POLYPUBLIE
Polytechnique Montréal

POLYTECHNIQUE MONTRÉAL
UNIVERSITÉ D'INGÉNIERIE

Titre: Title:	Modélisation et contrôle adaptatif de la croissance de cellules HEK-293 en milieu sans sérum
Auteur: Author:	Pascal Siegwart
Date:	1998
Type:	Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis
Référence: Citation:	Siegwart, P. (1998). Modélisation et contrôle adaptatif de la croissance de cellules HEK-293 en milieu sans sérum [Master's thesis, École Polytechnique de Montréal]. PolyPublie. https://publications.polymtl.ca/6925/

Document en libre accès dans PolyPublie
Open Access document in PolyPublie

URL de PolyPublie: PolyPublie URL:	https://publications.polymtl.ca/6925/
Directeurs de recherche: Advisors:	Michel Perrier, & Amine A. Kamen
Programme: Program:	Unspecified

Ce fichier a été téléchargé à partir de PolyPublie, le dépôt institutionnel de Polytechnique Montréal
This file has been downloaded from PolyPublie, the institutional repository of Polytechnique Montréal

https://publications.polymtl.ca

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

MODÉLISATION ET CONTRÔLE ADAPTATIF DE LA CROISSANCE DE CELLULES HEK-293 EN MILIEU SANS SÉRUM

PASCAL SIEGWART
DÉPARTEMENT DE GÉNIE CHIMIQUE
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLÔME DE MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES
(GÉNIE CHIMIQUE)
JUILLET 1998

© Pascal Siegwart, 1998.

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.

0-612-38710-0

Canada

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé:

MODÉLISATION ET CONTRÔLE ADAPTATIF DE LA CROISSANCE DE CELLULES HEK-293 EN MILIEU SANS SÉRUM

présenté par: SIEGWART Pascal
en vue de l'obtention du diplône de: Maîtrise ès sciences appliquées
a été dûment accepté par le jury d'examen constitué de:

M. RAMSAY Bruce, Ph.D., président
M. PERRIER Michel, Ph. D., membre et directeur de recherche
M. KAMEN Amine, Ph. D., membre et codirecteur de recherche
M^{me} DE TREMBLAY Michèle, Ph. D., membre

REMERCIEMENTS

Issu d'une grande école française, j'ai été nourri de concepts théoriques mathématisants. Néophyte, la transition a été rude lorsqu'il a fallu reposer les pieds sur terre à la découverte des biotechnologies. Mon chemin initiatique est passé par des cours à l'université, puis par la mer de littérature scientifique et enfin il a bien fallu franchir la porte des laboratoires. Je tiens ainsi à remercier Michel Perrier et Amine Kamen qui m'ont fait confiance dès mon arrivée, qui m'ont orienté et qui étaient disponibles pour répondre à mes questions métaphysiques sur le contrôle de procédés et la petite vie intime des cellules. Je remercie Shawn Barret et Danielle Jacob avec qui j'ai fait équipe au fameux F54, le laboratoire des virus, et avec qui j'ai vécu les expériences terribles de contamination. Je dois donner une mention spéciale à Johanne Côté, Stéphane Lanthier, Sylvie Perret, Barbara Jardin, Rosanne Tom, et tous les autres de l'équipe pour leur immense patience et leur aide quand un certain individu blond errait dans les laboratoires que ce soit à la recherche d'un simple flacon ou avec une question de débutant. Je remercie Robert Voyer, dépanneur officiel (au sens français et non québécois) toujours disponible et compétent. Merci à Gilles Lefebvre, mon collègue de bureau, victime de mes questions de 'Jeopardy' et qui m'attendait quand je peinais en ski de fond. Je remercie Anik Chevrier, Sandrine Dahan et Gilles Lefebvre (encore!) pour leur lecture critique de ce mémoire. Enfin, j'ai été très heureux d'avoir partagé cette expérience québécoise dans le secteur le plus dynamique et le plus souriant de l'IRB. Et puisqu'on ne vit pas toujours d'amour et d'eau fraîche, je remercie la Fondation de l'Ecole Polytechnique de Paris et le fond Québécois F.C.A.R. pour leur soutien financier.

Pour finir je voudrais présenter mes derniers voeux de départ par ordre alphabétique: qu'Alice ne manque pas d'énergie, qu'Arno continue à aimer le ski, que Blandine ne voit plus de bactéries, que Diane achète mes meubles, qu'Eef ne grandisse plus, que la fête continue grâce à Emel et Micheal, que Fabrice reste au Québec, qu'Hafida passe un joyeux anniversaire, qu'Isabelle retrouve son gentil sourire, que Janani ne souffre plus de

sa Végétariennus Insectus aiguë, que Lyne me fasse quand même un gâteau, que Manon prenne soin de mon Dionex, que Marco continue d'être gentil avec Danielle, que Maria retrouve son baladeur, que Nathalie achète ma voiture, que Normand puisse rentrer regarder la télévision le soir, que Petros fasse marcher le FIA, que le journal continue avec Sylvie D., que Sylvie S.-A. me pardonne pour la bouteille d'hélium, que Vadim garde son appétit, qu'Yves laisse son Mac pour un PC, et que tous ceux que j'ai oubliés me pardonnent.

RÉSUMÉ

L'utilisation des cellules mammifères pour la production de protéines et de particules virales est de plus en plus étendue dans l'industrie pharmaceutique. La culture de ces types d'organismes est délicate, complexe et exige des techniques des plus élaborées. Dans le but de contribuer à l'optimisation de la culture en bioréacteur des cellules animales, un travail de modélisation et de contrôle adaptatif de concentration du glucose a été réalisé. L'effort de l'étude est concentré sur le métabolisme du glucose et dans une moindre mesure sur celui de la glutamine. L'hypothèse principale émise est la nécessité de développer des stratégies réduisant la production de lactate par les cellules, afin d'augmenter les concentrations cellulaires et les productivités. En utilisant les cellules humaines HEK-293, quatres cultures en cuvée alimentée en bioréacteur de 22 L ont été réalisées en milieu sans sérum avec un système de mesure en ligne de la concentration de glucose par l'analyse par injection de flux toutes les 30 minutes et un contrôle à faible concentration.

Un contrôleur adaptatif discrétisé a d'abord été testé en simulation sur un modèle de croissance non structuré. La concentration de glucose a ainsi été maintenue à 1 mM tout au long des cultures. Ce contrôleur fonctionnait de manière satisfaisante à basse et haute densités cellulaires sans nouveau réglage de paramètres. Le seul paramètre estimé s'avérait être une information précieuse pour le suivi de l'état physiologique des cellules. Les taux de consommation de glucose et de glutamine et les taux de production de lactate et d'ammoniac ont été comparés avec ceux d'une expérience de culture en cuvée avec une concentration initiale de glucose de 21 mM. Les profils des concentrations peuvent être divisés en 3 phases. La première est caractérisée par une bonne croissance cellulaire et un haut taux spécifique de consommation de glucose et de production de lactate. La deuxième phase conserve un fort taux spécifique de croissance, mais il apparaît une réduction significative des taux spécifiques de consommation de glucose et de glutamine et des taux spécifiques de production de lactate. Dans la dernière phase, la croissance

cellulaire est considérablement ralentie, avec une consommation au lieu d'une production de lactate. Dans cette phase la glutamine n'est pratiquement plus consommée. Le taux spécifique de respiration semblait rester constant pendant les deux premières phases, suggérant une limitation de la capacité de la voie oxydative. La production de lactate a été réduite de façon importante par le contrôle de la concentration de glucose à faible niveau. L'énergie produite par la glycolyse ne semble pas essentielle à la croissance cellulaire. Le transport du glucose par les cellules semble être le facteur qui régule le métabolisme du glucose. Un premier modèle non-structuré de la croissance cellulaire supposant une indépendance complète entre la voie d'oxydation du glucose et la glycolyse permet de rendre compte de l'influence de la concentration de glucose sur le taux de glycolyse. Ce modèle n'explique pas les changements d'état physiologique entre les deux premières phases. Sur ce modèle, sont validés un contrôleur adaptatif de la concentration de glucose et un contrôleur adaptatif de la concentration d'oxygène dissous. Un contrôleur adaptatif modifié permet de contrôler l'oxygène dissous sans connaissance du coefficient variable de transfert de masse d'oxygène. Des estimateurs de taux spécifiques de croissance sont également présentés. Un second modèle de croissance qui intègre le transport de glucose par les cellules et qui considère la glycolyse comme une certaine perte énergétique, rend compte des données expérimentales sur l'ensemble des deux phases avec une erreur relative moyenne de 7% pour la culture en cuvée et de 18% pour la culture en cuvée alimentée. Une nouvelle stratégie de contrôle de glucose est proposée et simulée sur le deuxième modèle pour s'affranchir de la mesure de la concentration de glucose. Par la mesure du taux de consommation d'oxygène, on alimente le bioréacteur en glucose pour contrôler un paramètre physiologique de glycolyse au lieu de contrôler seulement l'environnement des cellules.

ABSTRACT

Mammalian cells are used more and more by the pharmaceutical industry to produce proteins and virus particles. Mammalian cell culture is critical, complex and requires highly developed technologies. In order to contribute to the cell culture optimization in bioreactor, models and adaptive controllers have been developped. The focus in this study is on the glucose metabolism and, to a lower extent, on the glutamine metabolism of the cells. The main hypothesis is that the lactate production by cells needs to be reduced in order to reach higher cell density and higher productivity. With HEK-293 human cells, four fed-batch cultures at low glucose concentration were performed in serum free medium with on-line measurement of glucose concentration using Flow Injection Analysis (FIA) every 30 minutes. A discrete adaptive controller has previously been tested by simulation using an unstructured growth model. The concentration of glucose in the bioreactor was maintained at 1 mM throughout the culture using an adaptive nonlinear controller based on minimal modelling of the process. The controller worked satisfactorily for both low and high cell concentrations without need for retuning between different culture phases. A single parameter was estimated and shown useful to diagnose the physiological state of the culture. The glucose and glutamine uptake rates and the lactate and ammonia production rates were compared to those obtained in batch mode with an initial glucose concentration at 21 mM. The concentration profiles obtained from both culture modes could be divided into three phases for interpretation. The first phase was characterized by high specific growth rate, high specific glucose consumption, and high specific lactate production. In the second phase, high specific growth rate was still observed but with a significant decrease in the specific rates of glucose uptake, lactate production, and glutamine uptake. In the last phase, cell growth became significantly slower with a decrease of specific glucose uptake rate and with lactate consumption instead of production. The glutamine consumption was negligible during this last phase. The specific respiration rate appeared to remain constant during the first two phases

suggesting that no change occured in oxidative pathway capacity. Lactate production was significantly reduced by maintaining a low glucose concentration thus decreasing the rate of glycolysis. The energy produced by glycolysis did not appear to be essential for cell growth. Glucose transport by the cells seemed to regulate the metabolism of glucose. A first unstructured growth model was developed based on the assumption that oxydative pathways and glycolysis were completely independent. This model accounted for the influence of glucose concentration on glycolysis, but failed to explain the physiological changes between the two first phases. Using this model, an adaptive controller of dissolved oxygen was validated. A modified adaptive controller allows to control dissolved oxygen without knowing the oxygen mass transfer coefficient. Estimators of specific growth rates are presented. A second growth model, which integrates glucose transport by the cells, and which considers glycolysis as an energy waste, was proposed. This model accounted for the experimental data during both first phases with relative errors of 7% in the batch culture and 18% in the fed-batch culture. A new strategy of glucose control is proposed and simulated to eliminate on line glucose measurement. Measuring the oxygen consumption rate, glucose is fed in the bioreactor to directly control a physiological parameter of glycolysis, instead of controlling the cell environment.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMEMENTS iv

RÉSUMÉ vi

ABSTRACT viii

LISTE DES TABLEAUX xvi

LISTE DE FIGURES xvii

LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS xx

LISTE DES ANNEXES xxv

INTRODUCTION 1

CHAPITRE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE 3

I.1. Les Cellules animales 3

I.1.1 Les cellules mammifères, des eucaryotes supérieurs 3

I.1.2 Milieux de culture 4

I.1.2.1 Milieu standard 4

I.1.2.2 Milieu sans sérum 5

I.1.2.3 Optimisation du milieu 6

I.1.3 Métabolisme du glucose et de la glutamine *7*
I.1.3.1 Le glucose 8
I.1.3.2 La glutamine 9
I.1.4 L'effet inhibiteur du lactate et de l'ammoniac *9*
I.1.4.1 Le lactate 10
I.1.4.2 L'ammoniac 10
I.1.5 Stratégies de réduction des consommations de glucose et de glutamine *10*
I.1.5.1 Considérations énergétiques 10
I.1.5.2 Contrôle à basse concentration 11
I.1.5.3 Rétro-inhibition de la glycolyse par le lactate 12
I.1.5.4 Milieu sans insuline 12
I.1.5.5 Génie métabolique 13

I.2. Modélisation de la culture de cellules animales 13

I.2.1 Généralités *13*
I.2.1.1 Complexité de la modélisation 13
I.2.1.2 Utilité de la modélisation 14
I.2.2 Méthodologie *15*
I.2.3 Limitations par les mesures en ligne *16*
I.2.4 Exemples de modélisation *16*

I.3. Méthodes de mesure de glucose 17

I.3.1 Mesure par chromatographie liquide *17*
I.3.2 Mesure enzymatique *18*
I.3.3 Mesure en ligne *19*
I.3.3.1 Extraction du filtrat 19
I.3.3.2 Fréquence et gamme de mesure 19

I.4. Contrôleurs de systèmes biologiques 19

I.4.1 Contrôle en boucle ouverte 20

I.4.2 Contrôle en boucle fermée 20

I.4.2.1 P.I.D 21

I.4.2.2 Contrôle adaptatif 22

I.4.2.3 Stratégies heuristiques 24

CHAPITRE II : Contrôle adaptatif de la concentration de glucose à faible niveau pour étudier le métabolisme des cellules HEK-293 en milieu sans sérum 26

II.1. Abstract 28

II.2. Introduction 28

II.3. Materials and Methods 31

II.3.1 Cell line and culture medium 31

II.3.2 Inoculum 31

II.3.3 Bioreactor culture 32

II.3.4 On-line glucose analysis 33

II.3.5 Analytical Methods 34

II.3.6 Glucose feeding 35

II.4. Modeling and theoretical aspects 35

II.4.1 Stabilizing control 36

II.4.2 Minimal system knowledge, minimal monitoring 37

II.4.3 Discretization 38

II.4.4 Selection of tuning parameters *39*

II.5. Results and Discussion **40**

II.5.1 Control *40*

II.5.1.1 Performance 40

II.5.1.2 Measurement errors 43

II.5.1.3 Control at high cell density 44

II.5.1.4 Controller reaction to glucose over-addition 45

II.5.1.5 Estimation of biomass 47

II.5.2 Basic metabolism and growth *50*

II.5.2.1 Glucose consumption and lactate production 51

II.5.2.2 Glutamine consumption and ammonia production 56

II.6. Conclusion **58**

II.7. Nomenclature **58**

II.8. Acknowledgment **59**

II.9. Literature Cited **60**

CHAPITRE III : MODÉLISATION ET CONTRÔLE **63**

III.1. Modèle de croissance I **63**

III.1.1 Modélisation *63*

III.1.2 Les taux spécifiques de réaction *65*

III.1.3 Relations entre coefficients de rendement *66*

III.1.4 Variables des transferts de masse gazeux *67*

III.1.5 Valeurs initiales des variables d'état *68*

III.1.6 Utilisation des données expérimentales *68*
III.1.7 Simulations sur MATLAB® *72*
III.1.8 Contrôleurs adaptatifs *74*
III.1.8.1 Contrôle de l'oxygène dissous 74
III.1.8.2 Contrôle de la concentration de glucose 78
III.1.9 Estimateurs de taux spécifiques de réaction *80*
III.1.9.1 Estimateur du taux spécifique de croissance μ 80
III.1.9.2 Estimation de μ_R et μ_F 81
III.1.10 Observateur asymptotique *83*

III.2. Modèle de croissance II 84

III.2.1 Modélisation *85*
III.2.2 Les taux spécifiques de réaction *86*
III.2.2.1 Le transport de Glucose 86
III.2.2.2 L'oxidation du glucose 86
III.2.2.3 La glycolyse 87
III.2.3 Utilisation des données expérimentales *87*
III.2.3.1 Taux de réactions et coefficients de rendement 87
III.2.3.2 Influence des activateurs de transport de glucose 90
III.2.4 Simulations sur MATLAB® *93*

III.3. Nouvelle stratégie de contrôle 95

III.3.1 Croissance limitée en glucose *95*
III.3.2 Détermination de l'OUR *96*
III.3.2.1 Méthode directe 97
III.3.2.2 Méthode d'estimation avec contrôleur adaptatif 97
III.3.2.3 Méthodes dynamiques 97
III.3.2.4 Méthode de dynamique du contrôleur 98
III.3.3 Simulation du contrôleur *99*

CONCLUSION ET RECOMMANDATION 102

RÉFÉRENCES 105

ANNEXES 114

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1 : Réduction de la glycolyse par une faible concentration de glucose dans le milieu de culture basé sur le modèle Xie et Wang (1996a)..... 16

Table 2.1 : Specific growth rate and yield coefficients for a batch culture (initial glucose concentration 21 mM) and a low glucose control culture in exponential phase. Two physiological states were indentified. 52

Table 2.2 : Specific consumption and production rates for a batch culture and a low glucose control culture in exponential phase. Two physiological states were indentified..... 54

Tableau 3.1 : Valeurs des conditions initiales des expériences en cuvée et en cuvée alimentée. 68

Tableau 3.2 : Paramètres du modèle de croissance I d'après les données expérimentales pour x=18. 70

Tableau 3.3 : Paramètres du modèle de croissance I d'après les données expérimentales pour x=100. 71

Tableau 3.4 : Paramètres du modèle de croissance II d'après les données expérimentales pour x=15 et κ=0.1. 89

Tableau 3.5 : Paramètres de la modélisation des activateurs du transport de glucose. 91

Tableau 3.6 : Erreurs relatives moyennes du modèle II par rapport aux données expériementales. 95

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 : Diagramme simplifié du réseau de réactions impliquant le glucose et la glutamine d'après Xie et Wang (1996). 7

Figure 2.1 : Glucose on-line measurement system. From the recirculation loop through a ceramic filter, the filtrate was injected every 30 minutes to the glucose oxidase mediated biosensor. The signal was integrated by a computer. The controller set the flow rate of a 3.3 M glucose solution on a syringe pump. 33

Figure 2.2 : Simulation of glucose control with initial conditions. S_0=1.3 mM, C=0.4 h^{-1}, $\hat{\theta}_{S_0}$=0 h^{-1}, γ=400,000. Three different senarios were tested: 2a) immediate and exact glucose measurement every 30 minutes, 2b) 1 hour delay in the exact measurement, 2c) 30 minutes delay and 5% white noise in the measurement. 38

Figure 2.3 : Glucose concentration measured by the FIA system every 30 minutes with 40 minutes time delay and controlled at 1mM by adaptive control during 10 days in a 19 L working volume bioreactor. 40

Figure 2.4 : Histogram of the glucose concentration of Figure 2.3. The mean value is 1.007 mM and the standard deviation 0.067 mM. 41

Figure 2.5 : (a) Glucose consumed by the cells, (b) glucose feeding rate F, (c) estimator $\hat{\theta}_S$, and (d) biomass concentration counted (Δ and dotted line) and estimated (-). The control was performent throughout the culture: low density, exponential phase, stationary phase. 42

Figure 2.6 : Glucose feeding flow rate F (—) and glucose consumed (---). The errors in glucose measurement induce oscillations in F. The control system is particularly sensitive to these errors at the beginning of the culture. 43

Figure 2.7 : Reaction of the controller to a pulse addition of glucose. The controller stopped the feeding and $\hat{\theta}_S$ converged within 8 hours. S decreased back to 1 mM in 20 hours, and thereafter was controlled at 1mM. 46

Figure 2.8. : Biomass concentration (Δ) and biomass estimator. The estimation is accurate up to $1.5x10^6$ Cells/mL 47

Figure 2.9 : Reaction to a -2^0C temperature shift at 68 hours. The cell metabolism slowed down. The estimator $\hat{\theta}_s$ dropped within 2 hours. This estimator provided on-line information of cell physiological state and therefore, can be used as indicator by an expert system. 49

Figure 2.10 : Comparison between a batch (open symbols) and a fed-batch (closed symbols) culture. (a) biomass (Δ,▲), (b) $Y_{S/X}$(,), and (c) $Y_{L/S}$ (O,●). Three phases appeared: (—) high glucose consumption, (⁻⁻) low glucose consumption, (---) glutamine limitation. 51

Figure 2.11 : Comparison between batch (open symbols) and fed-batch (closed symbols) culture. (a) $Y_{Gln/X}$ (,), and (b) $Y_{NH3/S}$ (O,●). Three phases appeared: (—) high glucose consumption, (⁻⁻) low glucose consumption, (---) glutamine limitation. 54

Figure 2.12 : Simplified glucose energetic pathway. Glucose flux is imposed by the cell glucose transporters. The capacity of oxidation in the TCA cycle is limited and glucose over flux is directed to glycolysis. 56

Figure 3.1 : Simulation du modèle I de croissance en cuvée avec une concentration de glucose initiale de 21 mM. Les symboles représentent les données expérimentales. . 72

Figure 3.2 : Simulation du modèle I de croissance en cuvée alimentée avec contrôle de glucose à 1 mM par un contrôleur adaptatif. Les symboles représentent les données expérimentales. 73

Figure 3.3 : Contrôle de l'oxygène dissous à 40% par le contrôleur adaptatif estimateur/observateur. Le kla_C est supposé connu ($1.1\ h^{-1}$) 76

Figure 3.4 : Contrôle de l'oxygène dissous à 40% par le contrôleur adaptatif modifié. Le kla_C est inconnu et n'est pas estimé. 78

Figure 3.5 : Contrôle de la concentration de glucose à 1 mM par le contrôleur adaptatif estimateur/observateur. 79

Figure 3.6 : Estimateur du taux spécifique de croissance μ. 80

Figure 3.7 : Estimateur du taux spécifique de glycolyse et du taux spécifique de respiration par la mesure de S, L, et X. 83
Figure 3.8 : Concentration d'insuline recombinante dans le milieu pour les expériences de cultures en cuvée et en cuvée alimentée. 92
Figure 3.9 : Simulation du modèle II de croissance en cuvée avec une concentration de glucose initiale de 21 mM. Les symboles représentent les données expérimentales. . 93
Figure 3.10 : Simulation du modèle II de croissance en cuvée alimentée avec contrôle de glucose à 1mM par un contrôleur adaptatif. Les symboles représentent les données expérimentales. 94
Figure 3.11 : Simulation du modèle II de croissance en cuvée alimentée avec contrôle de glucose proportionnel à l'OUR avec ρ=0.1. 100

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

Sigles :

293S	Lignée cellulaire HEK-293 cultivée en suspension
293SF	Lignée cellulaire HEK-293 cultivée en suspension en milieu sans sérum
ADN	Acide Désoxyribo-Nucléique
ARN	Acide Ribo-Nucléique
ATP	Adénosine triphosphate
cells	Cellules (mot anglais)
CO_2	Dioxyde de carbone
DO	Oxygène dissous
E1A-E1B	Gènes d'adénovirus
F.I.A.	Analyse pas injection de flux
FIX-MMI	Logiciel d'acquisition de données et de contrôle
Glc	Glucose
Gln	Glutamine
GLUTs	Famille de transporteurs de glucose (transport facilité)
GUR	Taux de consommation de glucose
HEK	Cellules de rein d'embryon humain
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance
HRI	Agitateur à ruban hélicoïdal
HSFM	Milieu sans sérum commercial
IGF-I	Hormone similaire à l'insuline
M.I.M.O.	Système à multiples entrées et sorties
$NaHCO_3$	Carbonate de sodium
NH_3	Ammoniac et, par abus, ion ammonium
O_2	Oxygène
OUR	Taux de consommation d'oxygène

P.I.	Contrôleur Proportionnel, Intégral
P.I.D.	Contrôleur Proportionnel, Intégral, Dérivatif
pH	Valeur opposée du logarithme de la concentration d'ions hydronium
pK_a	pH d'équilibre entre la forme acide et la forme basique d'un composé
SGLTs	Famille de transporteurs de glucose (transport actif)
TCA	Cycle de l'acide citrique

Symboles latins :

a	Paramètre de régression linéaire entre C_S et C [-]
A	Activité des activateurs du transport de glucose [-]
b	Paramètre de regression entre C_S et C[M]
C	Concentration d'oxygène dissous [M]
C^*	Concentration de référence d'oxygène dissous [M]
C_S	Concentration de saturation d'oxygène dissous [M]
D	Taux de dilution [h^{-1}]
F	Vecteur(scalaire) des taux d'alimentation [$L.h^{-1}$]
G	Concentration de dioxyde de carbone dissous [M]
G_S	Concentration de saturation de dioxyde de carbone dissous [M]
H_C	Constante de Henry de solubilité de l'oxygène [atm/M]
H_G	Constante de Henry de solubilité du dioxyde de carbone [atm/M]
k	Coefficient de rendement de consommation de glucose par cellule [µmol/10^6Cells]
K	Matrice des coefficients de rendement de réaction
k_*	Coefficients de rendement [µmol/10^6Cells]
k_d	Taux spécifique de mortalité [h^{-1}]
K_F	Constante de Monod de la croissance par glycolyse (Fermentation) [mol]
K_L	Constante d'inhibition de la croissance par le lactate [mol]
kla_C	Coefficients de transfert d'oxygène dissous [h^{-1}]

kla_G	Coefficients de transfert de dioxyde de carbone dissous [h^{-1}]
K_R	Constante de Monod de la croissance par la voie oxydative (Respiration) [mol]
K_T	Constante de Monod du transport du glucose par les cellules [mol]
L	Concentration de lactate [M]
M_{erreur}	Matrice d'erreur pour l'estimation des taux spécifiques de croissance [h^{-1}]
p	Puissance de la sigmoïde modélisant l'activité des activateurs du transport de glucose [-]
P(x)	Polynôme caractéristique
P_{O2}	Pression partielle d'oxygène [atm]
P_{O2}^*	Pression partielle d'oxygène de référence [atm]
Q	Vecteur des taux d'extraction
q_*	Taux spécifique de consommation ou production du composé * [$\mu mol/10^6 Cells/h$]
S	Concentration de glucose [M]
S^*	Concentration de référence de glucose [M]
S_{out}	Concentration de glucose dans le milieu [M]
T	Période de mesure de la concentration de glucose [h]
t	Temps [h]
t_m	Temps de transition entre les phases 1 et 2 de la culture [h]
V	Volume de milieu de culture dans le bioréacteur [L]
$V_{pertubation}$	Vecteur des perturbations de la dynamique des erreurs pour l'estimation des taux spécifiques de croissance
X	Concentration de cellules [10^6cells/mL]
y	Variable du contrôleur
y^*	Point de consigne de la variable du contrôleur

$Y_{Gln/X}$ Coefficient de rendement de glutamine par cellule [µmol/10^6cells]

$Y_{L/S}$ Coefficient de rendement de lactate par glucose [mol/mol]

$Y_{L/X}$ Coefficient de rendement de lactate par cellule [µmol/10^6cells]

$Y_{NH3/Gln}$ Coefficient de rendement d'ammoniac par glutamine [mol/mol]

$Y_{O2/S}$ Coefficient de rendement d'oxygène par glucose [mol/mol]

$Y_{O2/X}$ Coefficient de rendement d'oxygène par cellule [µmol/10^6cells]

$Y_{S/X}$ Coefficient de rendement de glucose par cellule [µmol/10^6cells]

Symboles Grecs :

α Facteur multiplicatif [-]

γ Déviation standard de l'estimateur discrétisé de glucose [M^2h^{-2}]

γ_1, γ_2 Paramètres de l'observateur pour l'estimation des taux spécifiques de croissance [M^{-2}]

γ_C Paramètre de l'estimateur d'oxygène dissous [M^{-2}]

γ_S Paramètre de l'estimateur de concentration cellulaire [M^{-2}]

γ_X Paramètre de l'estimateur de glucose [M^{-2}]

η_F Taux spécifique de glycolyse (Fermentation) [µmol/10^6Cells/h]

η_T Taux spécifique de transport de glucose [µmol/10^6Cells/h]

η_T^* Taux spécifique maximal de transport de glucose [µmol/10^6Cells/h]

φ Vecteur des taux de réaction

κ Pourcentage de contribution de la glycolyse à la croissance cellulaire [-]

λ_1, λ_2 Valeurs propres des matrices d'erreur [h^{-1}]

λ_3, λ_4 Valeurs propres des matrices d'erreur [h^{-1}]

λ_C Paramètre du contrôleur d'oxygène dissous (kla_C connu) [h^{-1}]

λ_C^2 Paramètre du contrôleur d'oxygène dissous (kla_C inconnu) [-]

λ_f Facteur d'oubli de l'estimateur discrétisé de glucose [-]

λ_S Paramètre du contrôleur de glucose [h^{-1}]

μ	Taux spécifique de croissance [h^{-1}]
μ_F	Taux specifique de glycolyse (Fermentation) [h^{-1}]
μ_F^*	Taux specifique maximal de glycolyse (Fermentation) [h^{-1}]
μ_R	Taux spécifique de réaction d'oxydation (Respiration) [h^{-1}]
μ_R^*	Taux spécifique maximal de réaction d'oxydation (Respiration) [h^{-1}]
θ_C	Estimateur pour le contrôle d'oxygène dissous (kla_C connu) [h^{-1}]
θ_C^2	Estimateur pour le contrôle d'oxygène dissous (kla_C inconnu) [M]
θ_S	Estimateur du contrôle de glucose [h^{-1}]
ρ	Pourcentage de glycolyse dans le métabolisme du glucose [-]
ω_1, ω_2	Paramètres de l'observateur pour l'estimation des taux spécifiques de croissance [h^{-1}]
ω_C	Paramètre de l'observateur d'oxygène dissous [h^{-1}]
ω_S	Paramètre de l'observateur de glucose [h^{-1}]
ω_X	Paramètre de l'observateur de concentration cellulaire [h^{-1}]
ξ	Vecteur des variables d'état

Indices et exposants :

$\hat{*}$	Valeur estimée de la variable *
$*_0$	Valeur initiale de la variable *
$*_t$	Valeur au temps t de la variable *

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : Programmation du contrôleur adaptatif. 114
Annexe 2 : Paramètres du modèle I 116
Annexe 3 : Observateur asymptotique. 118
Annexe 4 : Les transporteurs de glucose 120

INTRODUCTION

Le besoin de matériels biologiques (protéines, virus, biomasse) produits par les eucaryotes supérieurs se fait toujours plus pressant par l'industrie pharmaceutique et par les laboratoires de recherche en biotechnologies. Les fermentations microbiennes ne permettent pas de produire de nombreuses protéines dont l'activité biologique nécessite une maturation complexe (clivage, repliement, glycolysation). Ces protéines sont souvent utilisées pour le criblage moléculaire ou pour leur caractérisation tridimensionnelle. Les virus produits par les cellules animales sont des vecteurs pour les transferts génétiques en laboratoires ou en essais cliniques de thérapie génique. Depuis leur adaptations par Graham et al. (1977) les cellules HEK-293, cellules humaines de rein d'embryon, deviennent de plus en plus largement utilisées. Leur adaptation en milieu sans sérum (Côté et al. 1998) les privilégie pour des cultures à grande échelle. Des récepteurs membranaires et la protéine C sont couramment produits à l'échelle de réacteurs pilotes par les cellules 293. De plus, leur capacité à compléter les régions E1A-E1B des adénovirus recombinants, leur permet de produire des adénovirus recombinants utilisés en thérapie génique ou de produire des protéines de façon transitoire (Nadeau et al. 1995).

L'étude du métabolisme des cellules animales a d'abord été motivée par le fait que les concentrations cellulaires et les rendements de production des produits d'intérêt semblaient limités par l'accumulation de sous-produits inhibiteurs comme le lactate et l'ammoniac. De nombreuses observations rapportées dans la littérature montrent que le fait de contrôler la concentration de glucose dans le milieu à faible niveau permet de réduire la production de lactate par les cellules. Kurokawa et al. (1994) ont contrôlé la concentration de glucose à 5.5, 2.8 et 1.1 mM, et Ozturk et al. (1997) à 5mM.

Les techniques de culture des cellules animales sont encore nouvelles et le domaine est en pleine expansion. Ce mémoire a pour objectif de contribuer à l'optimisation des procédés de culture de cellules animales à grande échelle. La modélisation de la croissance

des cellules rend possible la définition de nouvelles stratégies de culture et la réalisation de contrôleurs pour appliquer ces stratégies. Le travail ici présenté a été réalisé en s'appuyant sur des données expérimentales obtenues en culture en bioréacteur avec les cellules HEK-293 adaptées en suspension et en milieu sans sérum. Les modèles et les interprétations offertes ne se limitent pas à cette seule lignée cellulaire. Nombre de concepts énoncés dans ce mémoire peuvent être généralisés à l'ensemble des lignées cellulaires mammifères.

