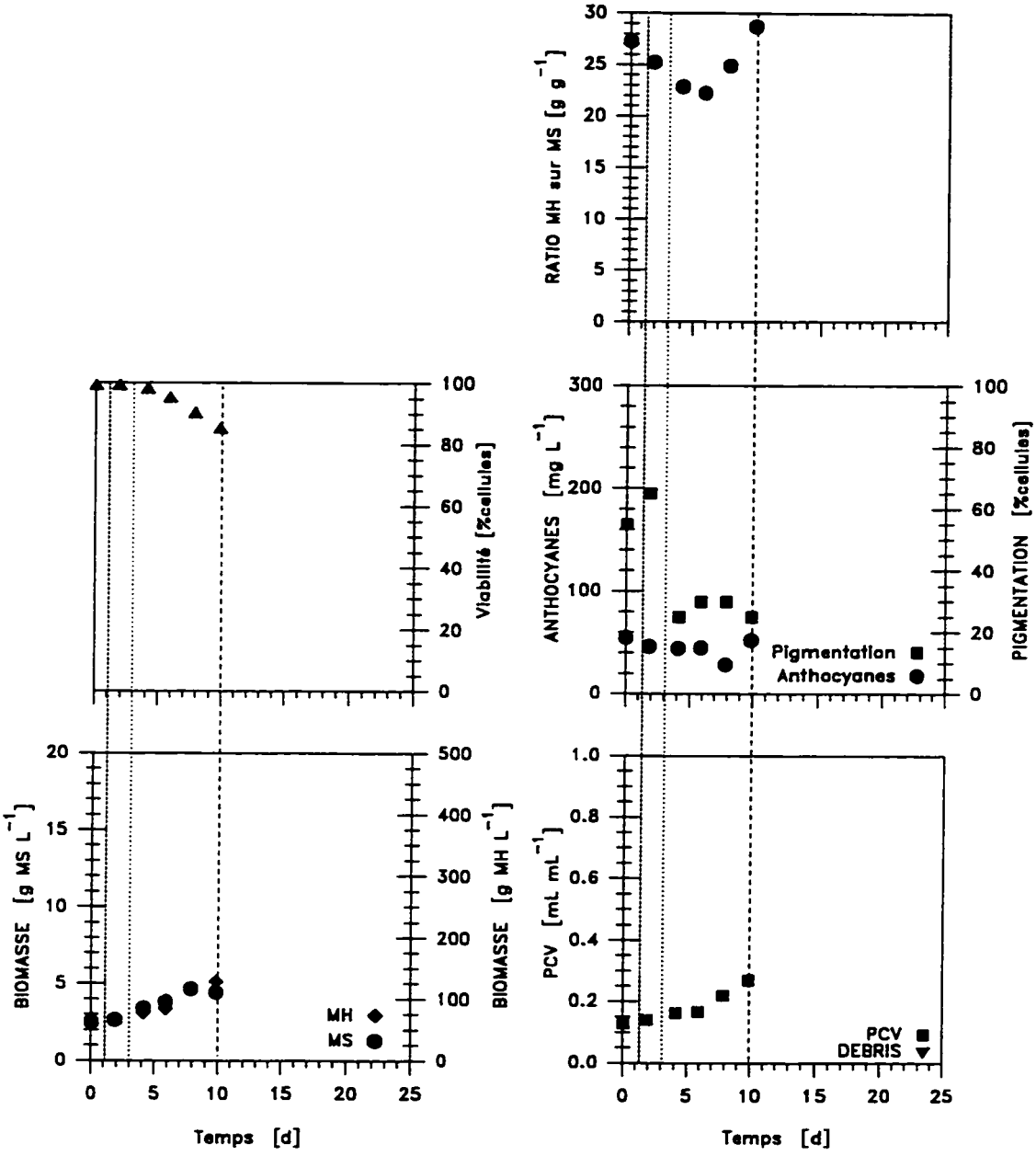


Figure A3.79 Indicateurs de croissance, production d'anthocyanes, masse spécifique des cellules et ratio de la biomasse humide sur la biomasse sèche d'une culture en cuvée sans contrôle d'OD. Milieu de culture: B5QN, lignée VVG109 sc37.

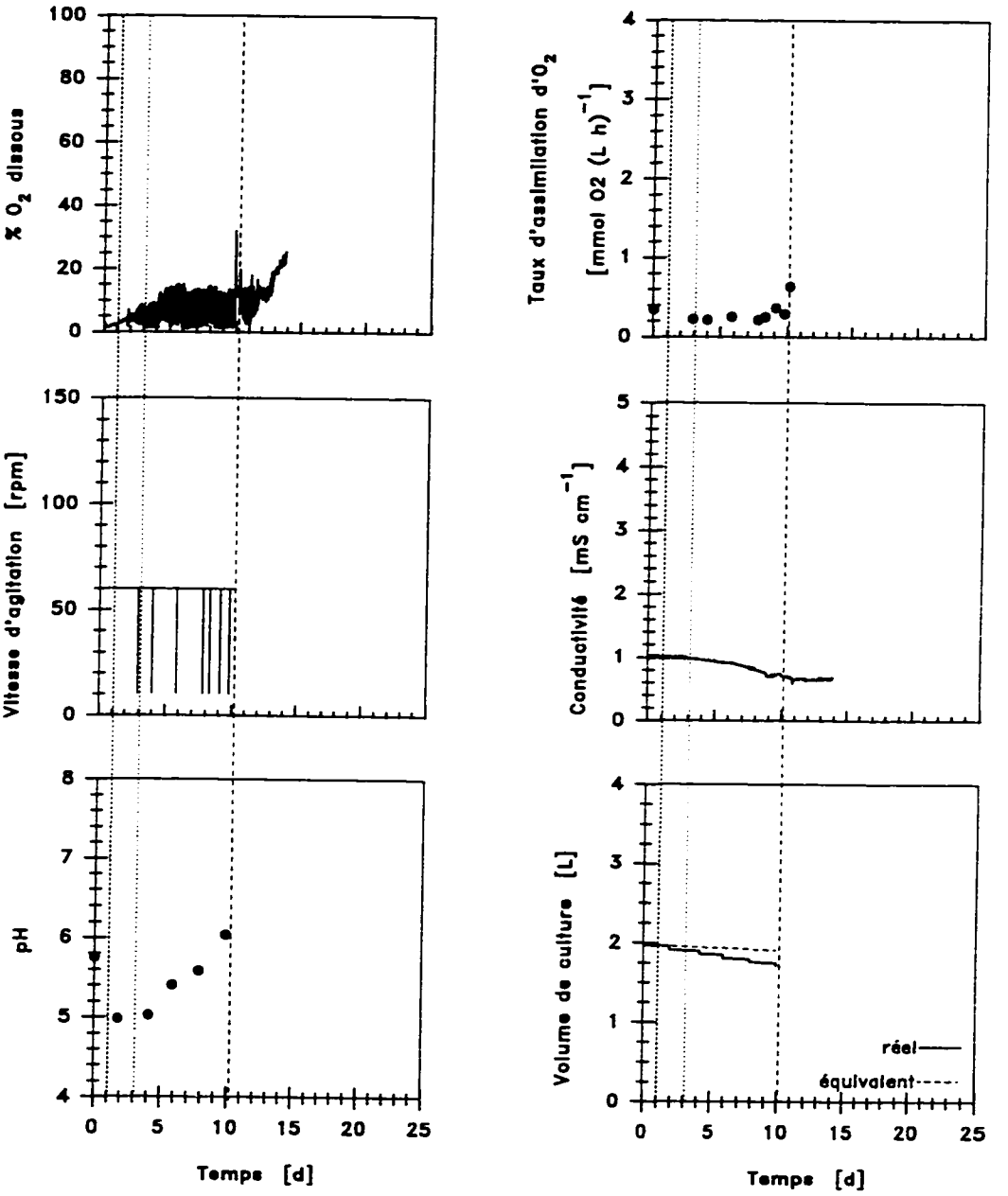


Figure A3.80 Vitesse d'agitation, concentration d'OD, taux volumique d'assimilation d'oxygène, conductivité du milieu de culture et volume de culture d'une cuvée sans contrôle d'OD Milieu de culture: B5QN, lignée VVG109 sc37.

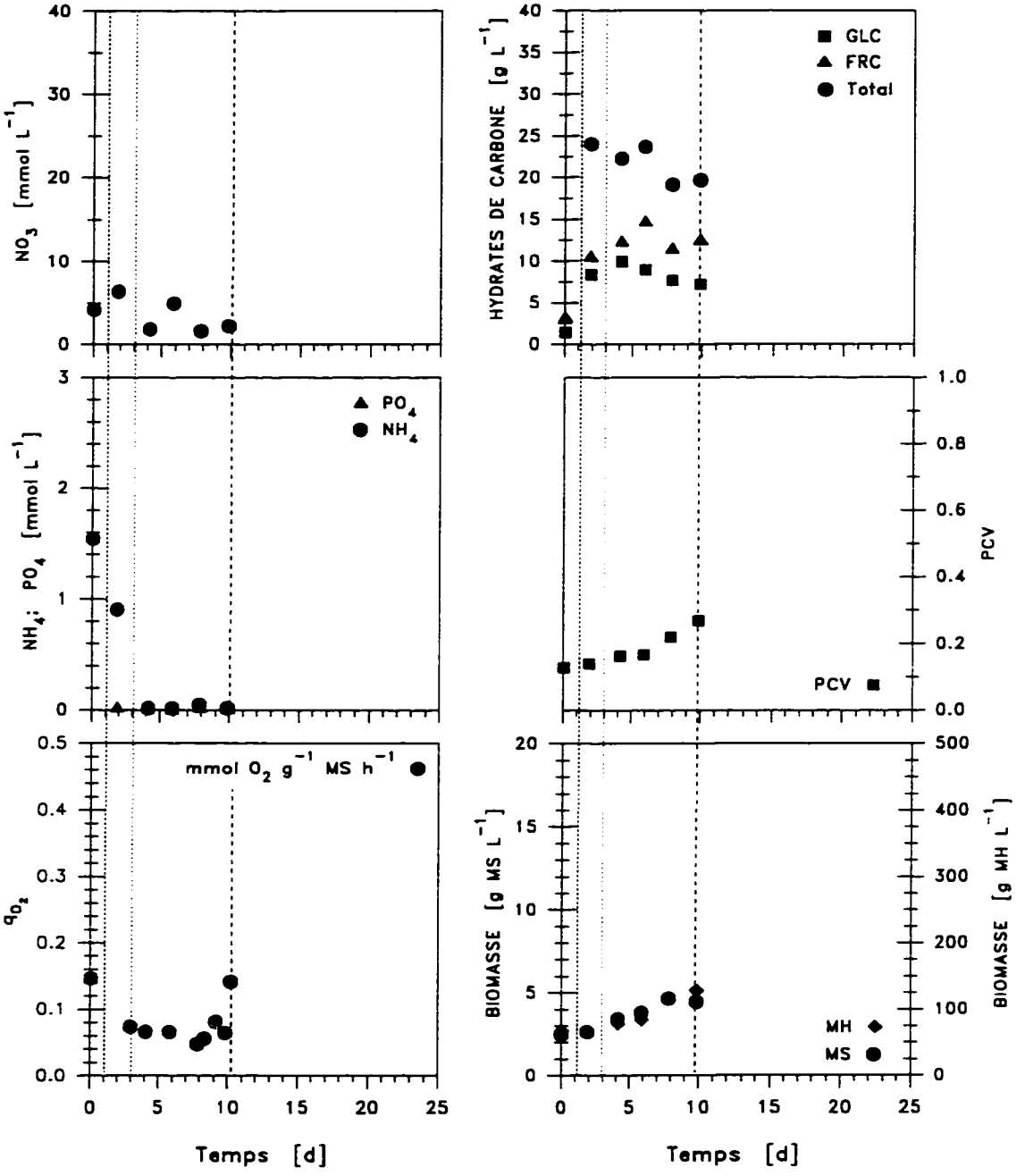


Figure A3.81 Consommation de nutriments et croissance de la biomasse d'une cuvée sans contrôle d'OD Milieu de culture: B5QN, lignée VVG109 sc37.

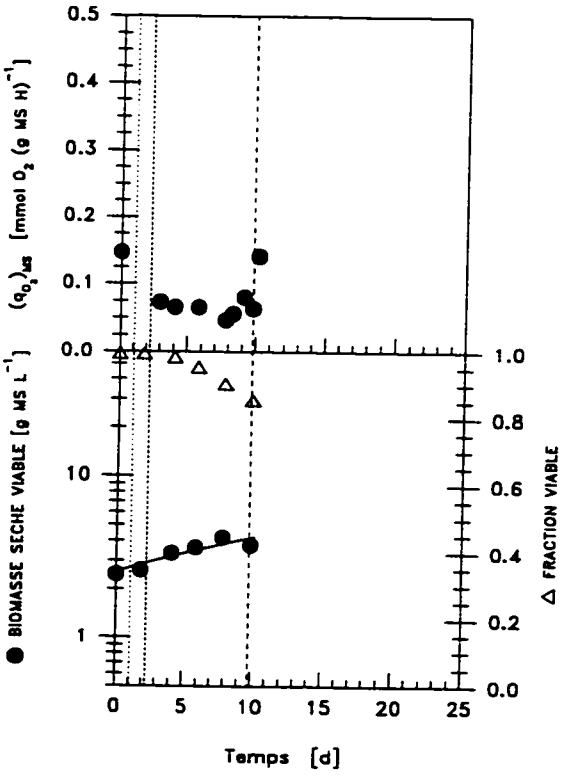


Figure A3.82 Taux spécifique d'assimilation d'O_2 et croissance de la biomasse d'une cuvée sans contrôle d'OD Milieu de culture B5, lignée VVG109 sc37.

A4. CULTURES EN CUVÉES ALIMENTÉES

Des cultures en bioréacteurs opérés en mode cuvée alimentée ont été effectuée dans les bioréacteurs à double ruban hélicoïdal afin de cerner la cause de la limitation nutritionnelle observée dans les cultures de *Vitis vinifera* dans le milieu B5. La stratégie repose globalement sur l'hypothèse que le plafonnement des mesures d'OUR reflète un changement important dans le comportement de la culture dont la principale cause devrait être une limitation nutritionnelle. Ainsi les mesures d'OUR ont été utilisée pour diagnostiquer la manifestation d'une limitation et enclencher l'alimentation, en lot ou suivant une rampe, d'une solution concentrée de nutriments choisis.

Les résultats présentés ici sous forme de courbes évolutives sont ceux analysés spécifiquement dans le chapitre 6. Des cultures en flacons agités ont été effectuées parallèlement à toutes les cultures en bioréacteurs comme cultures témoins. Certaines de ces cultures ont été l'objet d'une analyse plus poussée au chapitre 4 ainsi que dans l'annexe 2.

A4.1 CONDITIONS EXPÉRIMENTALES ET PRÉSENTATION DES RÉSULTATS

Les expériences rapportées ici ont été effectuées avec la lignée VVG111 sc20, sc27 et sc31, sevrées de son besoin d'hydrolysat de caséine et cultivées dans l'obscurité. Les cellules de cette lignée sont cultivées sans apport de lumière. Initialement, ces cellules croissaient surtout en amas d'un diamètre d'environ 2 mm et étaient difficiles à échantillonner avec une pipette à large ouverture. Des cellules de la sous-culture sc21 ont donc été filtrées à travers une passoire stérile dont les ouvertures étaient de 1 mm, mises en culture et soumises à l'entretien régulier afin d'obtenir une suspension fine. Le suffixe Dxx accolé au nombre de sous-cultures depuis l'établissement de la lignée désigne donc le nombre de sous-cultures depuis la sélection par

filtration des amas cellulaires les plus fins. Les courbes en flacons produites au chapitre 4 représentent le comportement des cellules VVG111 sc31(D10).