Par une revue bibliographique, le premier chapitre présente d'abord les caractéristiques principales du métabolisme des cellules animales et la composition des milieux de culture est décrite. L'attention est portée sur les deux voies métaboliques les plus importantes, celles du glucose et celles de la glutamine. Les stratégies proposées par la littérature pour réduire la production de sous-produits toxiques (lactate, ammoniac) sont présentées. Par la suite, les bases de la modélisation de la croissance cellulaire sont exposées. Après une brève présentation des méthodes et appareillages de mesure de la concentration de glucose, les différentes stratégies de contrôle utilisées pour les systèmes biologiques sont passées en revue. Le deuxième chapitre est constitué d'une publication. Cet article a un double objectif. Premièrement, il présente la conception d'un contrôleur discrétisé de la concentration de glucose dans le milieu de culture en bioréacteur et l'évaluation de ses performances. La deuxième partie analyse le métabolisme du glucose et, secondairement, de la glutamine, ainsi que l'influence d'un contrôl à faible concentration. Ces interprétations sont conduites à la lumière des mécanismes de transport de glucose des cellules. La dernière partie de ce travail se concentre sur la modélisation du métabolisme du glucose. Un premier modèle identifiant la voie d'oxydation et la glycolyse est présenté. Nombre de contrôleurs adaptatifs et d'estimateurs de taux de réaction sont exposés en simulation sur ce modèle. Puis, pour mieux rendre compte des données expérimentales, au premier modèle est intégré le transport du glucose par les cellules. Enfin, dans un troisième temps du Chapitre 3, à la lumière des interprétations sur le métabolisme, une stratégie originale d'alimentation en glucose liée au taux de consommation d'oxygène est présentée et testée en simulation.

CHAPITRE I
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1. Les Cellules animales

I.1.1 Les cellules mammifères, des eucaryotes supérieurs

Le secteur biomédical est de plus en plus consommateur de protéines et de virus recombinants. Les systèmes microbiens permettent des productions à faibles coûts grâce à leurs taux de croissance rapides, leurs taux de production élevés, les hautes densités cellulaires atteintes, les grands volumes utilisés et les milieux de cultures peu onéreux. Mais on se heurte au dilemme de la qualité versus la quantité. Certaines protéines recombinantes de structures complexes produites par les systèmes microbiens n'ont pas l'activité biologique escomptée. Bien que ces cellules soient capables de produire toutes les séquences peptidiques, elles ne possèdent pas cette machinerie encore mal connue et propre aux eucaryotes supérieurs permettant la maturation complète des protéines. Ce traitement comporte des étapes de phosphorylation, de clivage, de repliement et de glycosylations complexes (primaire, secondaire ou tertiaire). Ces protéines sont souvent utilisées pour le criblage moléculaire de médicaments ou leurs caractérisations tridimensionnelles. Il est alors important d'obtenir des stocks à hauts degrés de pureté et d'activité biologique.

La production de virus recombinants humains devient un domaine important. De grandes quantités de virus sont nécessaires pour les transferts génétiques en laboratoire et pour les essais cliniques de thérapie génique. Le système d'expression Adénovirus-cellules HEK-293 est très populaire (voir Chapitre 2). Ici encore la qualité de la production est prépondérante: on s'intéresse aux particules (virus) actives par cellules et non pas seulement aux particules totales.

Pour augmenter la productivité des cellules animales, les ingénieurs des bioprocédés possèdent deux stratégies: augmenter le volume de production ou augmenter la densité cellulaire. Le travail à très grand volume (>200 L) entraîne des difficultés par limitations de transfert de masse et de maintien d'homogénéité à cause de la fragilité des cellules. Augmenter la densité cellulaire en conservant des taux spécifiques de production élevés demande l'optimisation de milieux de culture et oblige à développer des stratégies de contrôle de plus en plus précises et complexes. Contrôler la qualité de la production implique non seulement la maîtrise de l'environnement des cellules mais aussi le contrôle des paramètres physiologiques du métabolisme.

I.1.2 Milieux de culture

I.1.2.1 Milieu standard

Le milieu de culture, contrairement aux milieux utilisés pour les cultures microbiennes, est d'une composition riche et complexe. Les cellules ont besoin de plusieurs sources d'énergie: un hydrate de carbone (glucose, fructose ou galactose) et certains acides aminés (essentiellement la glutamine (Dalili 1989)). Les principales sources de carbone sont également les hydrates de carbone et les acides aminés. Certains acides aminés ne peuvent pas être synthétisés par la cellule; ils sont alors qualifiés d'acides aminés essentiels. Ce sont l'arginine, l'histidine, l'isoleucine, la leucine, la lysine, la méthionine, la phénylalanine, la thréonine, le tryptophane, et la valine (Voet et Voet 1995). D'autres acides aminés sont parfois également ajoutés pour faciliter la croissance (alanine, asparagine, aspartate, cystéine, glutamate, glutamine, glycine, proline, sérine, tyrosine). La glutamine, par contre, est particulièrement importante, car elle est le point de départ pour la synthèse des acides aminés non essentiels (Voet et Voet 1995). Des vitamines, des ions métalliques et des sels (Na, Cl, Ca, K, P) sont indispensables pour la croissance des cellules. L'osmolarité du milieu de culture doit être proche de l'osmolarité physiologique (250 à 350 mOsm). Les cellules ont besoin de dioxyde de carbone dissous

et d'oxygène dissous (DO) qui agit comme accepteur d'électrons. La DO est contrôlée entre 35 et 55% de la concentration de saturation avec l'air. Dans ce domaine, la DO n'influe pas sur le métabolisme des cellules (Tziampazis 1994). Le pH doit rester autour de 7. Le dioxyde de carbone sert ainsi de tampon, mais on ajoute parfois le tampon HEPES (pK_a=7.31 (Côté et al. 1997)).

Pour le cas des cultures en suspension, le milieu doit être pauvre en calcium pour éviter l'agrégation des cellules. Un surfactant, comme le Pluronic (Gibco), est également ajouté pour protéger les cellules contre les forces de cisaillement.

Du sérum animal est ajouté au milieu. La composition des sérums n'est pas définie, c'est un milieu complexe, riche en protéines. Les principaux éléments sont les facteurs de croissance, les hormones, les oligo-éléments, et les lipides. Le sérum est le composant le plus onéreux, sa composition varie d'un lot à un autre, et il peut être vecteur de contaminants comme les virus ou les prions (Côté et al. 1998). Il complique aussi les processus de purification, car il contient nombre de protéines. Depuis les cinq dernières années, de plus en plus de nouveaux milieux sans sérum sont développés pour palier à ces défauts.

I.1.2.2 Milieu sans sérum

Des milieux commerciaux sans sérum sont aujourd'hui sur le marché. On trouve par exemple le DMEM (Dulbecco) et le F12 (Ham) utilisés par Zhou et Hu (1995b) pour des hybridomes, ou le HSFM (Gibco, Grand Island, NY) choisi par Côté et al. (1998) pour les 293SF. Les compositions exactes de ces milieux ne sont pas divulguées pour des raisons de compétitivité commerciale. On y trouve en fait la même composition telle qu'énoncée précédemment pour les milieux classiques avec des compléments de vitamines, des ions divers, des lipides et des protéines pour remplacer le sérum (Glassy et al. 1988). Le milieu est alors parfaitement défini, ce qui permet une optimisation de la concentration des composés (et ainsi une réduction des coûts) et une bonne reproductibilité des lots.

Finalement le problème d'ajout d'extraits de source animale n'en est pas pour autant totalement résolu: on ajoute encore des protéines (insuline, transferrine) et des lipides (albumine). Leur production par des organismes inférieurs recombinants n'est pas toujours possible et augmente les coûts.

Pour travailler avec un milieu sans sérum, les cellules doivent être adaptées à ce nouveau milieu (Côté et al. 1998). L'opération est longue et difficile. Il n'est pas garanti pour toutes les lignées cellulaires que ces clones garderont le même taux spécifique de croissance, les mêmes taux spécifiques de production de protéines, ou pourront atteindre de hautes densités cellulaires. Côté et al. (1998) ont montré que la production d'adénovirus était possible en milieu sans sérum, mais elle a souligné la diminution de productivité due à la fragilité accrue des cellules en milieu sans sérum.

I.1.2.3 Optimisation du milieu

Un grand effort d'optimisation de la composition des milieux a été accompli depuis les dix dernières années (Jayme 1991). En 'équilibrant' les quantités relatives des acides aminés, les densités cellulaires maximales peuvent être augmentées de façon importante. Jo et al. (1990) ont ainsi atteint une densité de $10x10^6$cells/mL en culture en cuvée. Xie et Wang (1994a) ont proposé que la stoechiométrie de la composition relative des acides aminés et du glucose soit calquée sur la composition cellulaire (protéines, ARN, ADN, lipides) et sur le métabolisme énergétique. Les risques de manques de nutriments et l'accumulation de sous-produits, comme l'alanine, le lactate ou l'ammoniac, en sont réduits de façon importante. En cuvée alimentée, grâce à un nouveau milieu équilibré, Xie et Wang (1994b) ont pu multiplier la densité cellulaire maximale par 5 et la production d'anticorps monoclonaux par 10. Malheureusement, à cause de la variabilité entre les différentes lignées cellulaires, il faudrait optimiser le milieu de culture pour chaque lignée.

I.1.3 Métabolisme du glucose et de la glutamine

La figure 1.1 illustre le degré de complexité des voies métaboliques dans les cellules animales. Pourtant le diagramme est grandement simplifié. Par exemple la réaction notée F1 du glucose en pyruvate implique 10 composés intermédiaires et 12 enzymes (Voet et Voet 1995). L'interaction entre les voies du glucose et de la glutamine est forte (Meulan et al. 1990). De plus dans un environnement in vitro et avec des cellules à taux de division élevés, le métabolisme se trouve déréglé.

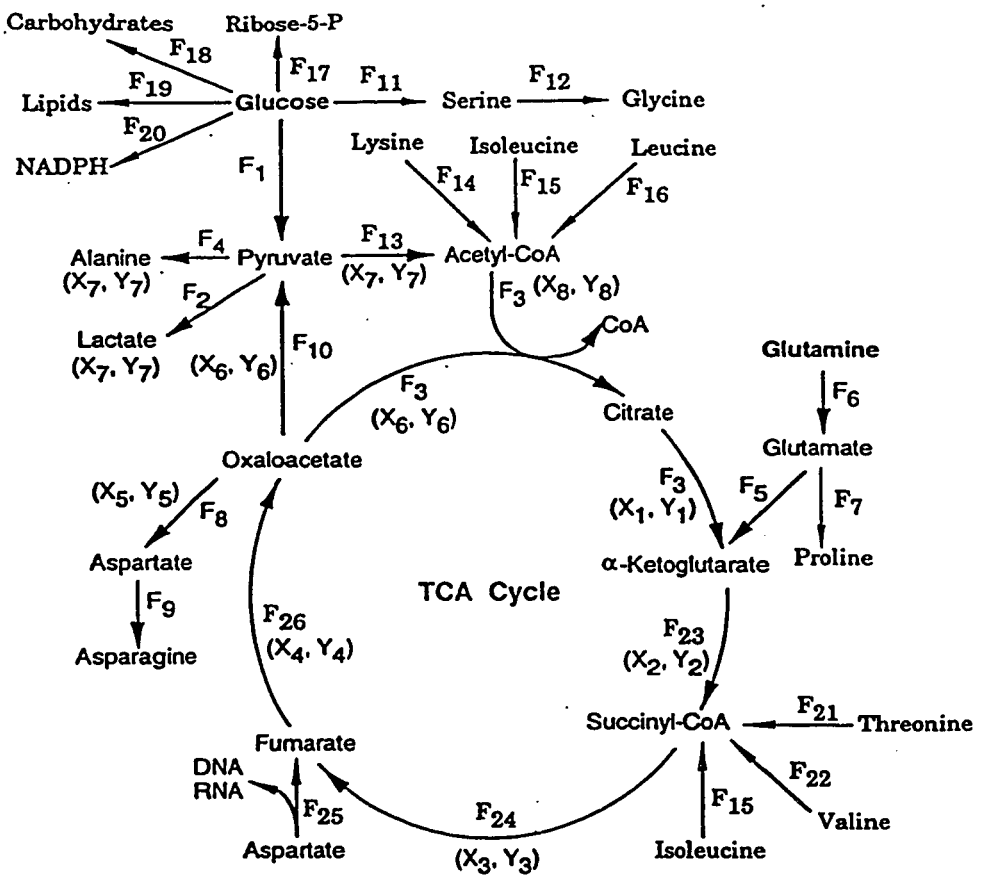


Figure 1.1 : Diagramme simplifié du réseau de réactions impliquant le glucose et la glutamine d'après Xie et Wang (1996).

I.1.3.1 Le glucose

La membrane plasmique de la cellule étant imperméable au glucose, la cellule possède de nombreux transporteurs passifs de glucose et, pour certaines lignée cellulaires, des transporteurs actifs. Les transporteurs passifs fonctionnent selon un mécanisme de diffusion facilitée, et certains types de transporteurs ont une constante d'affinité pouvant atteindre 0.2 mM (Wheeler 1985).

Deux voies énergétiques principales sont importantes pour le métabolisme du glucose: la glycolyse (réactions F1, F2 sur la Figure1.1) et la voie oxydative (F1, F13, F3, F23, F24 et F26). Les premières étapes jusqu'à la formation du pyruvate sont communes (Xie et Wang 1996a). Puis dans les conditions courantes, par la voie de glycolyse (ou fermentation) 80% du pyruvate est transformé en lactate[1] et 20% entre dans le cycle de l'acide citrique (TCA) pour être oxydé en dioxyde de carbone (oxydation ou respiration). Certaines observations indiquent même que 96% du glucose peut être orienté vers la glycolyse (Fitzpatrick et al. 1993, Petch et Butler 1994). La première voie est énergétiquement peu efficace (2 ATP produits par glucose) et produit un déchet gênant, le lactate. La deuxième voie produit théoriquement 36 ATP par glucose et consomme de l'oxygène. L'indicateur généralement utilisé pour quantifier l'équilibre relatif des deux voies est le coefficient de rendement de lactate produit par glucose consommé, $Y_{L/S}$. Par conservation du carbone, une mole de glucose produit 2 moles de lactate par la glycolyse. Réduire la glycolyse signifie donc diminuer $Y_{L/S}$. On rapporte des valeurs variant de 2 à 0.8 (Garnier et al. 1994, Nadeau et al. 1996, Kurokawa et al. 1994).

Une forte glycolyse est en général constatée dans les cellules à taux de division élevé. Pourtant son rôle n'est pas encore compris. Newsholme et al. (1985) la justifient par le fait qu'une importante glycolyse augmente la sensibilité à la régulation du flux vers le cycle de l'acide citrique ('theory of quantitative principle of control'). Schneider et al. (1996) rapportent qu'une forte glycolyse pourrait augmenter la concentration des

---

[1] En réalité en acide lactique, on emploie lactate par abus de langage.

précurseurs de macromolécules de synthèse. Schneider néanmoins rappelle qu'il existe des cellules à forts taux de division qui produisent peu de lactate.

I.1.3.2 La glutamine

Comme indiqué sur la figure 1.1, la glutamine est transformée en glutamate (F6) par la libération d'un ion ammonium[2] NH_4^+. Ensuite le glutamate peut soit entrer dans le cycle de l'acide citrique (TCA, par F5) libérant une seconde molécule d'ammoniac, soit, par des réactions de transamination, produire des acides aminés non essentiels (F7). Xie et Wang (1996a) et Fitzpatrick et al. (1993) ont évalué à 35% la part de glutamine entrant dans le cycle de l'acide citrique pour la production d'énergie. Le métabolisme de la glutamine est appelé glutaminolyse. Jusqu'à 10% (Petch 1994) de la glutamine serait même transformé en lactate. Le coefficient de rendement $Y_{NH3/Gln}$ de production d'ammoniac par glutamine consommée est utilisé comme indicateur physiologique. Les bilans sur l'azote N sont difficiles (Xie et Wang 1996), car il est possible qu'une partie de l'ammoniac s'évapore avec les gaz de sortie du bioréacteur. On rapporte des valeurs de $Y_{NH3/Gln}$ variant de 1 (Glacken et al. 1986) à 0.3 (Xie et Wang 1996). D'autre part la glutamine se décompose spontanément mais lentement en glutamate dans le milieu (Ozturk et al. 1990), ce qui peut éventuellement fausser les bilans. Des mesures de taux de transport de glutamine suggèrent que le transport régule le métabolisme de la glutamine (Jenkins et al. 1992, Fitzpatrick et al. 1993).

I.1.4 L'effet inhibiteur du lactate et de l'ammoniac

La problématique liée aux voies métaboliques de la glycolyse et de la glutaminolyse est la production de déchets (lactate et ammoniac) qui peuvent avoir des effets inhibiteurs. Il faut distinguer une inhibition de la croissance cellulaire et une inhibition de la production de la protéine d'intérêt. Il est important tout de même de noter

---

[2] On ne distinguera pas ici l'ammoniac et l'ion ammonium.

que certains auteurs (Jo et al. 1990) remettent en cause les effets inhibiteurs du lactate et de l'ammoniac aux concentrations habituellement rapportées.

I.1.4.1 Le lactate

Une inhibition de la croissance cellulaire a été largement rapportée pour des concentrations de lactate supérieures à 20-30 mM (Glacken et al. 1986, Omasa et al. 1992 et Nadeau et al. 1996). Certains ont également constaté une baisse de productivité de la production de protéine. Mais Nadeau et al. (1996) ont démontré que ce n'était pas l'action directe du lactate sur les cellules 293S qui était responsable de l'inhibition, mais plutôt l'augmentation d'osmolarité liée à la production de lactate par les cellules. En effet, dans le but de contrôler le pH, l'ajout de base est nécessaire pour neutraliser l'acide lactique produit. Ainsi l'augmentation de l'osmolarité est le corollaire de la glycolyse.

I.1.4.2 L'ammoniac

L'effet d'inhibition de l'ammoniac sur la croissance cellulaire a été observé pour de nombreuses lignées cellulaires: Glacken et al. (1986), McQueen et al. (1989), Ljunggren et Häggström (1992), Gaertner et Dhurjati (1993), Newland et al. (1994) et Schneider et al. (1996). Les concentrations inhibitrices rapportées varient de 4 à 10 mM. D'après Schneider et al. (1996), l'ammoniac semble agir comme inhibiteur sous la forme NH_3 (1% de l'ammoniac total à pH 7). L'ammoniac serait un compétiteur pour les cations (ions métalliques). Selon Ryll et al. (1994) l'ammoniac inhiberait la production de certaines enzymes.

I.1.5 Stratégies de réduction des consommations de glucose et de glutamine

I.1.5.1 Considérations énergétiques

Bien que la glycolyse ne produise que 2 moles d'ATP par mole de glucose, la réaction peut contribuer jusqu'à 40% de la production d'ATP (Xie et Wang 1996b).

L'apport énergétique de la glutaminolyse peut atteindre 30% (Xie et Wang 1996b). Diminuer les taux de glycolyse et de glutaminolyse, c'est aussi réduire la production d'énergie de la cellule. On constate que cette baisse de production énergétique n'est pas compensée par une augmentation du taux de respiration (Xie et Wang 1996b, chapitre 2) qui reste pratiquement constant. Le taux spécifique de croissance ne semble pas être affecté par cette diminution énergétique (Newland et al. 1990, Chapitre 2). Newland et al. (1990) suggèrent que la croissance cellulaire n'est pas limitée par une demande énergétique mais par les taux de réactions de synthèse. Cette énigme de 'surplus d'énergie' ('energy surplus') est également constatée dans le monde microbien, comme le rapportent Tsai et Lee (1990) et Zeng et Deckwer (1995).

I.1.5.2 Contrôle à basse concentration

Les méthodes généralement utilisées pour réduire la glycolyse et la glutaminolyse sont le contrôle de la concentration de glucose et/ou de glutamine à de faibles niveaux en cuvée alimentée ou en perfusion.

Glacken et al. (1986) et Kurokawa et al. (1994) ont contrôlé la concentration de glucose à des niveaux variant de 5.5 mM à 1.1 mM en cuvée alimentée. La production de lactate a pu ainsi être réduite d'un facteur 3 et la production d'anticorps augmentée. En perfusion, Ozturk et al. (1997) ont contrôlé le glucose à 5 mM et le lactate à 18 mM augmentant ainsi la concentration cellulaire de 2 à 10 millions de cellules par millilitre. En expérience de cuvée alimentée par croissance limitée en glucose, Ljunggren et Häggström (1994) obtenaient des taux de production de lactate bien plus faibles qu'en cuvée. En culture en continu, Hiller et al. (1991) ont montré que baisser le taux de dilution diminuait la concentration de glucose dans le milieu et réduisait le coefficient de rendement de production de lactate par glucose consommé. Miller et al. (1989a) ont observé que des impulsions de glucose (concentration variant de 0.1 mM à 6 mM) multipliaient le taux de glycolyse jusqu'à 200 fois.

Des expériences similaires de cuvées alimentées en glutamine réalisées par Glacken et al. (1986), Kurokawa et al. (1994), et Ljunggren et Häggström (1992) ont démontré

une baisse de la consommation de glutamine et une diminution de $Y_{NH3/Gln}$ par le contrôle de la concentration de glutamine jusqu'à 1mM. Une impulsion de glutamine (concentration variant de 0.2 mM à 3 mM) augmente de façon significative le taux de consommation de glutamine d'après Miller et al. (1989b).

Le contrôle de la concentration de glucose ou de glutamine à faible niveau justifie le développement de contrôleurs performants et robustes pour éviter aux cellules toute privation en nutriments.

I.1.5.3 Rétro-inhibition de la glycolyse par le lactate

Gaertner et Dhurjati (1993) font état d'une rétro-inhibition de la glycolyse par le lactate. Une concentration élevée de lactate en début de culture avec un pH de 7 et une osmolarité de 320 mOsm seraient alors des conditions efficaces pour réduire la glycolyse. Mais cette hypothèse semble isolée dans la littérature et de plus, elle est contredite par la thèse de Miller (1987) rapportée par Zeng et Deckwer (1995b).

McQueen et al. (1989) ont fait état qu'une diminution de pH (jusqu'à 6.8) dans le milieu de culture réduisait la demande en glucose par une baisse de la glycolyse sans affecter de façon importante le taux spécifique de croissance.

I.1.5.4 Milieu sans insuline

L'insuline (additif au milieu de culture) est une hormone qui active le transport du glucose dans la cellule. Zhou et Hu (1995b) ont montré qu'un milieu sans insuline réduit la consommation spécifique de glucose des hybridomes par deux sans modifier le taux spécifique de croissance. Malheureusement cette méthode ne peut pas s'appliquer à toutes les lignées cellulaires, car la croissance de certaines lignées requiert la présence d'insuline dans le milieu.

I.1.5.5 Génie métabolique

Le génie métabolique utilise des techniques permettant de modifier directement le métabolisme en changeant les caractéristiques génétiques. Par exemple, si on a identifié un gène étranger susceptible de résoudre un problème posé, on peut introduire par transfection ce gène dans la cellule et l'intégrer au génome. On donne ainsi aux cellules une nouvelle propriété. Hunt et al. (1997) ont transfecté le gène d'une hormone équivalente à l'insuline, l'IGF-I (insuline-like, growth factor I), pour permettre aux cellules de croître dans un milieu sans insuline. L'IGF-I est alors auto-régulée et sa concentration est mieux adaptée à la concentration cellulaire. Il a été également rapporté qu'une transfection du gène de la glutamine synthétase permet d'utiliser un milieu sans glutamine. De façon symétrique, on peut imaginer que les outils du génie génétique pourraient permettre 'd'effacer' ou de faire sous exprimer un gène précis (on peut penser à la lactate déshydrogénase).

I.2. Modélisation de la culture de cellules animales

I.2.1 Généralités

I.2.1.1 Complexité de la modélisation

Les systèmes biologiques de cellules animales sont complexes. Des milliers de réactions simultanées impliquent des milliers de produits. Le degré des équations serait trop élevé pour des calculs par ordinateurs. De plus les paramètres souvent méconnus ne sont pas constants et les cellules semblent posséder plusieurs états stationnaires. Un modèle supporte en général une seule lignée cellulaire et son application à d'autres lignées échoue.

On classe les modèles en deux catégories: structurés et non-structurés. Les modèles structurés considèrent certaines des réactions intermédiaires dans la cellule. Ces réactions sont souvent regroupées en familles: Barford et al. (1992) segmentent le

métabolisme en groupements autour d'un composé principal (glutamine, aspartate, sérine, pyruvate, phénylalanine et histidine). A titre d'exemple, le modèle de Xie et Wang (1996a) comporte 26 réactions. Les modèles non-structurés, plus populaires car plus accessibles, ne considèrent que ce qui entre et sort de la cellule (principe de la boîte noire). En fait, en général, les concentrations des produits dans le milieu peuvent être bien plus aisément mesurées que celles des produits intracellulaires. La plupart des modèles supposent une population homogène de cellules. Des modèles ségrégués considèrent plusieurs types de population. Cela devient important, par exemple, dans le cas de la formations d'agrégats (Teixeira et al. 1994) ou d'un modèle de cinétique d'infection par un virus.

Dans les modèles non-structurés on retrouve partiellement, comme variables: la biomasse, les sources énergétiques (glucose, glutamine, acide aminés, oxygène), les produits formés (lactate, ammoniac, protéine d'intérêt, dioxyde de carbone); comme réactions: la croissance et la mortalité cellulaires, les productions et consommations des produits. Les facteurs déterminants qui caractérisent les modèles sont les expressions des coefficients de rendement et des taux de réactions. Ces expressions sont basées sur des bilans de masse et des observations expérimentales.

I.2.1.2 Utilité de la modélisation

Les modèles facilitent la compréhension d'un système. Ils permettent des simulations qui sont indispensables à la réalisation de contrôleurs. Les temps et les coûts de développement en sont considérablement réduits. Certains modèles sont utilisés pour définir des stratégies d'optimisation. De Tremblay et al. (1992) définissent ainsi une stratégie d'alimentation en culture en cuvée alimentée. Malheureusement, beaucoup d'algorithmes d'estimation et de contrôle développés sont uniquement validés par des simulations sur des modèles sans courir la chance d'être appliqués en culture. Cela s'explique en partie par les problèmes de coûts de réalisation et les séparations d'expertises entre les personnes du contrôle (ingénieurs) et les personnes qui réalisent les cultures (biologistes).

Il reste à remarquer le faible niveau prédictif des modèles actuels pour différentes conditions de cultures. Ryszcuk et Emborg (1997) évaluent une stratégie d'optimisation pour des hybridomes en rapportant le modèle de Batt et Kompala (1989) et le modèle de Nielsen (1995). Les deux modèles réagissent différemment et les taux de production de lactate et d'ammoniac ne sont plus comparables.

I.2.2 Méthodologie

La forte majorité des modèles est fondée sur des équations de bilan (masse ou énergie) s'énonçant ainsi:

(1.1) Variation = génération - consommation + apport - disparition

A titre d'exemple:

(1.2) $dX/dt = \mu X - k_d X - DX$

(1.3) $dS/dt = - k\mu X + DS_{in} - DS$

La première étape est l'identification des composés chimiques clés représentatifs du système. Ensuite il faut écrire les équations de réactions entre ces composés (Chotteau et al. 1995). Par bilans de masse, on peut établir des relations entre les différents coefficients de réaction. Le choix des formulations mathématiques des taux de réactions est critique. Elles sont empiriques et doivent refléter les données expérimentales. Il faut également définir les concentrations initiales de tous les composés. Finalement, le modèle doit être simulé sur ordinateur et les résultats doivent être comparés aux données expérimentales pour valider le modèle.

De nouveaux types de modèles sont depuis peu développés (Tziampazis et Samdanis 1994). On peut entre autre sommairement citer les réseaux neuronaux (qui demandent une grande quantité de données) et les fractales.

I.2.3 Limitations par les mesures en ligne

De nombreuses variables des modèles ne peuvent pas être déterminées en ligne dans la culture. Les biocapteurs ne sont pas assez performants. Même en différé, il est difficile de mesurer les concentrations de composés chimiques intracellulaires: les périodes d'échantillonnages sont longues et nombre de produits sont instables. Ces problèmes peuvent être partiellement compensés par l'utilisation de 'soft sensors' ou capteurs logiciels (Tziampazis et al. 1994) comme les observateurs d'état et les estimateurs. Cependant, ces outils présupposent une modélisation du système.

I.2.4 Exemples de modélisation

Le modèle de Xie et Wang (1996a) est un modèle structuré comportant 26 réactions présentées à la figure 1.1. Les taux de réactions sont recalculés pour chaque expérience. Le modèle permet de décrire les bilans d'énergie (Xie et Wang 1996b) en termes de production d'ATP. Ce modèle illustre bien la problématique du lactate. Le tableau 1.1 résume les équilibres de masse et énergétiques de la glycolyse en cultures à haute et à basse concentration de glucose.

Tableau 1.1 : Réduction de la glycolyse par une faible concentration de glucose dans le milieu de culture basé sur le modèle Xie et Wang (1996a).

	Culture avec glucose	
	Haute concentration	Basse concentration
Fraction de glucose transformée en lactate	81%	52%
Part énergétique de la glycolyse	41%	27%

Le modèle de Zeng et Deckwer (1995a) est un modèle non-structuré. Il est centré sur la consommation de glucose et de glutamine. L'originalité du modèle repose sur la formulation des taux spécifiques de réaction de glucose (q_{Glc}) et de glutamine (q_{Gln}) en trois termes:

$$(1.4) \quad q_{Glc} = q^{*}_{Glc} + \Delta q^{Glc}_{Glc} + \Delta q^{Gln}_{Glc}$$

$$(1.5) \quad q_{Gln} = q^{*}_{Gln} + \Delta q^{Glc}_{Gln} + \Delta q^{Gln}_{Gln}$$

Le premiers termes q_{Glc}^{*} et q_{Gln}^{*} représentent les taux spécifiques de consommation sous limitation de glucose et de glutamine. Ils sont fonction de la maintenance et de la croissance cellulaire. Les autres termes Δq^{i}_{j} sont les taux spécifiques de gaspillage ou d'épargne de glucose et de glutamine dus aux excès de glucose et de glutamine. Zeng et Deckwer (1995a) modélisent ainsi l'influence de la concentration de glucose et de glutamine sur la glycolyse. Il montre aussi qu'une haute concentration de glutamine peut inhiber ou activer la consommation de glucose dépendant des conditions de cultures, tandis que le niveau de glucose ne semble pas influencer le taux de consommation de glutamine.

I.3. Méthodes de mesure de glucose

Il existe deux méthodes particulièrement utilisées pour la mesure de la concentration de glucose dans le milieu de culture.

I.3.1 Mesure par chromatographie liquide

Il s'agit d'une méthode couramment appelée HPLC (High Performance Liquid Chromatography). Un volume précis de milieu est injecté à haute pression dans une colonne de séparation. Cette colonne possède des sites qui ont un affinité pour le glucose. Le glucose se fixe ainsi sur ces sites. On injecte alors un éluant qui modifie les propriétés d'affinité de la colonne et libère le glucose à un temps défini (temps de rétention) caractéristique du glucose. Un détecteur (conductimétrie ou densité optique) réagit au

passage du glucose. Le signal obtenu est un pic donc l'intégration est proportionnelle à la concentration de glucose. Male et al. (1997a) décrivent le sytème Dionex avec la colonne CarboDac Pal également utilisé pour les mesures de glucose rapportées au chapitre 2. Il est ainsi possible de mesurer le glucose jusqu'à de très faibles concentrations (<0.01 mM) avec une erreur de ±5 à 10% suivant les sytèmes utilisés.

Cette méthode nécessite un appareillage trés onéreux et elle est longue à mettre en oeuvre (chimie, courbe de calibration).

I.3.2 Mesure enzymatique

Xie et Wang (1994a) et Kyung et al. (1994) ont utilisé le kit enzymatique de la compagnie Sigma (USA). Le système de mesure développé par Male et al. (1997a) et décrit au chapitre 2, utilise également la méthode enzymatique. Le Biolyser (Kodak, USA) est un appareil qui permet de mesurer le glucose de 1 à 25 mM en 5 minutes de manière totalement automatisée. Yellow Spring instruments (OH, USA) vend également un analyseur à méthode enzymatique de meilleure sensibilité utilisé par Zhou et Hu (1994) et Ozturk et al. (1997). Le principe est l'oxydation du glucose grâce à une combinaison d'enzymes biologiques: l'hexokinase, la glucose-6-phosphate déshydrogénase et parfois la glucose oxydase. L'accepteur d'électron ou oxydant de la réaction peut être l'oxygène ou un composé ajouté au milieu comme le DMFe (Male et al. 1997a). Cette réaction provoque une variation de la concentration de l'oxydant qui induit un changement de potentiel que l'on peut mesurer.

Cette méthode est en général moins précise que la méthode par chromatographie, mais elle est bien plus rapide et plus économique à réaliser.

I.3.3 Mesure en ligne

I.3.3.1 Extraction du filtrat

Il n'existe pas de biocapteurs fiables pour la mesure du glucose dans le bioréacteur essentiellement pour des raisons de stérilisation à haute température. Il faut donc extraire un filtrat du bioréacteur pour l'injecter dans le système de mesure. Ozturk et al. (1997) et Male et al. (1997a) utilisent un filtre en céramique tangentiel dans une boucle de recirculation. Les caractéristiques de cette boucle sont discutées au chapitre 2. Kurokawa et al. (1994) utilisent un simple filtre métallique directement plongé dans le bioréacteur et une pompe pour en extraire le filtrat. Quelle que soit la méthode employée, deux qualités sont prépondérantes: que l'échantillon ainsi obtenu soit représentatif du bioréacteur et que le système n'introduise pas de contamination.

I.3.3.2 Fréquence et gamme de mesure

Pour un système de mesure en ligne, il est important que la période de mesure soit inférieure à la constante de temps du système. Le domaine de mesure doit également recouvrir la concentration de glucose dans le milieu et la précision de la mesure doit être suffisante. Les deux méthodes de mesure de glucose présentées précédemment ont été utilisées pour réaliser des mesures en ligne de concentration de glucose. Kurokawa et al. (1994) mesurait la concentration de glucose aux 2 heures par HPLC. Male et al. (1997a) (et Chapitre 2) mesuraient la concentration de glucose toutes les 30 minutes par le FIA et Ozturk et al. (1997) toutes les heures avec un analyseur Yellow Spring.

I.4. Contrôleurs de systèmes biologiques

L'environnement des cellules animales doit être finement contrôlé. Ces cellules sont extraites d'un organisme vivant extrêmement bien régulé. In vitro, on ne peut manipuler qu'une infime partie de ces variables. Le domaine de tolérance de ces variables peut être très réduit, ce qui exige une bonne performance des contrôleurs. Par exemple la

température doit être finement contrôlée à 37°C ±0.1 et le pH entre 6.9 et 7.2 ±0.1 dépendant des lignées cellulaires. Par ailleurs, les systèmes biologiques sont hautement non-linéaires et les paramètres dépendent du temps. Il semble exister plusieurs états physiologiques de fonctionnement à cause du caractère adaptatif des cellules à leur environnement. De par leur grande complexité, la modélisation de ces systèmes est une tâche très difficile. De plus, comme rappelé précédemment, la restriction des mesures à cause des capteurs biologiques est une sérieuse limitation en contrôle. En contre-partie, les temps de réponse des systèmes biologiques sont longs (jusqu'à plusieurs heures) ce qui permet de corriger les erreurs.

I.4.1 Contrôle en boucle ouverte

Ces stratégies sont souvent appliquées sur les systèmes microbiens (Chim-Anage et al. 1990 et 1991) en cuvée alimentée pour suivre une trajectoire de croissance optimale. Mais ce type de contrôle suppose une très bonne connaissance du système (modélisation) et la possibilité de définir une stratégie d'optimisation. Takamatsu et al. (1985) a défini une commande d'alimentation optimale pour la levure de boulanger et De Tremblay et al. (1992) pour des hybridomes, mais ce type de contrôle reste dans bien des cas à l'étape de simulation et est rarement validé par l'expérience.

I.4.2 Contrôle en boucle fermée

Cette stratégie de contrôle est la plus largement répandue essentiellement de par ses propriétés de stabilisation. Le 'Feedback Control' (contrôle par rétroaction) est la plus populaire. Le 'Feedforward Control' (commande par anticipation) exige une bonne modélisation du système et reste peu employé (O'Connor 1991). Les contrôleurs ont en général une seule entrée et une seule sortie. Des contrôleurs M.I.M.O. (Multiple Input,

Multiple Output)[3] sont tout de même parfois utilisés par exemple dans le cas de l'aération du bioréacteur (bullage et agitation). Aucun travail impliquant un contrôleur M.I.M.O. n'a cependant été rapporté quant à une stratégie d'alimentation en nutriments tels que le glucose et la glutamine. Oegglerli et al. (1995) proposent une modélisation linéare à coefficients constants de la dynamique d'oxygène dissous ($dX/dt = AX + bU$, Segorg et al. (1989)) en définissant le taux de consommation d'oxygène comme une perturbation, mais ce type d'approximation et de simple modélisation donne de bien faibles résultats.

I.4.2.1 P.I.D.

La commande du contrôleur Proportionnel Intégral Dérivatif (P.I.D.) (Seborg et al. 1989) comprend trois termes. Le terme proportionnel est une action directement proportionnelle à l'écart (erreur) par rapport au point de consigne. Il est très sensible aux erreurs de mesure et aux perturbations. De plus, il subsiste un biais (offset) pour une culture en cuvée alimentée. Le terme intégral intègre le décalage par rapport au point de consigne. Si le décalage perdure, il faut renforcer l'action du contrôleur. En général, les bruits de mesure (positifs et négatifs) se compensent par intégration ce qui explique l'importance de ce terme pour la stabilisation du système. Le terme dérivatif est proportionnel à la vitesse de déviation par rapport au point de consigne. Très sensible au bruit, ce terme est souvent omis (contrôleur P.I.).

Un contrôleur P.I.D. est simple d'utilisation, fiable et largement répandu dans l'industrie. Ce contrôleur est linéaire et n'est performant que dans un certain domaine linéarisé du système. Des contrôleurs P.I.D. sont souvent utilisés pour contrôler des caractéristiques physiques (Nadeau et al. 1996) faiblement dépendant de l'état de la culture (pH par ajout de base et DO par sélection de la pression partielle d'oxygène, température par résistance électrique). Du fait que les systèmes biologiques sont fortement non-linéaires, son application reste limitée. Cependant, Dairaku et al. (1981) avaient utilisé un contrôle P.I.D. pour maintenir la concentration d'éthanol constante par la

---

[3] Entrées multiples, sorties multiples.

détermination du taux d'alimentation en glucose pour une culture de levures. Mais, pour remédier aux limites linéaires inhérentes au contrôleur P.I.D., en 1986 Dairaku et al. ont ajouté un autoréglage (auto-tuning) des paramètres du contrôleur. Cette méthode suppose malgré tout l'élaboration d'une stratégie d'autoréglage (donc de nombreux tests) et implique l'intervention d'autres mesures (dans ce cas la biomasse). De Tremblay et al. (1993) ont, grâce à un simple P.I., contrôlé le taux spécifique de croissance d'hybridomes mais une méthode élaborée d'estimation en ligne du taux spécifique de croissance supportait ce contrôleur.

I.4.2.2 Contrôle adaptatif

Le livre de Bastin et Dochain (1990) est utilisé comme référence principale pour décrire les principes du contrôle adaptatif pour les systèmes biologiques. La méthodologie adaptative requiert un modèle dynamique simple du système biologique. En général on restreint le choix des variables d'état à celles que l'on veut mesurer, estimer ou contrôler. A partir de ces schémas réactionnels, on écrit les équations différentielles (comme présentées ci-dessus) qui régissent les dynamiques des variables. On obtient un modèle dynamique dont la forme générale est:

$$(1.6)\quad \frac{d\xi(t)}{dt} = K\varphi(\xi,t) - D\xi - Q(\xi) + F(t)$$

avec: ξ le vecteur des variables d'état

K la matrice des coefficients de rendement de réaction

φ le vecteur des taux de réaction

D le vecteur des taux de dilution

Q le vecteur des taux d'extraction

F le vecteur des taux d'alimentation

Dans bien des cas φ est inconnu ou partiellement connu. La matrice des coefficients de rendement K est parfois connue si un grand travail de modélisation du système biologique

a été antérieurement réalisé. Un exemple de cet établissement d'équations dynamiques sera présenté au Chapitre 2.

Les deux piliers du contrôle adaptatif sont 'l'observation' des variables d'état et 'l'estimation' des taux de réaction. L'observation consiste à reconstruire une variable d'état dynamique qui converge vers la valeur réelle. Une mesure partielle du vecteur d'état peut permettre l'estimation d'autres variables d'état (propriété d'observabilité). Un exemple de construction d'observateur asymptotique sera donné au chapitre 3. L'estimation permet d'évaluer certains taux de réaction par la mesure partielle du vecteur d'état. Les chapitres 2 et 3 développent des estimateurs de taux de consommation spécifiques de glucose et d'oxygène et de taux spécifiques de croissance. Trois types d'estimateurs sont présentés: les estimateurs directs (design de Lyapunov), les estimateurs indirects (combinant un observateur) et les estimateurs discrétisés (méthode des moindres carrés).

Connaissant la dynamique d'une variable d'état et son(ses) taux de réaction associé(s), un contrôleur peut être utilisé pour contrôler cette variable. On peut alors recourir au 'contrôle linéarisant'. Ce type de contrôle est réalisé par la sélection d'une dynamique linéaire entre la variable d'état de sortie y(t) et son point de consigne (entrée) $y^*(t)$. Par exemple une dynamique du premier ordre sera:

$$(1.7)\quad \frac{d\left[y^*(t)-y(t)\right]}{dt}+\lambda\left[y^*(t)-y(t)\right]=0$$

Cette équation, associée à l'équation de la dynamique de y(t), définit alors la loi de commande.

De nombreux estimateurs et contrôleurs adaptatifs ont été développés ces dernières années pour des systèmes biologiques comme les levures ou les bactéries. A titre d'exemple, Chul et al. (1991) ont utilisé un contrôleur adaptatif incluant la dynamique de la sonde à oxygène pour contrôler l'oxygène dissous. Pomerleau et Perrier (1990 et 1992)

ont défini des estimateurs de taux de réaction chez la levure de boulanger. Gudi et al. (1994 et 1997) ont réalisé l'observation de toutes les variables de la culture de Streptomycine par la mesure du taux de consommation de CO_2 en ligne et de la concentration de la biomasse et du glucose avec retard.

Une autre méthode d'estimation des taux de réaction est l'utilisation des filtres de Kalman. Shimizu et Takamatsu (1989) et Shimizu et al. (1990) ont comparé l'estimation du taux de croissance spécifique par les deux méthodes.

Le point faible immédiat de la méthodologie du contrôle adaptatif est que celle-ci ne définit pas une stratégie d'optimisation. Van Impe et al. (1994) et Van Impe et Bastin (1995) proposent l'utilisation du contrôle optimal pour définir une trajectoire optimale bien que cette dernière soit irréalisable à cause des imperfections du modèle. Grâce au contrôle heuristique on peut trouver des trajectoires sous-optimales que l'on peut ensuite atteindre par un contrôleur adaptatif.

Le contrôle adaptatif est particulièrement bien adapté aux système biologiques non linéaires et dépendant du temps. Il est capable de contrôler des systèmes complexes dont la modélisation est imparfaite et la mesure des variables d'état difficile. Il s'applique ainsi complètement aux systèmes constitués par les cellules animales.

I.4.2.3 Stratégies heuristiques

Des stratégies originales sont parfois développées. Elles reposent sur la modélisation du système qui propose un lien direct entre le paramètre mesuré et la commande. Quelques exemples sont décrits ci-dessous.

Kyung et al. (1994) (culture en perfusion) et Zhou et Hu (1995a) (en cuvée alimentée) mesurent l'OUR (Oxygene Uptake Rate)[4] supposé proportionnel au taux de

[4] Taux de consommation d'oxygène.

consommation de glucose et en déduisent le taux de dilution ou le taux d'alimentation de glucose.

Kyung et al. (1995) utilisent le volume de base ajoutée pour maintenir le pH constant comme indication de la production de lactate. Ils en déduisent alors la consommation de glucose associée dans le but de déterminer le taux d'alimentation de glucose.

De même Shimuzu et al. (1990) avaient déjà utilisé (pour des levures) la mesure du flux de NH_3 qui maintient le pH constant pour la détermination de μX (taux de croissance). A l'aide d'un filtre de Kalman le taux spécifique de croissance μ est déterminé et le taux d'alimentation est alors calculé.

CHAPITRE II

Contrôle adaptatif de la concentration de glucose à faible niveau pour étudier le métabolisme des cellules HEK-293 en milieu sans sérum

Ce chapitre présente l'article intitulé '*Adaptive control at low-level glucose concentration to study HEK-293 cell metabolism in serum free cultures*'. Cet article a été soumis à la revue *Biotechnology Progress*.

Adaptive control at low-level glucose concentration to study HEK-293 cell metabolism in serum free cultures.

Pascal Siegwart[1,2], Keith Male[1], Johanne Côté[1], John H.T. Luong[1], Michel Perrier[2], Amine Kamen[1*]

[1] Biotechnology Research Institute, National Research Council Canada, 6100 Royalmount Avenue, Montréal, Québec, Canada, H4P 2R2
Tel: (514) 496 2264; Fax: (514) 496 6785; E-mail: Amine.Kamen@nrc.ca

[2] Département de génie chimique, Ecole Polytechnique, Université de Montréal, Case Postale 6079, Succursale centre-ville, Montréal, Québec, Canada, H3C 3A7

* Corresponding author

Keywords

Adaptive control, on-line estimation, low glucose, lactate, glutamine, glucose transport

II.1. Abstract

Fed-batch cultures were carried out to study the metabolism of HEK-293 cells at a low level of glucose concentration. The concentration of glucose was measured every 30 minutes by a FIA system and was maintained at 1 mM throughout the culture using an adaptive nonlinear controller based on minimal modelling of the process. The controller worked satisfactorily for both low and high cell concentrations without the need for retuning between different culture phases. A single parameter was estimated and shown useful to diagnose the physiological state of the culture. The glucose and glutamine uptake rates and the lactate and ammonia production rates were compared to those obtained in batch mode with an initial glucose concentration at 21 mM. The concentration profiles obtained from both culture modes could be divided into three phases for interpretation. The first phase was characterized by high specific growth rate, high specific glucose consumption, and high specific lactate production. In the second phase, high specific growth rate is still observed but with a significant decrease in the specific rates of glucose uptake, lactate production, and glutamine uptake. In the last phase, cell growth became significantly slower with a decrease of specific glucose uptake rate and lactate consumption instead of production. The glutamine consumption in this last phase was negligible. The specific respiration rate appeared to remain constant during the first two phases suggesting that no change occured in the oxidative pathway capacity. Lactate production was significantly reduced by maintaining a low glucose concentration thus decreasing the rate of glycolysis. The energy produced by glycolysis did not appear to be essential for cell growth. It is believed that further investigation in the cell glucose transporter mechanism could lead to new strategies to reduce glycolysis.

II.2. Introduction

Human Embryo Kidney (HEK) cells or 293 cells are, since their original transformation by Graham et al. (1977), constantly increasing in popularity. Adaptation to

suspension and serum free medium (reviewed in Côté et al. 1998) further increased their potential for large scale culture. As human derived cells, 293 cells are believed to be an appropriate system to produce therapeutics with complex structures. Furthermore, 293 cells are easily transfectable by classical calcium phosphate methods, and these are now used for large scale transient expression of recombinant proteins (Jordan et al. 1998) as well as stable expression. However, the primary reason for the development of 293 cells is related to their ability to complement E1A-E1B defective adenoviruses. As such they are used for the production of recombinant adenovirus in research laboratories to provide the basic knowledge for the development of improved systems for gene transfer and gene therapy (Kovesdi et al. 1997).

Study of metabolism and physiology in mammalian cell culture were primarily motivated by the belief that cell concentration and product yield were limited by the accumulation of inhibitors such as lactic acid and ammonium (Hu and Aunins 1997). We have previously shown (Nadeau et al. 1996) that accumulation of lactate in 293 cell cultures could reach inhibitory levels during growth and upon infection with recombinant adenovirus. Moreover, lactic acid accumulation acidifies the medium, requiring pH adjustments with base addition which in turn increases the osmolarity (Nadeau et al. 1996; Omassa et al. 1992). Many reports on hybridoma cells demonstrated that controlling the glucose concentration at low level could redirect the cell metabolism to reduced glucose uptake rate and lactic acid production rate. Kurokawa et al. (1994) controlled glucose at 5.5, 2.8, and 1.1 mM, and Ozturk et al. (1997) at 5 mM. Therefore, as part of a continuing effort to develop high cell density and high yield processes for large scale production of therapeutics using 293SF-3F6 cells (a serum free medium sub-clone growing in suspension) it was decided to control the glucose level at 1 mM in fed-batch cultures. Prior to any control, an original Flow Injection Analysis (FIA) system was developed (Male at al. 1997) to monitor the glucose level on-line.

Different control strategies were considered before designing an appropriate controller adapted to maintain glucose concentration at 1 mM in mammalian cell culture.

Optimal control is not suitable because it requires a complete knowledge of the process and is very sensitive to model errors. There is no adequate growth model for mammalian cells because of the complexity of their metabolism. The system is complex, time varying, and highly non-linear. Cell concentration determines the system dynamics. From batch to batch, complete reproducibility remains a problem. It appears that cell history influences cell behaviour. These characteristics forbid simple approaches such as using standard P.I.D. controllers. An adaptive proportional integral derivative controller with time evolving parameters has proven to be efficient (Dairaku et al. 1983). However the difficulties in parameter tuning for a standard P.I.D. are increased by the appropriate selection of parameter evolution strategy. This tuning needs either a good process model or a long test period.

Since the last decade, adaptive control is establishing itself as a performant strategy for poorly understood processes (Dochain and Bastin, 1990). A simple model is sufficient to obtain the controller structure. The feedback action compensates for model uncertainties and major disturbances. In addition, with the estimator potential and with the appropriate minimal measurement of environmental parameters, no physiological culture parameters are needed as prior knowledge. Ease of parameter tuning allows succesful control right from the first culture test. The estimator, which is part of the controller, can be used as an on-line estimation of cell physiological parameters (Konstantinov 1996).

The work presented herein addresses two objectives: first, the design and development of an adaptive controller, second, the evaluation of the effect of 1 mM glucose control on 293SF-3F6 basic cell metabolism. In the first part, modeling and controller design are presented in respect to minimal system knowledge and minimal monitoring objectives. Adaptive controller performances regarding error in the measurements and changes in cell physiological state are described. Also, the effectiveness of a biomass estimator associated with the controller is discussed. In the second part, physiological parameters of the glucose and the glutamine pathways for glucose fed-batch culture are presented. Taking into consideration mass and energy balances, the metabolism

of cells cultured in 1 mM glucose controlled cultures and batch cultures are compared. Change in glucose metabolism is discussed in the light of glucose transport mechanism.

II.3. Materials and Methods

II.3.1 Cell line and culture medium

The human cells cultivated in the bioreactor were 293SF-3F6 cells, clones of Human Embryonic Kidney 293S (Nadeau 1996) cells adapted to grow in serum free medium in our laboratory (Côté et al. 1998). The cells were maintained in suspension culture in custom-made low-calcium serum-free medium (LC-SFM) which is composed of H-SFM medium (GIBCO Grand Island, NY) supplemented as described by Côté (1998). Glucose powder (SIGMA, St Louis, MO) was used to complete the medium at 1 mM concentration, and to prepare a 3.3 M feed solution used for glucose fed-batch. Antibiotic and antimycotic (200x, Cellgro, Mediatech, USA) were added to the culture medium. Hepes (SIGMA) with a pK_a equal to 7.31, was added (10 mM) for its buffer effect.

II.3.2 Inoculum

The inoculum was prepared in 0.5 to 2 L shake flasks with LC-HSFM containing 25mM of glucose. The FORMA orbital shakers (FORMA Scientific, Mariette, OHIO) were operated at 130 rpm. These large culture volumes were kept with closed shake flasks without CO_2 addition. The cells were kept in exponential phase at a density between 0.3 and 1 million cells per mL. Before inoculating the bioreactor, cells were centrifuged at 1000 rpm for 15 minutes (Sorvall, RC-3B Plus) to separate cells and the highly concentrated glucose medium, and subsequently resuspended in a 1 mM glucose medium. The bioreactor was inoculated at around 0.15×10^6 Cells/mL.

II.3.3 Bioreactor culture

Four fermentations were performed in a Chemap CF2000 (Mannedorf, Switzerland) 22-L bioreactor (19L working volume). Such a pilot scale bioreactor was used to reduce the cell recirculation frequency in the loop (see next section), and volume change allowed to be neglected. A double helical ribbon impeller (HRI) (Kamen et al. 1991) rotating at 90 to 120 rpm ensured good mixing. Three surface baffles on the vessel breaking the surface liquid (Kamen et al. 1991) increased gas mass tranfer. Sparging was not used in order to minimize the shear stress. The temperature was controlled at 37 °C by a standard P.I. controller and a water jacket. Dissolved oxygen was monitored on-line and controlled at 40% of the air saturation by a P.I. mass-flow programmed on FIX MMI (Intellution, Nordwood MA) software running on a PC-486. The pH was also monitored on-line (Ingold pH probe, Andover MA) and maintained at 7.2. The pH was controlled at the begining of the culture by setting manually the percentage of CO_2 in the gas inlet, then later by automatic addition of 7.5% $NaHCO_3$ (w/v) using a P.I. controller. The measurement and control of glucose concentration is described in the following sections.

A previous 2.9 L batch culture performed by Côté et al. (1998) in our lab with the same cells, the same medium composition, but with an initial glucose concentration of 21 mM, will be used as a control to discuss the effect of low-glucose.

II.3.4 On-line glucose analysis

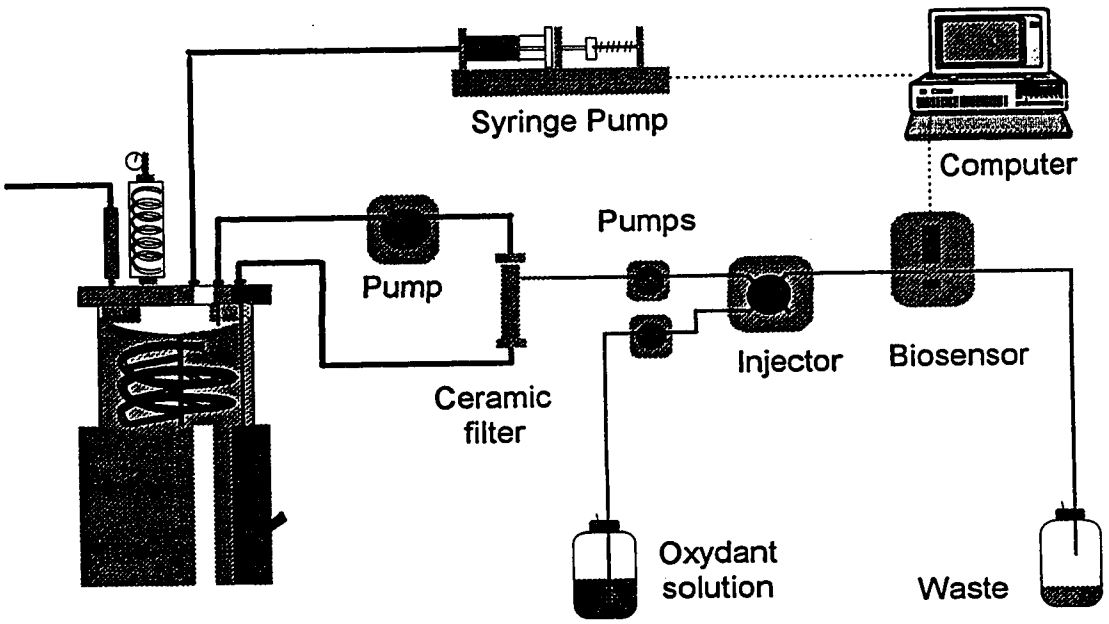


Figure 2.1 : Glucose on-line measurement system. From the recirculation loop through a ceramic filter, the filtrate was injected every 30 minutes to the glucose oxidase mediated biosensor. The signal was integrated by a computer. The controller set the flow rate of a 3.3 M glucose solution on a syringe pump.

Glucose concentration was measured on-line every 30 minutes using the flow injection analysis (FIA) biosensor system implemented by Male et al. (1997). Filtrate was extracted using a cylindrical ceramic tangential microfilter (Eppendorf) in a recirculation loop and fed to the FIA system at 4 mL/h. The set up is shown in Figure 2.1. The recirculation flow rate had to be carefully chosen considering mammalian cell sensitivity to shear stress versus the risk of cell adhesion on the surface tubing and filter. The selected flow rate (115 mL/min) in 6.4 mm and 3.1 mm tubing gives Reynolds numbers of 1123 and 544 respectively, the upper limit of laminar flow. The length of tubing was minimized

to reduce the dead volume (33.3 mL) and cell time residence (17.4 s) to prevent any oxygen or nutriment depletion. In a 3L reactor, the passage frequency in the loop is 2.3 h^{-1}. In a 19L bioreactor it is reduced to 0.36 h^{-1}, and the effect on cells is assumed to be negligible. It was important to keep a continuous flow of the filtrate from the bioreactor to the FIA system to prevent any back flow from the measurement system. Azide (0.1%) was added in the FIA buffer solution to prevent any growth in the FIA tubing. The FIA measurement signal, a chromatography type, was sent to a PC 486 computer and was integrated using the FIX MMI Intellution software[1]. A standard solution of 1 mM glucose was injected every two days to recalibrate the integration system. The concentration of glucose in the bioreactor was then measured on-line every 30 minutes with 40 minutes time delay. The measurement system was stable over 10 days.

II.3.5 Analytical Methods

Total cell number was counted in a hemacytometer (Hausser Scientific, Horshow, PA) under a microscope. Because of cell aggregation, 500 µL culture aliquot was placed in a 6 mL polystyrene tube and agitated to break the cell clumps. This method decreased the apparent cell viability, therefore, the cell viability percentage was estimated separately without agitating cells with erythrosin B (Garnier et al. 1994). Because the viability was always over 95%, hereon the discussion will only include the total cell density. Glutamine was analysed by HPLC as described by Kamen et al. (1991). Glucose and lactate were analysed using the DX 500 HPLC system (Dionex, Sunnyvale, CA) according to the method described by Male et al. (1997). Ammonia was measured by phenol-hypochlorite reaction following the protocol of Weatherburn (1967).

---

[1] L'Annexe 1 présente la fenêtre de contrôle et les blocks de programmation sur FIX

II.3.6 Glucose feeding

A syringe pump (Harvard Apparatus, South Natick, MA) was used to inject a high concentration glucose solution (3.3 M) into the bioreactor. The flow rate, calculated by the adaptive controller on FIX MMI, was sent to the pump using Microsoft DDE communication protocol.

II.4. Modeling and theoretical aspects

The model is based on biomass X growth on glucose substrate S. The reaction scheme (1) is a qualitative relation and omits other components like oxygen, carbon dioxide, lactate, or amino acids.

(2.1) S X

For a fed-batch culture, this reaction scheme (2.1) yields the classical mathematical relations (2.2) to (2.4), where V is the volume in the bioreactor, D the dilution rate, F the feed rate, S_{in} the glucose concentration in the feed solution, and $k = Y_{S/X}$ the yield coefficient of substrate consumptions on cell mass. The feedback arrow suggests an autocatalytic reaction from the biomass in equation (2.1). This is mathematically translated in a reaction rate μX proportional to X where μ is the conventional specific growth rate. The two major glucose metabolite pathways, glycolysis and oxidation, are not distinguished.

(2.2) $$\frac{dX}{dt} = -DX + \mu X$$

(2.3) $$\frac{dS}{dt} = -DS - k\mu X + DS_{in}$$

(2.4) $$\frac{dV}{dt} = DV = F$$

The specific reaction rate μ is a complex function of X, S, dissolved oxygen, amino-acids, growth factors, byproducts such as lactate or ammonia, osmolarity, pH, temperature, size of cell aggregates, and cell history. A Monod or Contois function will only incompletely

describe the culture and will not be useful for robust control. The potential of adaptive control lies in the estimation of the reaction rate. The control is based on a model but has no need of physiological parameters apriori knowledge. The control is robust in regard to culture condition changes and allows simple scale up. The parameter θ_S, that will be estimated, is defined as the glucose consumption rate divided by glucose concentration S:

(2.5) $\theta_S = k\mu X / S$

S is defined here as the regressor (Bastin and Dochain 1990). Defined in this manner, θ_S has units of h^{-1} and can be understood as the inverse of the system time constant. With (2.5), equation (2.3) becomes:

(2.6) $\frac{dS}{dt} = -DS - \theta_S S + DS_{in}$

II.4.1 Stabilizing control

The method applied is linearising control using a linear stable reference for the tracking error (S^*-S) (Bastin and Dochain 1990). The closed loop system has to be stable for unmodeled disturbances or uncertainties in modelling. Convergence of S to the set point S^* is given by the following equation (λ_S>0):

(2.7) $\frac{d(S^* - S)}{dt} = -\lambda_S (S^* - S)$

The exponential convergence rate (time constant $1/\lambda_S$) of S to S^* can be chosen as a function of the system characteristics. If the set point is constant, combining (2.6) and (2.7) the control law results in the glucose feeding rate F, equation (2.8).

(2.8) $F = \frac{\lambda_S (S^* - S) + \theta_S S}{S_{in} - S} V$

This control action $F_{applied}$ is bounded (2.9) by the maximal (F_{max}) and minimal (F_{min}) flow rate of the feeding pump.

$$(2.9)\quad F_{applied} = \begin{cases} F & if\ F_{\min} \le F \le F_{\max} \\ F_{\min} & if\ F \le F_{\min} \\ F_{\max} & if\ F \ge F_{\max} \end{cases}$$

The first part $\lambda_S(S^*-S)$ of the non linear control law (2.8) can be interpreted as a proportional control to stabilize the system, while the second term $\theta_s S$ is the feed required uniquely based on modelling. Compared to 19 L of culture medium in 22 L bioreactor, using a highly concentrated feeding solution (S_{in} = 3.3 M), the injected volume of feed solution, the sampling volume, and the volume extracted by the FIA (4 mL/h) could be neglected in the mass balance calculation.

II.4.2 Minimal system knowledge, minimal monitoring

The controller design has to minimize the number of culture parameters used and has to be robust to the estimation error of these parameters. Culture parameter measurement is costly and in many cases not achievable because of the lack of reliable sensors, therefore for direct feed-back control only glucose concentration was measured. An adaptive PID as described by Dairaku et al. (1983) would need extra information like biomass concentration to adapt the PID parameters. As proposed by Bastin and Dochain (1990), an indirect estimator (2.10) and (2.11) estimates on-line $\theta_S = k\mu X/S$ and the glucose concentration S itself . This indirect estimator decouples the dynamics of the controller and the estimator.

$$(2.10)\quad \frac{d\hat{S}}{dt} = -DS - \hat{\theta}_s S + DS_{in} + \omega_s(S - \hat{S})$$

$$(2.11)\quad \frac{d\hat{\theta}}{dt} = \gamma_s S(S - \hat{S})$$

The variables with a hat are the estimated variables by calculation. Bastin and Dochain (1990) explained how to choose the parameters ω_S and γ_S to set the eigenvalues of the error dynamics. The convergence of $\hat{\theta}_s$ and $\hat{S}$ to θ_S and S was theoretically assured, but the rate of convergence was determined by the system itself. If the convergence is slow in

comparison to the system dynamics, a proper initialization of these variables becomes critical. A computer simulation was developed by Siegwart (1998) with a simple cell growth model that resulted in a convergence time of 5 hours of culture.

II.4.3 Discretization

For calculations the equations (2.10) and (2.11) are discretized using the Euler first order approximation. The glucose sampling period was T = 0.5 h. A recursive least-squares method (Hsia 1977) with exponential data weighting λ_f to assure convergence yields the following estimation equation:

(2.12) $$\gamma_{t+1} = \frac{\gamma_t}{\lambda_f + T^2 S_t^2 \gamma_t}$$

(2.13) $$\hat{\theta}_{S_{t+1}} = \hat{\theta}_{S_t} - \gamma_{t+1} S_t T [S_{t+1} - S_t + T S_t \hat{\theta}_{S_t} - T D_t (S_{in} - S_t)]$$

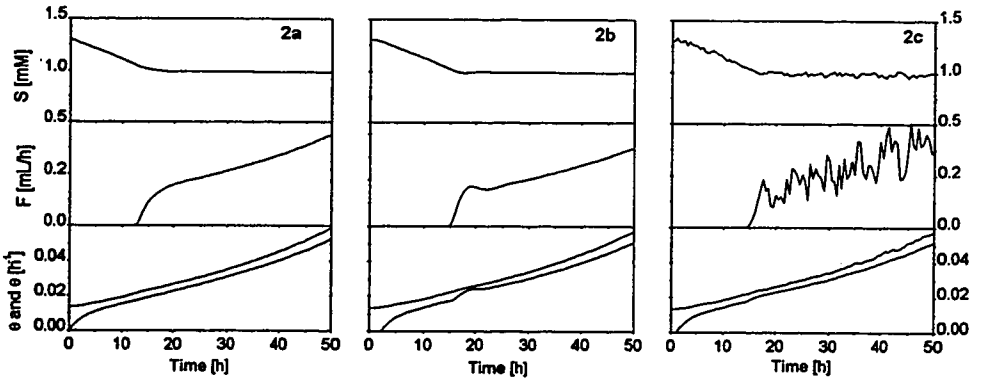


Figure 2.2 : Simulation of glucose control with initial conditions. S_0=1.3 mM, C=0.4 h^{-1}, $\hat{\theta}_{S_0}$=0 h^{-1}, γ=400,000. Three different senarios were tested: 2a) immediate and exact glucose measurement every 30 minutes, 2b) 1 hour delay in the exact measurement, 2c) 30 minutes delay and 5% white noise in the measurement.

Figure 2.2a shows a simulation of this discrete controller on Matlab® (Siegwart 1998). In these equations the measurement of time delay, about 40 minutes, was ignored. The effect of this approximation had been validated by simulating a 1 hour delay in the model (Figure 2.2b). The parameter γ is the covariance of the estimator $\hat{\theta}_S$ calculation. It indicates the level of confidence in the estimator, and it should evolve in a constant interval. A divergence to infinity would mean a divergence of the estimator, and a deviation to zero would send the system to sleep which means that the estimator would be over-confident and would not react to the change in the biological system. The glucose feed rate is then calculated every half hour by (2.14) and is bounded by equation (2.9).

$$(2.14)\quad F_{t+1} = D_{t+1}V = \frac{\lambda_S(S^* - S_{t+1}) + \hat{\theta}_{S_{t+1}} S_{t+1}}{S_{in} - S_{t+1}} V$$

II.4.4 Selection of tuning parameters

All parameters $\hat{\theta}_{S_0}$, γ_o, λ_f, and C in equations (2.12), (2.13), and(2.14) are easy to tune. The parameters $\hat{\theta}_S$, and γ have a physical interpretation. The tuning was tested on a model of cell growth simulated with Matlab®. A half hour delay and 5% white noise in the glucose measurement were simulated and the controller was still effective. The results are presented in Figure 2.2c. To assure a proper control, the controller time constant $1/\lambda_S$ must be shorter than the open loop time response of the system $1/\theta$. From previous cultures, θ_S was found to be around 0.02 h^{-1} at the culture start ($X = 0.15 \times 10^6$ cells/mL) and 0.2h^{-1} after 100 hours ($X = 2.5 \times 10^6$ cells/mL). Therefore, λ_S was tuned at 0.4 h^{-1}. λ_f is the forgetting factor (Bastin and Dochain 1990). To reduce the sensitivity to glucose error measurement, λ_f was tuned at 0.9. To minimize the estimator convergence time, the initial values were chosen as close as possible to the real values. $\hat{\theta}_{S_0} = k\mu X_0/S_0$ could be calculated because $k\mu$ was estimated from a previous run to be 0.18×10^{-3} mol/10^9 cells/h at

the beginning of the culture. For $X_0 = 0.15x10^9$ cells/L, θ_0 will be 0.027 h^{-1}. The initial value γ_0 was then set to 400,000 (the mean value of γ found by simulation).