La progression de la démarche expérimentale nous a successivement menés à tester l'effet d'un apport supplémentaire d'ions PO_4 (sous forme de NaH_2PO_4), d'ions Mg (sous forme de $MgSO_4$) et d'ions ammonium (sous forme de $(NH_4)_2SO_4$) fourni conjointement avec une solution concentrée de glucose à des concentrations visant à augmenter la concentration résiduelle de glucose dans le milieu de culture de 5 g L^{-1} et à alimenter à la culture une quantité relative d'ions d'environ celle initialement présente dans le milieu de culture, i.e. 1 mmol PO_4 ou Mg et 2 mmol NH_4 par g MS de biomasse par litre de culture selon le cas. Les conditions expérimentales, détaillées au chapitre 2, sont résumées au tableau A4.1. Les cultures témoins en flacons agités de ces cultures en bioréacteurs ont été effectuées dans le même milieu B5 qui constitue le milieu de base des cuvées alimentées. Elles ont déjà été présentées à l'Annexe 2.

Un index détaillé des figures représentant la progression de divers paramètres décrivant l'état de toutes ces cultures est présenté au tableau A4.2. Similairement aux résultats présentés à l'annexe 3, les lignes verticales qui jalonnent les graphes mettent de l'emphase sur les moments où le milieu extracellulaire est épuisé en NH_4, en PO_4 et en hydrates de carbones, et où l'OUR atteint un maximum selon la nomenclature déjà présentée au tableau A2.1, page 243. Toutes les concentrations sont corrigées pour l'évaporation, le volume occupé par les cellules et la dilution causée par les ajouts de milieu. Elles sont donc exprimées sur la base du volume initial des cultures.

Tableau A4.1 Conditions expérimentales des cultures en bioréacteur visant l'étude de la source de limitation nutritionnelle de la croissance cellulaire.

Lignée cellulaire	Cuvée	Réacteur 5L	Réacteur 2L	Milieu de culture	
VVG111 sc20	H27	✓		B5	
				OUR_{max}	à 10,8 d;
				+ 5,5 g Glc L^{-1}	
				+ 1,05 mmol PO_4 g^{-1} MS	à 12,7 d;
				OUR_{max}	à 17,2 d;
				+ 5,3 g Glc L^{-1}	
				+ 2,06 mmol PO_4 g^{-1} MS	à 17,7 d
sc20	H28		✓	Cuvée en B5	
sc27(D6)	H30		✓	B5	
				OUR_{max}	à 7,6 d;
				+ 5,4 g Glc L^{-1}	
				+ 0,51 mmol PO_4 g^{-1} MS	à 8,6 d
sc31(D10)	H31	✓		B5	
				OUR_{max}	à 7,1 d;
				+ 5,0 g Glc L^{-1}	
				+ 0,39 mmol Mg g^{-1} MS	à 7,7 d
sc31(D10)	H32		✓	B5	
				OUR_{max}	
				+ 5,3 g Glc L^{-1}	alimentés sur
				+ 0,76 mmol NH_4 g^{-1} MS	deux jours
					à 7,7 d

Milieu de base B5 : $B5NA_{0,2}K_{0,1}$(3% Saccharose)
Concentration d'OD : 50%

Tableau A4.2 Index des figures représentant les résultats des cultures en cuvée en bioréacteurs

Cuvée	Flacons témoins			Bioréacteurs			
	Croissance Viabilité Acy Rapport MH/MS	Nutriments OD Croissance	Comparaison Indices augmentation biomasse	OD OUR Vitesse d'agitation pH Conductivité Volume	Nutriments q_{O2} Croissance	Croissance Viabilité Acy Masse spécifique des cellules Rapport MH/MS	q_{O2} Croissance
	Fig. *page*	Fig. *page*	Fig. *page*	Fig. *page*	Fig. *page*	Fig. *page*	Fig. *page*
H27	A2.1, *A250*	A2.2, *A251*	A4.1, *A374*	A4.3, *A376*	A4.4, *A377*	A4.2, *A375*	A4.5, *A378*
H28	A2.7, *A256*	A2.8, *A257*	A4.6, *A379*	A4.8, *A381*	A4.9, *A382*	A4.7, *A380*	A4.10, *A383*
H30	A2.13, *A262*	A2.14, *A263*	A4.11, *A384*	A4.13, *A386*	A4.14, *A387*	A4.12, *A385*	A4.15, *A388*
H31	A2.20, *A269*	A2.21, *A270*	A4.16, *A389*	A4.18, *A391*	A4.19, *A392*	A4.17, *A390*	A4.20, *A393*
H32	A2.20, *A269*	A2.21, *A270*	A4.21, *A394*	A4.23, *A396*	A4.24, *A397*	A4.22, *A395*	A4.25, *A398*

Rappelons que pour les flacons témoins la mesure de pH est celle du surnageant après décantation de la biomasse. Lorsque des mesures de pH ont été faites en ligne dans les bioréacteurs, elles sont représentées par un trait continu. Les mesures du pH du surnageant des échantillons soutirés des bioréacteurs sont représentés par des cercles pleins. Le volume des cultures en flacons agités correspond au volume moyen de tous les flacons témoins d'une même expérience compte tenu de l'échantillonnage périodique et de la perte de volume par évaporation. Pour les bioréacteurs, le volume réel correspond au volume de culture dans le bioréacteur compte tenu de l'évaporation du liquide et de l'échantillonnage alors que le volume dit équivalent néglige l'effet de l'échantillonnage puisque celui-ci est homogène. Toutes les concentrations sont

exprimées par unité de volume initial de culture et les mesures de concentrations de nutriments ont été corrigées pour considérer le volume occupé par la biomasse. Ainsi, les concentrations sont rapportées sur une base comparable. Les barres d'erreur correspondent à la déviation standard des mesures pour les échantillons répétés des cultures en flacons agités.

A4.2 COMPLÉMENT AUX COURBES DE CROISSANCE ET DE CONSOMMATION DE NUTRIMENTS

A4.2.1 Viabilité

Comme pour toutes les cultures, la viabilité est demeurée élevée et relativement constante et la proportion des débris cellulaires n'a jamais dépassé 1 à 2% du volume de la biomasse. Les viabilités initiales, minimales et moyennes des cultures en cuvée alimentée sont présentées au tableau A4.3. Comme pour les cultures en cuvée présentées à l'annexe 3, la viabilité des cellules isolées était élevée, les problèmes de viabilité semblent donc être reliés à la grosseur des amas cellulaires. De même, comme il a été noté au chapitre 3 et dans l'annexe 2, la perte de viabilité des cultures témoins en flacons agités des cellules de la sous-culture 31(D10) a vraisemblablement été causée par l'épuisement du milieu en hydrates de carbone. Toutes les autres cultures présentées ici n'ont pas été poursuivies suffisamment longtemps ou ont été alimentée en hydrates de carbone de telle sorte qu'une perte similaire de viabilité en fin de culture n'a pas été observée.

Tableau A4.3 Viabilité des cultures en cuvée alimentée en bioréacteurs

Lignée cellulaire	Milieu de culture	Cuvée	Viabilité [%]				
VVG111	B5		Initiale	minimale	moyenne	intervalle confiance 95%	nombre de mesures
sc20		H27(témoin)[a]	55	55	75	11	16
sc20	+ NaH_2PO_4	H27	55	55	69	12	13
sc20		H28	40	40	77	12	9
sc27(D6)		H29(témoin)	80	60	83	7,8	12
sc27(D6)	+ NaH_2PO_4	H30	90	80	92	3,0	14
sc31(D10)		H31(témoin)	100	10[b]	86	13	14
sc31(D10)	+ $MgSO_4$	H31	100	70	92	5,0	15
sc31(D10)	+ $(NH_4)_2SO_4$	H32	100	85	95	2,4	14

ND Non disponible
a Cultures témoins en flacons agités
b Baisse notable de la viabilité au 16ième jour de culture

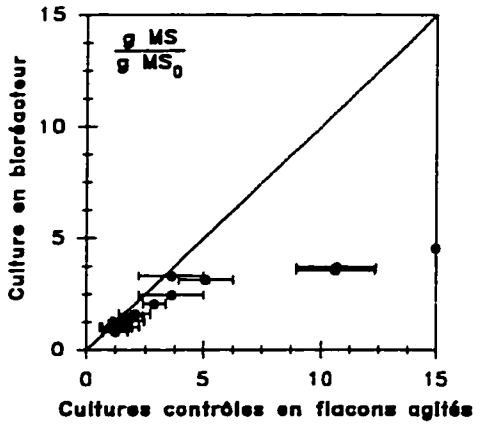


Figure A4.1 Ajout de NaH_2PO_4 : Comparaison des indices d'augmentation de la biomasse sèche d'une culture en cuvée alimentée contrôlée à 50% d'OD avec ses cultures témoins en flacons agités. Milieu de culture: B5, lignée VVG111 sc20, alimentation ponctuelle d'un supplément concentré de glucose et de NaH_2PO_4 à OUR_{max}.

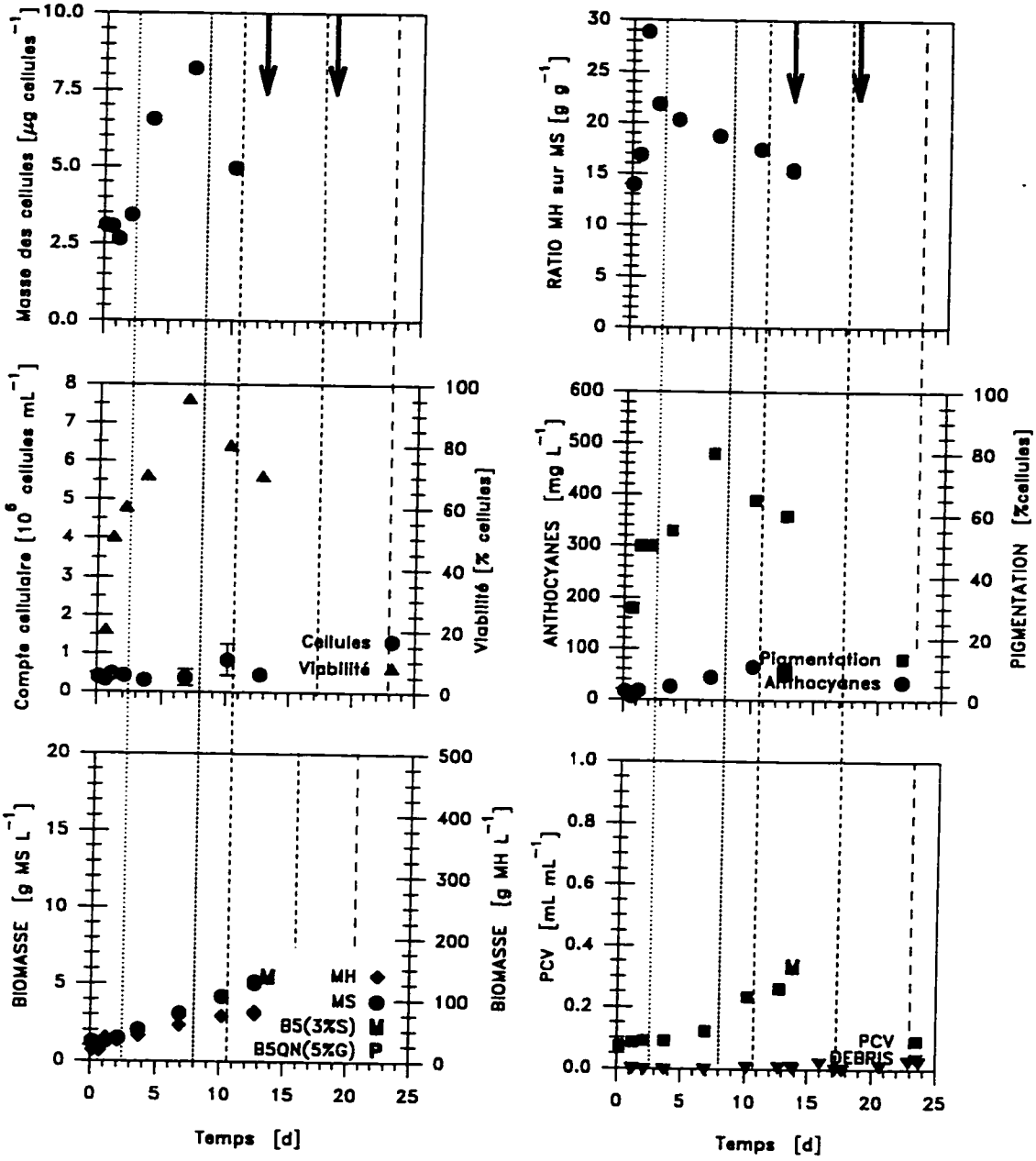


Figure A4.2 Ajout de NaH_2PO_4 : Indicateurs de croissance, production d'anthocyanes, masse spécifique des cellules et ratios de la biomasse humide sur la biomasse sèche d'une culture en cuvée contrôlée à 50% d'OD. Milieu de culture: B5, lignée VVG111 sc20, alimentation ponctuelle d'un supplément concentré de glucose et de NaH_2PO_4 à OUR_{max}.

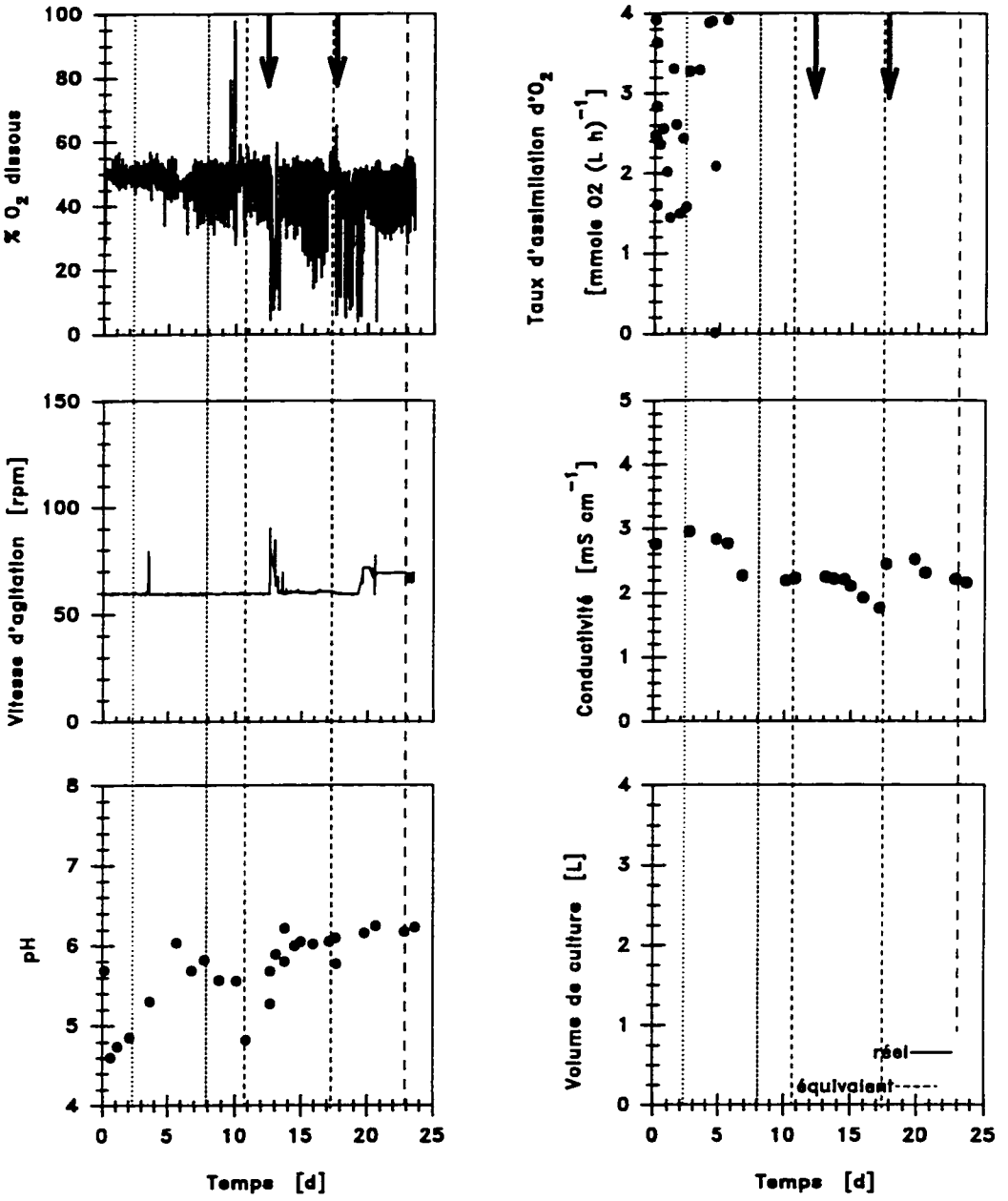


Figure A4.3 Ajout de NaH_2PO_4 : Vitesse d'agitation, concentration d'OD, taux volumique d'assimilation d'oxygène, conductivité du milieu de culture et volume de culture d'une cuvée contrôlée à 50% d'OD Milieu de culture: B5, lignée VVG111 sc20, alimentation ponctuelle d'un supplément concentré de glucose et de NaH_2PO_4 à OUR_{max}.

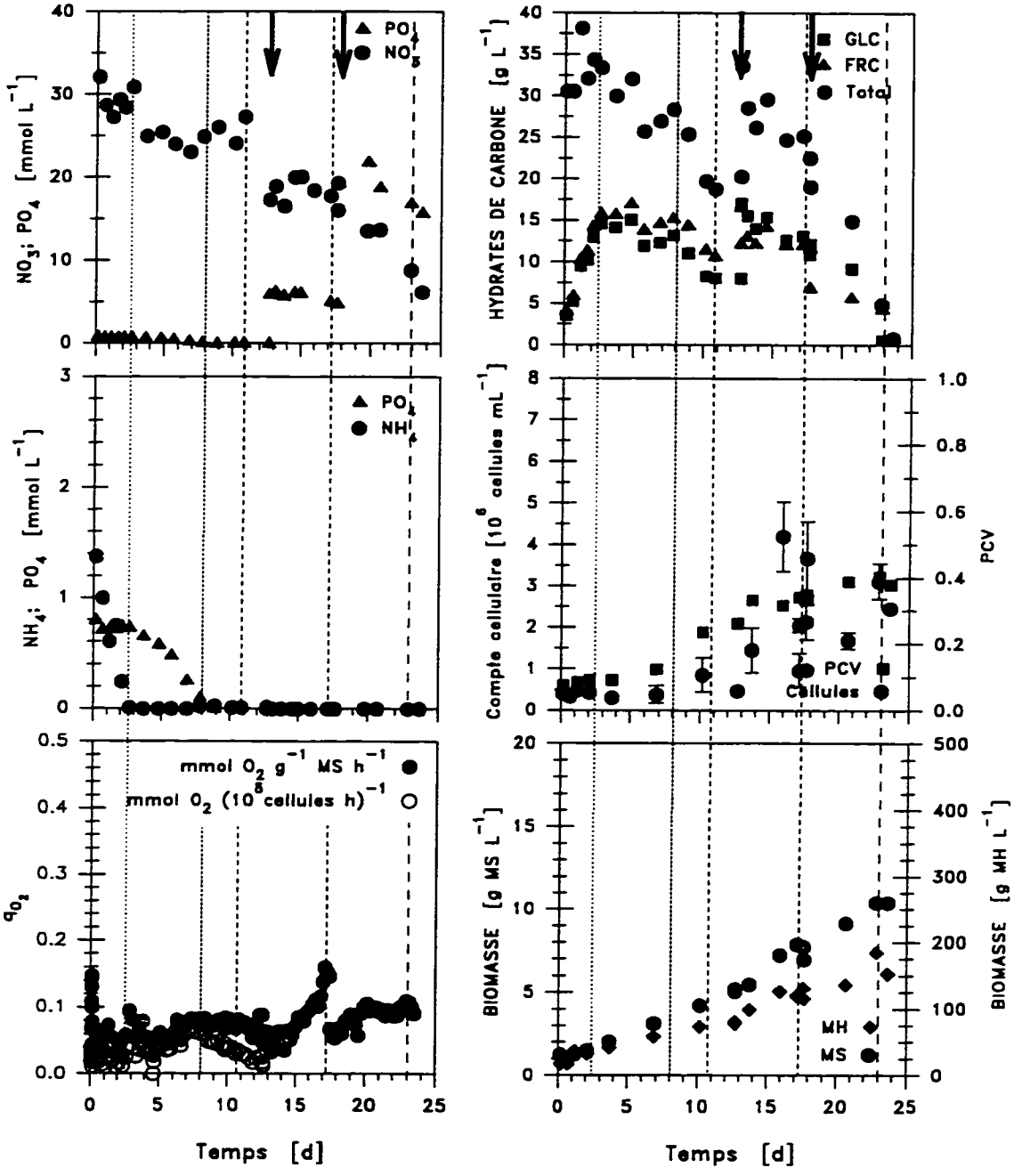


Figure A4.4 Ajout de NaH_2PO_4 : Consommation de nutriments et croissance de la biomasse d'une cuvée contrôlée à 50% d'OD Milieu de culture: B5, lignée VVG111 sc20, alimentation ponctuelle d'un supplément concentré de glucose et de NaH_2PO_4 à OUR_{max}.

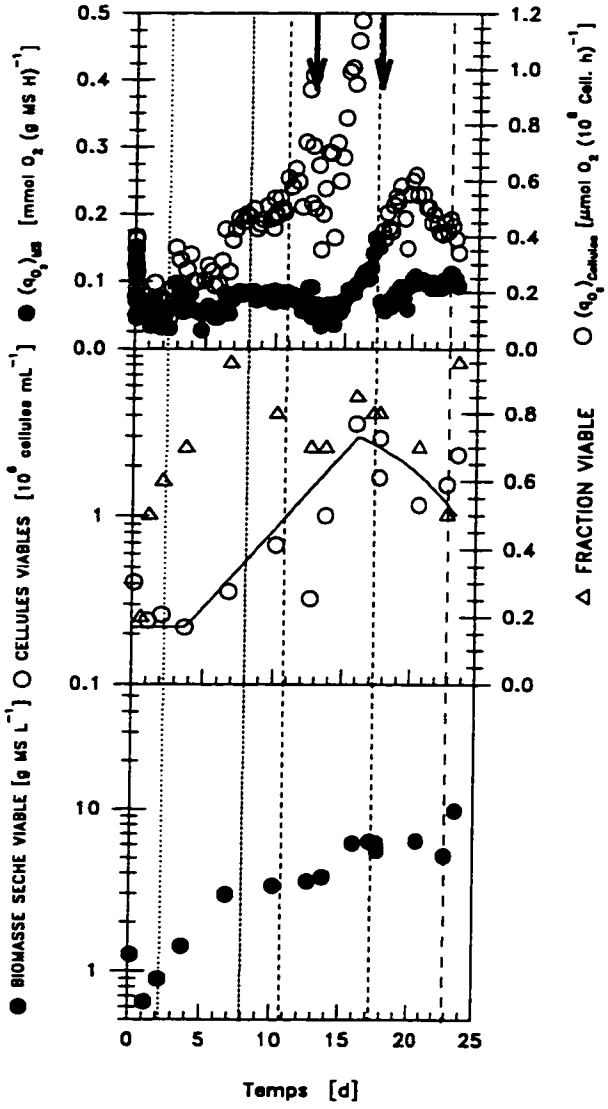


Figure A4.5 Ajout de NaH_2PO_4 : Taux spécifique d'assimilation d'O_2, prolifération cellulaire et croissance de la biomasse d'une cuvée contrôlée à 50% d'OD Milieu de culture B5, lignée VVG111 sc20, alimentation ponctuelle d'un supplément concentré de glucose et de NaH_2PO_4 à OUR_{max}.

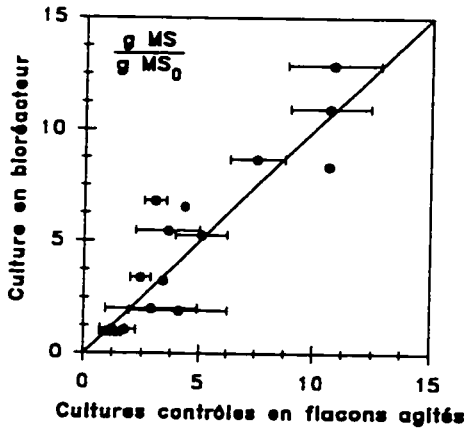


Figure A4.6 Comparaison des indices d'augmentation de la biomasse sèche d'une culture en cuvée contrôlée à 50% d'OD avec ses cultures témoins en flacons agités. Milieu de culture: B5, lignée VVG111 sc20.

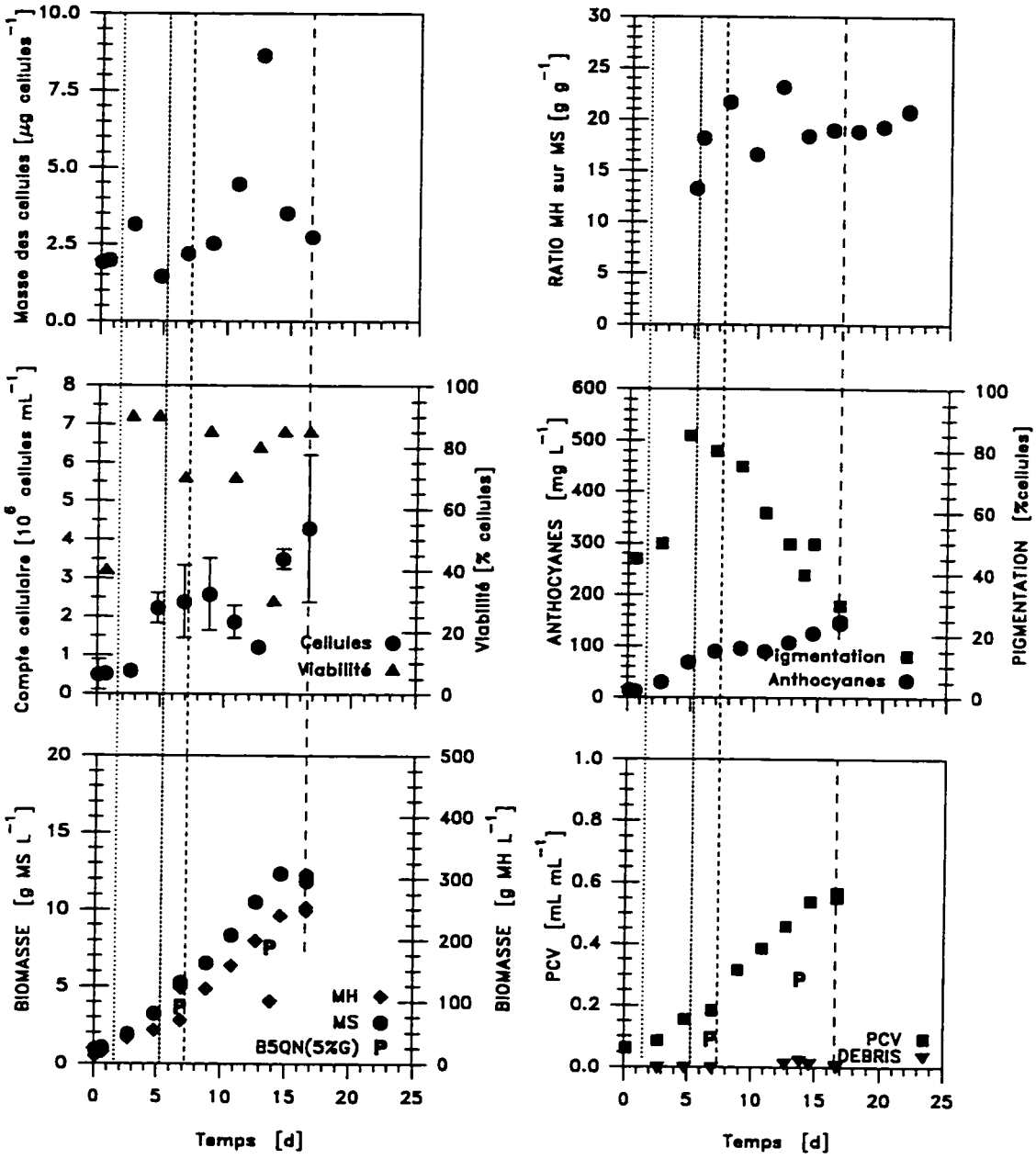


Figure A4.7 Indicateurs de croissance, production d'anthocyanes, masse spécifique des cellules et ratios de la biomasse humide sur la biomasse sèche d'une culture en cuvée contrôlée à 50% d'OD. Milieu de culture: B5, lignée VVG111 sc20.

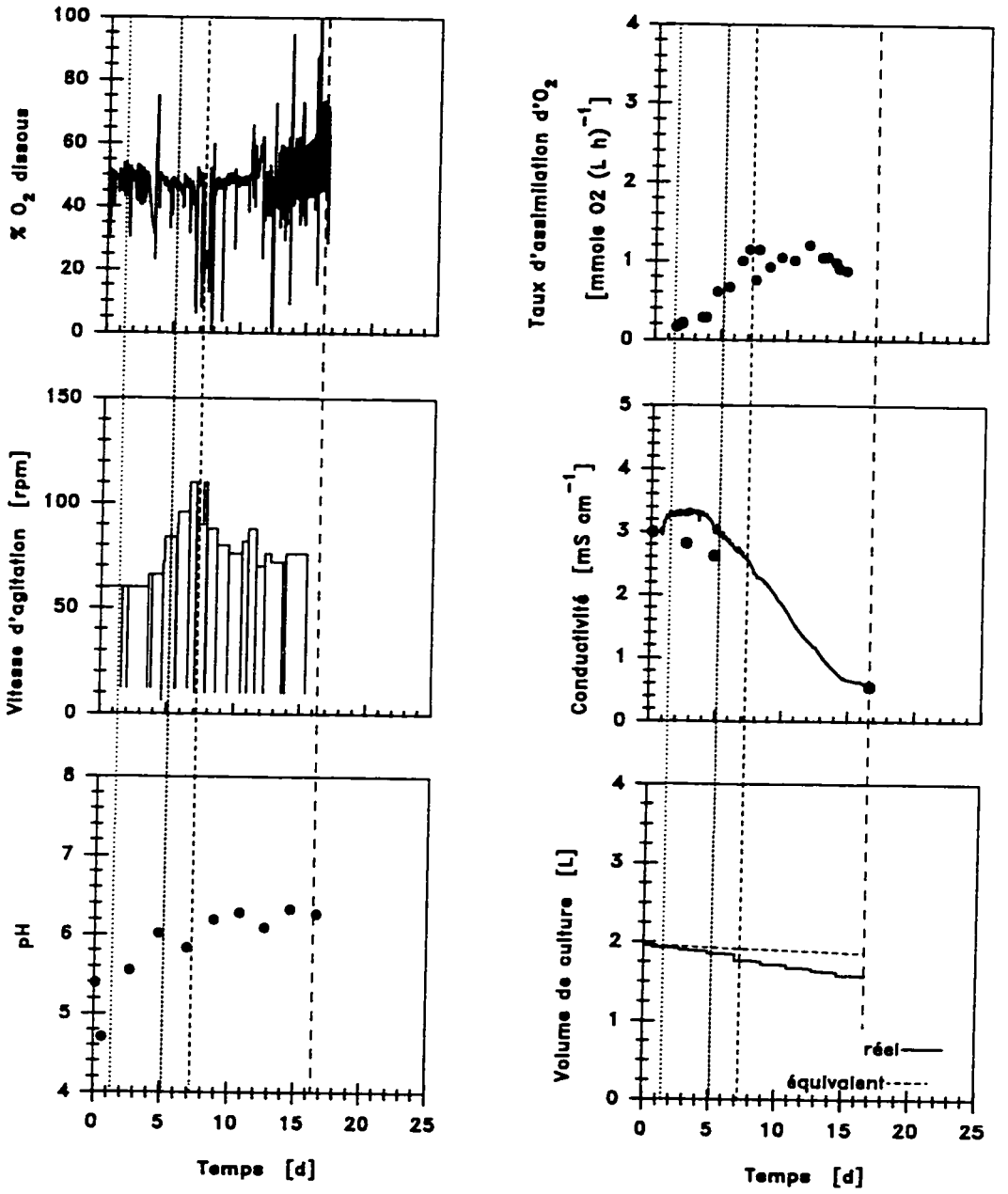


Figure A4.8 Vitesse d'agitation, concentration d'OD, taux volumique d'assimilation d'oxygène, conductivité du milieu de culture et volume de culture d'une cuvée contrôlée à 50% d'OD Milieu de culture: B5, lignée VVG111 sc20.