II.5. Results and Discussion

II.5.1 Control

II.5.1.1 Performance

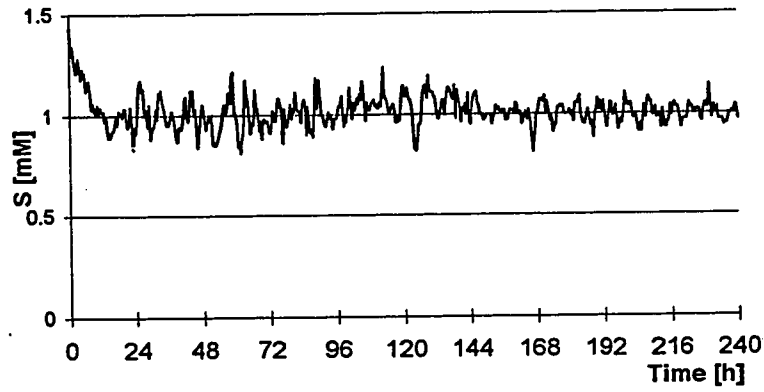


Figure 2.3 : Glucose concentration measured by the FIA system every 30 minutes with 40 minutes time delay and controlled at 1mM by adaptive control during 10 days in a 19 L working volume bioreactor.

Figure 2.3 shows the glucose concentration measured in the bioreactor by the FIA system. Samples taken from the bioreactor at various times were analysed by HPLC for glucose concentration that agreed very closely to the FIA values. Figure 2.4 gives the histogram of the signal. Initial glucose concentration was 1.3 mM, and 15 hours were needed for the glucose concentration to drop to about 1 mM. Therefore, not considering this first 15 hours period which is independant of any controller action, the mean of

glucose concentration was 1.007 mM with a standard deviation of 0.067 mM. All the measurements were between 0.8 and 1.2 mM and 87% were between 0.9 and 1.1 mM. The glucose concentration was maintained at this level for over 10 days. Figure 2.5 shows a low density exponential phase, a high density exponential phase and a stationary phase, in the culture. The controller was functioning equally well in all phases, because $\hat{\theta}_S$ was automatically adjusted. In all of the four experiments there was no lag in the glucose control because of the time needed for the parameters $\hat{\theta}_S$ and γ to converge, and precise initialization of $\hat{\theta}_S$ and γ was not required. The parameters converged after about 5 hours. Furthermore, the controller proportional part $\lambda_S(S^*-S)$ was able to perform the control during the beginning of the low cell density phase.

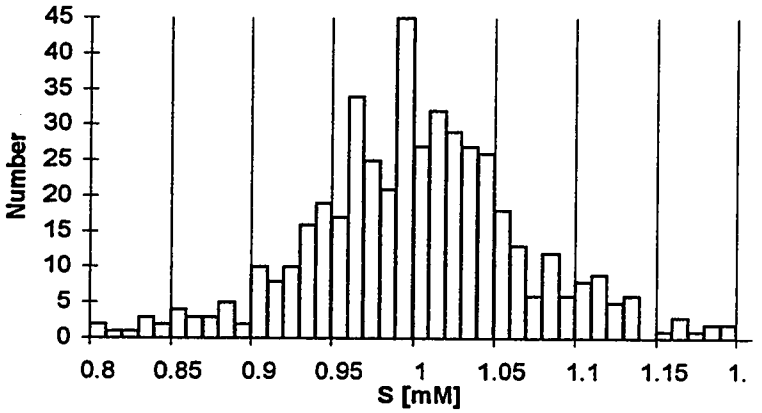


Figure 2.4 : Histogram of the glucose concentration of Figure 2.3. The mean value is 1.007 mM and the standard deviation 0.067 mM.

The 40 minutes measurement time delay in the glucose concentration does not seem to affect the controller performance. Even at high cell concentration the quickest system time response $1/\theta_S$ is 5 hours. The effect of this delay is hidden because of the larger effect due to error glucose measurement as described below.

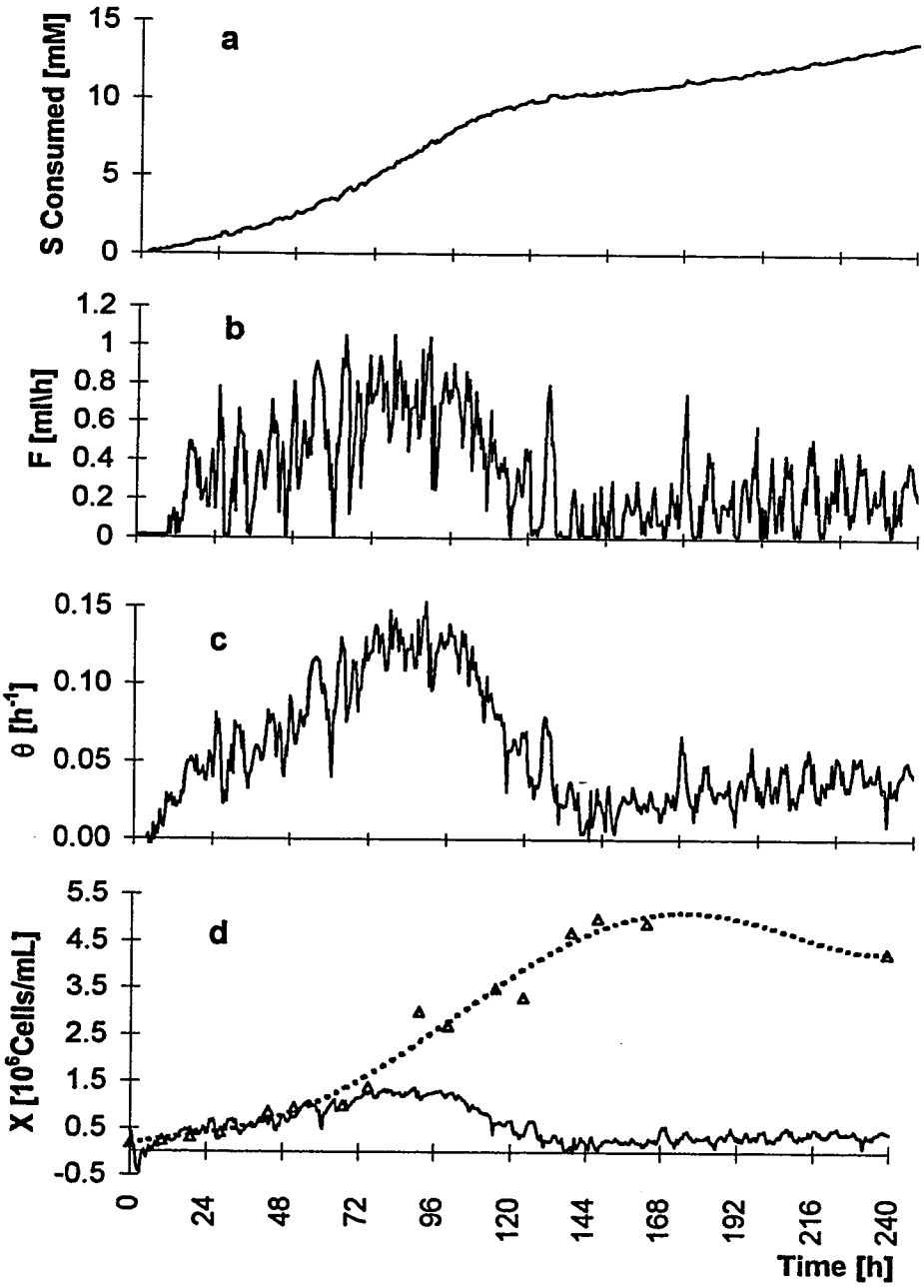


Figure 2.5 : (a) Glucose consumed by the cells, (b) glucose feeding rate F, (c) estimator $\hat{\theta}_s$, and (d) biomass concentration counted (Δ and dotted line) and estimated (-). The control was performent throughout the culture: low density, exponential phase, stationary phase.

II.5.1.2 Measurement errors

The precision in measuring glucose concentration by the FIA was ±5%. This error is greater than what has been described by Male et al. (1997), due to the on-line automatic integration of the signal which is less precise than what was performed manually. From time to time some perturbations increased the error up to 20%. A change in the glucose concentration between two consecutive measurements over 8% is most likely a measurement error because the system dynamics are too slow to induce such a real change in 0.5 hours. Because of the proportional part $\lambda_S(S^*-S)$ in the control law, these perturbations tend to destabilize the controller, and to induce an over reaction in the feed rate setting. This sensitivity is particularly strong at the beginning of the fermentation (Figure 2.6). When λ_S is over 0.4 h^{-1} and $\hat{\theta}_s$ is small (0.01 to 0.02 h^{-1}), the term $\hat{\theta}_s S$ is negligible in equation (14) when compared to λ_S (S^*-S). $\hat{\theta}_s S$ is less sensitive to noise in glucose concentration measurement. Values of λ_S between 0.1 and 0.4 are acceptable for this system. If $\hat{\theta}_s$ is badly initialized and λ_S is too small, the controller could fail during the 5 hours needed for the convergence of $\hat{\theta}_s$.

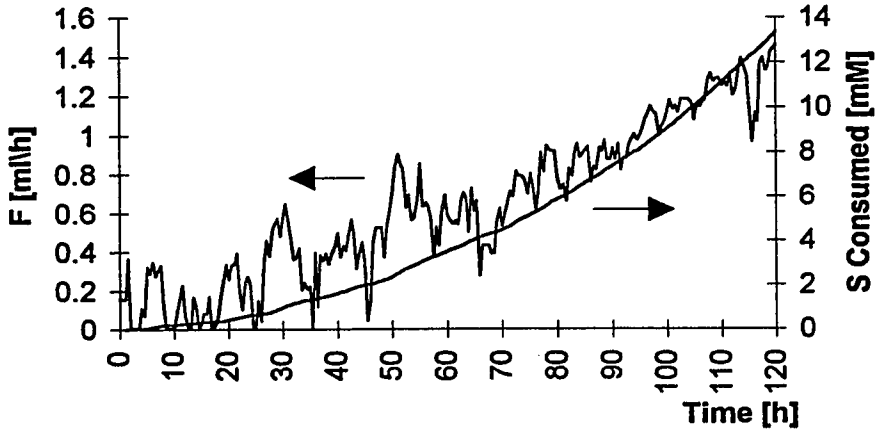


Figure 2.6 : Glucose feeding flow rate F (—) and glucose consumed (---). The errors in glucose measurement induce oscillations in F. The control system is particularly sensitive to these errors at the beginning of the culture.

II.5.1.3 Control at high cell density

During the exponential phase, θ_S increases exponentially proportional to X. Therefore, the term $\hat{\theta}_S S$ increased by one order of magnitude, but the proportional term $\lambda_S(S^*-S)$ remained approximately of the same order. Thus, $\hat{\theta}_S S$ became dominant compared to the proportional action term. This could cause a problem in the case of an important external perturbation on S. If S becomes suddenly very different from S* (0.6 or 1.4 mM), the controller would need a long time to correct the offset. On the other hand, an increase of the controller parameter λ_S would affect the controller performance at the beginning of the culture as explained previously. To improve the controller performance, λ_S could be defined as a time evolving parameter instead of remaining constant. To set λ_S as a proportional function of the biomass concentration would imply a measurement of X. But as apparent in Figure 2.5, λ_S would be over evaluated in the stationary phase, when the glucose consumption rate significantly decreases and the process time constant $1/\theta_S$ increases. λ_S can be chosen as a function of $\hat{\theta}_S$. A simple proportional relation is proposed:

(2.14) $$\lambda_S = \lambda_{S_0} \frac{\hat{\theta}_S}{\hat{\theta}_{S_0}}$$

If a relative error $(S^*-S)/S$ of 5% in the glucose concentration is acceptable and $\hat{\theta}_{S_0}$ is equal to 0.02 h^{-1}, λ_{S_0} is calculated to be 0.4 h^{-1} to have $\hat{\theta}_S S$ and $\lambda_S(S^*-S)$ in the same order of magnitude. But as shown in Figure 2.5, in the first hours of the fermentation θ_S is not correctly estimated, and also oscillates too much. The dependence of λ_S in $\hat{\theta}_S$ should occur only when $\hat{\theta}_S$ is stabilized. Equation (2.15) is proposed to reduce λ_S variation during the beginning of the fermentation. λ_{S_0} remains equal to 0.4 h^{-1} and α must be chosen typically between 3 and 5.

$$(2.15)\quad \lambda_S = \lambda_{S_0}\left[1+\frac{\hat{\theta}_S}{\alpha\hat{\theta}_{S_0}}\right]$$

II.5.1.4 Controller reaction to glucose over-addition

Glucose was quickly added until a concentration of 1.5 mM was reached. The parameter $\hat{\theta}_S$ became highly negative to follow this over addition of glucose (Figure 2.7). The controller stopped the glucose feed immediately. The glucose was slowly consumed by the cells and reached 1 mM after 20 hours, but $\hat{\theta}_S$ converged to 0.02 h^{-1}, in only 8 hours. This shows that the estimator time constant is two times quicker than the biological system. When the glucose concentration came back to 1 mM, the controller was able to maintain the glucose concentration nearly constant.

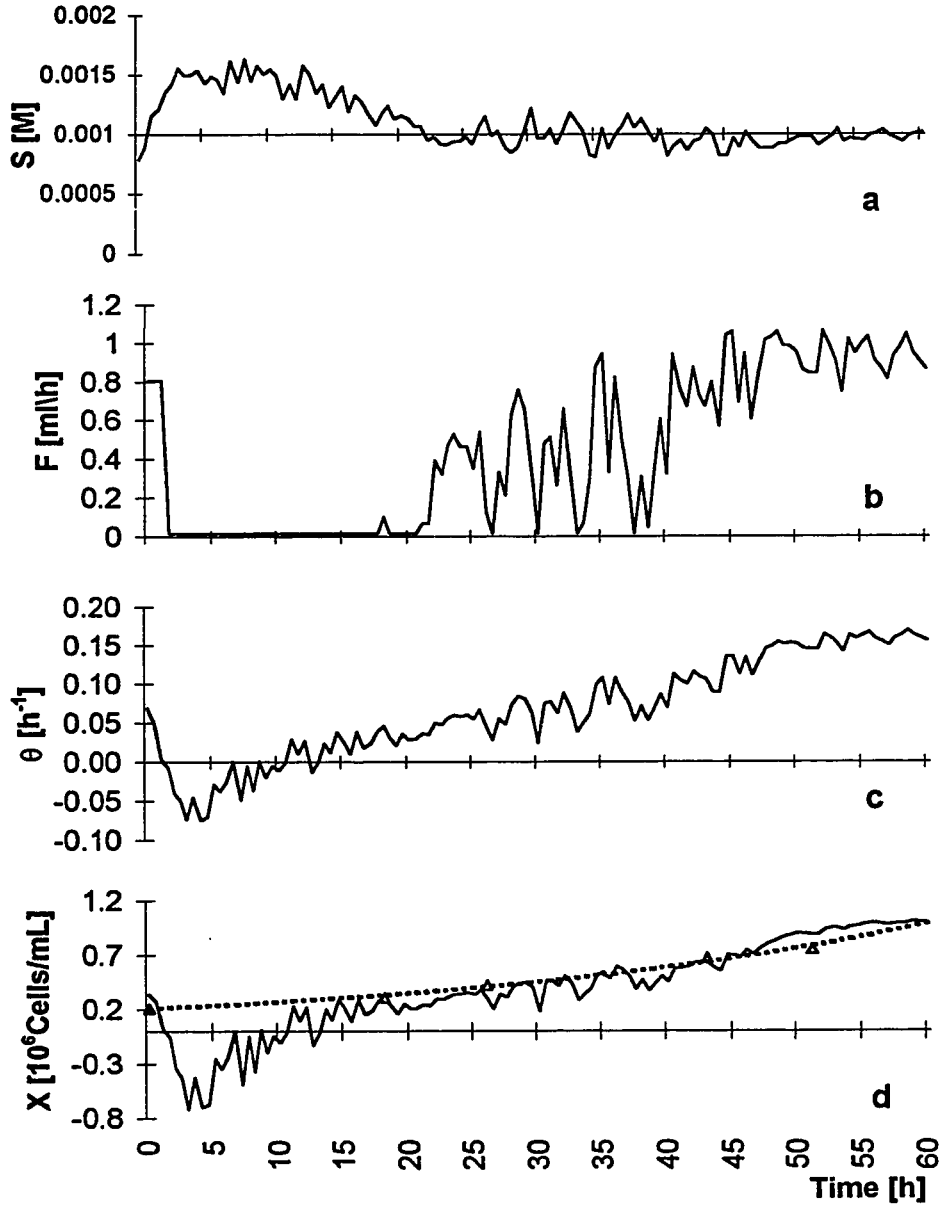


Figure 2.7 : Reaction of the controller to a pulse addition of glucose. The controller stopped the feeding and $\hat{\theta}_s$ converged within 8 hours. S decreased back to 1 mM in 20 hours, and thereafter was controlled at 1mM.

II.5.1.5 Estimation of biomass

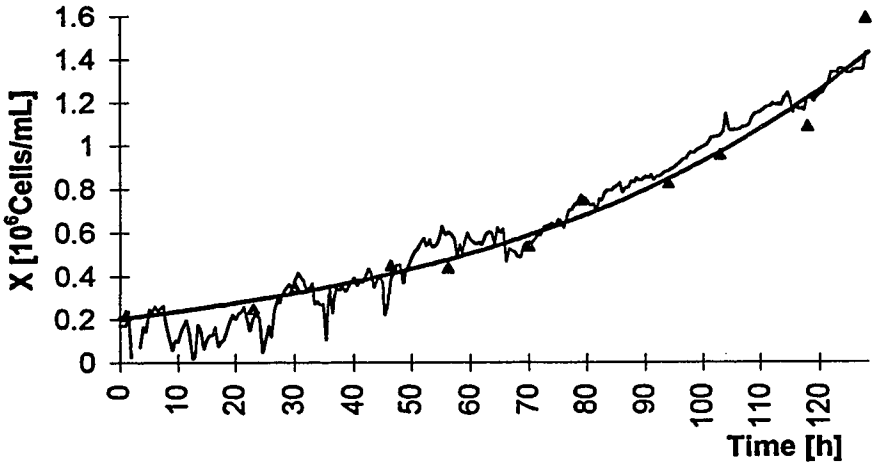


Figure 2.8. : Biomass concentration (Δ) and biomass estimator. The estimation is accurate up to $1.5x10^6$ Cells/mL.

The estimated parameter $\hat{\theta}_s$ = kμX/S includes a direct estimation of the reaction rate of glucose consumption. If kμ is determined a priori and deemed constant, X can be monitored on-line. Note that during the exponential phase kμ is the specific glucose consumption rate currently noted q_S. Figures 2.5d and 2.8 show X estimation results. After a few hours needed for the estimator to converge, X is well estimated only in a certain time range since kμ is not constant over the culture. For X higher than $1.5x10^6$ Cells/mL, μ is decreasing and it will be shown later that a change in the cell glycolysis metabolism modifies k. Furthermore kμ seems to vary from fed-batch to fed-batch between 0.10 and 0.17 μmole/10^6Cells/h; so kμ is calculated to superimpose the graph of X estimated with the biomass concentration measured by cell count. Although this biomass estimator does not provide an accurate approximation of X and is quantitatively not usable, it is an immediate indicator of the culture physiological state. Konstantinov

(1996) underlined the importance of monitoring physiological cell parameters to really control the cell activity. Using this biomass estimator, it is then possible to follow metabolical change in the glucose pathways and change in the cell growth rate. A second level of control, called expert system by Konstantinov (1994), could react to this metabolic change. For instance, a detection of a decreasing growth rate could trigger a strategy of amino acid feed. Figure 2.9 shows an example of a cell physiological change. After 68 hours the temperature was changed from 37 to 35 ^{0}C. The cell metabolism slowed down and the cell growth significantly reduced. The glucose concentration started to increase 3 hours after the change, and the controller reduced the feeding flow rate. $\hat{\theta}_S$ and X estimated decreased within 4 hours. The glucose consumption rate almost dropped by half. This estimator break is observable on-line and a culture failure is detected within 4 hours. An alarm or expert system could then be activated. This example also underlines the controller performance. The controller was able to adapt rapidly to this system dynamic change. The maximum glucose concentration deviation was only 25% and the control was restored within 7 hours.

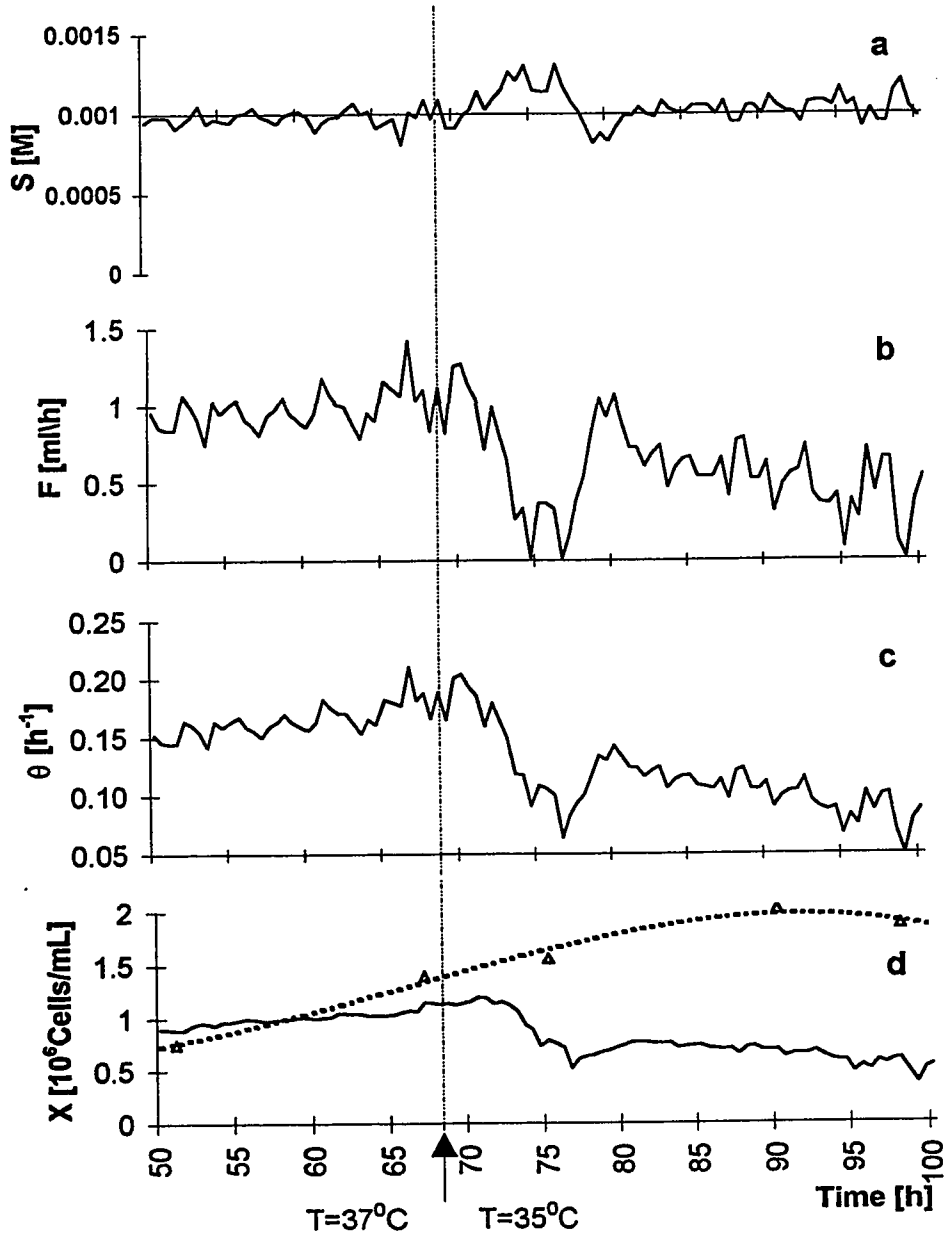


Figure 2.9 : Reaction to a -2°C temperature shift at 68 hours. The cell metabolism slowed down. The estimator $\hat{\theta}_s$ dropped within 2 hours. This estimator provided on-line information of cell physiological state and therefore, can be used as indicator by an expert system.

II.5.2 Basic metabolism and growth

No lag time in the growth was observed upon changing the initial glucose concentration from 21 mM to 1 mM in the bioreactor fed-batch culture. The cell doubling time was close to 24 hours up to a cell concentration of $3x10^6$ Cells/mL. Overall, there was no significant difference in the specific growth rate between a batch with 21 mM initial glucose concentration and low glucose concentration control cultures. Consequently, glucose transport and metabolism did not seem to be limited at a glucose concentration of 1 mM. For the batch as well as for the fed-batch culture, the cell growth timecourse appeared to be divided in 3 successive phases (Figures 2.10 and 2.11). From the beginning of the culture to a cell density of about $1x10^6$ cells/mL, the first phase was characterized by a high specific growth rate, and high specific glucose consumption and lactate production rates. In the second phase, from $1x10^6$ to about $3x10^6$ cells/mL, a high specific growth rate is maintained while the glucose specific uptake, the lactate production, and the glutamine specific uptake rates showed a significant decrease. In the last phase, cell growth became considerably slower, the glucose specific uptake rate decreased again, and lactate was consumed instead of being produced with negligible glutamine consumption by the cells. The transition from phase 1 to phase 2 may have been induced by a change in the glucose metabolism, and the transition to phase 3 by a change in the glutamine metabolism. Because glucose and glutamine metabolic pathways in the cell are interrelated (Schneider et al. 1996), a change in one pathway could certainly affect the other.

II.5.2.1 Glucose consumption and lactate production

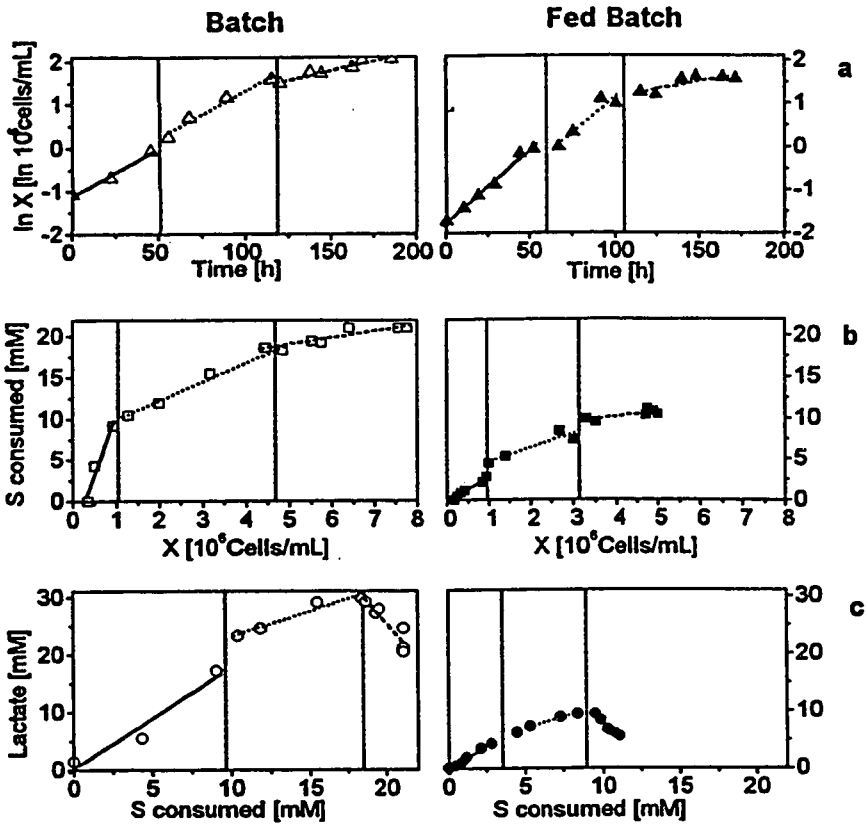


Figure 2.10 : Comparison between a batch (open symbols) and a fed-batch (closed symbols) culture. (a) biomass (Δ,▲), (b) $Y_{S/X}$ (,■), and (c) $Y_{L/S}$ (O,●). Three phases appeared: (—) high glucose consumption, (···) low glucose consumption, (---) glutamine limitation.

Comparing a batch culture with the 1 mM glucose control, the highest lactate concentration accumulated was reduced by a factor of 3 (30 mM versus 10 mM, Figure 2.10c). The lactate production on glucose consumption yield dropped down to

0.79 (Table 2.1). On the other hand oxygen respiration rate was not affected by this low glucose control. This decrease in glycolysis due to low glucose control was mostly observed in the first phase of the cultures. q_S decreased from 0.33 to 0.10 µmol/10^6cells/h and $Y_{L/S}$ from 2 to 1.6 mol/mol. In the second phase, glucose specific uptake rate q_S in the batch culture was reduced by one sixth, although glucose concentration remained high at 10 mM. In the fed-batch culture, because of low-glucose concentration control, the glucose specific consumption rate was low in phase one, and dropped even further in phase 2, although the concentration of glucose was maintained at constant level. In this phase, the glycolysis rate for the batch culture became close to the fed-batch experiment. However, at this point, glutamine concentration (over 3.5 mM) was not limiting. Although q_S decreased, cell growth was not affected suggesting no energetic limitation. Finally, an auto-regulation in the glucose metabolism was observed, reducing the glycolysis when cell density reached 1x10^6 Cells/mL. No similar metabolic changes have been reported in the literature.

		Batch		Glucose 1mM	
	[10^6Cells/mL]	Phase 1 X < 1	Phase 2 1<X<3	Phase 1 X < 1	Phase 2 1<X<3
µ	[h-1]	0.0223	0.0218	0.0338	0.0333
$Y_{L/S}$	[mol/mol]	2.0	1.2	1.6	0.79
$Y_{S/X}$	[µmol/10^6Cells]	15	2.3	3.1	2.0
$Y_{O2/X}$	[µmol/10^6Cells]	8.8	-	7.1	7.6
$Y_{O2/S}$	[mol/mol]	0.56	-	2.3	3.8
$Y_{Gln/X}$	[µmol/10^6Cells]	2.8	0.93	1.39	0.97
$Y_{NH4+/Gln}$	[mol/mol]	0.17	0.29	0.3	0.17

Table 2.1 : Specific growth rate and yield coefficients for a batch culture (initial glucose concentration 21 mM) and a low glucose control culture in exponential phase. Two physiological states were indentified.

The respiration rate q_{O2} appeared to remain constant at a value around 0.24 $\mu mol/10^6 cells/h$ (Table 2.2) during the two phases, and suggests no change in the oxidative pathway capacity. This value seems to remain constant for various culture conditions with high growth rate performed in our laboratory. Glycolysis pathway is theoretically 18 times less effective than oxidative pathway in energy production (glycolysis produces 2 ATP/Glucose, oxidation 36 ATP/Glucose), but because of the high glycolysis rate, this energy production becomes important. In the first phase of the batch culture, 36% of the ATP production by glucose metabolism was produced by glycolysis. In the fed-batch culture and in the second phase of the batch, constant respiration rate and significant decrease of glycolysis, led to a decrease of 30% of energy production by glucose without affecting cell growth. One could expect that cells would increase glutaminolysis to compensate for energy, but on the contrary the glutamine specific consumption rate was decreasing in the second phase of both culture conditions. The decrease of glutaminolysis rate intensified this decrease of energy production. It has already been reported in the review of Newland et al. (1990), that in tumor cells, cell growth was not limited by energy production but rather by biosynthesis rate. Xie at al. (1996b) showed that the ATP production per cell was 3 to 4 times over the theoretical need of ATP for synthesis of cell mass and product, and active transport of glucose and amino acids. This could be interpreted (Figure 2.12) by an over influx of glucose in the cell due to high glucose transport rate. Either because the flux of pyruvate in the TCA cycle is limited by a saturated oxidative capacity, or glucose flux directed to the TCA cycle already produce sufficient ATP, the over flux of glucose in the cell is directed to lactate production (Sonnleitner et al. 1985).

Table 2.2 : Specific consumption and production rates for a batch culture and a low glucose control culture in exponential phase. Two physiological states were indentified

		Batch		Glucose 1mM	
		Phase 1	Phase 2	Phase 1	Phase 2
	[10^6Cells/mL]	X < 1	1<X<3	X < 1	1<X<3
q_s	[µmol/10^6Cells/h]	0.33	0.050	0.10	0.067
q_{O2}	[µmol/10^6Cells/h]	0.20	-	0.24	0.25
q_L	[µmol/10^6Cells/h]	0.67	0.060	0.17	0.053
q_{Gln}	[µmol/10^6Cells/h]	0.062	0.020	0.047	0.032

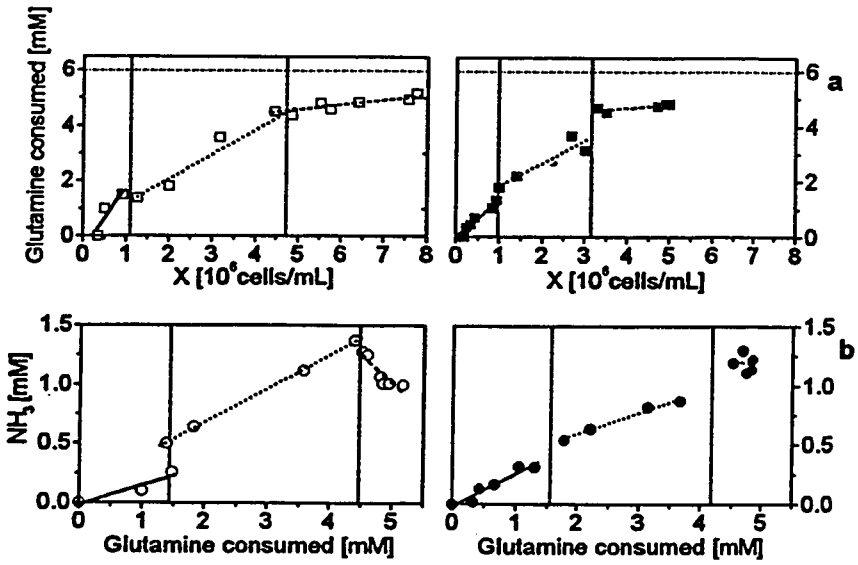


Figure 2.11 : Comparison between batch (open symbols) and fed-batch (closed symbols) culture. (a) $Y_{Gln/X}$ (,■), and (b) $Y_{NH3/S}$ (O,●). Three phases appeared: (—) high glucose consumption, (···) low glucose consumption, (---) glutamine limitation.

To understand if these observations are specific to this cell line or is due to the particular medium composition, further studies are required. Different hypotheses could explain these characteristics. A retro inhibition of glycolysis by lactate could be responsible for this decreasing glucose uptake. Gaertner et al. (1993) concluded on an inhibitory lactate effect on glucose uptake in hybridoma cells, however Miller (1987, dissertation cited by Zeng et al. 1995) found no effect on q_S after a lactate pulse. This hypothesis would hardly explain the transition to reduced glycolysis for the fed-batch culture at only 4.5 mM lactate. Furthermore preliminary tests on initial rates (data not shown) showed no significant inhibition on glycolysis up to an initial lactate concentration of 100 mM. A second hypothesis is that a limiting substrate in phase 2, such as an aminoacid, could unbalance the cell metabolism and induce a drop of glucose consumption. Another explanation would include the mechanism of glucose transporters. The cell membrane is impermeable to glucose, so the cell has to produce transport proteins to import glucose from the medium. There are two major groups of glucose transporters on the cell membrane. The GLUTs (Voet 1994) are facilitated diffusion transporters, which work in the direction of the glucose gradient. The SGLTs (Voet 1994) are active cotransporters using the Na^+ gradient between the cytoplasm and the medium. Glucose transport rate is proportional to the number of these transporters and can be regulated by the cell. In the fed-batch culture, a low glucose concentration in the medium would slow down the glucose transport rate inside the cell, and induce a decrease of glycolysis. Furthermore, the activity of some of these transporters is regulated by cofactors such as insulin. Insulin is a component of mammalian cell medium. Insulin may activate the glucose transport, increase the glucose concentration inside the cell, and consequently increase the glycolysis. But insulin is also metabolized by the cells and its concentration could decrease to a certain extent where glucose transport in the cell is significantly reduced. A decrease of glucose transport rate would explain the transition from phase 1 to phase 2 observed in both processes. Zhou et al. (1995) reported a decrease of 50% of glucose specific consumption rate q_s without affecting the specific growth rate, when removing insulin

from serum free medium. The 293SF cells are issued from kidney fibroblast, but through successive clone selection, the phenotype has evolved and so the types and number of glucose transporters on 293SF are unknown. To confirm this action of the transporters, it would be necessary to measure glucose inflow in one cell with different glucose concentration and insulin concentration in the medium. An identification and quantification of the glucose transporter types present on 293SF cell line would allow a modelling of cell glucose transport.

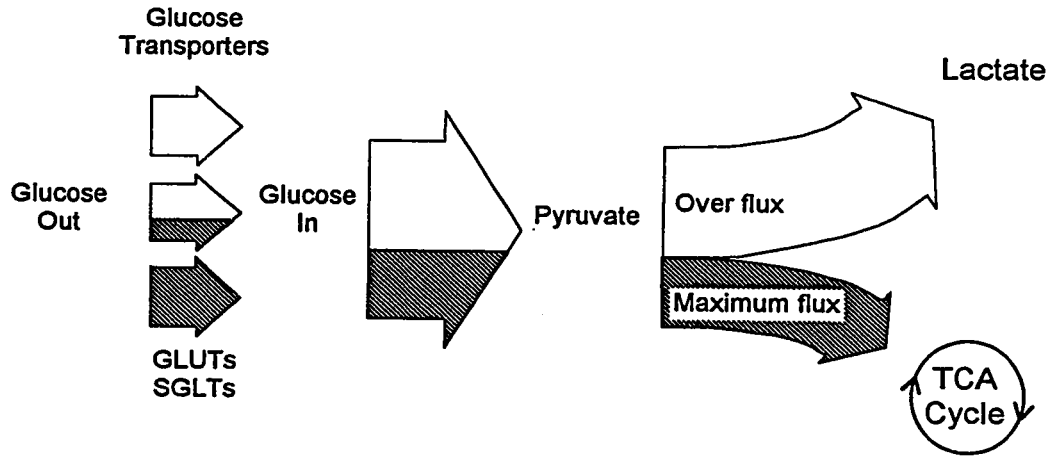


Figure 2.12 : Simplified glucose energetic pathway. Glucose flux is imposed by the cell glucose transporters. The capacity of oxidation in the TCA cycle is limited and glucose over flux is directed to glycolysis.

II.5.2.2 Glutamine consumption and ammonia production

The initial yield coefficient of glutamine consumption per cell $Y_{Gln/X}$ in the fed-batch culture was half compared to the batch culture as shown in Table 2.1. In addition, for the two culture modes, the decrease of q_s from phase 1 to phase 2 was followed by a decrease of glutamine specific consumption q_{Gln} as shown in Figure 2.11 and Table 2.2. The reduction of glutamine consumption rate was significant in the batch culture. In phase 2, the glutamine consumption rate for the batch and the fed-batch cultures were very close. Glycolysis and glutaminolysis seem to be linked, but the interaction is not complementary. Contrary to all expectations, a decrease of energy production due to

glycolysis diminution is not complemented by an increase of glutaminolysis. Controlling glucose at low level had shown a low glutamine consumption rate.

The yield coefficient of ammonia production on glutamine consumption $Y_{NH3/Gln}$ varied between 0.17 to 0.3 mol/mol. This value is rather small considering that the transformation of 1 mole of glutamine to glutamate produces 1 mole of ammonia, and the possible oxidation of glutamate releases another one. $Y_{NH3/Gln}$ for hybridoma cells has been reported to be between 0.3 and 0.5 mol/mol (Xie et al. 1996), and 0.35 to 0.66 mol/mol (Kurokawa et al. 1994). The variations of $Y_{NH3/Gln}$ between the batch and fed-batch culture, and between the two first phases remain unclear.

For a glutamine concentration lower than 1.6 mM, the growth rate dropped by a factor of 3 to 4 (data not shown). The cells were not in exponential phase anymore, but were able to grow very slowly. The minimum glutamine concentration required for exponential growth appeared to be 1.6 mM. At this glutamine concentration, its transport or metabolism in the cell may be limited because of a high affinity constant. Cells were not able to metabolize glutamine at concentration lower than 1 mM. Using a glutamine feeding strategy, higher cell density may be reached. In this glutamine limiting situation cell viability remained high however for a few days. On the other hand, ammonia, as shown in Figure 2.11, was consumed by the cells. Ammonia may replace glutamine as nitrogen source, but this decrease is also possibly caused by ammonia evaporation (Xie et al. 1996a). In the batch culture, at the beginning of the third phase, glucose concentration still remained at 2.4 mM; so glucose was not limiting yet. It can be observed in Figure 2.10 that $Y_{s/x}$ for batch and fed-batch cultures, was drastically low when the glutamine became limiting. The lactate was then quantitatively consumed by the cells. Lactate consumption was not due to glucose limitation in the batch culture, because this consumption was also observed in the fed-batch culture, where glucose was controlled. A detailed amino-acid analysis is necessary to better understand this metabolic shift, but the later phase is of limited interest because of a low growth rate.

II.6. Conclusion

The control algorithm presented has shown satisfactory control performance in different cell states such as low and high growth rates, and low and high cell densities. Precise initialization of the controller parameters (θ and γ) is not critical. Because of its estimator potential, the controller is easily adaptable to various cell line cultures and allows easy scale up.

Lactate production was reduced significantly by maintaining low glucose concentration thus decreasing the rate of glycolysis. $Y_{L/S}$ was reduced from 2 mol/mol to 0.8 mol/mol. Specific growth rate was not affected by this strategy. Glutamine was found to be limiting for a concentration under 1.6 mM. To reach higher cell density, a glutamine feeding strategy is necessary.

An auto-regulation leading to a reduction of glycolysis occurred for a cell density higher than $1x10^6$ Cells/mL. Respiration rate did not seem to be correlated to glucose consumption rate. The energy produced by glycolysis did not appear to be essential for cell growth, rather glycolysis appeared to be an energy waste. It is believed that further investigation in the cell glucose transporter mechanisms could lead to new strategies to reduce glycolysis.

II.7. Nomenclature

C controller parameter [h^{-1}]

D dilution rate [h^{-1}]

F glucose feeding rate [l/h]

k glucose yield coefficient on biomass $Y_{S/X}$ [μmol/10^6cells]

L lactate concentration [M]

q_* specific production or consumption rate of compound * [μmol/10^6cells/h]

S glucose concentration [M]

S^* set point glucose concentration [M]

S_{in} feed glucose concentration [M]

V	bioreactor volume [L]
X	total biomass concentration [10^6cells/mL]
$Y_{Gln/X}$	glutamine yield coefficient on cells [μmol/10^6cells]
$Y_{L/S}$	lactate yield coefficient on glucose [mol/mol]
$Y_{NH3/Gln}$	ammonia yield coefficient on glutamine [mol/mol]
$Y_{O2/S}$	oxygen yield coefficient on glucose [mol/mol]
$Y_{O2/X}$	oxygen yield coefficient on cells [μmol/10^6cells]
$Y_{S/X}$	glucose yield coefficient on cells [μmol/10^6cells]

α	multiplying constant
γ	standard deviation [M^2h^{-2}]
λ_f	forgetting factor
μ	specific growth rate [h^{-1}]
θ	estimator (system time constant) [h^{-1}]
$*_0$	intial values of *
$*_t$	* value at time t
$\hat{*}$	estimated variable *

II.8. Acknowledgment

The authors thank Danielle Jacob for her help with the bioreactor runs and Parminder Chahal for reviewing the manuscript. The French Fondation de l'École Polytechnique FX (Paris) and the Québec F.C.A.R. fund are greatfully acknowledged for their financial support.

II.9. Literature Cited

Bastin, G.; Dochain, D. On-line estimation and adaptive control of bioreactors. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V. **1990**.

Côté, J.; Garnier, A.; Massie, B.; Kamen, A. Serum-free production of recombinant proteins and adenoviral vectors by 293SF-3F6 cells. *Biotechnol. Bioeng.* **1998**, in press.

Dairaku, K.; Izumoto, E.; Morikawa, H.; Shioya, S.; Takamatsu, T. An advanced micro-computer coupled control system in a Baker's yeast fed-batch culture using a tubing method. *J. Ferment. Technol.* **1983**, *61*, 198-196.

Gaertner J. G.; Dhurjati, P. Fractional factorial study of hybridoma behavior. 2. Kinetics of nutrient uptake and waste production. *Biotechnol. Prog.* **1993**, *9, 309-316.*

Garnier, A.; Côté, J; Nadeau, I.; Kamen, A.; Massie, B. Scale up of the adenovirus expression system for the production of recombinant protein in human 293S cells. *Cytotechnology* **1994**, *15*, 145-155.

Glacken, M.W.; Fleischaker, R. J.; Sinskey, A. J. Reduction of waste product excretion via nutrient control: possible strategies for maximizing product and cell yield on serum in cultures of mammalian cells. *Biotechnol. Bioeng.* **1986**, *28*, 1376-1389.

Hsia,T. System identification. Lexington Books. **1977.**

Hu, W.S.; Aunins, J. Large scale mammalian cell culture. *Curr. Opin. Biotech.* **1997**, *8*, 148-153

Jordan, M.; Köhne, C.; Wurm, F. Calcium-phosphate mediated DNA transfer into HEK-293 cells in suspension: control of physicochemical parameters allows transfection in stirred media. *Cytotechnology*. **1998**, *26*, 39-47

Kamen, A.; Tom, R.; Caron, A.; Chavarie, C.; Massie B.; Archambault, J. Culture of insect cells in a helical ribbon impeler bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* **1991**, *38*, 619-628.

Konstantinov, K. Monitoring and control of the physiological state of cell cultures. *Biotechnol. Bioeng.* **1996**, *52*, 271-289.

Konstantinov, K.; Zhou, W.; Golini F.; Hu W. Expert systems in the control of animal cell culture processes: potentials, functions, and perspectives. *Cytotechnology.* **1994,** *14*, 233-246.

Kovesdi, I.; Brough, D.; Bruder, J.; Wickham, T. Adenoviral vectors for gene transfer. *Curr. Opin. Biotech.* **1997,** *8*, 583-589

Kurokawa, H.; Park, Y. S.; Lijima, S.; Kobayashi, T. Growth characteristics in fed-batch culture of hybridoma cells with control of glucose and glutamine concentrations. *Biotechnol. Bioeng.* **1994,** *44*, 95-103.

Male, K.; Gartu, O.; Kamen, A.; Luong, J. On line monitoring of glucose in mammalian cell culture using a flow injection analysis (FIA) mediated biosensor. *Biotechnol. Bioeng.* **1997,** *55*, 497-504.

Miller, W. M. Akinetic analysis of hybridoma growth and metabolism [Dphil thesis]. University of California, Berkeley, CA, USA; **1987.**

Nadeau, I.; Garnier, A.; Côté, J.; Massie, B.; Chavarie, C.; Kamen, A. Improvement of recombinant protein production with the human adenovirus/239S expression system using fed-batch strategies. *Biotechnol. Bioeng.* **1996,** *51*, 613-623.

Newland, M.; Greenfield P.F.; Reid, S. Hybridoma growth limitations: the roles of energy metabolism and ammonia production. *Cytotechnology* **1990,** *3*, 215-229.

Omasa, T.; Higashiyama, K; Shioya S.; Suga, K Effects of lactate concentration on hybridoma culture in lactate-controlled fed-batch operation. *Biotechnol. Bioeng.* **1992,** *39*, 556-564.

Ozturk, S. S.; Thrift, J. C.; Blackie, J. D.; Naveh, D. Real-time monitoring and control of glucose and lactate concentrations in a mammalian cell perfusion reactor. *Biotechnol. Bioeng.* **1997,** *53*, 372-378.

Schneider, M.; Marison, I. W.; Stockar, U. The importance of ammonia in mammlian cell culture. *J. Biotechnol.* **1996,** *46*, 161-185.

Siegwart, P. Modélisation et contrôle adaptatif de la croissance de cellules HEK-293 en milieu sans sérum. Montréal (QC): Ecole Polytechnique de Montréal; **1998**. Available from: University Microfilm International (U.M.I.).

Sonnleitner, B.; Käppeli, O. Growth of Saccharomyces cerevisiae is controlled by its limited respiratory capacity: formulation and verification of a hypothesis. *Biotechnol. Bioeng.* **1985,** *28*, 927-937.

Voet, D.; Voet, J. G. Biochemistry. USA: John Wiley and sons. Second edition, **1994**.

Weatherburn, M. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Anal. Chem.* **1967,** *39*, 971-974.

Xie, L.; Wang, D. Energy metabolism and ATP balance in animal cell cultivation using a stoichiometrically based reaction network. *Biotechnol. Bioeng.* **1996,** *52*, 591-601.

Xie, L.; Wang, D. Material balance studies on animal cell metabolism using a stoichiometrically based reaction network. *Biotechnol. Bioeng.* **1996,** *52*, 579-590.

Zeng A. P.; Deckwer, W. D. Mathematical modeling and analysis of glucose and glutamine utilization and regulation in cultures of continuous mammlian cells. *Biotechnol. Bioeng.* **1995,** *47*, 334-346.

Zhou W.; Hu W. S. Effect of insulin on a serum-free hybridoma culture. *Biotechnol. Bioeng.* **1995,** *47*, 181-185.

CHAPITRE III
MODÉLISATION ET CONTRÔLE

Deux modélisations de la croissance cellulaire sont proposées pour rendre compte des observations expérimentales. Ces modèles permettent d'approfondir la connaissance du métabolisme du glucose dans les cellules animales. Ils sont également particulièrement utiles pour développer les contrôleurs adaptatifs et estimateurs de taux de réaction présentés dans ce chapitre. Une troisième partie présente une nouvelle stratégie d'alimentation en glucose pour contrôler directement un paramètre physiologique de la glycolyse.

III.1. Modèle de croissance I

Une des problématiques principales soulignée précédemment liée à la culture de cellules de mammifères est la production de lactate par la glycolyse. Glucose et glutamine sont les deux principales sources d'énergie des cellules. Dans la modélisation qui suit on ne considérera pas la glutamine. On suppose qu'elle n'est pas un facteur limitant dans le domaine de validité du modèle.

On se propose de modéliser le système par une réaction d'oxydation (respiration) et une réaction de glycolyse (fermentation) du glucose. L'originalité du modèle réside dans le fait que ces deux voies métaboliques sont supposées être entièrement découplées. En réalité, la glycolyse et la voie oxydative partagent une première étape commune de transformation du glucose en pyruvate. Les taux élevés de viabilité (95%) observés pour cette lignée cellulaire (Chapitre 2) permettent de négliger la mortalité cellulaire.

<u>Respiration:</u> (3.1) **S** + **C** $\xrightarrow{\quad}$ **X** + **G**

<u>Fermentation:</u> (3.2) **S** $\xrightarrow{\quad}$ **X** + **L**

Notations:

S Concentration de glucose [M]

X Concentration de biomasse [10^6cells/mL]

C Concentration d'oxygène [M]

G Concentration de CO_2 [M]

L Concentration de lactate [M]

La flèche de retour de réaction indique une réaction auto-catalytique de la biomasse. Autrement dit, les taux de réactions sont proportionnels à X (Bastin et Dochain 1990).

III.1.1 Modélisation

D'après les bilans élaborés à partir du schéma réactionnel (3.1) et (3.2) on obtient le modèle d'état suivant:

$$(3.3)\quad \frac{dS}{dt} = -DS - k_1\mu_R X - k_4\mu_F X + DS_{in}$$

$$(3.4)\quad \frac{dX}{dt} = -DX + \mu_R X + \mu_F X$$

$$(3.5)\quad \frac{dC}{dt} = -DC - k_2\mu_R X + kla_C(C_S - C)$$

$$(3.6)\quad \frac{dG}{dt} = -DG - k_3\mu_R X + kla_G(G_S - G)$$

$$(3.7)\quad \frac{dL}{dt} = -DL + k_5\mu_F X$$

$$(3.8)\quad \frac{dV}{dt} = DV = F$$

Notations:

μ_R Taux spécifique de réaction d'oxydation (Respiration) [h^{-1}]

μ_F Taux spécifique de glycolyse (Fermentation) [h^{-1}]

k_* Coefficients de rendement [$\mu mol/10^6 Cells$]

kla_* Coefficients de transfert de masse [h^{-1}]

D Taux de dilution [h^{-1}]

S_{in} Concentration en glucose de la solution d'alimentation [M]

C_S Concentration de saturation d'oxygène dissous [M]

G_S Concentration de saturation CO_2 dissous [M]

Sous forme matricielle:

$$(3.9)\quad \frac{d}{dt}\begin{bmatrix} S \\ X \\ C \\ G \\ L \end{bmatrix} = -D\begin{bmatrix} S \\ X \\ C \\ G \\ L \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} -k_1 & -k_4 \\ 1 & 1 \\ -k_2 & 0 \\ k_3 & 0 \\ 0 & k_5 \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} \mu_R X \\ \mu_F X \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} DS_{in} \\ 0 \\ kla_C(C_S - C) \\ kla_G(G_S - G) \\ 0 \end{bmatrix}$$

III.1.2 Les taux spécifiques de réaction

Le taux spécifique de respiration μ_R est défini comme une fonction de Monod du glucose S et d'inhibition non-compétitive par le lactate (Tziampazis et al. 1994). L'inhibition par le lactate sur la croissance n'a pas directement été observée avec les cellules 293S (Nadeau et al. 1996), mais de par l'ajout de base $NaHCO_3$ pour contrôler le pH à 7.2, la production de lactate induit une augmentation d'osmolarité du milieu qui inhibe la croissance cellulaire. Le taux spécifique de fermentation μ_F est également choisi comme une fonction de Monod du glucose, mais sans inhibition par le lactate.

$$(3.10)\quad \mu_R = \mu_R^* \frac{S}{K_R + S} \cdot \frac{K_L}{K_L + L}$$

$$(3.11)\quad \mu_F = \mu_F^* \frac{S}{K_F + S}$$

On néglige par ailleurs les termes d'énergie de maintenance comme l'a justifié Zeng et al. (1995). Les paramètres μ_R^*, K_R, K_L, μ_F^*, et K_F sont calculés d'après les données expérimentales (voir section suivante). Pour rendre compte des observations de Glacken et al. (1986), de Kurokana et al. (1994), Ljunggren et al. (1994) et de Nadeau et al. (1996) sur la diminution de la glycolyse à concentration réduite de glucose dans le milieu, on suppose que la réaction d'oxydation est beaucoup plus sensible à la réduction de concentration de glucose que la réaction de glycolyse ou en terme mathématique: $K_R << K_F$.

La concentration d'oxygène n'apparaît pas dans les taux de réactions, car on considère que dans les conditions normales de contrôle à 40%, l'oxygène dissous (DO) n'est pas limitant. Tziampazis et al. (1994) ont rapporté que les taux de réactions sont presque indépendants de la DO si celle-ci reste dans un certain domaine (entre 20 et 60%). Les acides aminés, en particulier la glutamine, et facteurs de croissances ne sont pas non plus intégrés; le modèle ne sera valable que dans un domaine où ces composés ne limitent pas la croissance.

III.1.3 Relations entre coefficients de rendement

On peut lier certains coefficients de rendement de réaction entre eux par des considérations énergétiques ou par des bilans de masse.

La glycolyse produit 2 moles d'ATP et la voie oxydative 36 moles d'ATP par mole de glucose (Voet et Voet 1995, Nadeau et al. 1996b). Le rapport énergétique théorique est x=18.

(3.12) $k_4 = xk_1$ ou $Y_{SFerm/XResp} = xY_{SResp/XResp}$

Ce rapport reste théorique et sera remis en cause par les données expérimentales (section suivante).

Le coefficient de respiration RQ est pour les cellules animales très proche de 1 (Bonarius et al. 1995, Xie et al. 1996):

(3.13) $k_3 = k_2$ ou $Y_{G/XResp} = Y_{C/XResp}$

Par conservation du carbone, une mole de glucose est glycolysée en deux moles de lactate ($Y_{L/SFerm} = 2$):

(3.14) $k_5 = 2k_4$ ou $Y_{LFerm/XResp} = 2Y_{SFerm/XResp}$

Si le glucose utilisé comme source de carbone est négligé et si on ignore l'oxydation des autres composés, on a par conservation de l'oxygène et du carbone:

(3.15) $k_2 = 6k_1$ ou $Y_{C/XResp} = 6Y_{SResp/XResp}$

k_2 sera également ré-estimé d'après les paramètres de culture mesurés expérimentalement (section suivante).

k_1 est supposé constant et est ajusté en fonction des données expérimentales (section suivante). On négligera les termes de maintenance cellulaire (Zeng et al. 1995).

III.1.4 Variables des transferts de masse gazeux

L'aération du bioréacteur est réalisée par un transfert de surface (Kamen et al. 1991). Il n'y a pas de bullage pour minimiser le stress sur les cellules par les forces de cisaillement. Le taux de transfert de l'oxygène kla_C dépend principalement des caractéristiques hydrodynamiques du bioréacteur (configuration des pales, hélice, vitesse d'agitation, et volume). Typiquement pour les réacteurs utilisés (Chapitre 2), kla_C varie de 1 à 4 h^{-1}. Le coefficient de transfert pour le dioxyde de carbone kla_G est égal à 0.98 x kla_C (Bonarius et al. 1994) car son coefficient de diffusion est plus faible que celui de l'oxygène (Bird et al. 1960). Peu d'attention sera portée sur le dioxyde de carbone dans cette étude.

Les concentrations de saturation d'oxygène et de dioxide de carbone sont reliées aux pressions partielles respectives par leurs constantes de Henry.

(3.16) $H_C = 957$ atm/M (Kyung et al. 1994)

(3.17) $H_G = 28.97$ atm/M (Bonarius et al. 1995) (corrigé pour le milieu par le coefficient de Bunsen)

On contrôle la concentration d'oxygène dissous à 40% de la saturation de l'air, soit:

(3.18) $C_S = 0.4x0.21/H_C$

III.1.5 Valeurs initiales des variables d'état

Tableau 3.1 : Valeurs des conditions initiales des expériences en cuvée et en cuvée alimentée.

	Culture		
	Cuvée alimentée	Cuvée	Unités
X_0	0.18	0.34	[10^6cells/mL]
S_0	21	1	[mM]
C_0	0.0916	0.0916	[mM] (P_{O2}=0.084 atm)
G_0	5.2	5.2	[mM] (P_{CO2}=0.15 atm)
L_0	0.13	1.4	[mM]
V_0	19	2.9	[L]

III.1.6 Utilisation des données expérimentales

Les paramètres physiologiques des cellules déterminés lors des cultures en cuvée (Côté et al. 1997, Chapitre 2) et en glucose cuvée alimentée, avec les cellules 293SF dans un milieu sans sérum, sont décrites dans le Chapitre 2. Les valeurs de ces paramètres sont données dans les tableaux 2.1 et 2.2. La troisième phase des cultures ne sera pas couverte par le modèle car la glutamine n'y a pas été intégrée.

En négligeant les termes de dilution (puisque D reste faible), on peut exprimer les paramètres du modèles μ_R, μ_F, k_1, et k_4 en fonction de x et des divers coefficients de rendement mesurés (Tableau 2.1). Le principe est de dissocier l'utilisation du glucose

($dS=dS_R+dS_F$) et la production de biomasse ($dX=dX_R+dX_F$) en fonction des deux réactions. L'Annexe 2 donne le détail des calculs. On obtient les relations:

(3.19) $$\mu=\mu_R+\mu_F$$

(3.20) $$Y_{S/X}=k_1\frac{\mu_R+x\mu_F}{\mu_R+\mu_F}$$

(3.21) $$Y_{S/L}=\frac{1}{2}\left[1+\frac{\mu_R}{x\mu_F}\right]$$

(3.22) $$Y_{X/O_2}=\frac{1}{k_3}\left[1+\frac{\mu_F}{\mu_R}\right]$$

On peut en déduire les paramètres du modèle:

(3.23) $$k_1=Y_{S/X}-\frac{x-1}{2x}Y_{L/X}$$

(3.24) $$\mu_F=\frac{1/x}{(2Y_{S/L}-1)+1/x}\mu$$

(3.25) $$\mu_R=\frac{(2Y_{S/L}-1)}{(2Y_{S/L}-1)+1/x}\mu$$

(3.26) $$k_2=Y_{O_2/X}\left[1+\frac{\mu_F}{\mu_R}\right]$$

Le taux spécifique de croissance μ ne semble pas être un paramètre parfaitement reproductible. Les cultures en cuvée et en cuvée alimentée ont été réalisées dans des réacteurs différents (respectivement 3.5 L et 22 L). Par ailleurs les inocula étaient issus de lots différents de cellules 293SF congelées. Le nombre de passage pour l'inoculum de l'expérience en cuvée était également bien supérieur à l'autre inoculum. La différence de taux spécifique de croissance pour les deux cultures est exogène à la modélisation et dépend de l'histoire des cellules.

Le paramètre x est ajusté pour que k_1, k_2 et μ_R varient le moins possible pour les deux phases des deux expériences. Si l'on prend x=18 comme donné en théorie par le rapport énergétique des deux voies (Tableau 3.1), la contribution énergétique de la glycolyse à la croissance devient supérieure à celle de la respiration en phase 1 de la culture en cuvée. k_2 varie d'un facteur 2 (phase 1) entre la culture en cuvée et la culture en cuvée alimentée. Ceci vient contredire les observations du Chapitre 2 (la respiration produit l'énergie nécessaire à la croissance).

Tableau 3.2 : Paramètres du modèle de croissance I d'après les données expérimentales pour x=18.

x=18		Batch		Glucose 1mM	
		Phase 1	Phase 2	Phase 1	Phase 2
	[10^6Cells/mL]	X < 1	1<X<3	X < 1	1<X<3
μ_R	[h^{-1}]	0.0096	0.0201	0.0277	0.0318
μ_F	[h^{-1}]	0.0127	0.0017	0.0061	0.0012
k_1	[µmol/10^6Cells]	1.40	1.00	0.76	1.3
k_2	[µmol/10^6Cells]	20.5	9.5	8.7	7.9
k_4	[µmol/10^6Cells]	25	18	14	23

Pour corriger ce problème, il faut augmenter x. La contribution de la fermentation à la croissance en est alors réduite pour le même taux de production de lactate. Le Tableau 3.2 donne les valeurs des paramètres.

Tableau 3.3 : Paramètres du modèle de croissance I d'après les données expérimentales pour x=100.

x=100		Batch		Glucose 1mM	
		Phase 1	Phase 2	Phase 1	Phase 2
	[10^6Cells/mL]	X < 1	1<X<3	X < 1	1<X<3
μ_R	[h^{-1}]	0.0180	0.0215	0.0325	0.0328
μ_F	[h^{-1}]	0.0043	0.0003	0.0013	0.0002
k_1	[µmol/10^6Cells]	0.74	0.93	0.64	1.2
k_2	[µmol/10^6Cells]	10.9	8.9	7.4	7.6
k_4	[µmol/10^6Cells]	74	93	64	122

On retient ainsi comme valeurs moyennes pour décrire les phases 1 des deux expériences:

$k_1 = 0.7$ µmol/10^6cells/mL

$k_2 = 8.5$ µmol/10^6cells/mL

$k_4 = 70$ µmol/10^6cells/mL

Par contre, on a déjà mentionné que le modèle ne peut rendre compte de la différence des taux de croissance spécifiques entre les deux expériences (0.0223 contre 0.0338 en phase 1). On doit alors corriger la valeur de μ_R^* spécifiquement pour les deux expériences:

μ_R^*(cuvée) = 0.0180 h^{-1}

μ_R^*(cuvée alimentée) = 0.0325 h^{-1}

μ_F^* est donné par la valeur maximale de fermentation (cuvée phase 1).

$\mu_F^* = 0.0043$ h^{-1}

K_F est calculé de façon à ce que pour S=1 mM, μ_R soit égale à 0.0013 h^{-1} (cuvée alimentée, phase 1). Ainsi:

$K_F = 2.1$ mM

K_R est choisi très petit (0.1mM) et K_L très grand (200 mM), puisque le lactate ne semble pas inhiber la croissance dans ces conditions avec ce type de cellules.

III.1.7 Simulations sur MATLAB®

Les Figures 3.1 et 3.2 montrent les résultats des simulations avec les paramètres définis dans la partie précédente. L'oxygène est contrôlé par le contrôleur adaptatif défini plus loin. Le glucose est contrôlé à 1 mM dans la simulation de la cuvée alimentée par le contrôleur adaptatif présenté au Chapitre 2.

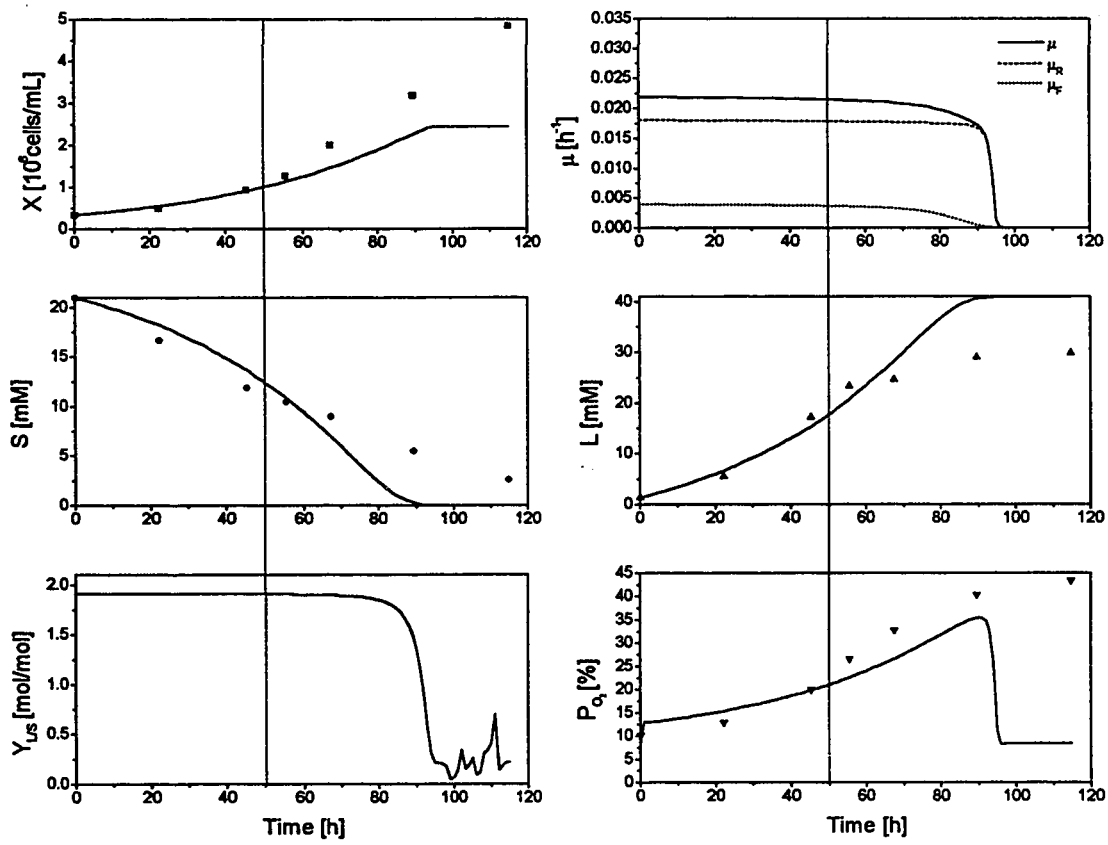


Figure 3.1 : Simulation du modèle I de croissance en cuvée avec une concentration de glucose initiale de 21 mM. Les symboles représentent les données expérimentales.