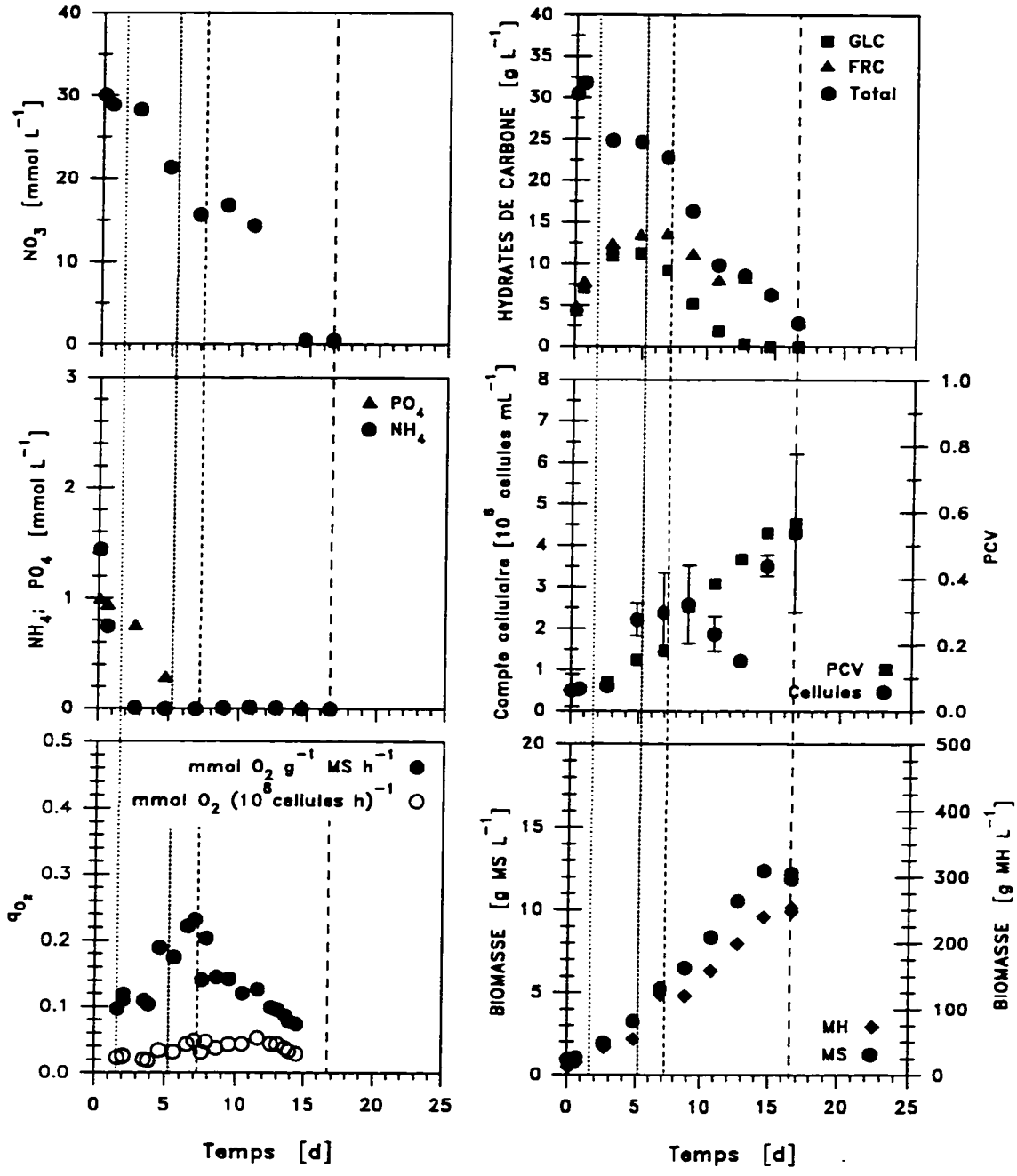


Figure A4.9 Consommation de nutriments et croissance de la biomasse d'une cuvée contrôlée à 50% d'OD Milieu de culture: B5, lignée VVG111 sc20.

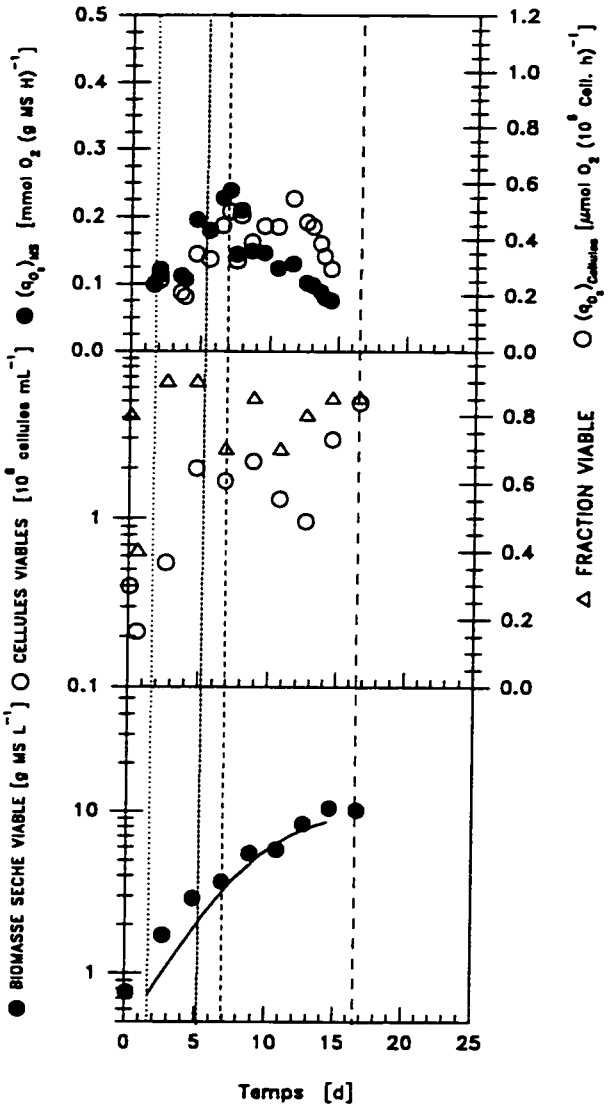


Figure A4.10 Taux spécifique d'assimilation d'O_2, prolifération cellulaire et croissance de la biomasse d'une cuvée contrôlée à 50% d'OD Milieu de culture B5, lignée VVG111 sc20.

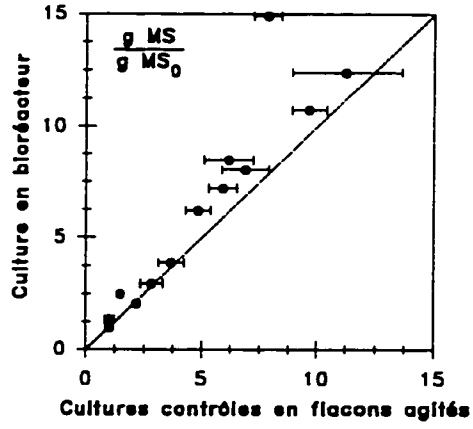


Figure A4.11 Ajout de NaH_2PO_4 : Comparaison des indices d'augmentation de la biomasse sèche d'une culture en cuvée alimentée contrôlée à 50% d'OD avec ses cultures témoins en flacons agités. Milieu de culture: B5, lignée VVG111 sc27(D6), alimentation ponctuelle d'un supplément concentré de glucose et de NaH_2PO_4 à OUR_{max}.

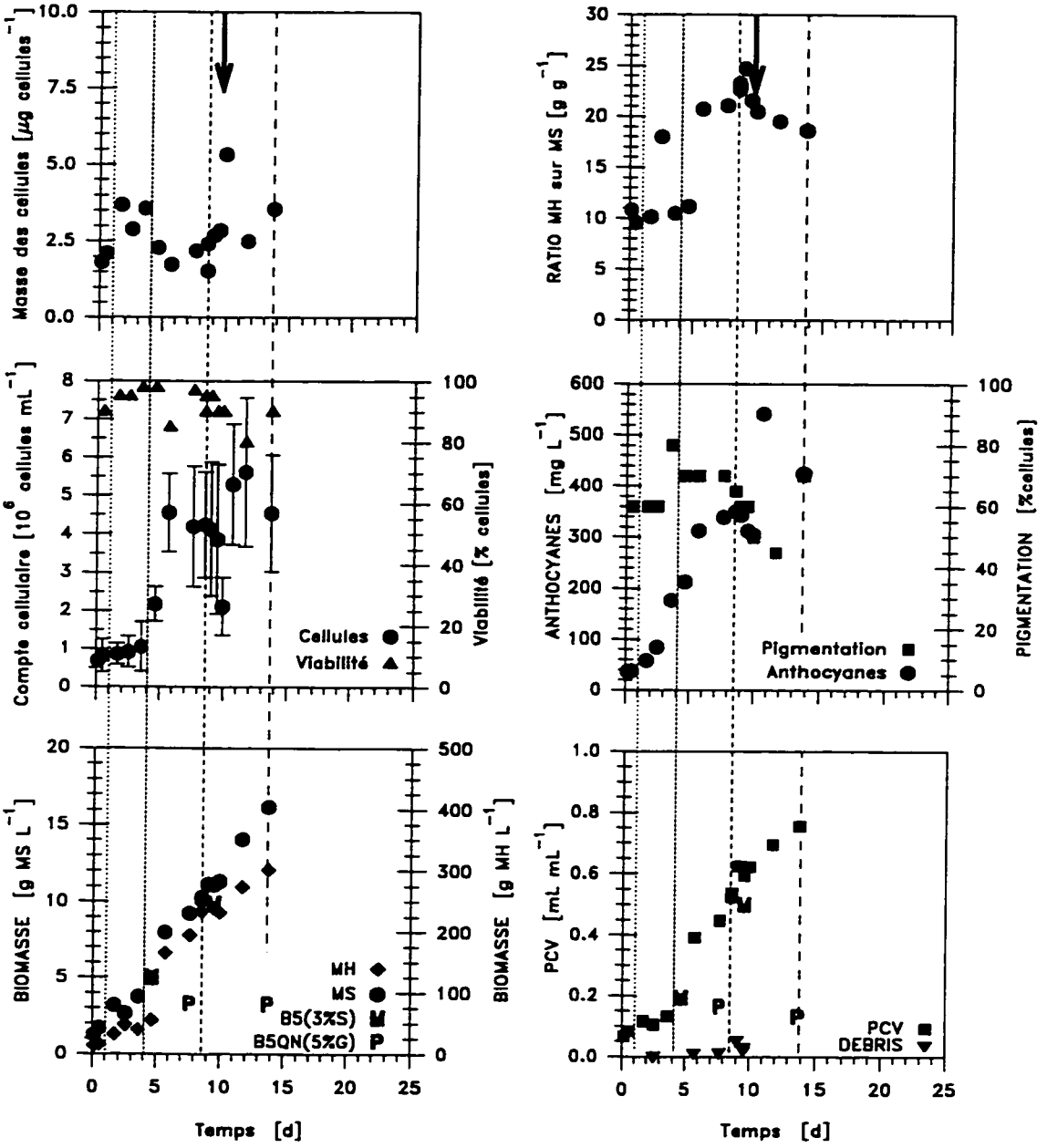


Figure A4.12 Ajout de NaH_2PO_4 : Indicateurs de croissance, production d'anthocyanes, masse spécifique des cellules et ratios de la biomasse humide sur la biomasse sèche d'une culture en cuvée contrôlée à 50% d'OD. Milieu de culture: B5, lignée VVG111 sc27(D6), alimentation ponctuelle d'un supplément concentré de glucose et de NaH_2PO_4 à OUR_{max}.

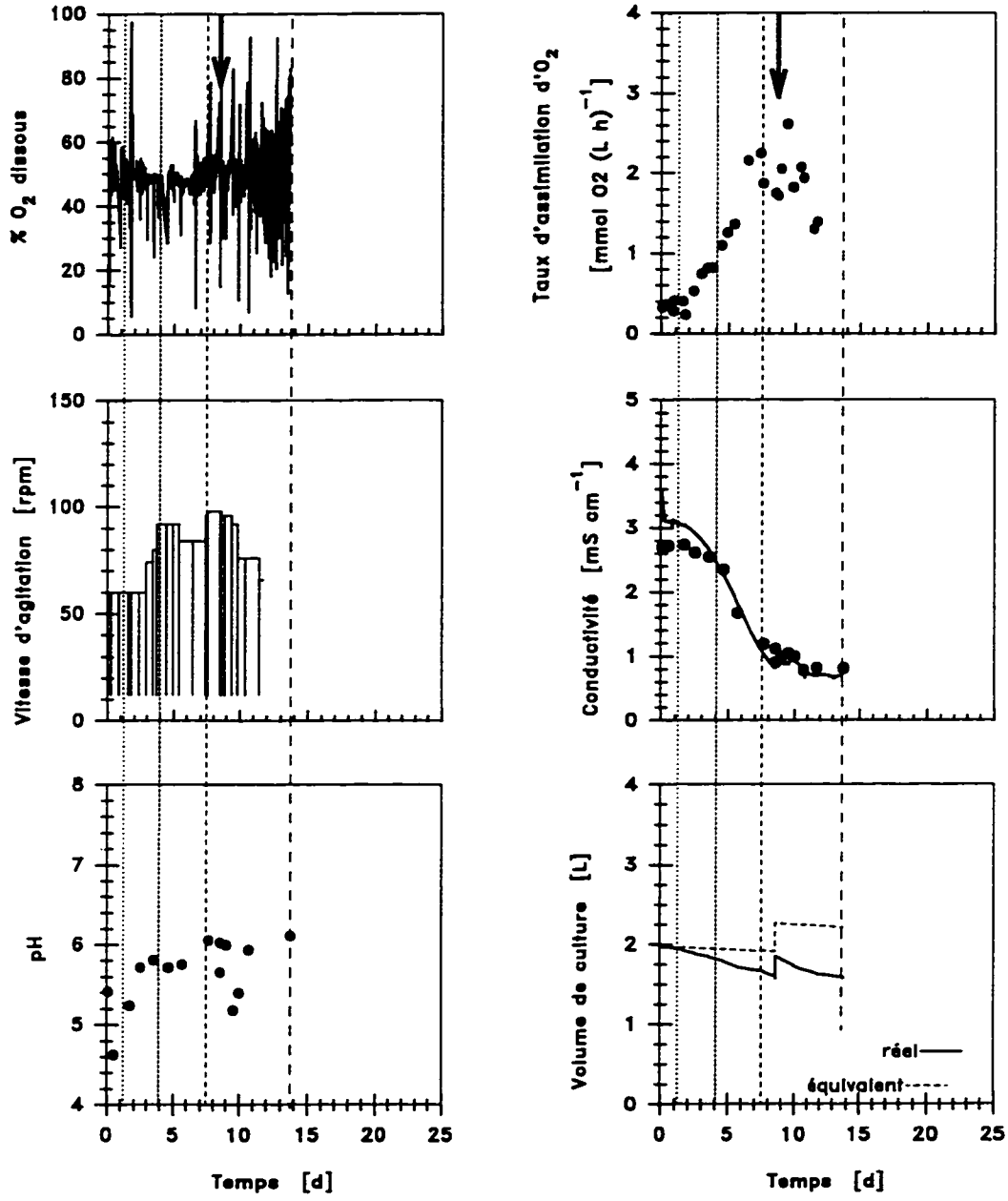


Figure A4.13 Ajout de NaH_2PO_4 : Vitesse d'agitation, concentration d'OD, taux volumique d'assimilation d'oxygène, conductivité du milieu de culture et volume de culture d'une cuvée contrôlée à 50% d'OD Milieu de culture: B5, lignée VVG111 sc27(D6), alimentation ponctuelle d'un supplément concentré de glucose et de NaH_2PO_4 à OUR_{max}..

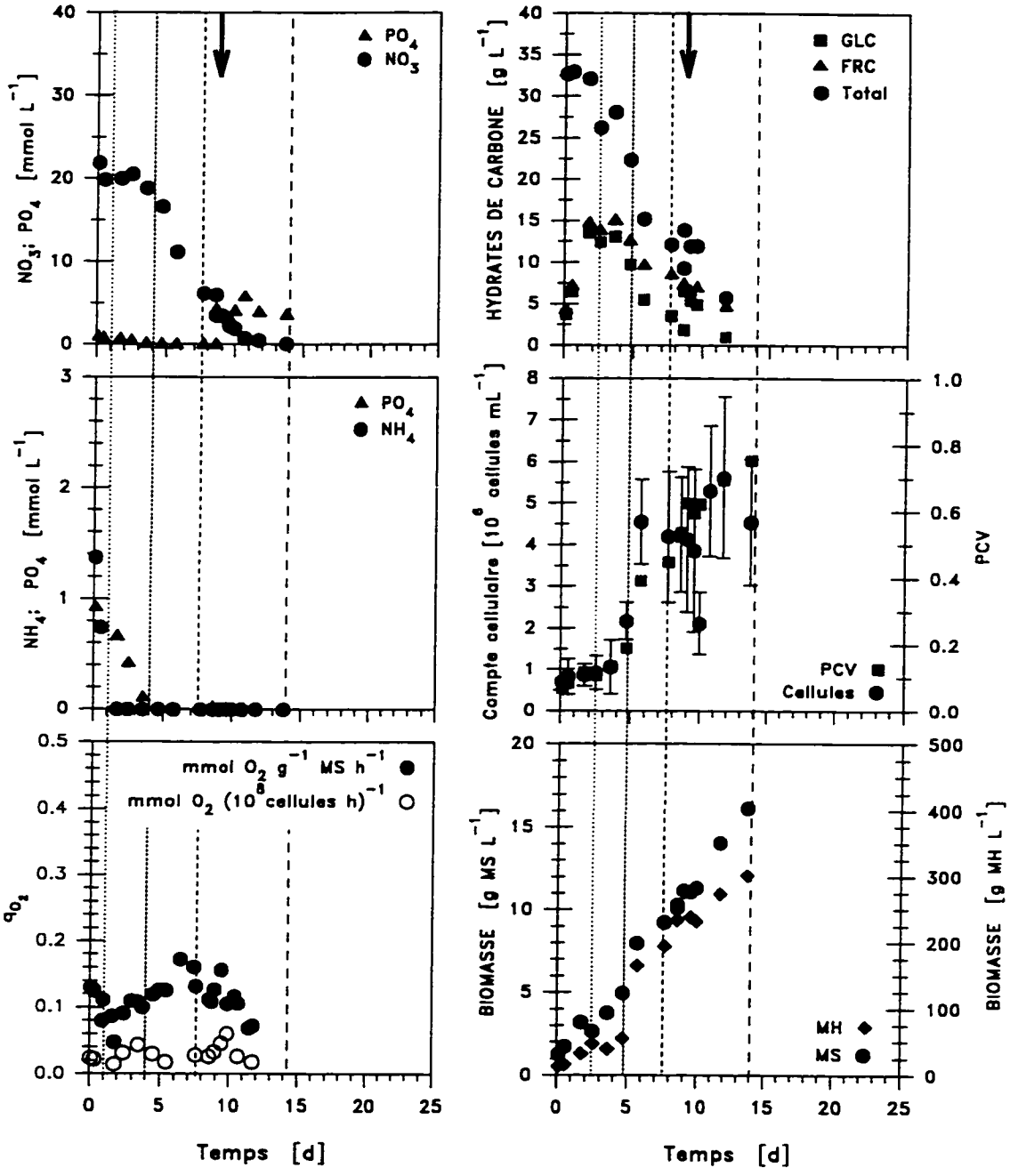


Figure A4.14 Ajout de NaH_2PO_4 : Consommation de nutriments et croissance de la biomasse d'une cuvée contrôlée à 50% d'OD Milieu de culture: B5, lignée VVG111 sc27(D6), alimentation ponctuelle d'un supplément concentré de glucose et de NaH_2PO_4 à OUR_{max}.

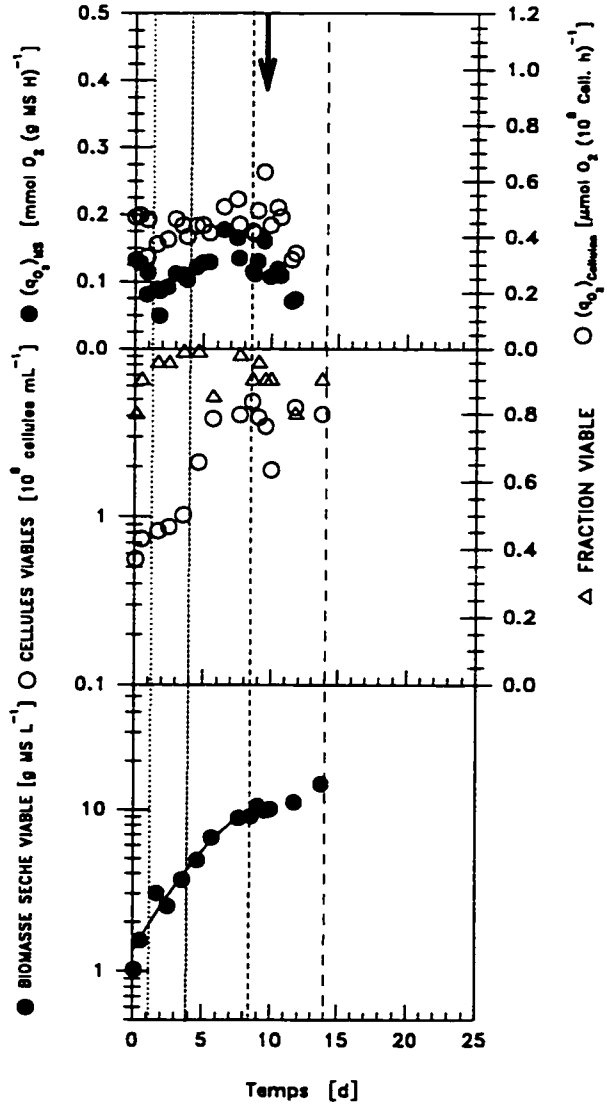


Figure A4.15 Ajout de NaH_2PO_4 : Taux spécifique d'assimilation d'O_2, prolifération cellulaire et croissance de la biomasse d'une cuvée alimentée contrôlée à 50% d'OD. Milieu de culture B5, lignée VVG111 sc27(D6), alimentation ponctuelle d'un supplément concentré de glucose et de NaH_2PO_4 à OUR_{max}.

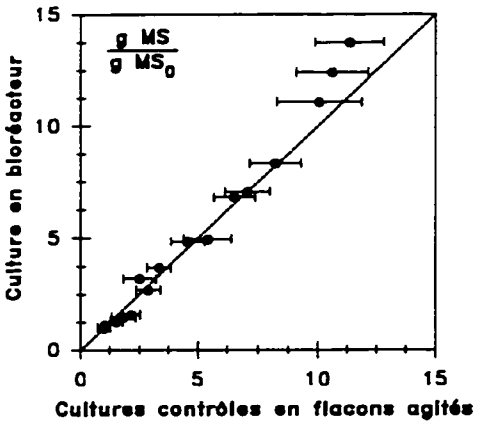


Figure A4.16 Ajout de $MgSO_4$: Comparaison des indices d'augmentation de la biomasse sèche d'une culture en cuvée alimentée contrôlée à 50% d'OD avec ses cultures témoins en flacons agités. Milieu de culture: B5, lignée VVG111 sc31(D10), alimentation ponctuelle d'un supplément concentré de glucose et de $MgSO_4$ à OUR_{max}.

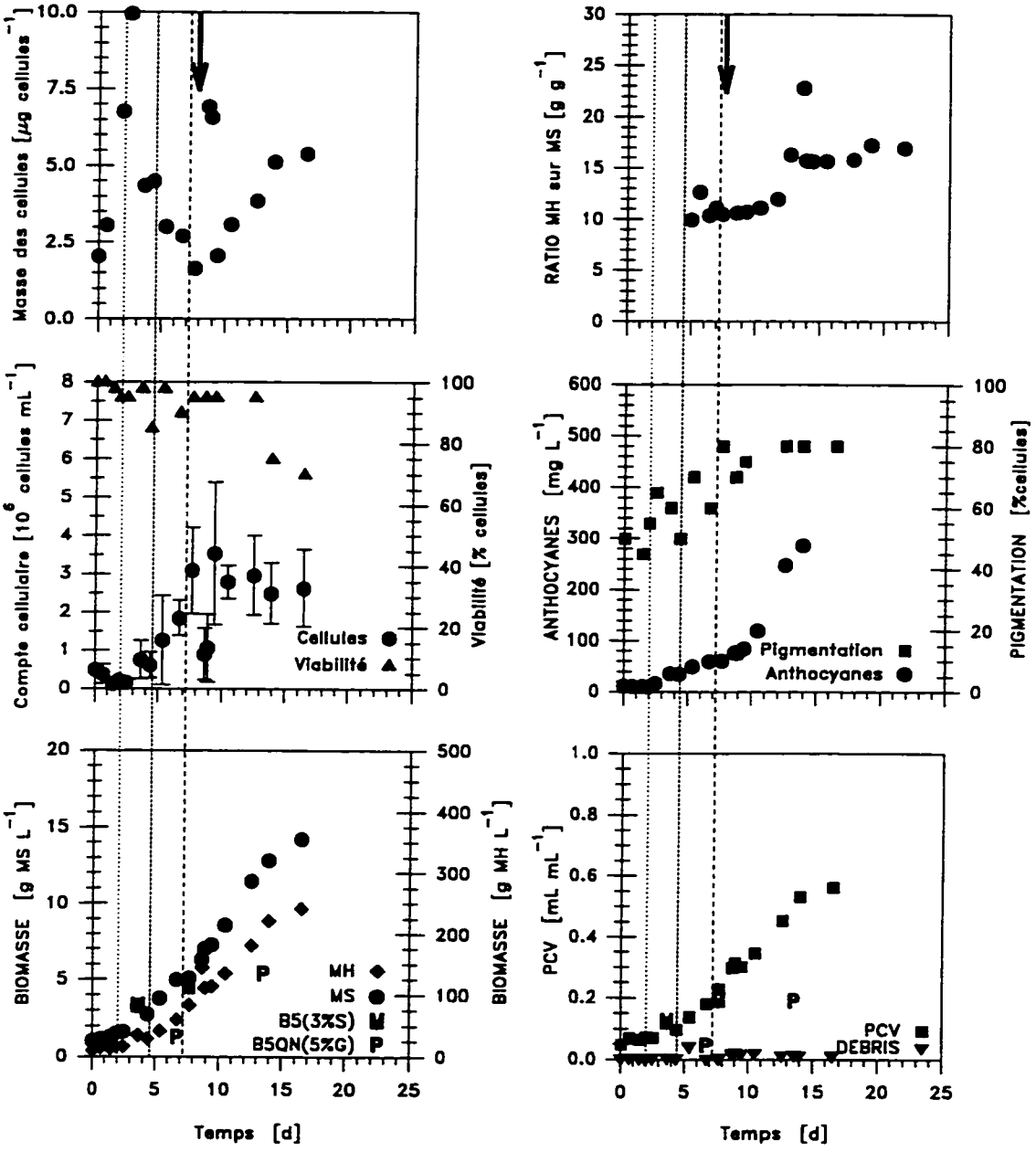


Figure A4.17 Ajout de $MgSO_4$: Indicateurs de croissance, production d'anthocyanes, masse spécifique des cellules et ratios de la biomasse humide sur la biomasse sèche d'une culture en cuvée contrôlée à 50% d'OD. Milieu de culture: B5, lignée VVG111 sc31(D10), alimentation ponctuelle d'un supplément concentré de glucose et de $MgSO_4$ à OUR_{max}.

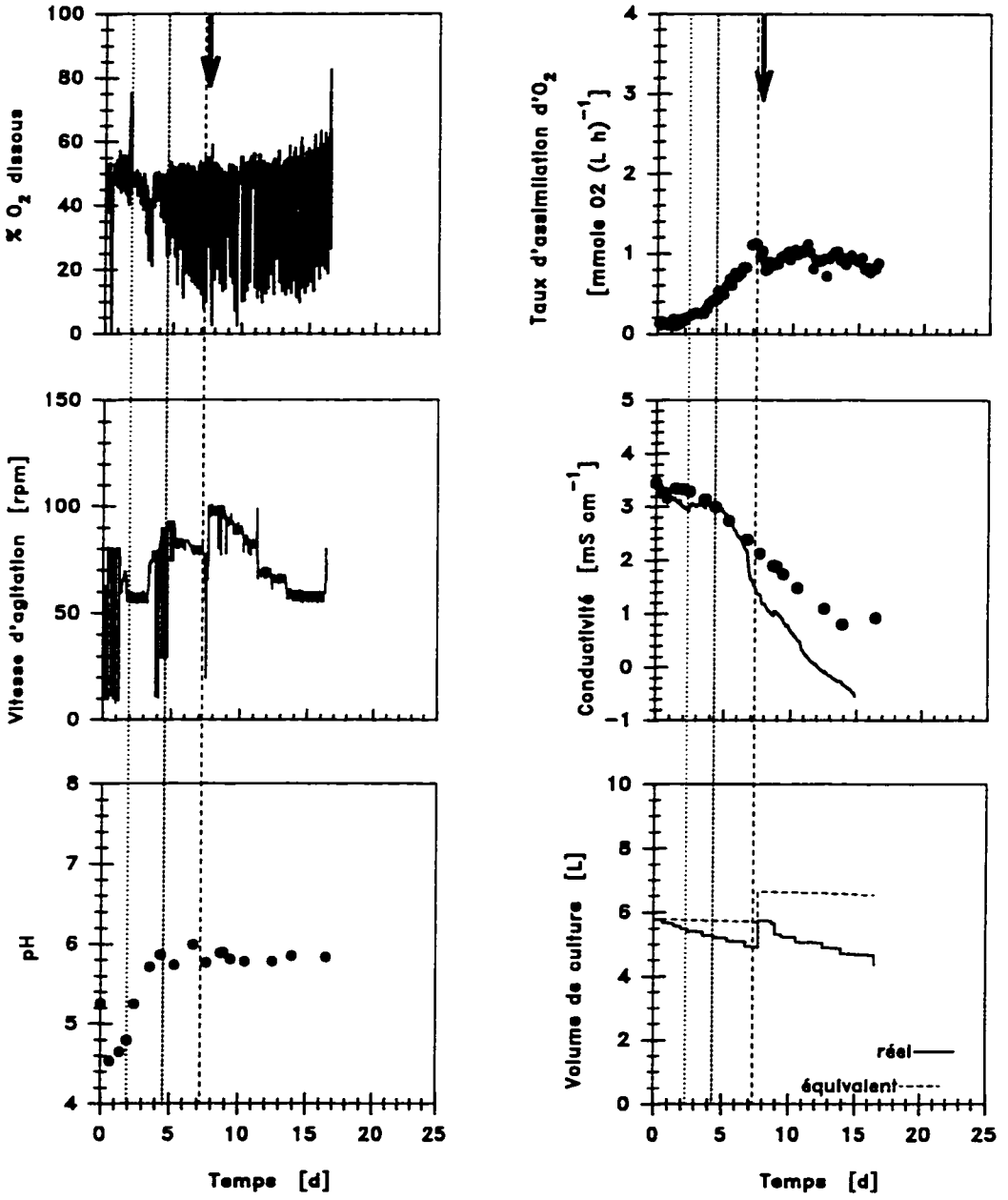


Figure A4.18 Ajout de $MgSO_4$: Vitesse d'agitation, concentration d'OD, taux volumique d'assimilation d'oxygène, conductivité du milieu de culture et volume de culture d'une cuvée contrôlée à 50% d'OD Milieu de culture: B5, lignée VVG111 sc31(D10), alimentation ponctuelle d'un supplément concentré de glucose et de $MgSO_4$ à OUR_{max}..