Le problème de concordance entre la pression partielle d'oxygène P_{O2} réelle et calculée par le modèle s'explique par l'erreur d'estimation du kla_C.

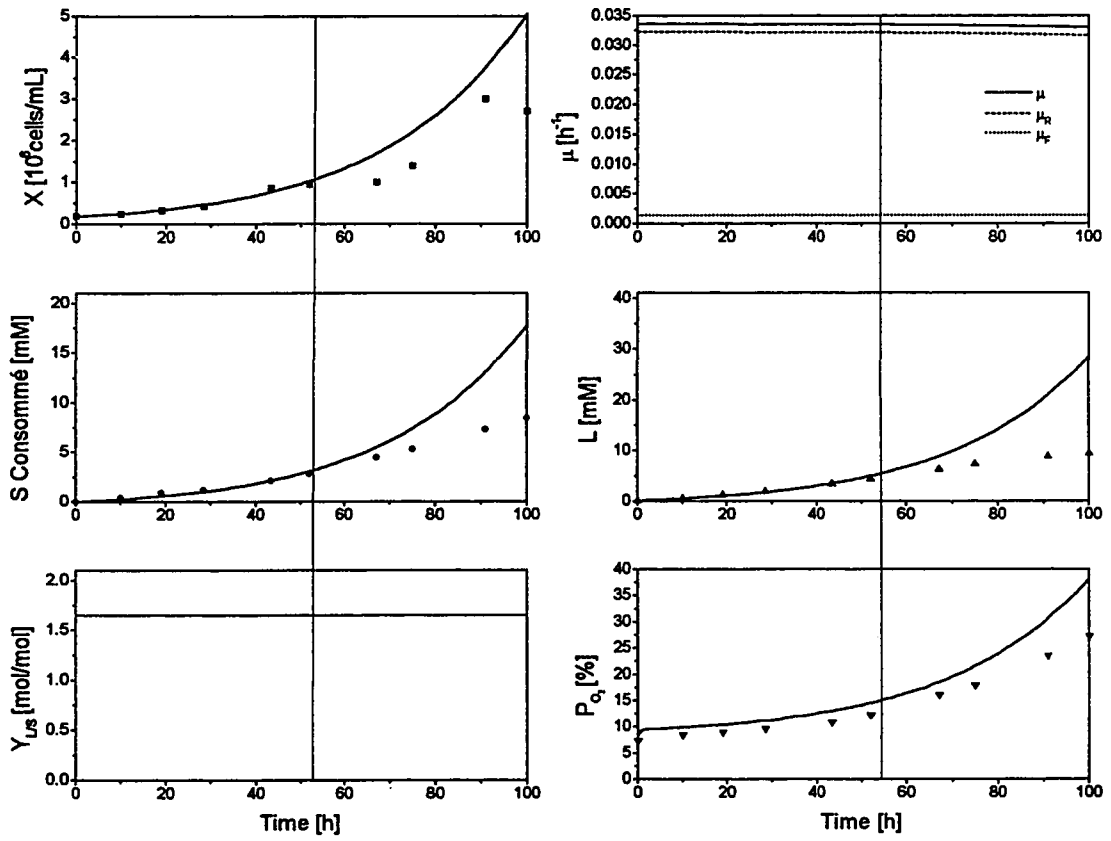


Figure 3.2 : Simulation du modèle I de croissance en cuvée alimentée avec contrôle de glucose à 1 mM par un contrôleur adaptatif. Les symboles représentent les données expérimentales.

Le modèle représente bien la culture dans la première phase. Il est capable de suivre la réduction de glycolyse par le contrôle de glucose à faible concentration. Les coefficients $Y_{L/S}$ (1.95 et 1.65) sont proches des coefficients calculés rapportés au Tableau 2.1 en première phase de culture. Il n'en reste pas moins que le changement de métabolisme observé en phase 2 n'est pas intégré par le modèle. Ce changement d'état

physiologique est particulièrement important dans le cas de la culture en cuvée alimentée. Le taux spécifique de consommation de glucose chute alors d'un facteur 6 (Tableau 2.2).

Cet échec partiel vis à vis de la deuxième phase de culture, nous pousse à développer un autre modèle intégrant le transport de glucose par les cellules (section III.2).

III.1.8 Contrôleurs adaptatifs

III.1.8.1 Contrôle de l'oxygène dissous

En culture on veut contrôler la concentration d'oxygène dissous à un niveau constant C^*. Dans les expériences du Chapitre 2, C^* est fixé à 40% de la saturation de l'air soit 0.0916 mM. La dynamique de l'oxygène dissous est donnée par (3.5)

$$(3.5) \quad \frac{dC}{dt} = -DC - k_2\mu_R X + kla_C(C_S - C)$$

De la même façon qu'au Chapitre 2 pour le contrôle de la concentration de glucose, on veut imposer une convergence exponentielle de C vers C^*.

$$(3.27) \quad \frac{d(C^* - C)}{dt} = \lambda_C(C^* - C)$$

En combinant (3.5) et (3.27), on obtient la loi de commande:

$$(3.28) \quad C_S = C + \frac{1}{kla_C}\left[\lambda_C(C^* - C) + DC + k_2\mu_R X\right]$$

En réalité on commande la fraction partielle d'oxygène dans la tête du réacteur:

$$(3.29) \quad P_{O_2} = H_C C_S = H_C C + \frac{H_C}{kla_C}\left[\lambda_C(C^* - C) + DC + k_2\mu_R X\right]$$

Avec les conditions aux limites:

(3.30) $P_{O2} > 0$ et $P_{O2} < 1$ atm

Il y a deux difficultés liées à ce contrôleur: l'OUR ($k_2\mu_R X$) n'est pas connu et le coefficient de transfert de masse kla_C est en général mal connu et n'est pas constant au cours de la culture.

Supposons kla_C connu:

On peut définir l'estimateur:

(3.31) $$\theta_C = [k_2 \mu_R X]/C$$

On utilise alors la méthode d'estimation indirecte proposée par Bastin et Dochain (1990).

(3.32) $$\begin{cases} \dfrac{d\hat{C}}{dt} = -DC - \hat{\theta}_C C + kla_C (C_s - C) + \omega_C (C - \hat{C}) \\ \dfrac{d\hat{\theta}_C}{dt} = -\gamma_C C (C - \hat{C}) \end{cases}$$

Le dynamique d'erreur est donnée par :

(3.33) $$\frac{d}{dt}\begin{bmatrix} \hat{C} - C \\ \hat{\theta}_C - \theta_C \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} -\omega_C & -C \\ \gamma_C C & 0 \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} \hat{C} - C \\ \hat{\theta}_C - \theta_C \end{bmatrix} + \underbrace{\begin{bmatrix} 0 \\ -d\theta_C/dt \end{bmatrix}}_{\text{Perturbation}}$$

Le choix des paramètres (3.34) est encore donné par la matrice d'erreur (3.33) dont λ_1 et λ_2 sont les valeurs propres négatives :

(3.34) $$\begin{cases} \omega_C = -\lambda_1 - \lambda_2 \\ \gamma_C = \lambda_1 \lambda_2 / C^2 \end{cases}$$

Le contrôle sous simulation est efficace et l'estimateur converge rapidement avec λ_1 et λ_2 égaux à -5. La robustesse du contrôleur aux perturbations et aux erreurs de mesure ne sera pas examinée dans ce travail.

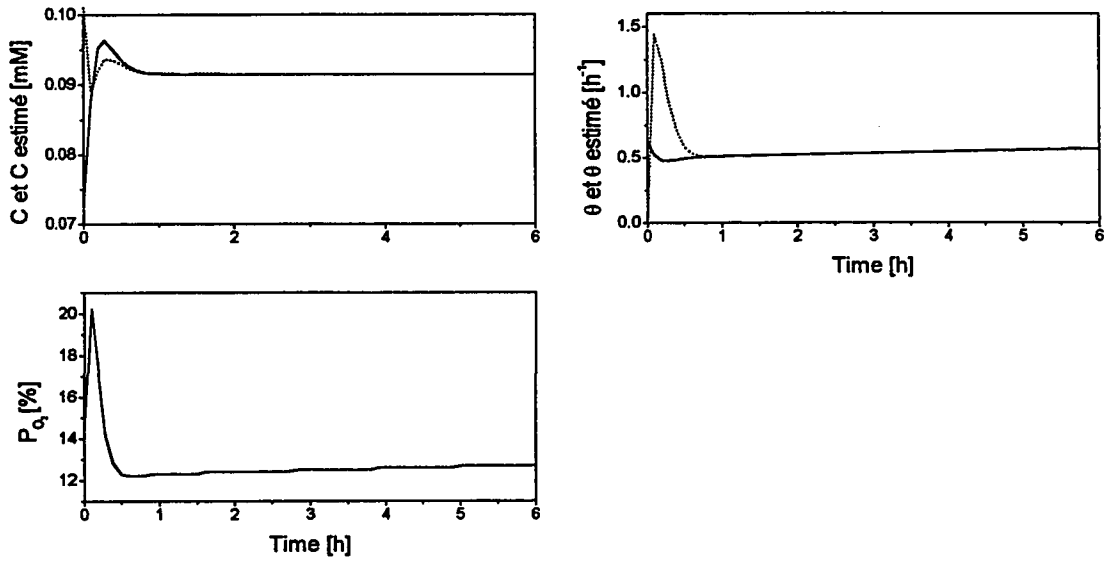


Figure 3.3 : Contrôle de l'oxygène dissous à 40% par le contrôleur adaptatif estimateur/observateur. Le kla_C est supposé connu (1.1 h^{-1}).

Considérant un kla_C de 1.1 h^{-1} (donc un temps de réponse du système de 1 heure) les performances du contrôleur sont très satisfaisantes. L'observateur de C converge en 50 minutes et, même avec un mauvais estimé au départ, C est ramené à son point de consigne en 40 minutes. Le contrôleur ajuste ensuite P_{O2} pour contrôler C constant tout au long de la culture (données non montrées).

kla_C inconnu:

Il est impossible d'estimer en même temps l'OUR (via θ_C) et le kla_C avec la seule mesure de C. Le système n'est pas observable. Cependant on peut tenter de réduire le nombre d'inconnues en les regroupant. On réarrange (3.28):

$$(3.35)\quad C_s = C + \left[\frac{\lambda_C}{kla_C}\right](C^* - C) + \left[\frac{DC + k_2\mu_R X}{kla_C}\right]$$

On définit :

$$(3.36)\quad \theta_C^2 = \frac{DC + k_2 \mu_R X}{kla_C} \quad \text{et}$$

$$(3.37)\quad \lambda_C^2 = \frac{\lambda_C}{kla_C}$$

On estime alors θ_C^2 et la variation de kla_C au cours de la culture étant en général raisonnable, elle n'affectera pas substantiellement la 'force' du contrôleur λ_C^2 dans l'équation (3.37).

θ_C^2 est estimé directement (Bastin et Dochain 1990), C étant le régresseur:

$$(3.38)\quad \frac{d\theta_C^2}{dt} = \gamma_C C(C^* - C)$$

Il faudrait ajouter les conditions qui bornent la commande C_S:

$$(3.39)\quad C_S > 0 \text{ et } C_S < 1/H_C$$

La figure 3.4 démontre la performance de ce contrôle en simulation. A t=20 h, le kla_C chute de 40% de sa valeur initiale (1.1 h^{-1}) et augmente à t=30 h pour retourner à 1.1 h^{-1}. λ_C^2 a été fixé à 30 h^{-1} et θ_C^2 à 10^{10} - cette valeur est élevée car les unités de la concentration de C sont en mol/L; en mmol/L, θ_C^2 serait égal à 10000. θ_C^2 converge en moins d'une heure et l'amplitude de la perturbation sur C est de 5%. Ce contrôleur mériterait d'être testé en culture.

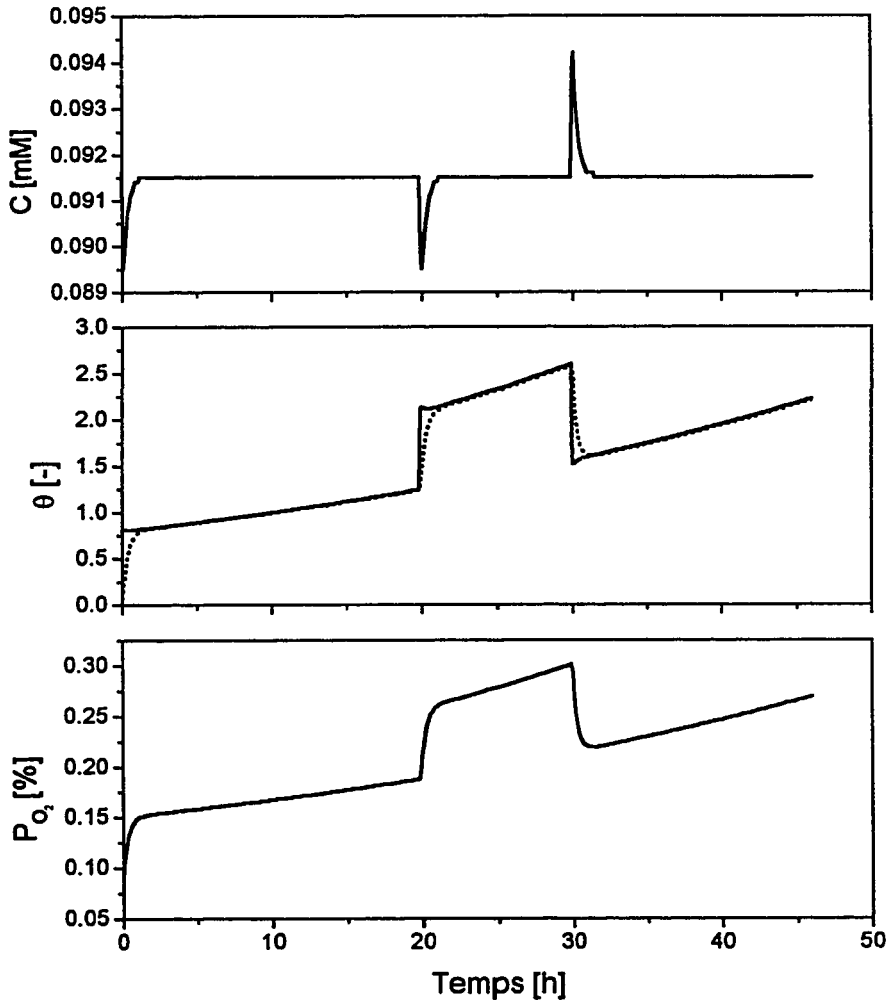


Figure 3.4 : Contrôle de l'oxygène dissous à 40% par le contrôleur adaptatif modifié. Le kla_C est inconnu et n'est pas estimé.

III.1.8.2 Contrôle de la concentration de glucose

Ce contrôleur a été présenté au Chapitre 2 dans sa version mesure en continue (2.8), (2.9), (2.10) et (2.11) (estimateur direct) et dans sa version discrétisée (2.12), (2.13) et (2.14) (estimation des moindres carrés).

Dans le cas de l'estimateur direct, ω_S et γ_S sont choisi de la même façon que pour le contrôle de l'oxygène dissous:

$$(3.40)\quad \begin{cases} \omega_S = -\lambda_1 - \lambda_2 \\ \gamma_S = \lambda_1\lambda_2 / S^2 \end{cases}$$

Le système étant plus lent $\lambda_1=\lambda_2=-2$ convient. La figure 3.5 présente les résultats. L'estimateur de θ_S converge en 4 heures et l'observateur de S converge en 1 heure. La valeur initiale de la concentration de glucose étant de 1.1 mM, les cellules consomment cet excès en 4 heures, puis le contrôleur maintient parfaitement S à 1 mM.

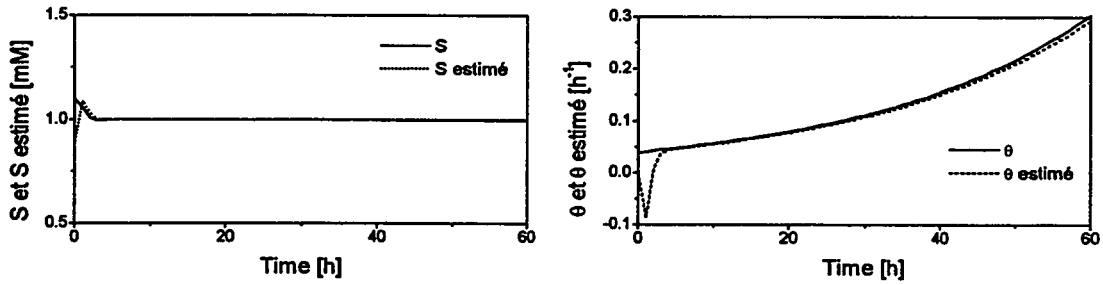


Figure 3.5 : Contrôle de la concentration de glucose à 1 mM par le contrôleur adaptatif estimateur/observateur.

La discussion au Chapitre 2 d'une formule adaptative de la force du contrôleur C_S pour le contrôleur discrétisé s'applique aussi bien à ce contrôleur observateur/estimateur. On peut reprendre les formules (2.14) ou (2.15) pour améliorer le contrôle à haute densité cellulaire.

III.1.9 Estimateurs de taux spécifiques de réaction

III.1.9.1 Estimateur du taux spécifique de croissance μ

Aujourd'hui certaines sondes de mesure de biomasse sont disponibles sur le marché et leur fiabilité semble être démontrée. Il existe des sondes mesurant la densité optique (turbidité) par un laser et d'autres mesurant la capacitance du milieu. On peut ainsi s'appuyer sur une mesure en ligne et fiable de la concentration cellulaire si la taille des cellules reste constante, pour estimer le taux spécifique de croissance. μ est bien souvent le paramètre physiologique principal d'une culture. On peut ensuite définir une stratégie pour le maximiser.

Comme expliqué dans les sections précédentes, on applique le même observateur/estimateur de X et μ.

$$(3.41)\quad \frac{d\hat{X}}{dt} = -DX + \hat{\mu}X + \omega_X(X - \hat{X})$$

$$(3.42)\quad \frac{d\hat{\mu}}{dt} = \gamma_X X(X - \hat{X})$$

$$(3.43)\quad \begin{cases} \omega_X = -\lambda_1 - \lambda_2 \\ \gamma_X = \lambda_1\lambda_2 / X^2 \end{cases}$$

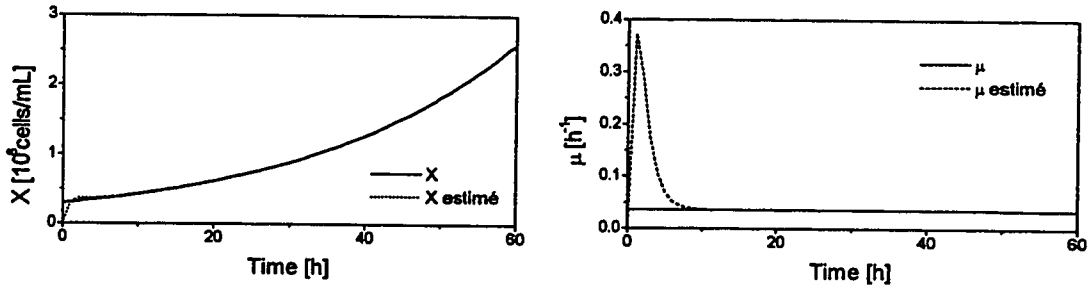


Figure 3.6 : Estimateur du taux spécifique de croissance μ.

Le figure 3.6 présente les performances de l'estimateur avec $\lambda_1=\lambda_2=-1$. L'estimateur de μ converge en 9 heures tandis que l'observateur converge en 3 heures

III.1.9.2 Estimation de μ_R et μ_F

On peut envisager la mesure simultanée du glucose (Male et al. 1997a) et du lactate (Male et al. 1997b) avec le système présenté au Chapitre 2. Dans ce cas il faut connaître les coefficients de rendement k_i et mesurer X par les moyens rapportés au paragraphe précédent. On définit de nouveau les observateurs/estimateurs d'état cette fois en dimension quatre (Bastin et Dochain 1990). X est le régresseur.

$$(3.44)\quad \begin{cases} \dfrac{d\hat{S}}{dt} = -DS - k_1\hat{\mu}_R X - k_4\hat{\mu}_F X + DS_{in} + \omega_1(S-\hat{S}) \\ \dfrac{d\hat{L}}{dt} = -DL + k_5\hat{\mu}_F X + \omega_2(L-\hat{L}) \end{cases}$$

$$(3.45)\quad \begin{cases} \dfrac{d\hat{\mu}_R}{dt} = -\gamma_1 k_1 X(S-\hat{S}) \\ \dfrac{d\hat{\mu}_F}{dt} = -\gamma_1 k_4 X(S-\hat{S}) + \gamma_2 k_5 X(L-\hat{L}) \end{cases}$$

Il faut choisir les paramètres ω_1, ω_2 et γ_1, γ_2 pour assurer la convergence. La dynamique d'erreur s'écrit :

$$(3.46)\quad \frac{d}{dt}\begin{bmatrix} \hat{S}-S \\ \hat{L}-L \\ \hat{\mu}_R-\mu_R \\ \hat{\mu}_F-\mu_F \end{bmatrix} = M_{erreur}\cdot\begin{bmatrix} \hat{S}-S \\ \hat{L}-L \\ \hat{\mu}_R-\mu_R \\ \hat{\mu}_F-\mu_F \end{bmatrix} + V_{Perturbation}$$

La matrice 4x4 de l'équation différentielle d'erreur est :

$$(3.47)\quad M_{erreur} = \begin{bmatrix} -\omega_1 & 0 & -k_1X & -k_4X \\ 0 & -\omega_2 & 0 & k_5X \\ k_1X\gamma_1 & 0 & 0 & 0 \\ k_4X\gamma_1 & -k_5X\gamma_2 & 0 & 0 \end{bmatrix}$$

MATLAB® ne permet pas de résoudre symboliquement le problème (imposer des valeurs propres négatives). Le polynôme caractéristique est:

$$(3.48)\quad P(x)=x^4+(\omega_1+\omega_2)x^3+\ldots+(k_1k_2k_5^2X^4\gamma_1\gamma_2)$$

Si on note λ_i les valeurs propres, le polynôme caractéristique s'écrit:

$$(3.49)\quad P(x)=x^4-(\lambda_1+\lambda_2+\lambda_3+\lambda_4)x^3+\ldots+\lambda_1\lambda_2\lambda_3\lambda_4$$

Les coefficients du polynôme sont tous positifs si ω_i et γ_i sont strictement positifs, ce qui assure que les parties réelles des racines (les valeurs propres) sont négatives et que le système des estimateurs converge. La forme des résolutions des systèmes précédants nous incite à tenter:

$$(3.50)\quad \begin{cases}\omega_1=-\lambda_1-\lambda_2\\ \omega_2=-\lambda_3-\lambda_4\\ \gamma_1=\lambda_1\lambda_2\,/\,k_1k_5X^2\\ \gamma_2=\lambda_3\lambda_4\,/\,k_2k_5X^2\end{cases}$$

Malheureusement avec ces valeurs le système semble diverger (résultats non montrés). On a donc choisi des paramètres plus petits et constants (indépendants de X).

$$(3.51)\quad \begin{cases}\omega_1=5\\ \omega_2=5\\ \gamma_1=10^7\\ \gamma_2=10^5\end{cases}$$

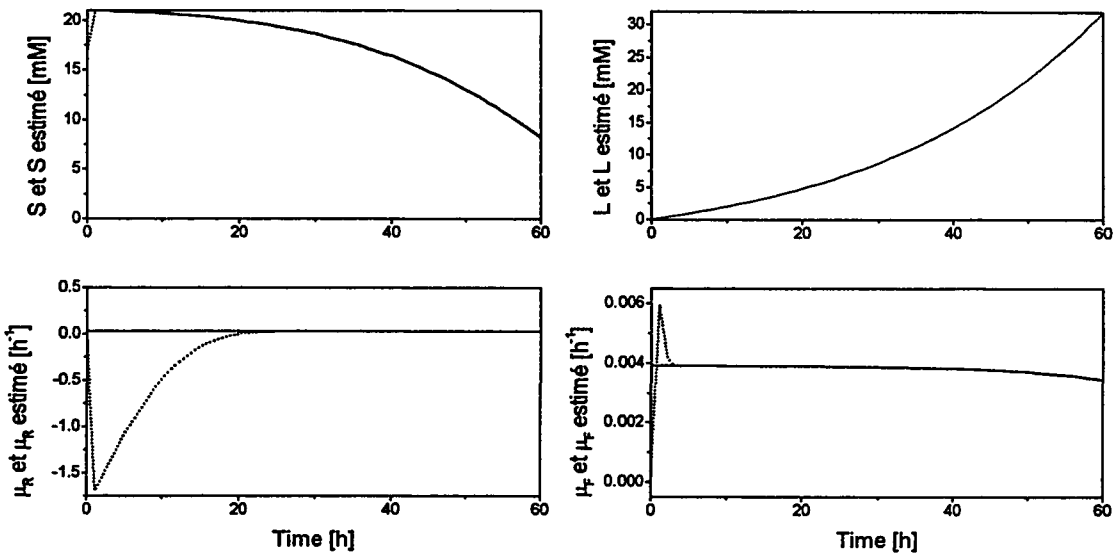


Figure 3.7 : Estimateur du taux spécifique de glycolyse et du taux spécifique de respiration par la mesure de S, L, et X.

La convergence de l'estimée de μ_F est rapide (3 heures) tandis que l'estimée de μ_R demande plus de 23 heures pour converger. Cela s'explique par le fait qu'on a relié dans (3.45) μ_F à S et L, mais μ_R seulement à S. On pourrait améliorer ces performances en diminuant les vitesses de convergence des observateurs de S et L (diminuer ω_1 et ω_2).

III.1.10 Observateur asymptotique

X et L sont choisis pour réaliser un 'Nice Partition' (Bastin et Dochain 1990) et S et L sont considérés comme étant mesurés. La tentative de programmation d'un observateur asymptotique a échoué et ne sera pas rapportée. Les détails des calculs sont tout de même en Annexe 3.

III.2. Modèle de croissance II

Pour corriger les imperfections du modéle I, le concept du transport du glucose par les cellules introduit au Chapitre 2 est inclus dans la modélisation. Le rôle des transporteurs de glucose dans les taux de réactions de glycolyse et d'oxydation est modélisé en Annexe 4. Une baisse de concentration de glucose dans le milieu, ainsi que la baisse de concentration des activateurs du transport (comme l'insuline, Voet et Voet 1995) ralentissent le transport de glucose dans la cellule et de ce fait le taux de glycolyse.

Transport (3.52) $S_{out} \longrightarrow S_{in}$

Le taux spécifique de réaction η_T est défini par rapport au glucose.

Respiration: (3.53) $S_{in} + C \longrightarrow X + G$

Le taux spécifique de réaction μ_R est défini par rapport à la biomasse.

Fermentation: (3.54) $S_{in} \longrightarrow X + L$

Le taux spécifique de réaction η_F est défini par rapport au glucose.

Notations:

S_{out}	Concentration de glucose dans le milieu	[M]
S_{in}	Concentration de glucose intracellulaire	[M]
X	Concentration de biomasse	[10^6cells/mL]
C	Concentration d'oxygène	[M]
G	Concentration de CO_2	[M]
L	Concentration de lactate	[M]

La flèche de retour indique une réaction auto-catalytique de la biomasse. Autrement dit, les taux de réactions sont proportionnels à X. La flèche en trait discontinu de la réaction (3.54) suggère une efficacité variable de la glycolyse à l'élaboration de la biomasse. Cette efficacité est mesurée par le paramètre κ variant de 0 à 1. Le surplus d'énergie alors produit est un gaspillage.

III.2.1 Modélisation

Par bilan à partir du schéma réactionnel on obtient les relations suivantes:

(3.55) $$\frac{dS_{out}}{dt} = -DS_{out} - \eta_T X + DS_{in}$$

(3.56) $$\frac{dS_{in}}{dt} = -k_1 \mu_R X - \eta_F X + \eta_T X$$

(3.57) $$\frac{dX}{dt} = -DX + \mu_R X + \frac{\kappa}{k_4} \eta_F X$$

(3.58) $$\frac{dC}{dt} = -DC - k_2 \mu_R X + kla_C (C_S - C)$$

(3.59) $$\frac{dG}{dt} = -DG - k_3 \mu_R X + kla_G (G_S - G)$$

(3.60) $$\frac{dL}{dt} = -DL + 2\eta_F X$$

(3.61) $$\frac{dV}{dt} = DV = F$$

Les mêmes définitions que pour le modèle I sont conservées pour les coefficients de rendement k_i. Sous l'hypothèse que les cellules n'accumulent pas de glucose, on peut considérer:

(3.62) $$\frac{dS_{in}}{dt} = 0$$

L'équation (3.56) avec (3.62) implique:

(3.63) $$\eta_T = k_1 \mu_R + \eta_F$$

Le flux de glucose entrant dans la cellule est directement orienté soit vers la voie oxydative, soit vers la glycolyse.

Sous forme matricielle:

$$(3.64)\quad \frac{d}{dt}\begin{bmatrix} S_{out} \\ X \\ C \\ G \\ L \end{bmatrix} = -D\begin{bmatrix} S_{out} \\ X \\ C \\ G \\ L \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & \kappa / k_4 \\ 0 & -k_2 & 0 \\ 0 & k_3 & 0 \\ 0 & 0 & 2 \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} \eta_T X \\ \mu_R X \\ \eta_F X \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} DS_{in} \\ 0 \\ kla_C(C_S - C) \\ kla_G(G_S - G) \\ 0 \end{bmatrix}$$

III.2.2 Les taux spécifiques de réaction

III.2.2.1 Le transport de Glucose

Puisque la membrane plasmique des cellules est imperméable au glucose, des transporteurs actifs et passifs (voir Chapitre 2) importent le glucose. On peut représenter le transport par une fonction de Monod de la concentration externe de glucose, puisqu'on suppose que la concentration interne de glucose est quasi nulle (pas d'accumulation). La vitesse maximale de transport dépend du nombre de ces transporteurs sur la membrane et de leur degré d'activation. Cette régulation est complexe et l'insuline est un activateur privilégié du transport (Voet et Voet 1995, Zhou et al. 1995).

$$(3.65)\quad \eta_T = \eta_T^*(t)\frac{S_{out}}{K_T + S_{out}}$$

$\eta_T^*(t)$ et K_T sont déterminés expérimentalement (section suivante).

III.2.2.2 L'oxydation du glucose

En reprenant les hypothèses sur les voies métaboliques du glucose présentées à la fin du Chapitre 2 et résumées par le schéma présenté à la Figure 2.12, on suppose que la voie d'oxydation du glucose est limitée à un maximum μ_R^* et qu'elle est prioritaire sur la

glycolyse. En conséquence, le flux de glucose entrant dans les cellules est oxydé jusqu'à un niveau de saturation μ_R^*.

$$(3.66)\quad \mu_R = MIN\left(\mu_R^*, \frac{\eta_T}{k_1}\right)$$

III.2.2.3 La glycolyse

Le flux de glucose excédentaire est orienté vers la glycolyse lorsque la voie oxydative est saturée. Pour rendre compte du fait que le taux de croissance des cellules n'est pas affecté par les différents niveaux de glycolyse (Chapitre 2, Xie et al. 1996b), on peut supposer que la voie oxydative fournit entièrement l'énergie nécessaire à la croissance cellulaire. Ainsi la glycolyse est une perte de glucose. Pour nuancer cette hypothèse, on considère que la glycolyse contribue tout de même à la croissance pour une fraction κ de l'énergie produite (équation 3.57). En reprenant les équations (3.63) et (3.66):

$$(3.67)\quad \eta_F = MAX\left(0, \eta_T - k_1 \mu_R\right)$$

III.2.3 Utilisation des données expérimentales

III.2.3.1 Taux de réactions et coefficients de rendement

Les paramètres physiologiques des cellules déterminés lors des cultures en cuvée (batch) (Côté et al. 1997, Chapitre 2) avec les cellules 293SF dans un milieu sans sérum sont utilisés, ansi que celles obtenues en cuvée alimentée (fed-batch) décrite dans le Chapitre 2. Les valeurs de ces paramètres sont donnés dans les tableaux 2.1 et 2.2.

Comme présenté et discuté au Chapitre 2, 3 phases ont été identifiées pendant l'évolution des cultures: une première phase de forte croissance avec un taux de consommation de glucose élevé, une deuxième phase encore de forte croissance mais avec

un taux de consommation de glucose réduit, et enfin une dernière phase où la croissance semblait limitée par la glutamine. Cette troisième phase ne sera pas couverte par le modèle car la glutamine n'y a pas été intégrée. Les changements métaboliques entre les phases 1 et 2, et entre les deux conditions de culture sont interprétés comme une variation de flux d'entrée de glucose dans les cellules par les transporteurs de glucose. D'après l'hypothèse d'auto-régulation retenue au Chapitre 2, la transition entre les phases 1 et 2 est supposée être due à la diminution de l'activité η_T des transporteurs. Le contrôle du glucose à faible concentration réduit le taux spécifique de transport de glucose. Cette propriété est caractérisée par K_T (fonction de Monod).