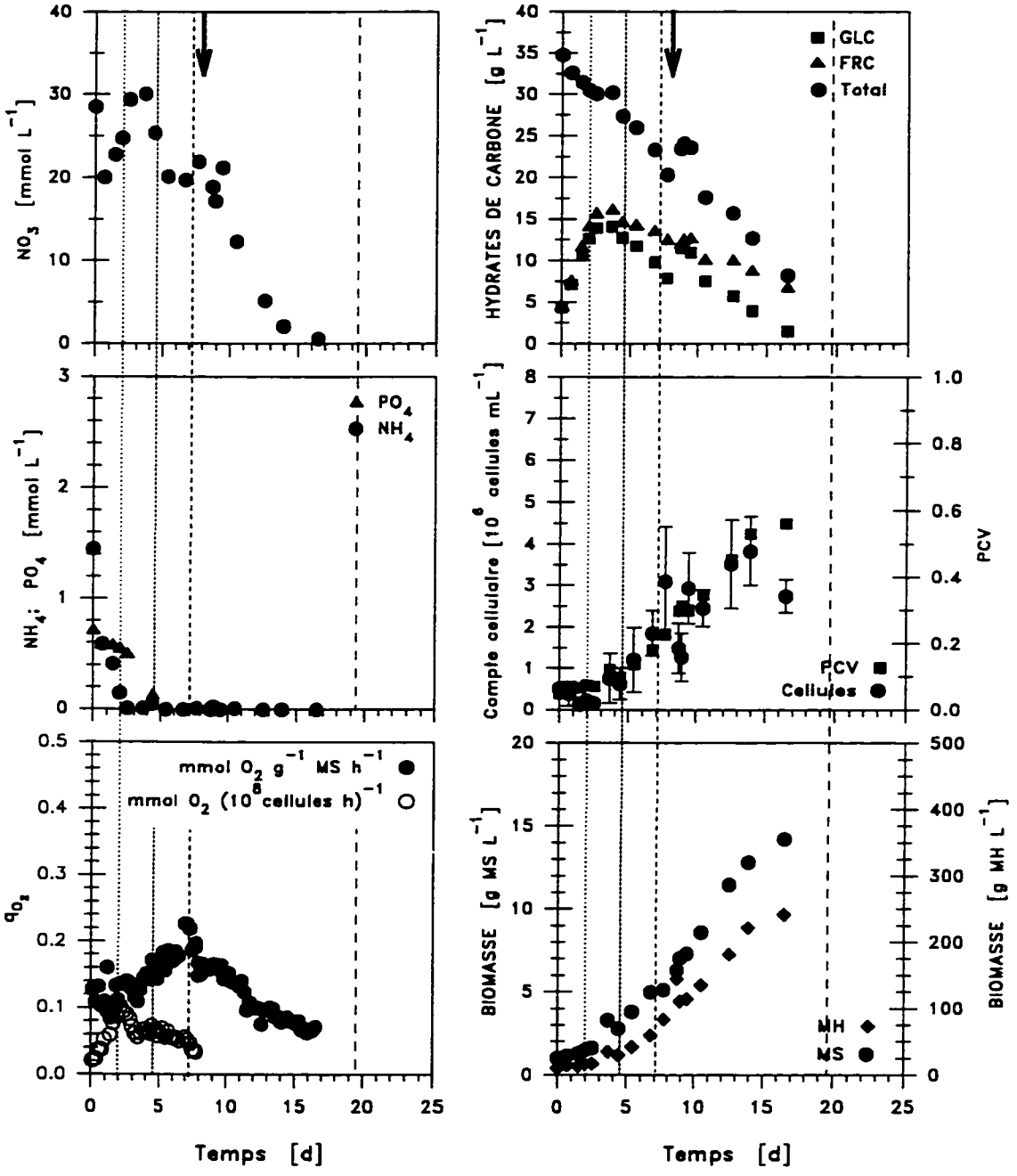


Figure A4.19 Ajout de $MgSO_4$: Consommation de nutriments et croissance de la biomasse d'une cuvée contrôlée à 50% d'OD Milieu de culture: B5, lignée VVG111 sc31(D10), alimentation ponctuelle d'un supplément concentré de glucose et de $MgSO_4$ à OUR_{max}.

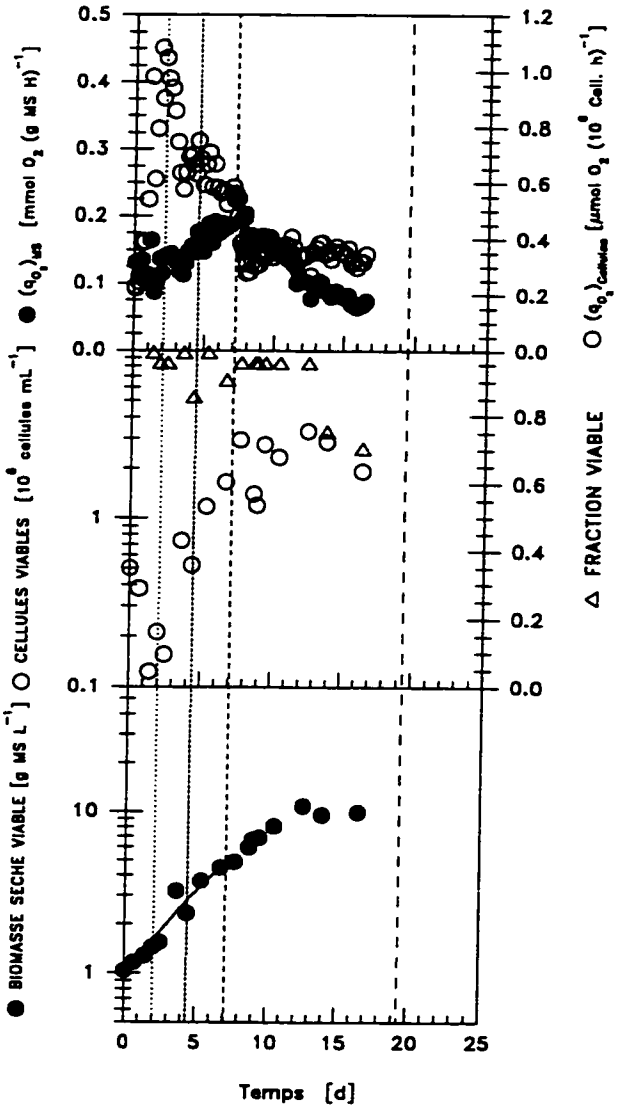


Figure A4.20 Ajout de $MgSO_4$: Taux spécifique d'assimilation d'O_2, prolifération cellulaire et croissance de la biomasse d'une cuvée contrôlée à 50% d'OD Milieu de culture B5, lignée VVG111 sc31(D10), alimentation ponctuelle d'un supplément concentré de glucose et de $MgSO_4$ à OUR_{max}.

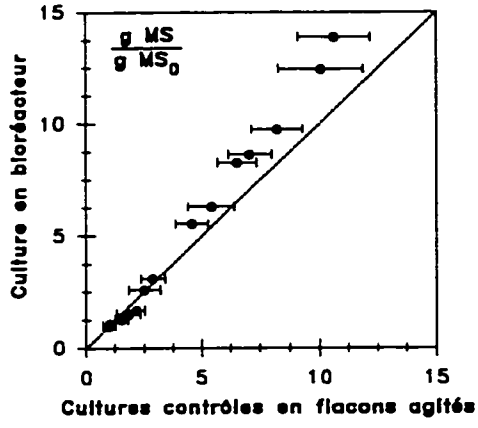


Figure A4.21 Ajout de $(NH_4)_2SO_4$: Comparaison des indices d'augmentation de la biomasse sèche d'une culture en cuvée alimentée contrôlée à 50% d'OD avec ses cultures témoins en flacons agités. Milieu de culture: B5, lignée VVG111 sc31(D10), alimentation graduelle d'un supplément concentré de glucose et de $(NH_4)_2SO_4$ à OUR_{max}.

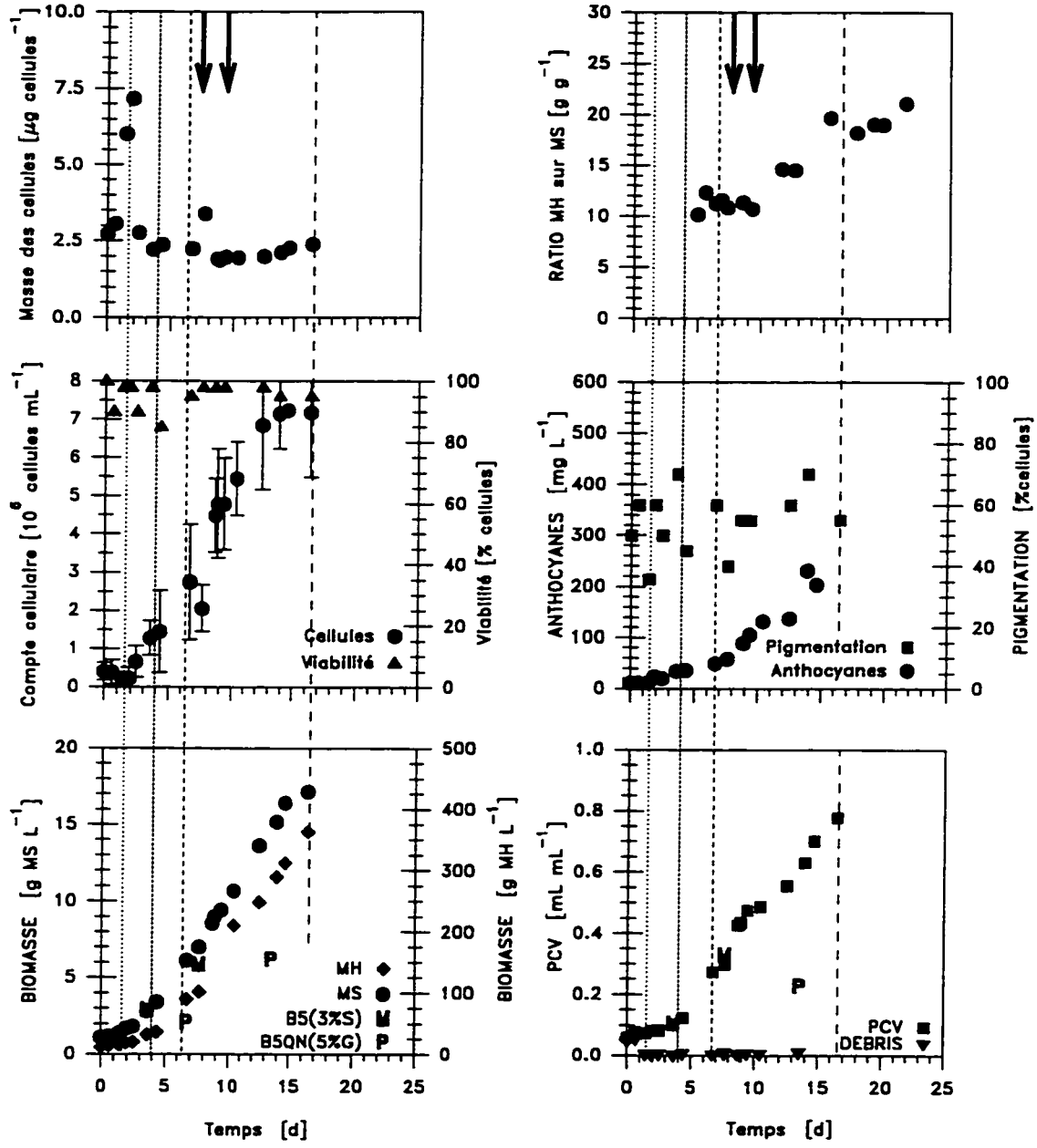


Figure A4.22 Ajout de $(NH_4)_2SO_4$: Indicateurs de croissance, production d'anthocyanes, masse spécifique des cellules et ratios de la biomasse humide sur la biomasse sèche d'une culture en cuvée contrôlée à 50% d'OD. Milieu de culture: B5, lignée VVG111 sc31(D10), alimentation graduelle d'un supplément concentré de glucose et de NaH_2PO_4 à OUR_{max}.

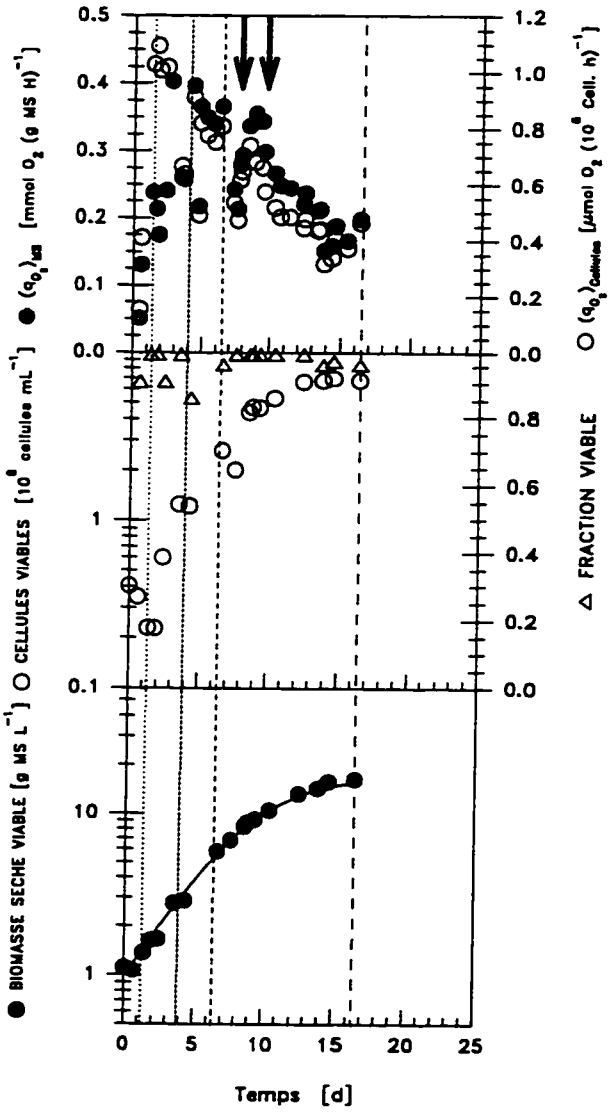


Figure A4.23 Ajout de $(NH_4)_2SO_4$: Taux spécifique d'assimilation d'O_2, prolifération cellulaire et croissance de la biomasse d'une cuvée contrôlée à 50% d'OD Milieu de culture B5, lignée VVG111 sc31(D10), alimentation graduelle d'un supplément concentré de glucose et de $(NH_4)_2SO_4$ à OUR_{max}.

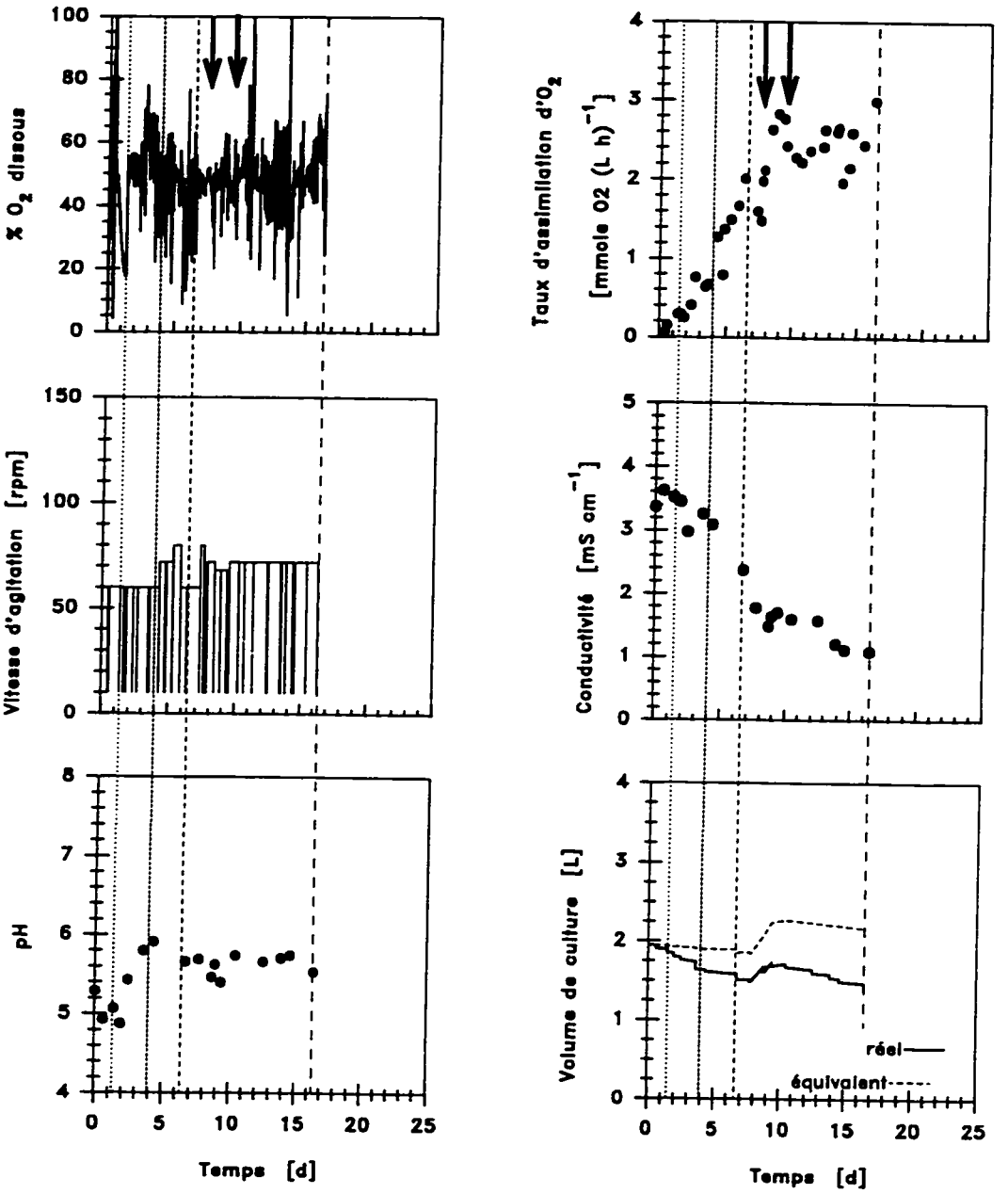


Figure A4.24 Ajout de $(NH_4)_2SO_4$: Vitesse d'agitation, concentration d'OD, taux volumique d'assimilation d'oxygène, conductivité du milieu de culture et volume de culture d'une cuvée contrôlée à 50% d'OD Milieu de culture: B5, lignée VVG111 sc31(D10), alimentation graduelle d'un supplément concentré de glucose et de $(NH_4)_2SO_4$ à OUR_{max}.

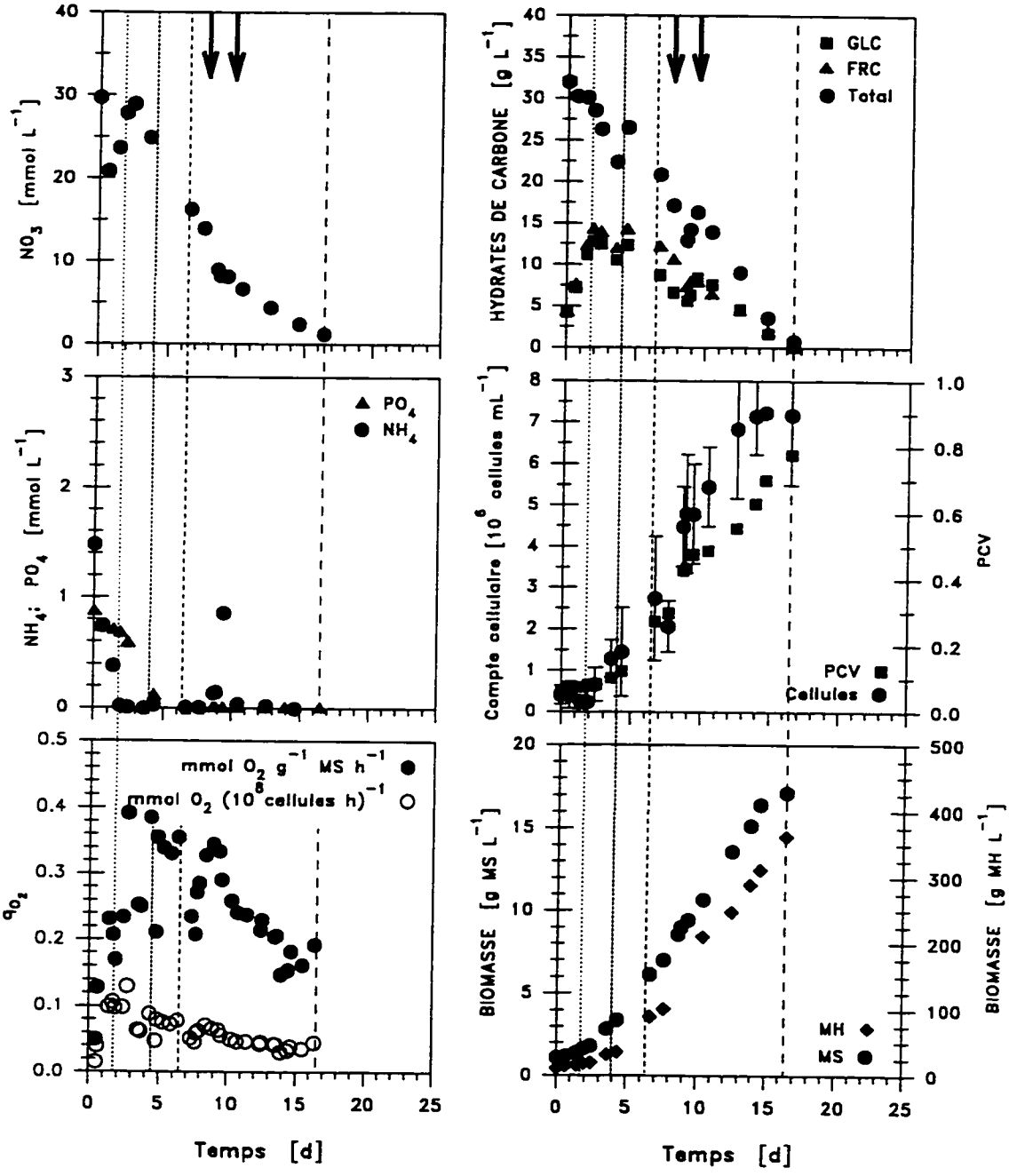


Figure A4.25 Ajout de $(NH_4)_2SO_4$: Consommation de nutriments et croissance de la biomasse d'une cuvée contrôlée à 50% d'OD Milieu de culture: B5, lignée VVG111 sc31(D10), alimentation graduelle d'un supplément concentré de glucose et de $(NH_4)_2SO_4$ à OUR_{max}.

A5. ÉTUDE PRÉLIMINAIRE DES PARAMÈTRES DÉRIVÉS DES MESURES DE CO_2

A5.1 Composition de la biomasse

Sur la base de mesures régulières d'OUR et de CER, on peut tenter de déterminer par bilan la composition de la biomasse. La croissance de la biomasse est une réaction autocatalysée. Ainsi, elle requiert minimalement la présence de biomasse pour produire de la biomasse. Dans cette réaction, les sources d'oxygène, de carbone, d'azote et d'hydrogène d'oxygène sont l'O_2, les hydrates de carbones ($C_6H_{12}O_6$), les ions ammonium et nitrate. L'équation la représentant est la suivante :

$$a\,O_2 + b\,C_6H_{12}O_6 + c\,NH_3 + d\,NO_3 \xrightarrow{\circlearrowright} e\,CH_\beta O_\gamma N_\delta + f\,H_2O + g\,CO_2 \qquad \text{(A5-1)}$$

En cuvée (ou en cuvée alimentée si l'on prend soin d'inclure une équation décrivant le changement de volume ou si l'on traite des données en termes de quantités plutôt qu'en termes de concentration), les variables a, b, c et d représentent la quantité de nutriments consommés entre un temps t et un temps $t + n$, et les variables f et g, la quantité d'eau et de dioxyde de carbone produits par la biomasse. Le fait que la réaction soit autocatalysée implique qu'une partie de la biomasse décrite dans le terme de droite soit aussi présente dans le terme de gauche. Si, en plus, on fait a priori l'hypothèse qu'au cours d'une cuvée, ou d'une cuvée alimentée, la composition de la biomasse peut évoluer, on doit réécrire l'équation 1 de la façon suivante :

$$e_t\left(CH_\beta O_\gamma N_\delta\right)_t + \Delta a\,O_2 + \Delta b\,C_6H_{12}O_6 + \Delta c\,NH_3 + \Delta d\,NO_3 \rightarrow e_{t+n}\left(CH_\beta O_\gamma N_\delta\right)_{t+n} + \Delta f H_2O + \Delta g CO_2 \qquad \text{(A5-2)}$$

où $\Delta a = a_{t+n} - a_t$. En restreignant l'analyse à l'évolution du contenu de la biomasse par rapport aux conditions initiales on écrira plus simplement :

$$e_0\left(CH_{\beta_0}O_{\gamma_0}N_{\delta_0}\right)+aO_2+bC_6H_{12}O_6+cNH_3+dNO_3 \rightarrow e\left(CH_\beta O_\gamma N_\delta\right)+fH_2O+gCO_2 \quad \text{(A5-3)}$$

où e_0 représente la quantité de biomasse de composition élémentaire $CH_{\beta_0}O_{\gamma_0}N_{\delta_0}$ présente initialement et où tous les autres paramètres représentent les quantités consommées ou produites de nutriments et de biomasse au temps t.

Plusieurs des variables de l'équation A5-3 peuvent être déduites des mesures effectuées aux cours des cultures. Ainsi,

- la quantité totale d'oxygène consommé peut être évaluée en posant que l'OUR varie linéairement entre deux mesures et en intégrant numériquement par la méthode du trapèze tout en considérant les changements de volume (variable *a*);

- de même, la quantité totale de dioxyde de carbone produit peut être évaluée en posant que le CER varie linéairement entre deux mesures, que la quantité de CO_2 dissous accumulée dans le milieu de culture est négligeable par rapport à la quantité produite, et en intégrant numériquement par la méthode du trapèze la courbe de CER (variable *g*);

- les quantités totales d'ions ammonium (*c*) et d'ions nitrate (*d*) consommés peuvent être évaluées aux temps correspondant aux mesures d'OUR en lissant les courbes de consommation par des polynômes;

- la quantité totale d'hydrates de carbone (*b*) consommés peut aussi être évaluée aux temps correspondant aux mesures d'OUR en lissant les courbes de progression de la concentration de chacun des hydrates de carbone dans le milieu par des polynômes. On pourra considérer une proportion constante de ces hydrates de carbone détournée vers la production de polysaccharides extracellulaires. En effet, les observations faites à l'annexe 3 permettent de dire qu'il y a vraisemblablement sécrétion de polysaccharides dans le milieu de culture. Or, dans la littérature, on trouve des valeurs mesurées pour une telle production de 20% des hydrates de carbone consommés pour *Petunia hybrida*,[48] 13% pour *Catharanthus roseus*[173] et de 20% pour *Nicotiana tabacum*.[173]

Désignant les variables à évaluer en caractères gras, les bilans de masse sur chacun des éléments C, H, O et N sont donc les suivants :

$$\begin{array}{lccccccccc}
\text{Bilan sur C:} & e_0 & & +6b & & & = & e & & +g \\
\text{Bilan sur H:} & \beta_0 e_0 & & +12b & +3c & & = & \beta e & +2f & \\
\text{Bilan sur O:} & \gamma_0 e_0 & +2a & +6b & & +3d & = & \gamma e & +f & +2g \\
\text{Bilan sur N:} & \delta_0 e_0 & & & +c & +d & = & \delta e & &
\end{array} \qquad \text{(A5-4)}$$

Si la composition et la concentration initiales de la biomasse sont connues, les variables e_0, α_0, γ_0 et β_0 du système d'équations (A5-4) sont fixés. De ces bilans de masse, on obtient successivement :

du bilan sur C, $$e = 6b + e_0 - g \qquad \text{(A5-5)}$$

du bilan sur N, $$\delta = \frac{c + d + \delta_0 e_0}{e} \qquad \text{(A5-6)}$$

du bilan dur H, $$f = \frac{\beta_0 e_0 - \beta e}{2} + 6b + 1{,}5c \qquad \text{(A5-7)}$$

du bilan sur O, $$f = (\gamma_0 e_0 - \gamma e) + 2a + 6b + 3d - 2g \qquad \text{(A5-8)}$$

En combinant les équations A5-7 et A5-8, on peut établir une relation entre la composition en oxygène et en hydrogène de la biomasse et les autres variables connues :

$$2(\gamma e - \gamma_0 e_0) - (\beta e - \beta_0 e_0) = 4a + 6d - 3c - 4g = h \qquad \text{(A5-9)}$$

où h représente une combinaison de variables connues.

Si la proportion de la biomasse sèche qui est constituée de cendres est connue, la mesure de biomasse sèche permet d'établir une relation supplémentaire entre la composition en oxygène et en hydrogène de la biomasse puisque la quantité de biomasse sèche produite est représentée par définition par la relation :

$$X_t\,(1 - \text{cendre}) = e(12 \cdot 1 + 1 \cdot \beta + 16 \cdot \gamma + 14 \cdot \delta) \qquad \text{(A5-10)}$$

où X_t représente la quantité de biomasse au temps t et les cendres représentent la fraction de la biomasse qui n'est pas constituée des éléments C, H, O, N. Comme la proportion des cendres résiduelles de la biomasse sèche n'a pas été mesurée, un estimé tiré de la littérature a été utilisé dans les calculs. Le tableau A5.1 présente les résultats obtenus par différentes équipes de recherche, selon les espèces, la proportion de cendres de la biomasse sèche varie entre 10% et 20%.

En combinant les équations 9 et 10, on obtient une expression qui relie γ aux variables connues :

$$\gamma = \frac{X_t(1-\text{cendre}) + 2\gamma_0 e_0 + h + \beta_0 e_0}{18e} - \frac{12+14\delta}{18} \qquad \text{(A5-11)}$$

Tableau A5.1 **Contenu en cendres, en carbone (C), en hydrogène (H) et en azote total (N) décrits dans la littérature pour différentes espèces.**

Cendres %	C %	H %	N %	Formule élémentaire	Espèce	Référence
20,2	35,6	0,19	0,39	$CH_{1,70}O_{0,68}N_{0,17}$	*P. hybrida*	De Gucht [48]
15,9	40,3	5,28	33,5	$CH_{1,57}O_{0,62}N_{0,11}$	*C. roseus*	Rho et André [135]
11,0	39,2	5,6	2,7	$CH_{1,71}O_{0,79}N_{0,06}$	*C. roseus*	Pareilleux et Vinas [122]
13,5	38,8	5,4	6,9	$CH_{1,65}O_{0,68}N_{0,15}$	*C. roseus* (continu)	Van Gulik et coll. [172]
7,6	39,4	5,9	5,6	$CH_{1,80}O_{0,79}N_{0,12}$	*C. roseus* (cuvée)	
16,2	36,5	5,0	7,0	$CH_{1,65}O_{0,72}N_{0,16}$	*N. tabacum* (continu)	Van Gulik et coll. [172]
10,5	39,1	5,7	6,1	$CH_{1,75}O_{0,74}N_{0,13}$	*N. tabacum* (cuvée)	

Notons de plus que la composition élémentaire de la biomasse étant ici définie par rapport à l'élément carbone, la variable *e* représente la quantité de mole de C présente dans la biomasse, de laquelle on peut déduire le contenu en carbone (en masse) de la biomasse (%C-MS). Ainsi,

$$\%C-MS=\frac{12\cdot e}{X_{MS}(1-\text{cendre})}\cdot 100 \qquad \text{(A5-12)}$$

Comme dans l'équation 9, définissant la variable *h*, *c* et *d* (la consommation d'ions ammonium et nitrate, au total 2 mmole et 25 mmole par litre de culture dans un milieu B5 standard, respectivement) sont négligeables devant *a* et *g* (la consommation d'O_2 et la production de CO_2, qui sont au total de l'ordre de 250 à 350 mmole par L), *h* est extrêmement sensible à la faible différence entre les quantités d'O_2 consommé et de CO_2 produit. D'autre part, la valeur de la variable *e* est principalement reliée à la consommation des hydrates de carbone (variable *b*) et à la production de CO_2 (variable *g*) (Équation A5-5). Or, dans les premiers jours de culture l'addition des trois mesures de saccharose, glucose et de fructose faite par chromatographie mène à une surestimation systématique de la concentration totale d'hydrates de carbone causé par le chevauchement partiel des pics de saccharose et de glucose. On peut postuler que cette erreur demeure importante tant que la concentration ainsi déterminée n'atteint pas au moins au niveau de la concentration de CH_2O présente lors de l'inoculation, ce qui coïncide généralement avec l'hydrolyse complète du saccharose. Ces deux éléments concourent à biaiser les estimés de la composition de la biomasse en hydrogène et en oxygène (β et γ) et de %C-MS, notamment sur les cinq premiers jours de culture.