En négligeant les termes de dilution (puisque D reste faible), on peut exprimer les paramètres du modèles η_T, η_F, k_1, k_4 et μ_R en fonction de κ, x et des divers coefficients de rendement mesurés. Le glucose transporté dans les cellules est égal au glucose consommé, soit:

(3.68) $\eta_T = q_S = Y_{S/X}\,\mu$

En reprenant l'équation (3.63) de non accumulation de glucose:

(3.63) $\eta_T = k_1\mu_R + \eta_F$

D'après l'équation (3.60) de dynamique de production du lactate:

(3.69) $2\eta_F = q_L = Y_{L/X}\,\mu$

η_T, η_F, k_1, k_4 et μ_R peuvent alors être exprimés à partir des trois dernières équations:

$$\left[\begin{array}{l}
\text{(3.68)}\ \eta_T = Y_{S/X}\,\mu \\
\text{(3.69)}\ \eta_F = Y_{L/X}\,\mu/2 \\
\text{(3.70)}\ k_1 = Y_{S/X} - \left[\dfrac{x-\kappa}{2x}\right] Y_{L/X} \\
\text{(3.71)}\ k_4 = x k_1 \\
\text{(3.72)}\ \mu_R = \left[1 - \dfrac{\kappa}{2xk_1} Y_{L/X}\right]\mu
\end{array}\right.$

De façon équivalente au modèle I, on calcule k_2:

$$(3.73)\quad k_2 = Y_{O2/X}\left[1+\frac{\kappa}{xk_1}\frac{\eta_F}{\mu_R}\right]$$

On choisit x=15 proche de la valeur théorique 18. κ est ajusté pour que μ_R reste constant le plus possible entre les deux phases pour chaque expérience et pour que k_1 soit pratiquement constant sur l'ensemble des deux expériences. On trouve ainsi κ=0.1 soit 10% de l'énergie de la glycolyse est associé à la croissance cellulaire. Le tableau 3.4 présente les résultats.

Tableau 3.4 : Paramètres du modèle de croissance II d'après les données expérimentales pour x=15 et κ=0.1.

x=15 κ=0.1		Batch		Glucose 1mM	
		Phase 1	Phase 2	Phase 1	Phase 2
	[10^6Cells/mL]	X < 1	1<X<3	X < 1	1<X<3
η_T	[µmol/10^6Cells/h]	0.335	0.0501	0.1048	0.0660
η_F	[µmol/10^6Cells/h]	0.318	0.0301	0.0838	0.0261
μ_R	[h^{-1}]	0.0198	0.0216	0.0329	0.0329
k_1	[µmol/10^6Cells]	0.84	0.93	0.64	1.2
k_2	[µmol/10^6Cells]	9.9	8.9	7.3	7.6
k_4	[µmol/10^6Cells]	13	14	10	18

On retient ainsi comme valeurs moyennes pour décrire les phases 1 et 2 des deux expériences:

k_1 = 0.85 µmol/10^6cells/mL

k_2 = 8.5 µmol/10^6cells/mL

k_4 = 12.8 µmol/10^6cells/mL

Pour les mêmes raisons exprimées dans la partie précédente, le modèle ne peut rendre compte de la différence des taux de croissance spécifiques entre les deux expériences (0.0223 contre 0.0338 en phase 1). On doit alors corriger la valeur de μ_R^* spécifiquement pour les deux expériences:

μ_R^*(cuvée) = 0.0223 h^{-1}

μ_R^*(cuvée alimentée) = 0.031 h^{-1}

η_T^* est donné par la valeur maximale de transport (cuvée phase 1).

η_T^* = 0.335 µmol/10^6cells/h

K_T est calculé de façon à ce que η_T soit égal à 0.105 µmol/10^6cells/h (cuvée alimentée, phase 1) lorsque la concentration de glucose est à 1 mM :

K_T = 2.2 mM

On remarque que cette valeur est pratiquement identique au K_F du modèle I puisqu'il joue le même rôle.

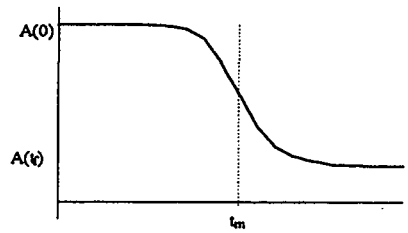
III.2.3.2 Influence des activateurs de transport de glucose

Il reste à modéliser l'action des activateurs du transport de glucose A (probablement l'insuline). En reprenant (3.65) on a:

$$(3.74)\quad \eta_T = \eta_T^* A(t) \frac{S_{out}}{K_T + S_{out}}$$

En début de culture, la concentration des activateurs est maximale, soit A(0) = 1. Puis la concentration diminue en s'accélérant car les activateurs sont métabolisés par les cellules dont la concentration augmente exponentiellement. A partir d'un certain temps (autour de t_m), cette concentration décroissante n'est plus saturante pour l'activation des transporteurs et ainsi l'activité de ces transporteurs chute. On peut modéliser cette concentration par une sigmoïde (équation logistique) (3.73).

$$(3.75)\quad A(t)=\frac{A(0)-A(t_f)}{1+(t/t_m)^p}+A(t_f)$$



$A(t_f)$ est l'activité résultante, p la puissance et t_m le temps où se fait la transition entre les deux phases.

On optimise ces paramètres pour que le modèle représente les données expérimentales et on obtient :

Tableau 3.5 : Paramètres de la modélisation des activateurs du transport de glucose.

	Culture		
	Cuvée alimentée	Cuvée	Unités
A(0)	1	1	[-]
$A(t_f)$	0.18	0.5	[-]
p	20	20	[-]
t_m	55	60	[h]

Le transport du glucose entre les deux phases est réduit d'un facteur 2 pour la culture en cuvée et d'un facteur 5.5 pour la culture en cuvée alimentée.

La Figure 3.8 présente la concentration d'insuline recombinante dans le milieu LC-HSFM pour les deux expériences. Les analyses ont été réalisées par radio-immunoessai par le département de biochimie de l'Universitée de santé de l'Estrie à Sherbrooke. La concentration initiale d'insuline est 100 fois supérieure à la concentration physiologique dans le sang, mais l'activité de cette insuline recombinante n'a pas été comparée à celle de l'insuline dans le sang. La concentration d'insuline décroît fortement pendant les cultures. Il est remarquable de constater que la diminution de concentration pour la culture en cuvée alimentée est rapide les 50 première heures (phase 1) puis ralentit (phase 2). Comme modélisé précédemment, la chute de concentration d'activateur (insuline) est moindre dans la culture en cuvée alimentée que dans la culture en cuvée. D'autres expériences sont nécessaires pour confirmer l'influence de l'insuline sur le transport de glucose.

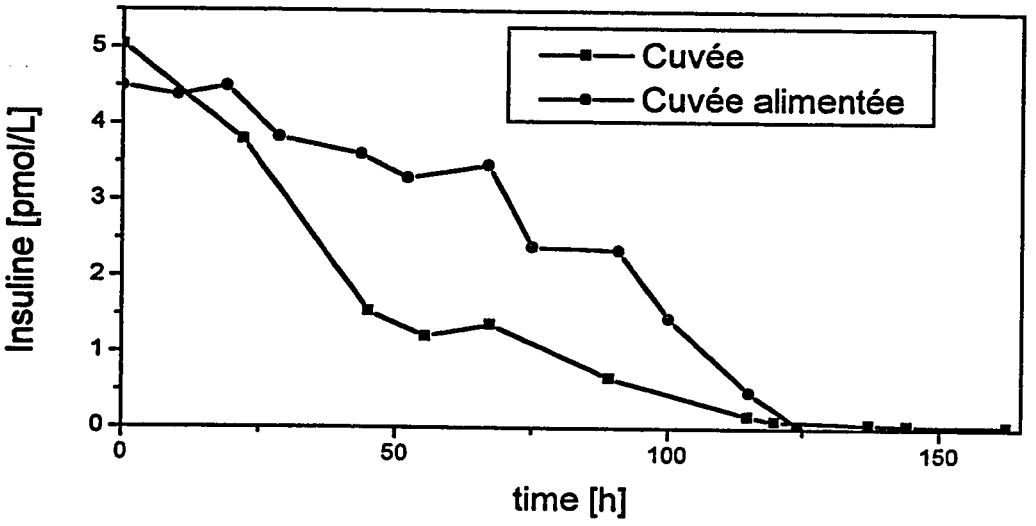


Figure 3.8 : Concentration d'insuline recombinante dans le milieu pour les expériences de cultures en cuvée et en cuvée alimentée.

III.2.4 Simulations sur MATLAB®

Le figures (3.9) et (3.10) présentent les résultats des simulations cuvée et cuvée alimentée avec le contrôleur adaptatif présenté au Chapitre 2.

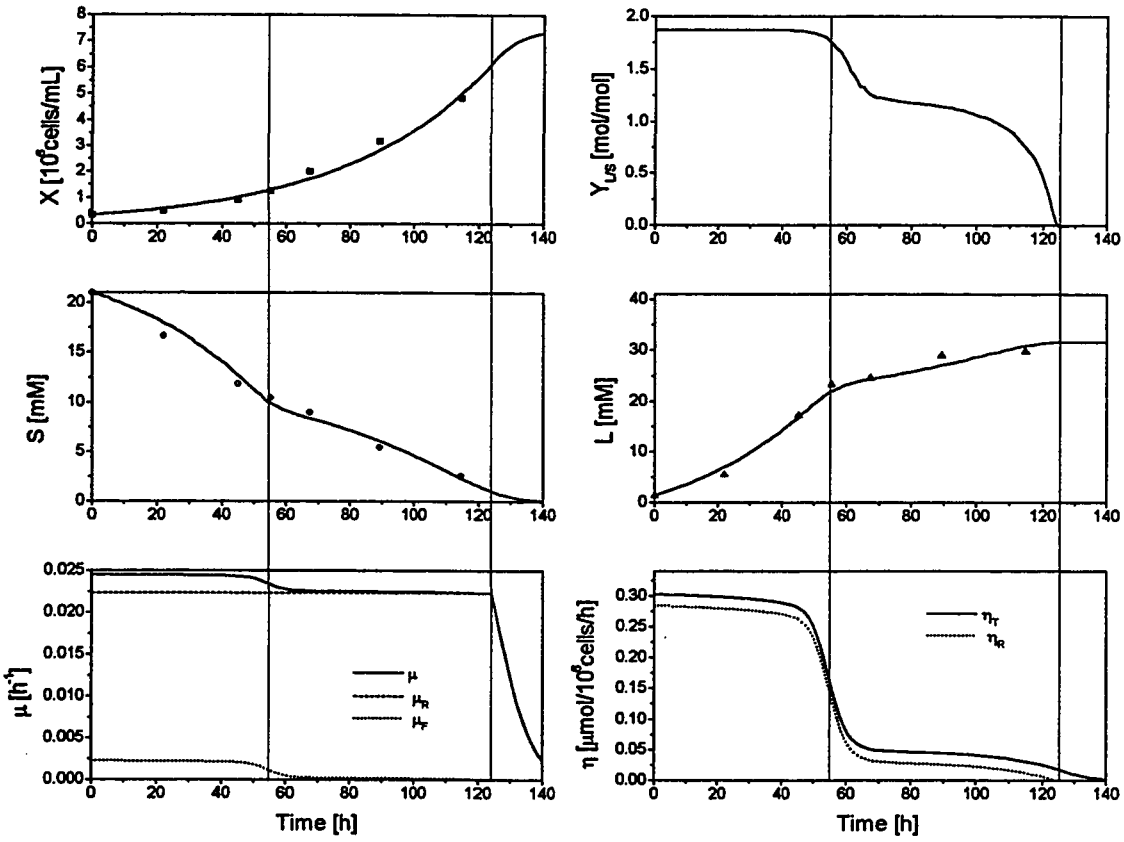


Figure 3.9 : Simulation du modèle II de croissance en cuvée avec une concentration de glucose initiale de 21 mM. Les symboles représentent les données expérimentales.

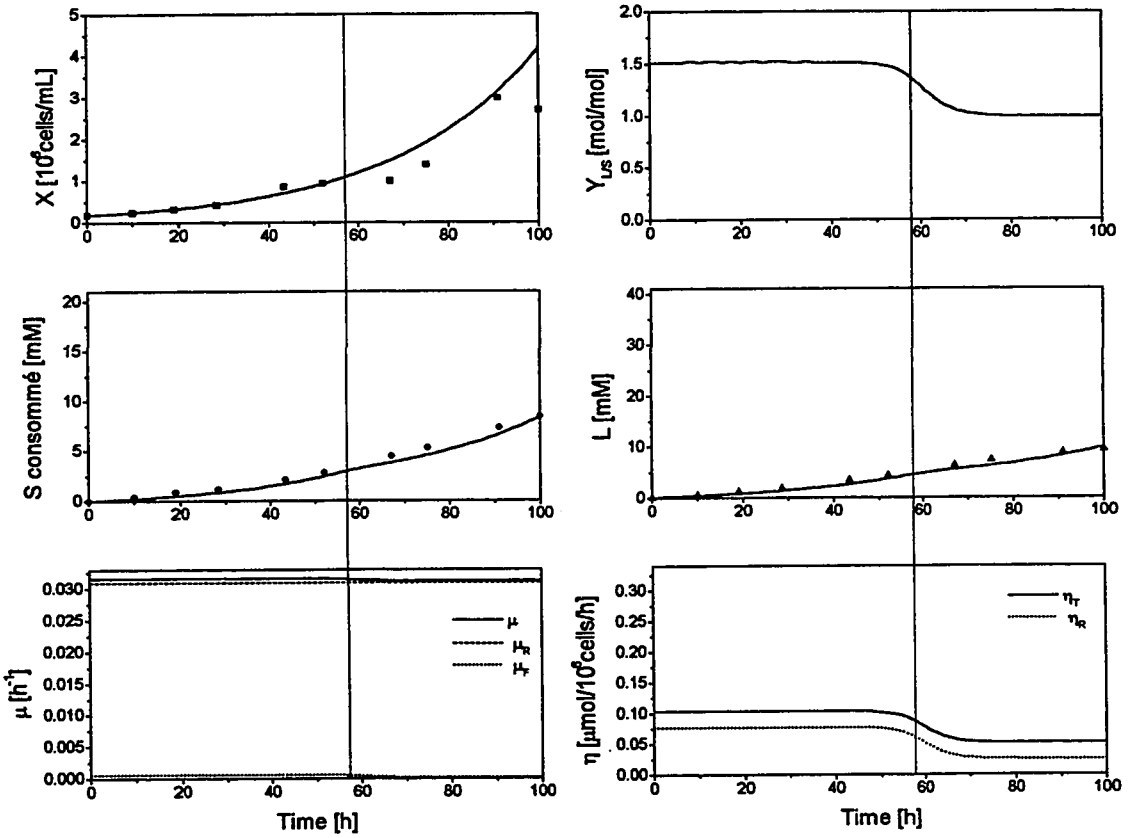


Figure 3.10 : Simulation du modèle II de croissance en cuvée alimentée avec contrôle de glucose à 1mM par un contrôleur adaptatif. Les symboles représentent les données expérimentales.

Le modèle marque bien la transition entre les phases 1 et 2 par la baisse de concentration des activateurs. Le Tableau 3.6 donne les poucentages des erreurs relatives moyennes du modèle par rapport aux données expérimentales.

Tableau 3.6 : Errreurs relatives moyennes du modèle II par rapport aux données expérimentales

	Culture		
	Cuvée alimentée	Cuvée	Unités
Biomasse X	17.8	8.5	[%]
Glucose S	20	7.0	[%]
Lactate L	15.4	6.7	[%]

La simulation concorde bien avec les données expérimentales pour la culture en cuvée. L'erreur de simulation est plus importante pour la culture en cuvée alimentée. La troisième phase (Chapitre 2) de la culture n'apparaît pas dans le modèle car la glutamine n'a pas été intégrée au modèle.

III.3. Nouvelle stratégie de contrôle

III.3.1 Croissance limitée en glucose

On reprend les équations de dynamique de la concentration de glucose et d'oxygène :

$$(3.55)\quad \frac{dS_{out}}{dt} = -DS_{out} - \mathrm{GUR} + DS_{in}$$

$$(3.58)\quad \frac{dC}{dt} = -DC - \mathrm{OUR} + kla_C(C_S - C)$$

On définit GUR[1] comme le taux de consommation de glucose et OUR[2] le taux de consommation d'oxygène.

[1] Glucose Uptake Rate

[2] Oxygen Uptake Rate

Si on se place dans le cas idéal où il n'y a plus de glycolyse, alors d'après (3.56) et (3.58) :

$$GUR = \eta_T X = k_i \mu X = k_1/k_2 OUR$$

En reprenant (3.15), finalement :

$$(3.76)\quad GUR = \frac{1}{6} OUR$$

En mesurant en ligne l'OUR (section suivante), on peut en déduire le taux d'alimentation en glucose (en négligeant les effets de dilution pour simplifier les expressions) :

$$(3.77)\quad D = \frac{OUR}{6 S_{in}}$$

Ainsi la concentration de glucose dans le bioréacteur restera constante.

Si maintenant un niveau minimum de glycolyse est nécessaire à la croissance. On peut définir ρ comme étant le pourcentage de glucose entrant dans la voie de la glycolyse. La loi de contrôle s'écrit :

$$(3.78)\quad D = \frac{1}{6(1-\rho)} \frac{OUR}{S_{in}}$$

En fait ρ s'exprime directement par le paramètre $Y_{L/S}$ mesurable expérimentalement.

$$(3.79)\quad \rho = \frac{Y_{L/S}}{2}$$

On peut alors valider la stratégie expérimentalement en vérifiant le rapport $k_1/k_2=6$ et $\rho=Y_{L/S}/2$. La stratégie n'est ainsi plus le contrôle de l'environnement des cellules mais elle cherche à agir directement sur un paramètre physiologique $Y_{L/S}$.

III.3.2 Détermination de l'OUR

Les méthodes d'analyse de gaz d'entrée et sortie sont en général peut fiables et demandent un appareillage coûteux. On s'en tiendra ainsi aux méthodes en phases liquides.

III.3.2.1 Méthode directe

Avec un contrôleur d'oxygène dissous efficace on peut considérer la concentration d'oxygène dissous constante :

$$(3.80)\quad \frac{dC}{dt}=0$$

Si le kla_C est bien connu et s'il peut être considéré constant pendant le temps de culture ou bien si sa variation est pré-déterminée, on peut reprendre (3.58) avec (3.80), (on négligera le taux de dilution pour simplifier les calculs):

$$(3.81)\quad OUR = kla_C(C_s - C^*)$$

Soit en terme de pression partielle:

$$(3.82)\quad OUR = kla_C(P_{O2} - P_{O2}^*)/H_C$$

La loi de commande devient:

$$(3.83)\quad D=\frac{1}{6(1-\rho)}\frac{kla_C(P_{O_2}-P_{O_2}^*)}{H_C S_{in}}$$

Cette méthode a été validée par Eyer et al. (1995).

III.3.2.2 Méthode d'estimation avec contrôleur adaptatif

Si la kla_C est connu, on peut utiliser l'estimateur $\hat{\theta}_C$ définit précédemment par (3.31) pour directement exprimer l'OUR. Ainsi la commande s'écrit:

$$(3.84)\quad D=\frac{1}{6(1-\rho)}\frac{\hat{\theta}_C C}{S_{in}}$$

III.3.2.3 Méthodes dynamiques

En supposant que l'OUR varie lentement par rapport à la dynamique du transfert de masse, on peut considérer l'OUR constant pendant le temps d'une perturbation.

kla_C connu :

On réalise une chute de DO jusqu'à 30% en vidangeant la tête réacteur avec de l'azote de façon à ce que C_S=0. L'équation (3.58) peut alors être intégrée pour calculer OUR :

$$(3.85)\quad \mathrm{OUR}=\frac{C(t_0)-C(t_f)}{t_f-t_0}-\frac{1}{t_f-t_0}\int_{t_0}^{t_f} kla_C C(t)dt$$

Cette méthode a été utilisée par Zhou et al. (1994).

kla_C inconnu :

La méthode rapportée par Yang et al. (1988) et Singh (1996) propose de couper l'échange de transfert de masse gazeux pendant la durée de la mesure. Cela nécessiterait l'arrêt total de l'agitation pour un réacteur possédant un kla_C de surface. Pour éviter ce problème, on pourrait appliquer C_S=C(t) pendant la mesure par un simple contrôleur proportionnel suivant la décroissance de la concentration d'oxygène. Ainsi dans (3.58) on s'affranchit du terme de kla_c. On néglige dans cette approximation la dynamique de la tête de réacteur. Il faut un débit de gaz assez élevé pour que l'on puisse considérer P_{O2} à l'entrée comme étant la valeur réelle dans la tête de réacteur. Koizumi et Aiba (1984) et Yang et al. (1988) proposent de plus de tenir compte du temps de réponse de la sonde. La dynamique se réduit à :

$$(3.86)\quad \mathrm{OUR}=-\frac{dC(t)}{dt}$$

III.3.2.4 Méthode de dynamique du contrôleur

En utilisant le contrôleur adaptatif présenté précédemment (kla_C connu), on avait la loi de commande :

$$(3.28)\quad C_s=C+\frac{1}{kla_c}\left[\lambda_c(C^*-C)+DC+\mathrm{OUR}\right]$$

Si on réalise un changement du point de consigne C^* par exemple de 40 à 30% d'oxygène dissous, (3.28) nous donne la dynamique du changement. C_s est une fonction linéaire de C:

$$(3.87)\ C_s = \underbrace{\left[1+\frac{\lambda_c + D}{kla_c}\right]}_{a} C + \underbrace{\frac{1}{kla_c}\left[\mathrm{OUR} - \lambda_c C^*\right]}_{b}$$

En traçant C_s en fonction de C, on peut trouver les paramètres a et b. On peut alors calculer kla_C et OUR :

$$(3.88)\ kla_C = \frac{1-a}{\lambda_C + D}$$

$$(3.89)\ \mathrm{OUR} = \frac{1-a}{\lambda_C + D} b + \lambda C^*$$

Le nouveau calcul de kla_C peut alors servir à mettre à jour la valeur dans le contrôleur adaptatif.

III.3.3 Simulation du contrôleur

Cette stratégie de contrôle est testée sur le modèle II avec la loi de commande directe (3.83). Il est important de suivre le concentration S_{out} de glucose dans le milieu. Le risque de cette stratégie est d'avoir une concentration de glucose dans le milieu trop basse, ce qui limiterait la croissance. Par conséquent l'OUR serait réduit par rapport à la trajectoire optimale et comme le taux d'alimentation de glucose est directement proportionnel à l'OUR, cela entraînerait encore une baisse de S_{out}. Il est important alors de vérifier que pour $\rho>0$ on se donne une marge de manoeuvre suffisante pour stabiliser le système.

La concentration d'équilibre dans le milieu de culture dépend de ρ, μ_R^* et du transport $\eta_T(S_{out},t)$ qui définit l'affinité des tranporteurs pour le glucose. Avec $\rho=0.1$ et en utilisant les paramètres de l'expérience en cuvée alimentée, on trouve une concentration d'équilibre de glucose de 0.36 mM lorsque l'activité A(t) des transporteurs est maximale. Lorsque l'activité des transporteurs chute ($A(t_f)=0.5$), S_{out} converge vers 0.85 mM. La

Figure 3.11 montre ce résultat de simulation. Cette convergence est lente, ce qui garantit peu de fluctuation sur la concentration de glucose.

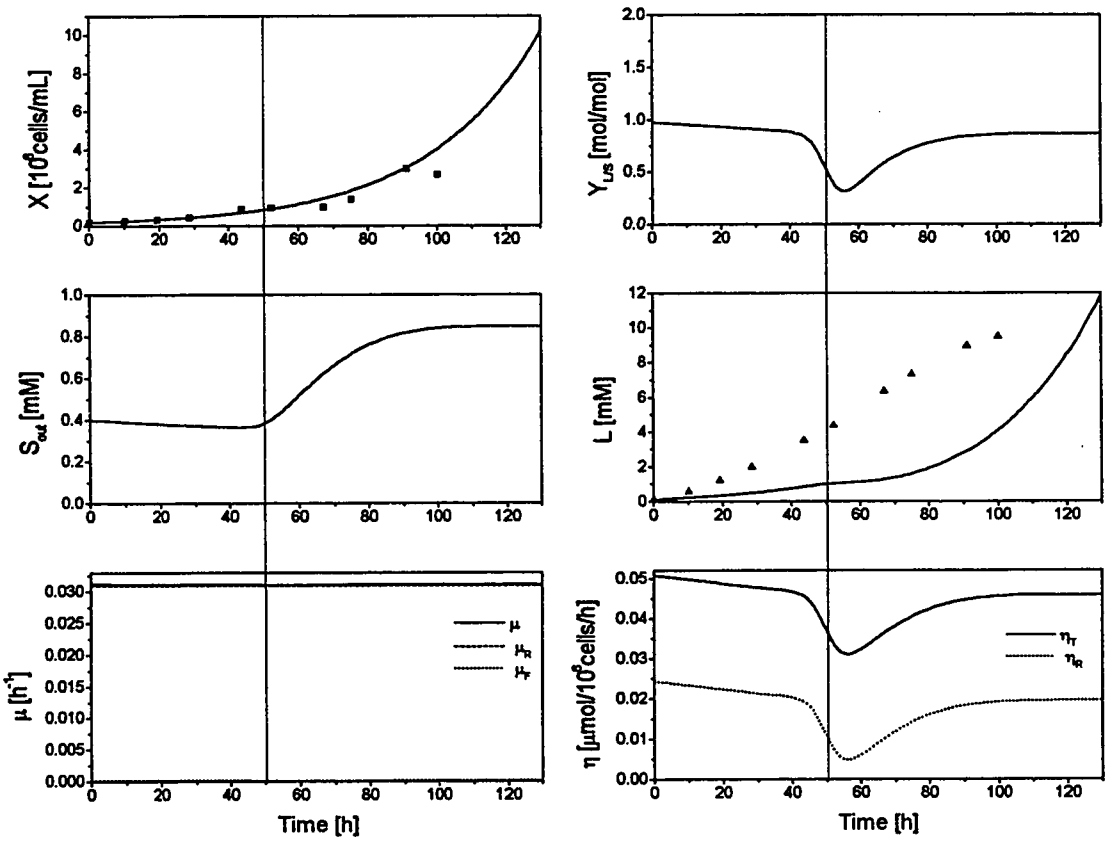


Figure 3.11 : Simulation du modèle II de croissance en cuvée alimentée avec contrôle de glucose proportionnel à l'OUR avec ρ=0.1.

La production de lactate reste très faible. On contrôle ainsi le paramètre physiologique $Y_{L/S}$ près de 0.9. L'état d'équilibre physiologique ne dépend pas de l'activité des transporteurs. (Figure 3.11). Par le choix de ρ, on contrôle ainsi l'état physiologique de la culture au lieu de contrôler un paramètre externe.

Remarquons que la relation proposée (3.79) entre ρ et $Y_{L/S}$ n'est pas vérifiée. Cela est dû au fait que k_2/k_1 pour le modèle II n'est pas égal à la valeur théorique 6 mais à 9.4. En prenant la valeur réelle de k_2/k_1 dans l'équation (3.78), l'équation (3.79) devient vérifiée.

$$(3.78)\quad D=\frac{1}{9.4(1-\rho')}\frac{OUR}{S_{in}}=\frac{1}{6(1-\rho)}\frac{OUR}{S_{in}}$$

$$(3.79)\quad \rho'=\frac{Y_{L/S}}{2}=\ 1-\frac{6(1-\rho)}{9.4}=\frac{0.85}{2}$$

CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

Le développement des procédés de culture de cellules animales nécessite une meilleure connaissance de ces systèmes biologiques et la définition de stratégies d'optimisation. La modélisation est un outil performant pour analyser et comprendre le métabolisme des cellules. Les contrôleurs sont les moyens techniques essentiels pour appliquer ces diverses stratégies.

La stratégie de contrôle de glucose à faible concentration a prouvé son efficacité en réduisant d'un facteur trois la production d'un sous-produit inhibiteur, le lactate. Le contrôle adaptatif appliqué au maintien de la concentration de glucose constante à 1 mM a démontré ses bonnes performances, grâce au potentiel de l'estimateur, face aux bruits de mesure et face aux changements d'états physiologiques. Différents contrôleurs adaptatifs et estimateurs, comme le contrôleur de la concentration d'oxygène dissous ou l'estimateur du taux spécifique de croissance, ont démontré leur validité par simulation. L'étude comparative du métabolisme cellulaire à haute et basse concentration de glucose dans le milieu a permis de proposer une modélisation de la croissance cellulaire sur le glucose en mettant en avant deux voies métaboliques: la glycolyse et la voie oxydative. L'analyse précise des taux spécifiques de consommation ou de production et des différents coefficients de rendement démontre l'existence de différents états physiologiques stationnaires des cellules. La nécessité d'une définition d'une stratégie d'alimentation en glutamine est clairement démontrée. A la lumière des données expérimentales, les hypothèses suivantes sur le métabolisme du glucose sont proposées: la voie oxydative est limitée à une capacité de respiration maximale et elle produit l'énergie suffisante nécessaire à la croissance rapide des cellules; les mécanismes de transport de glucose sur la membrane plasmique des cellules régulent le flux de glucose dans le métabolisme; on soupçonne l'insuline de jouer un rôle important dans l'activation de ce transport; l'excès

du flux de glucose qui n'est pas intégré par la voie oxydative, est transformé en lactate par la glycolyse; le contrôle du métabolisme du glucose passe ainsi par l'action sur les transporteurs de glucose transmembranaires. En introduisant les transporteurs de glucose, un deuxième modèle est proposé. Celui-ci concorde parfaitement avec les données expérimentales et permet d'interpréter les changements physiologiques de la culture. A la suite de ces considérations, une nouvelle stratégie d'alimentation de la culture en limitation de glucose est proposée. Elle repose sur le lien entre le taux de respiration d'oxygène et le taux de consommation de glucose. Son énorme avantage est qu'elle ne demande pas de mesure en ligne de la concentration de glucose dans le milieu de culture. Il est important de proposer des stratégies robustes facilement réalisables à grande échelle. Plutôt que de contrôler des paramètres environnementaux du milieu de culture, cette stratégie commande directement un paramètre physiologique ($Y_{L/S}$) des cellules.

Cette stratégie d'alimentation de glucose par la mesure du taux de respiration mérite d'être testée en bioréacteur. Il serait intéressant d'identifier la valeur minimale de glycolyse (ρ) nécessaire à une rapide croissance cellulaire. Ce contrôleur peut être couplé à une stratégie d'alimentation en glutamine pour atteindre de hautes densités cellulaires (supérieures à $10x10^6$cells/mL). Eyer et al. (1995) proposent d'ajouter de la glutamine lorsque le taux de consommation de d'oxygène diminue. Il est important de vérifier qu'il n'y ait pas de limitation par les acides aminés essentiels. L'ajout d'acides aminés non essentiels ne semble pas nécessaire en présence suffisante de glutamine. Un avantage important de cette stratégie de contrôle est qu'elle peut certainement s'appliquer à la phase d'infection par un virus pour la production de virus recombinants ou de protéines recombinantes. On peut ainsi espérer une forte augmentation des taux de rendements de production en infectant la culture à de plus hautes densités cellulaires.

Il serait intéressant d'évaluer les performances du contrôleur adaptatif modifié d'oxygène dissous en culture en bioréacteur avec des variations de kla_C (prise

d'échantillons, cuvée alimentée). La robustesse et le temps de stabilisation de ce contrôleur doivent également testé.

Par ailleurs, des expériences devraient également être réalisées pour étudier l'influence de l'insuline sur le taux spécifique de consommation de glucose. A terme, il pourrait être envisagé d'adapter les cellules 293SF dans un milieu sans insuline. La compréhension précise du métabolisme du glucose passe par l'étude et la caractérisation des transporteurs de glucose transmembranaires.

RÉFÉRENCES

BARFORD, J.; PHILLIPS, P. et HARBOUR, C. (1992). Simulation of animal cell metabolism. Cytotechnology, 10, 63-74.

BASTIN, G. et DOCHAIN, D. (1990). On-line estimation and adaptive control of bioreactors. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V.

BATT, B. et KOMPALA, D. (1989). A structured kinetic modeling framework for dynamics of hybridoma growth and monoclonal antiboby production in continuous suspension cultures. Biotechnol. Bioeng., 34, 515-531.

BIRD, R. B.; STEWARD, W. E. et LIGHFOOT, E. N. (1960). Transport phenomena. John Wiley and Sons, New York.

BONARIUS, H.; DE GOOIJER, D.; TRAMPER, J. et SCHMID, G. (1995). Determination of the respiration quotient in mammalian cell culture in bicarbonate buffered media. Biotechnol. Bioeng., 45, 524-535.

CHEN, L.; BASTIN G. et VAN BREUSEGEM, V. (1995). A case study of adative nonlinear regulation of fed-batch biological reactors. Automatica, 31, 55-65.

CHIM-ANAGE, P.; SHIOYA, S. et SUGA, K. (1990). Optimum conditions for histidine production by fed-batch culture of Brevibacterium flavum. Journal of fermentation and bioengineering, 70, 386-391.

CHIM-ANAGE, P.; SHIOYA, S. et SUGA, K. (1991). Maximum histidine production by fed-batch culture of Brevibacterium flavum. Journal of fermentation and bioengineering, 71, 186-190.