A5.2 Estimés des concentrations de CO_2 dans le milieu

Afin de comparer les cultures effectuées en flacons agités et en bioréacteurs sur la base du plus grand nombre de paramètres, les concentrations de CO_2 dissous dans le milieu de culture peuvent être estimées sur la base de bilans de masse. Ces estimés éclaireront les comparaisons entre le comportement des cuvées effectuées dans les deux systèmes de culture en absence de mesures de concentration de CO_2 dans le milieu.

Dans le milieu de culture, le bilan de masse sur un composé volatil est similaire au bilan de masse sur l'oxygène :

$$\frac{dOD}{dt} = k_L a \cdot \left(\frac{p_{O_2}}{H_{O_2} \cdot R \cdot T} - OD \right) - OUR = OTR - OUR \qquad \text{(A5-13)}$$

Pour l'oxygène, considérant en parallèle un bilan de masse dans la phase gazeuse :

$$\frac{dp_{O_2}}{dt} = \frac{K}{V_g}\left((p_0)_{O_2} - p_{O_2}\right) - k_L a \cdot \frac{V_L}{V_g}\left(\frac{p_{O_2}}{H_{O_2}} - OD \cdot R \cdot T \right), \qquad \text{(A5-14)}$$

un régime pseudo-permanent, une phase gazeuse parfaitement mélangée et une pression constante de 1 atm, on obtient :

$$OD = \frac{p_{O_2}}{H_{O_2} \cdot R \cdot T} - \frac{OUR}{k_L a}, \qquad \text{(A5-15)}$$

et

$$p_{O_2} = (p_{O_2})_0 - OUR \cdot \frac{V_L \cdot R \cdot T}{K}. \qquad \text{(A5-16)}$$

Substituant l'équation A5-16 dans l'équation A5-15, on trouve que la concentration d'OD est fixée principalement par l'OUR et les taux de transfert du système de culture selon la relation :

$$OD = \frac{(p_{O_2})_0}{H_{O_2} \cdot R \cdot T} + OUR\left(\frac{V_L}{K \cdot H_{O_2}} + \frac{1}{k_L a} \right) \qquad \text{(A5-17)}$$

En bioréacteur, K est remplacé par F_g, le débit gazeux. Pour l'oxygène, la constante de Henry est de 32 mol mol^{-1}. Considérant les valeurs usuelles de V_L, de K et du taux volumique unitaire d'aération (F_g/V_L), le terme dominant affectant l'OUR dans l'équation A5-17 est $k_L a^{-1}$.

Pour le CO_2, la situation est potentiellement plus complexe. En effet, le CO_2 peut se trouver sous quatre formes dépendamment des conditions de pH du milieu : CO_2, H_2CO_3, HCO_3^- et $CO_3^=$ selon les conditions d'équilibre des réactions :

Cellules

⋮

CPR

$$p_{CO_2} \leftrightarrow [CO_2]_L \underset{k_2}{\overset{k_1}{\leftrightarrow}} H_2CO_3 \overset{K_1}{\leftrightarrow} H^+ + HCO_3^- \overset{K_2}{\leftrightarrow} H^+ + CO_3^=$$

CTR

À 25°C, $k_1 = 0{,}03\ s^{-1}$ et $k_2 = 20\ s^{-1}$.[4] La formation du H_2CO_3 est donc une réaction relativement lente, bien qu'elle soit rapide relativement aux taux de transfert et de production en cause dans les cultures de cellules végétales. À l'équilibre, la concentration de H_2CO_3 ne représente cependant que 0,0015 fois la concentration de CO_2 et est donc négligeable. Comparativement, la formation des ions bicarbonate et carbonate est très rapide. Les constantes d'équilibre sont les suivantes :[4,27]

$$K_1 = \frac{10^{-pH} \cdot [HCO_3^-]}{[CO_2] + [H_2CO_3]} = 10^{-6,3}\ M\ (25°C) \qquad \text{(A5-18)}$$

$$K_2 = \frac{10^{-pH} \cdot [CO_3^=]}{[HCO_3^-]} = 10^{-10,25}\ M\ (25°C) \qquad \text{(A5-19)}$$

Au pH typique des cultures de cellules végétales et plus particulièrement pour les cultures en cuvée de *V. vinifera* dont le pH atteint rarement plus de 6,3 en fin de culture, les ions carbonates sont pratiquement inexistants. Le bilan de masse sur le CO_2 pour un pH inférieur à 8,0 est le suivant :

$$\frac{d[CO_2]}{dt} + \frac{d[HCO_3^-]}{dt} = (k_L a)_{CO_2} \cdot \left(\frac{p_{CO_2}}{H_{CO_2} \cdot R \cdot T} - [CO_2] \right) + CPR. \qquad \text{(A5-20)}$$

À l'équilibre, l'équation (A5-19) indique que la concentration d'ion bicarbonate, elle, sera dix fois supérieure à celle du CO_2 à pH 7,3, mais égale à pH 6,3 et réduite à 5% de la concentration de CO_2 à pH 5. La concentration de HCO_3^- atteinte en fin de culture alors que le pH atteint 6 à 6,5, représente donc peu par rapport au CO_2 produit pendant la culture et continuellement transféré au gaz d'aération. En fait, considérer l'équilibre CO_2-HCO_3^- lorsque le pH du milieu est inférieur à 6,5 et qu'il évolue à un taux de 0,05 h^{-1}, corrige la concentration estimée de CO_2 dissous obtenu d'un bilan sur le CO_2 seulement de 5% au maximum. Hormis les situations de contrôle de pH dans lesquelles celui-ci peut fluctuer rapidement et faire varier la concentration de CO_2 dissous et la pression partielle de CO_2, [142] le taux de transfert de CO_2, CTR, n'est pas influencé significativement par les conditions de pH des cultures de cellules de plantes et peut-être assimilé au taux de production de CO_2, CPR. De plus, comme les réactions biologiques impliquées sont lentes par rapport à la capacité de transfert, on considérera, comme pour l'oxygène, un régime pseudo-permanent. Le bilan global sur le CO_2 dans le liquide (Équation A5-20) se réduit donc simplement à :

$$\frac{d[CO_2]_L}{dt} = k_L^{CO_2}a \cdot \left(\frac{p_{CO_2}}{H_{CO_2} \cdot R \cdot T} - [CO_2]_L \right) + CPR = CTR + CPR. \qquad \text{(A5-21)}$$

Considérant le bilan de masse dans la phase gazeuse :

$$\frac{dp_{CO_2}}{dt} = \frac{K}{V_g}\left((p_0)_{CO_2} - p_{CO_2}\right) - (k_La)_{CO_2} \cdot \frac{V_L}{V_g}\left(\frac{p_{CO_2}}{H_{CO_2}} - [CO_2]_L \cdot R \cdot T \right), \qquad \text{(A5-22)}$$

un régime pseudo-permanent et une pression constante de 1 atm, on obtient :

$$[CO_2]_L = \frac{p_{CO_2}}{H_{CO_2} \cdot R \cdot T} + \frac{CPR}{k_L^{CO_2}a} \qquad \text{(A5-23)}$$

et

$$p_{CO_2} = (p_{CO_2})_0 + CPR \cdot \frac{V_L \cdot R \cdot T}{K}, \qquad \text{(A5-24)}$$

Lorsque des mesures de la production de CO_2 sont disponibles, la concentration de CO_2 dans les bioréacteurs est obtenue en substituant l'équation A5-24 dans l'équation A5-23 pour obtenir :

$$[CO_2]_L = \frac{(p_{CO_2})_0}{H_{CO_2} \cdot R \cdot T} + CER\left(\frac{V_L}{F_g \cdot H_{CO_2}} + \frac{1}{k_L^{CO_2}a}\right). \qquad \text{(A5-25)}$$

Chez *Catharanthus roseus*, les coefficients respiratoires rapportés dans la littérature, RQ = CPR/OUR, varient en moyenne de 0,8 à 1,3. [136,172] En fixant le coefficient respiratoire RQ égal à 1, il est possible de comparer les conditions de cultures en bioréacteur HRI et en flacon agité en termes de concentrations de CO_2 par les relations :

$$[CO_2]_L = \frac{(p_{CO_2})_0}{H_{CO_2} \cdot R \cdot T} + OUR\left(\frac{V_L}{F_g \cdot H_{CO_2}} + \frac{1}{k_L^{CO_2}a}\right), \text{ et} \qquad \text{(A5-26)}$$

$$[CO_2]_L = \frac{(p_{CO_2})_0}{H_{CO_2} \cdot R \cdot T} + OUR\left(\frac{V_L}{K \cdot H_{CO_2}} + \frac{1}{k_L^{CO_2}a}\right) \qquad \text{(A5-27)}$$

pour le bioréacteur et le flacon agité, respectivement. Pour le CO_2, la constante de Henry à 25°C est de 1,21 mol mol^{-1} et, dépendamment des conditions de culture, les deux termes affectant l'OUR (ou le CER) peuvent être significatifs tant pour le réacteur HRI aéré par la surface que pour les flacons agités.

A5.3 Estimés du contenu en carbone de la biomasse

La quantité totale de CO_2 produite peut être utilisée conjointement avec les quantités totales d'hydrates de carbone consommées et de biomasse produite, pour estimer le contenu en carbone de la biomasse selon la relation :

$$C - MS_{estimé} = \frac{C_{consommé} - C_{produit}}{\text{biomasse produite}} \qquad \text{(A5-28)}$$

où chacun les trois variables de l'équation (28) sont respectivement,

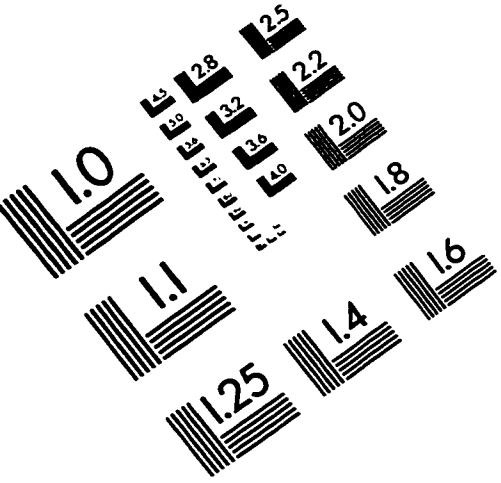
$$C_{consommé} = \left(\left([CH_2O]_0 - [CH_2O]_f\right) V_{L,0} + \left([CH_2O]_{alim.} \cdot V_{L,alim.}\right)\right)(1-\alpha) \cdot \frac{6\,C-mol}{180\,g\,CH_2O} \cdot \frac{12\,g\,C}{C-mol} \qquad \text{(A5-29)}$$

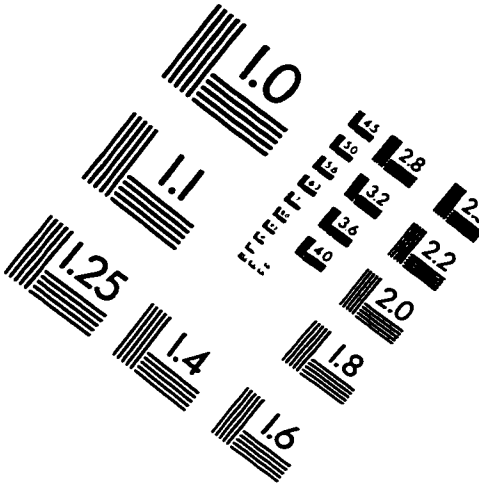
où α représente la portion des hydrates de carbone sécrétés dans le milieu sous forme de polysaccharides qui pourrait atteindre 8% [172,173] à 20%; [48]

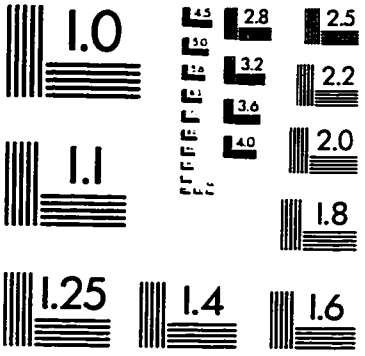
$$C_{produit} = \sum_{t=0}^{t=t_f} \frac{0{,}5 \cdot \left(\left(p_{CO_2}\right)_{i+1} + \left(p_{CO_2}\right)_i\right) \cdot 0{,}5 \cdot \left(V_{L,i+1} + V_{L,i}\right)}{RT\left(t_{i+1} - t_i\right)} \cdot \frac{12\,g\,C}{mmol\,CO_2}, \text{ et} \qquad \text{(A5-30)}$$

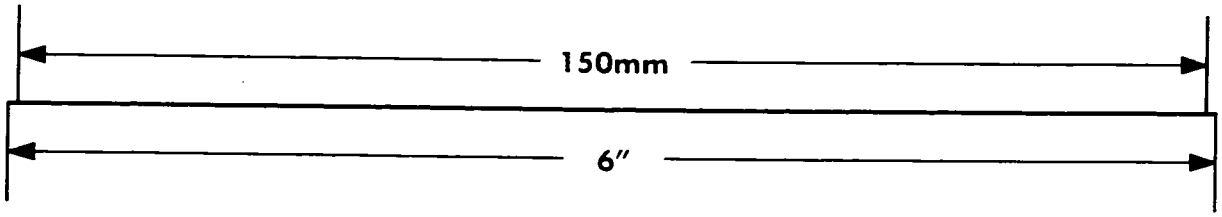
$$\text{biomasse produite} = \left(x_{MS,f} - x_{MS,0}\right) V_{L,0}. \qquad \text{(A5-31)}$$

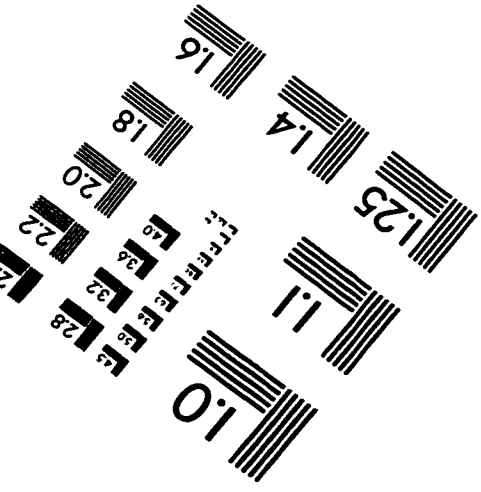
IMAGE EVALUATION TEST TARGET (QA-3)

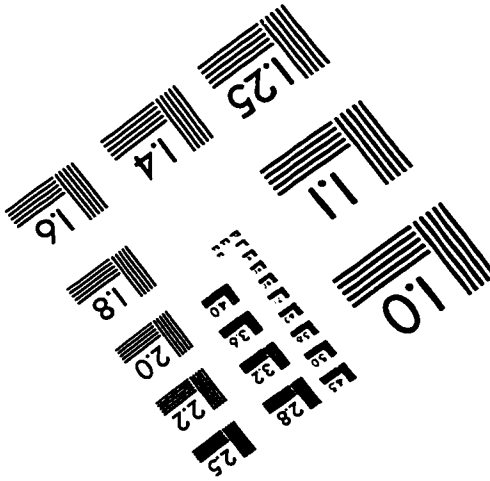












APPLIED IMAGE, Inc
1653 East Main Street
Rochester, NY 14609 USA
Phone: 716/482-0300
Fax: 716/288-5989

© 1993, Applied Image, Inc., All Rights Reserved