CHOTTEAU, V. (1995). A general modeling methodology for animal cell cultures. Thèse de doctorat, Université catholique de Louvain, Belgique.

CÔTÉ, J.; GARNIER, A.; MASSIE, B. et KAMEN, A. (1998). Serum-free production of recombinant proteins and adenoviral vectors by 293SF-3F6 cells. Biotechnol. Bioeng. A l'impression.

DAIRAKU, K.; YAMASAKI, Y.; KUKI, K.; SHIOYA, S. et TAKAMATSU, T. (1981). Maximum production in a bakers'yeast fed-batch culture by a tubing method. Biotechnol. Bioeng., 3, 2061-2081.

DAIRAKU, K.; IZUMOTO, E.; MORIKAWA, H.; SHIOYA, S. et TAKAMATSU, T. (1983). An advanced micro-computer coupled control system in a Baker's yeast fed-batch culture using a tubing method. J. Ferment. Technol., 61, 198-196.

DALILI, M.; SAYLES, G. et OLLIS, D. (1990). Glutamine-limited batch hybridoma growth and antibody production: experiment and model. Biotechnol. Bioeng., 36, 74-82.

DE TEMBLAY, M.; PERRIER, M.; CHAVARIE, C. et ARCHAMBAULT, J. (1992). Optimization of fed-batch culture of hybridoma cells using dynamic programming: single and multi feed cases. Bioprogress Engineering, 7, 229-234.

DE TEMBLAY, M.; PERRIER, M.; CHAVARIE, C. et ARCHAMBAULT, J. (1993). Fed-batch culture of hybridoma cells: comparison of optimal control approach and closed loop strategies. Bioprogress Engineering, 9, 13-21.

EYER, K.; OEGGERLI, A. et HEINZLE, E. (1995). On-line gas analysis in animal cell cultivation: II. methods for oxygen uptake rate estimation and its application to controlled feeding of glutamine. Biotechnol. Bioeng., 45, 54-62.

FITZPATRICK, L.; JENKINS, A. et BUTLER, M. (1993). Glucose and glutamine metabolism of a murine B-lymphocyte hybridoma grown in batch culture. Applied Biochem. Biotechnol., 43, 93-116.

GAERTNER J. G. et DHURJATI, P. (1993). Fractional factorial study of hybridoma behavior. 2. Kinetics of nutrient uptake and waste production. Biotechnol. Prog., 9, 309-316.

GARNIER, A.; CÔTÉ, J; NADEAU, I.; KAMEN, A. et MASSIE, B. (1994). Scale up of the adenovirus expression system for the production of recombinant protein in human 293S cells. Cytotechnology, 15, 145-155.

GLACKEN, M.W.; FLEISCHAKER, R. J. et SINSKEY, A. J. (1986). Reduction of waste product excretion via nutrient control: possible strategies for maximizing product

and cell yield on serum in cultures of mammalian cells. Biotechnol. Bioeng., 28, 1376-1389.

GLASSY, M.; THARAKAN, J. et CHAU, P. (1988). Serum-free media in hybridoma culture and monoclonal antiboby production. Biotechnol. Bioeng., 32, 1015-1028.

GUDI, R.; SHAH, S. et GRAY, M. (1994). Multirate state and parameter estimation in an antibiotic fermentation with delayed mearsurements. Biotechnol. Bioeng.,. 44, 1271-1278.

GUDI, R.; SHAH, S.; GRAY, M. et YEGNESWARAN, P. (1997). Adaptive multirate estimation and control of nutrient levels in a fed-batch fermentation using off-line and on-line measurements. The canadian journal of chemical engineering, 75, 562-573.

HILLER, G.; AESCHLIMANN, A.; CLARK, D. et BLANCH, H. (1991). A kinetic analysis of hybridoma growth and metabolism in continuous suspension culture on serum-free medium. Biotechnol. Bioeng., 38, 733-741.

HSIA,T. (1977). System identification. Lexington Books.

HU, W.S. et AUNINS, J. (1997). Large scale mammalian cell culture. Curr. Opin. Biotech., 8, 148-153.

HUNT, S.; PAK, S.; BRIDGES, M.; GRAY, P. et SLEIGH, M. (1997). Chinese hamster ovary cells produce sufficient recombinant insulin-like growth factor I to support growth in serum-free medium. Cytotechnology, 24, 55-64.

JAYME, D. (1991). Nutrient optimization for high density biological production applications. Cytotechnology, 5, 15-30.

JENKINS, H.; BUTLER, M. et DICKSON, A. (1992). Characterization of glutamine metabolism in two related murine hybridomas. Journal of Biotechnology, 23, 167-182.

JO, E.-C.; PARK, H. J. et KIM, K. H. (1990). Balanced nutrient fortification enables high-density hybridoma cell culture in batch culture. Biotechnol. Bioeng., 38, 717-722.

JO, E.-C.; PARK, H. J.; KIM, K. H. et MOON, H. M. (1993). Repeated fed-batch culture of hybridoma cells in nutrient-fortified high-density medium. Biotechnol. Bioeng., 42, 1229-1237.

JORDAN, M.; KÖHNE, C. et WURM, F. (1998). Calcium-phosphate mediated DNA transfer into HEK-293 cells in suspension: control of physicochemical parameters allows transfection in stirred media. Cytotechnology. 26, 39-47.

KAMEN, A.; TOM, R.; CARON, A.; CHAVARIE, C.; MASSIE B. et ARCHAMBAULT, J. (1991). Culture of insect cells in a helical ribbon impeler bioreactor. Biotechnol. Bioeng., 38, 619-628.

KAMEN, A.; CHAVARIE, C.; ANDRÉ, G. et ARCHAMBAULT, J. (1992). Design parameters and performance of a surface baffled helical ribbon impeller bioreactor for the culture of shear sensitive cells. Chemical engineering science, 47, 2375-2380.

KARSENTI, L.; LAMNABHI-LAGARRIGUE, F. et BASTIN, G. (1996). Adaptive control of nonlinear systems with nonlinear parameterization. System & control letters, 27, 87-97.

KOIZUMI, J. et AIBA, S. (1984). Reassessment of the dynamic kla method. Biotechnol. Bioeng., 26, 1131-1133.

KONSTANTINOV, K.; ZHOU, W.; GOLINI F. et HU W. (1994). Expert systems in the control of animal cell culture processes: potentials, functions, and perspectives. Cytotechnology. 14, 233-246.

KONSTANTINOV, K. (1996). Monitoring and control of the physiological state of cell cultures. Biotechnol. Bioeng., 52, 271-289.

KOVESDI, I.; BROUGH, D.; BRUDER, J. et WICKHAM, T. (1997). Adenoviral vectors for gene transfer. Curr. Opin. Biotech., 8, 583-589.

KUROKAWA, H.; PARK, Y. S.; LIJIMA, S. et KOBAYASHI, T. (1994). Growth characteristics in fed-batch culture of hybridoma cells with control of glucose and glutamine concentrations. Biotechnol. Bioeng., 44, 95-103.

KYUNG, Y-S.; PESHWA, M.; GRYTE, D. et HU, W-S. (1994). High density culture of mammalian cells with dynamic perfusion based on on-line oxygen uptake rate measurements. Cytotechnology, 14, 183-190.

KYUNG, Y. S. et HU, W. S. (1995). Enhanced productivity of protein C by recombinant human cells in automated fed-batch cultures. Cytotechnology, 17, 109-115.

LEE, S. C.; HWANG, Y. B.; CHANG, H. N. et CHANG Y. K. (1991). Adaptive control of dissolved oxygen concentration in a bioreactor. Biotechnol. Bioeng., 37, 597-607.

LJUNGGREN, J. et HÄGGSTRÖM, L. (1992). Glutamine limited fed-batch culture reduces the overflow metabolism of amino acids in myeloma cells. Cytotechnology, 8, 45-56.

LJUNGGREN, J. et HÄGGSTRÖM, L. (1994). Catabolic control of hybridoma cells by glucose and glutamine limited fed batch cultures. Biotechnol. Bioeng., 44, 808-818.

MALE, K.; GARTU, O.; KAMEN, A. et LUONG, J. (1997). On line monitoring of glucose in mammalian cell culture using a flow injection analysis (FIA) mediated biosensor. Biotechnol. Bioeng., 55, 497-504.

MALE, K.; GARTU, O.; KAMEN, A. et LUONG J. (1997). A flow-injection (FI) mediated biosensor for on-line monitoring of lactate in mammalian cell culture. Analytica Chimica Acta, 351, 159-167.

MCQUEEN, A. et BAILEY, J. E. (1990). Effect on ammonium ion and extracellular pH on hybridoma cell metabolism and antibody production. Biotechnol. Bioeng., 35, 1067-1077.

MILLER, W. M. (1987). A kinetic analysis of hybridoma growth and metabolism.. Thèse de doctorat, University of California, Berkeley, CA.

MILLER, W.; WILKE, R. et BLANCH, H. (1998). Transient responses of hybridoma cells to nutrient additions in continuous culture: I. glucose pulse and step changes. Biotechnol. Bioeng., 33, 477-486.

NADEAU, I. (1995). Mise à l'échelle du procédé de production de protéines recombinantes avec le système d'expression adénovirus et cellules 293S. Mémoire de maîtrise, École Polytechnique de Montréal, Canada.

NADEAU, I.; GARNIER, A.; CÔTÉ, J.; MASSIE, B.; CHAVARIE, C. et KAMEN, A. (1996). Improvement of reconbinant protein production with the human adenovirus/239S expression system using fed-batch strategies. Biotechnol. Bioeng., 51, 613-623.

NEWLAND, M.; GREENFIELD P.F. et REID, S. (1990). Hybridoma growth limitations: the roles of energy metabolism and ammonia production. Cytotechnology, 3, 215-229.

NEWLAND, M.; KAMAL, M. N.; GREENFIELD, P. et NIELSEN, L. (1994). Ammonia inhibition of hybridomas propagated in batch, fed-batch, and continuous culture. Biotechnol. Bioeng., 43, 434-438.

NEWSHOLME, E.; CRABTREE, B. et ARDAWI, M. (1985). The role of high rates of glycolysis and glutamine utlization in rapidly dividing cells. Bioscience reports, 5, 393-400.

NIELSON, L. (1995). Modeling hybridoma cultures. Thèse de doctorat, University of Queensland, États Unis.

O'CONNOR, G. (1991). Design and evaluation of control strategies for high cell density fermentations. Biotechnol. Bioeng., 39, 293-304.

OEGGERLI, A.; EYER, K. et HEINZLE, E. (1995). On-line gas analysis in animal cell cultivation: I. control of dissolved oxygen and pH. Biotechnol. Bioeng., 45, 42-53.

OMASA, T.; HIGASHIYAMA, K; SHIOYA S. et SUGA, K. (1992). Effects of lactate concentration on hybridoma culture in lactate-controlled fed-batch operation. Biotechnol. Bioeng., 39, 556-564.

OZTURK, S.; BERNHARD, O. et PALSSON, O. (1990). Chemical decomposition of glutamine in cell culture media: effect of media type, pH, and serum concentration. Biotechnol. Prog., 6, 121-128.

OZTURK, S. S.; THRIFT, J. C.; BLACKIE, J. D. et NAVEH, D. (1997). Real-time monitoring and control of glucose and lactate concentrations in a mammalian cell perfusion reactor. Biotechnol. Bioeng., 53, 372-378.

PETCH, D. et BUTLER, M. (1994). Profile of energy metabolism in a murine hybriboma: glucose and glutamine utilization. Journal of cellular physiology, 161, 71-76.

POMERLEAU, Y. et PERRIER, M. (1990). Estimation of multiple specific growth rates in bioprocesses. AIChE Journal, 36, 207-215.

POMERLEAU, Y. et PERRIER, M. (1992). Estimation of multiple specific growth rates: experimental validation. AIChE Journal, 38, 1751-1760.

RYLL, T.; VALLEY, U. et WAGNER, R. (1994). Biochemistry of growth inhibition by ammonium ions in mammalian cells. Biotechnol. Bioeng., 44, 184-193.

RYSZCZUK, A. et EMBORG, C. (1997). Evaluation of mammalian fed-batch cultivations by two different models. Bioprocess Engineering, 16, 185-191.

SCHNEIDER, M.; MARISON, I. W. et STOCKAR, U. (1996). The importance of ammonia in mammalian cell culture. J. Biotechnol., 46, 161-185.

SEBORG, D. E.; EDGAR, T. F. et MELLICAMP, D. A. (1989). Process dynamics and control. John Wiley and Sons, New York.

SHIMIZU, H. et TAKAMATSU, T. (1989). An algorithmic approach to constructing the on-line estimation system for the specific growth rate. Biotechnol. Bioeng., 33, 354-364.

SHIMIZU, H.; ARAKI, K.; SHIOYA, S. et SUGA, K. (1991). Optimal production of gluathione by controlling the specific growth rate of yeast in fed-batch culture. Biotechnol. Bioeng.,. 38, 196-205.

SINGH, V. (1996). On-line measurement of oxygen uptake in cell culture using the dynamic method. Biotechnol. Bioeng., 52, 443-448.

SONNLEITNER, B. et KÄPPELI, O. (1985). Growth of Saccharomyces cerevisiae is controlled by its limited respiratory capacity: formulation and verification of a hypothesis. Biotechnol. Bioeng., 28, 927-937.

TAKAMASTU, T.; SHIOYA, S.; OKADA, Y. et KANDA, M. (1985). Profile control scheme in a bakers'yeast fed-batch culture. Biotechnol. Bioeng., 27, 1675-1686.

TEIXEIRA DE MATTOS, M.; DE BOER, J. et NEIJSSEL, O. (1994) Metabolisc shift analysis at high cell densities. FEMS Microbiology reviews, 14, 21-28.

TSAI, S. et LEE, Y. (1990). A model for energy-sufficient culture growth. Biotechnol. Bioeng., 35, 138-145.

TZIAMPAZIS, E. et SAMDANIS, A. (1994). Modeling of cell culture processes. Cytotechnology, 14, 191-204.

VAN IMPE, J.; BASTIN, G.; ISERENTANT, D. et VERACHTERT, H. (1994). Advanced process control in an uncertain environment: optimal adaptative control in biotechnology. Journal A, 35, 41-49.

VAN IMPE, J.; NICOLAÏ, B.; VANROLLEGHEM, P.; SPRIET, J.; DE MOOR, B. et VANDEWALE, J. (1994). Optimal control of the penicillin G fed-batch fermentation: an analysis of the model of Heijnen et al. Optimal control applications & methods, 15, 13-34.

VAN IMPE, J. et BASTIN, G. (1995). Optimal adaptive control of fed-batch fermentation processes. Control Eng. Practice, 3, 939-954.

VOET, D. et VOET, J. G. (1995). Biochemistry. John Wiley and sons. Second edition, USA.

WEATHERBURN, M. (1967). Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. Anal. Chem., 39, 971-974.

WHEELER, T. (1985). The glucose transporter of mammalian cells. Ann. Rev. Physiol., 47, 503-517.

XIE, L. et WANG, I. (1994a). Stoichiometric analysis of animal cell growth and its application in medium design. Biotechnol. Bioeng., 43, 1164-1174.

XIE, L. et WANG, I. (1994b). Fed-batch cultivation of animal cells using different medium design concepts and feeding strategies. Biotechnol. Bioeng., 43, 1175-1189.

XIE, L. et WANG, D. (1996a). Material balance studies on animal cell metabolism using a stoichiometrically based reaction network. Biotechnol. Bioeng., 52, 579-590.

XIE, L. et WANG, D. (1996b). Energy metabolism and ATP balance in animal cell cultivation using a stoichiometrically based reaction network. Biotechnol. Bioeng., 52, 591-601.

YANG, X.; MAO, Z. et YANG, S. (1988). An improved method for determination of the volumetric oxygen transfer coefficient in fermentation processes. Biotechnol. Bioeng., 31, 1006-1009.

ZENG A. P. et DECKWER, W. D. (1995a). Mathematical modeling and analysis of glucose and glutamine utilizationand regulation in cultures of continuous mammlian cells. Biotechnol. Bioeng., 47, 334-346.

ZENG, A. et DECKWER, W. (1995b). A kinetic model for substrate and energy consumption of microbial growth under substrate-sufficient conditions. Biotechnol. Prog., 11, 71-79.

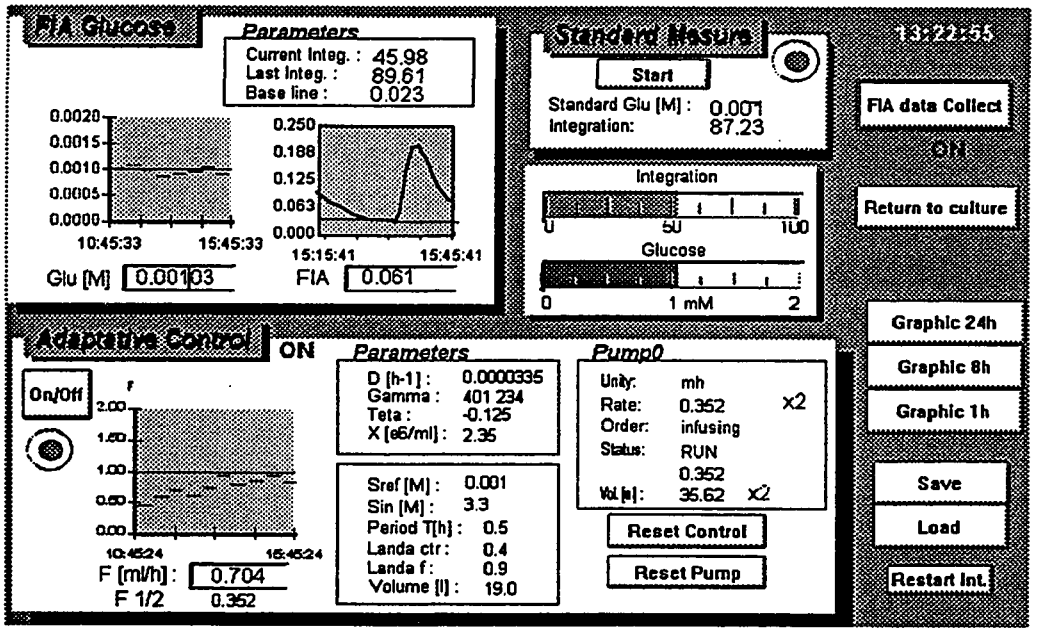
ZHOU, W. et HU, W.-S. (1994). On-line characterization of a hybridoma cell culture process. Biotechnol. Bioeng., 44, 170-177.

ZHOU, W. et HU, W.-S. (1995a). High viable cell concentration fed-batch cultures of hybridoma cells through on-line nutrient feeding. Biotechnol. Bioeng., 46, 579-587.

ZHOU W. et HU W.-S. (1995b). Effect of insulin on a serum-free hybridoma culture. Biotechnol. Bioeng., 47, 181-185.

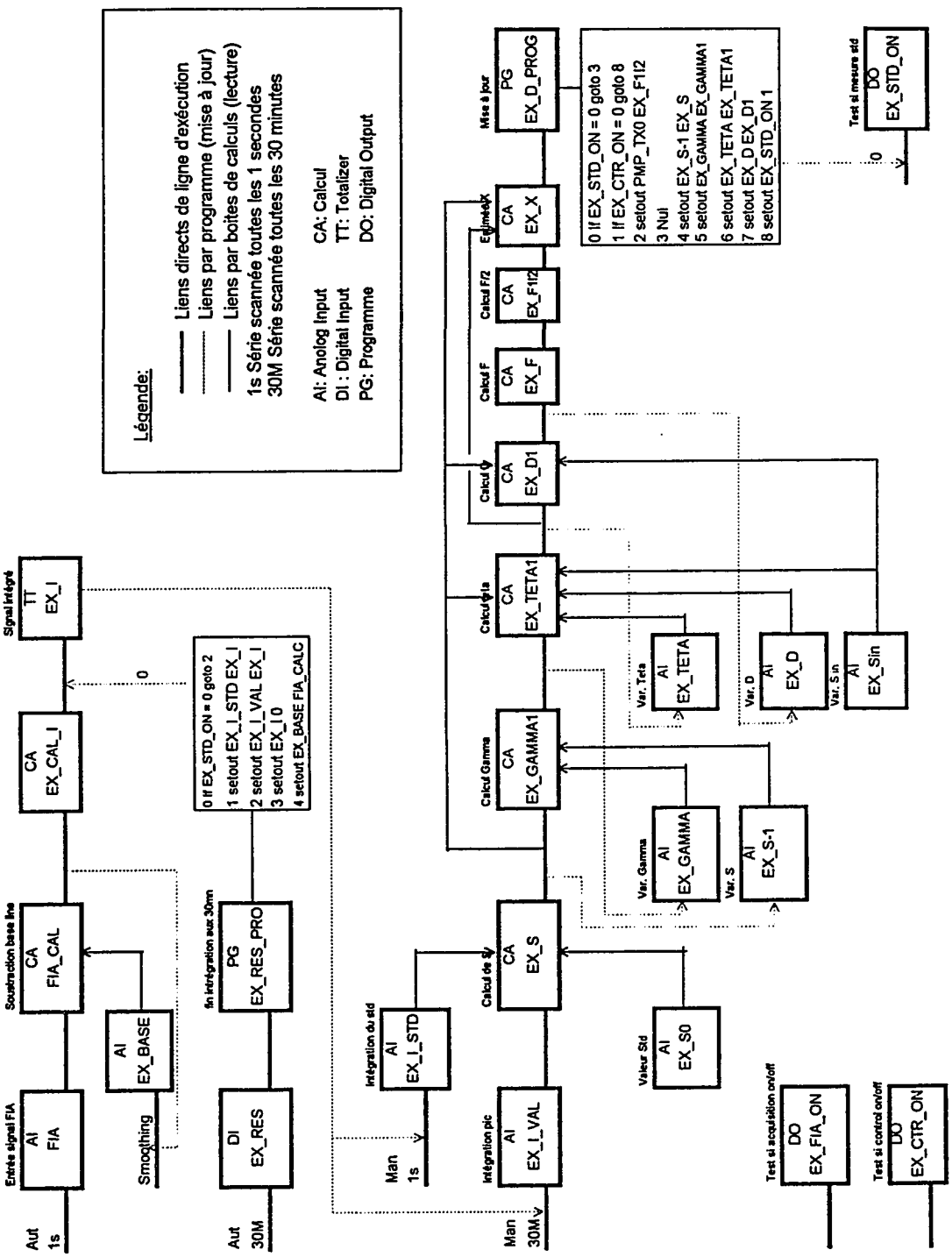
ANNEXE 1

Programmation du contrôleur adaptatif



Fenêtre de contrôle du système de mesure en ligne de la concentration de glucose dans le milieu et du contrôleur adaptatif de la concentration de glucose programmé sur la logiciel FIX-MMI Intellution.

La page suivante présente la structure du programme sur FIX-MMI Intellution. La programmation se fait par chaines de blocks qui sont cycliquement exécutées (scan). La première chaine intégre le signal du FIA. La deuxième termine l'intègration toutes les 30 minutes. La troisième calcule la concentration de glucose, les paramètres du contrôleur, le débit d'alimentation en glucose et l'estimateur de biomasse.


Légende:
Liens directs de ligne d'exécution
Liens par programme (mise à jour)
Liens par boites de calculs (lecture)
1s Série scannée toutes les 1 secondes
30M Série scannée toutes les 30 minutes
AI: Anolog Input
DI : Digital Input
PG: Programme
CA: Calcul
TT: Totalizer
DO: Digital Output
Entrée signal FIA
AI FIA
Aut 1s
Soustraction base line
CA FIA_CAL
Smoothing
AI EX_BASE
Signal intégré
TT EX_I
CA EX_CAL_I
0
0 If EX_STD_ON = 0 goto 2
1 setout EX_I_STD EX_I
2 setout EX_I_VAL EX_I
3 setout EX_I 0
4 setout EX_BASE FIA_CALC
fin intégration aux 30mn
PG EX_RES_PRO
DI EX_RES
Aut 30M
Intégration étalon
AI EX_I_STD
Man 1s
Intégration pic
AI EX_I_VAL
Man 30M
Calcul de S
CA EX_S
Valeur Std
AI EX_S0
Calcul Gamma
CA EX_GAMMA1
Var. Gamma
AI EX_GAMMA
Var. S
AI EX_S-1
Calcul Teta
CA EX_TETA1
Var. Teta
AI EX_TETA
Var. D
AI EX_D
Var. S in
AI EX_Sin
Calcul D
CA EX_D1
Calcul F
CA EX_F
Calcul F/2
CA EX_F1/2
Equation X
CA EX_X
Mise à jour
PG EX_D_PROG
0 If EX_STD_ON = 0 goto 3
1 If EX_CTR_ON = 0 goto 8
2 setout PMP_TX0 EX_F1/2
3 Nul
4 setout EX_S-1 EX_S
5 setout EX_GAMMA EX_GAMMA1
6 setout EX_TETA EX_TETA1
7 setout EX_D EX_D1
8 setout EX_STD_ON 1
Test si mesure std
DO EX_STD_ON
0
Test si acquisition on/off
DO EX_FIA_ON
Test si control on/off
DO EX_CTR_ON

ANNEXE 2

Paramètres du modèle I

Dans ces développements on néglige les effets de dilutions puisque le volume varie peu (D très faible). On sépare artificiellement les quantités concernant la réaction oxydative et la réaction de glycolyse :

$$dX = dX_R + dX_F$$

$$dS = dS_R + dS_F$$

avec par définition :

$$\mu_R = \frac{1}{X}\frac{dX_R}{dt}\ ,\ \mu_F = \frac{1}{X}\frac{dX_F}{dt} \text{ et } \mu = \mu_R + \mu_F = \frac{1}{X}\frac{dX}{dt}$$

$$\frac{dS_R}{dt} = k_1 \mu_R X \text{ et } \frac{dS_F}{dt} = k_4 \mu_F X$$

On peut faire un bilan sur la consommation du glucose :

$$\frac{dS}{dt} = \frac{dS_R}{dt} + \frac{dS_F}{dt} = \frac{dS}{dX}\frac{dX}{dt}$$

$$\frac{dS}{dX}\mu X = k_1 \mu_R X + k_4 \mu_F X$$

$$Y_{S/X} = \frac{k_1 \mu_R + k_4 \mu_F}{\mu}$$

$$Y_{S/X} = k_1 \frac{\mu_R + x\mu_F}{\mu_R + \mu_F}$$

La même approche pour le lactate :

$$\frac{dS}{dL} = \frac{dS_R}{dL} + \frac{dS_F}{dL}$$

Or on sait que $\frac{dS_F}{dL} = \frac{1}{2}$

D'où $$Y_{S/L} = \frac{1}{2}\frac{dS_R}{dS_F} + \frac{1}{2} = \frac{1}{2}\frac{k_1 \mu_R}{k_4 \mu_F} + \frac{1}{2}$$

$$Y_{S/L} = \frac{1}{2}\left[1 + \frac{\mu_R}{x\mu_F}\right]$$

Pour l'oxygène dissous :

$$Y_{X/O_2} = Y_{X_R/O_2} . Y_{X/X_R}$$

$$Y_{X/O_2} = \frac{1}{k_2}\left[1 + \frac{dX_F}{dX_R}\right]$$

$$Y_{X/O_2} = \frac{1}{k_2}\left[1 + \frac{\mu_F}{\mu_R}\right]$$

ANNEXE 3

Observateur Asymptotique

Les notations utilisées sont reprises de Bastin (1990). On réalise une 'Nice Partition' en choisissant X et L.

$$\xi_a = \begin{bmatrix} X \\ L \end{bmatrix} \quad K_a = \begin{bmatrix} 1 & 1 \\ 0 & k_5 \end{bmatrix} \qquad F_a - Q_a = \begin{bmatrix} 0 \\ 0 \end{bmatrix}$$

$$\xi_b = \begin{bmatrix} S \\ C \\ G \end{bmatrix} \quad K_b = \begin{bmatrix} -k_1 & -k_4 \\ -k_2 & 0 \\ k_3 & 0 \end{bmatrix} \qquad F_b - Q_b = \begin{bmatrix} DS_{in} \\ kla_C(C_S - C) \\ kla_G(G_S - G) \end{bmatrix}$$

$$A_0 = -K_a K_b^{-1} = \begin{bmatrix} k_1 & \dfrac{-k_1 + k_4}{k_5} \\ k_2 & \dfrac{-k_2}{k_5} \\ -k_3 & \dfrac{k_3}{k_5} \end{bmatrix}$$

Les variables d'état mesurées sont S et L

$$\xi_1 = \begin{bmatrix} S \\ L \end{bmatrix} \quad K_1 = \begin{bmatrix} -k_1 & -k_4 \\ 0 & k_5 \end{bmatrix}$$

$$\xi_2 = \begin{bmatrix} X \\ C \\ G \end{bmatrix} \quad K_2 = \begin{bmatrix} 1 & 1 \\ -k_2 & 0 \\ k_3 & 0 \end{bmatrix}$$

On définit le vecteur Z dont la dynamique est indépendante des taux de réaction et des coefficients de rendement (nice partition).

$$Z = A_0 \xi_a + \xi_b$$

$$\frac{dZ}{dt} = -DZ + F_b - Q_b$$

En regroupant les variables mesurées, Z s'écrit:

$$Z=\underbrace{\begin{bmatrix} 1 & \dfrac{-k_1+k_4}{k_5} \\ 0 & \dfrac{-k_2}{k_5} \\ 0 & \dfrac{k_3}{k_5} \end{bmatrix}}_{A_1}\cdot\begin{bmatrix} S \\ L \end{bmatrix}+\underbrace{\begin{bmatrix} k_1 & 0 & 0 \\ k_2 & 1 & 0 \\ -k_3 & 0 & 1 \end{bmatrix}}_{A_2}\cdot\begin{bmatrix} X \\ C \\ G \end{bmatrix}$$

$$\frac{d\hat{Z}}{dt}=-D\hat{Z}+\begin{bmatrix} DS_{in} \\ kla_C(C_S-C) \\ kla_G(G_S-G) \end{bmatrix}$$

Ainsi on peut estimer les trois variables non mesurées à condition de connaître les coefficients de rendement.

$$\hat{\xi}_2=\begin{bmatrix} \hat{X} \\ \hat{C} \\ \hat{G} \end{bmatrix}=A_2^{-1}\left[\hat{Z}-A_1\xi_1\right]$$

La convergence de X est bonne mais celles de C et G sont décevantes même avec des valeurs de $\hat{Z}_1(t=0)$, $\hat{Z}_2(t=0)$ et $\hat{Z}_3(t=0)$ différentes seulement de 0.1%, 1% et 1% respectivement des valeurs réelles. Le système est très sensible à une erreur sur $\hat{Z}_1(t=0)$. Cet observateur semble être un échec. On pourrait tenter de construire un observateur sur les mesures de X et G.

ANNEXE 4

Les transporteurs de Glucose

Transport du glucose extérieur dans les cellules:

$S_{out} \rightleftharpoons S_{in}$

La vitesse du transport est donnée par la cinétique de Michaelis-Menton. La vitesse maximale de transport est proportionnelle au nombre de transporteurs sur la membrane [E] et est supposée être activée par [A] et inhibée par [I].

$$v_{T1} = k_1[E_1]\frac{[A_1]}{[I_1]}\frac{[S_{out}]}{K_{T1}+[S_{out}]}$$

On peut considérer le cas de trois types de transport particulier :

Forte affinité, pas d'inhibiteur, pas d'activateur:

$$v_{T1} = k_1[E_1]$$

Faible affinité, pas d'inhibiteur, pas d'activateur:

$$v_{T2} = k_2[E_2]\frac{[S_{out}]}{K_{T2}}$$

Forte affinité, pas d'inhibiteur, activateur A_3:

$$v_{T3} = k_3[E_3][A_3]$$

Réaction intracellulaire:

Le glucose est immédiatement transformé en pyruvate.

$S_{in} \rightleftharpoons 2\,Py$

La vitesse de formation du pyruvate est supposée une cinétique d'ordre α par rapport au glucose intracellulaire:

$$v_{Py} = k_{Py}[S_{in}]^{\alpha}$$

Par la voie de d'oxydation, le flux est supposé rapidement saturé par une limite de respiration à V_{max}.

$$Py \rightleftharpoons 3CO_2$$

Par la voie de la glycolyse, le pyruvate est transformé en lactate. La cinétique est supposée d'ordre α_L,

$$Py \rightleftharpoons L$$

$$v_L = k_L[Py]^{\alpha_L}$$

On suppose qu'il n'y a pas d'accumulation de glucose et de pyruvate. En applicant l'approximation des états quasi-stationnaires:

$$\frac{d[S_{in}]}{dt} = 0 \qquad k_1[E_1] + k_2[E_2]\frac{[S_{out}]}{K_{T2}} + k_3[E_3][A_3] = k_{Py}[S_{in}]^{\alpha}$$

$$\frac{d[Py]}{dt} = 0 \qquad 2k_{Py}[S_{in}]^{\alpha} = k_L[Py]^{\alpha_L} + V_{max}$$

D'où la vitesse de formation de lactate:

$$V_L = \left[2k_1[E_1] + 2k_2[E_2]\frac{[S_{out}]}{K_{T2}} + 2k_3[E_3][A_3]\right] - V_{max}$$

Cette relation permet d'interpréter les variations de glycolyse observées au cours des expériences.

1/ Variation cuvée - cuvée alimentée

En cuvé alimentée la concentration de glucose dans le milieu S_{out} est contrôlée à un niveau très faible. Les transporteurs E_3 ne sont alors plus efficaces. Le flux d'importation du glucose et, en conséquence, la glycolyse sont réduits.

2/ Variation phase 1 - phase 2

L'insuline A_3 présente dans le milieu est progressivement métabolisée par les cellules.

L'activité des transporteurs E_3 diminue, réduisant le flux de transport du glucose et ainsi la glycolyse.