

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉTUDE SUR LA MODÉLISATION DYNAMIQUE GÉNÉRALE D'UN SYSTÈME DE
CROISSANCE DE CELLULES D'INSECTE *SPODOPTERA FRUGIPERDA* (Sf-9)

MARIE-CHRISTINE LOCAS
DÉPARTEMENT DE GÉNIE CHIMIQUE
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLÔME DE MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES
(GÉNIE CHIMIQUE)
AOÛT 2003

© Marie-Christine Locas, 2003



National Library
of Canada

Bibliothèque nationale
du Canada

Acquisitions and
Bibliographic Services

Acquisitions et
services bibliographiques

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

ISBN: 0-612-89217-4

Our file Notre référence

ISBN: 0-612-89217-4

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.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this dissertation.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de ce manuscrit.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the dissertation.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

Canada

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé :

ÉTUDE SUR LA MODÉLISATION DYNAMIQUE GÉNÉRALE D'UN SYSTÈME DE
CROISSANCE DE CELLULES D'INSECTE *SPODOPTERA FRUGIPERDA* (Sf-9)

Présenté par : LOCAS Marie-Christine

En vue de l'obtention du diplôme de : Maîtrise ès sciences appliquées

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

M. KLIVANA Danilo, Ph.D., président

M. PERRIER Michel, Ph.D., membre et directeur de recherche

Mme ELIAS Cynthia, Ph.D., membre et codirectrice de recherche

Mme SMETS Ilse, Ph. D., membre

À mes grands-mères,

À Laurette pour m'avoir montré qu'il est possible de vivre sa vie dans le respect de soi et des autres. Pour avoir su vivre pleinement sa vie de femme, de mère et d'épouse. Pour m'avoir transmis le goût du bonheur.

À Simone, pour m'avoir appris à respecter les autres dans leurs forces et leurs faiblesses, pour m'avoir inculqué le sens de l'honneur et du devoir. Pour avoir fait de sa vie le plus beau combat qui soit.

À toutes les deux, pour m'avoir montré ce que c'est d'aimer.

Remerciements

Je tiens à remercier mon directeur de recherche M. Michel Perrier et M. Amine Kamen pour m'avoir permis de réaliser ce projet de recherche et pour m'avoir permis d'acquérir une formation spécialisée dans le domaine des biotechnologies. Merci à vous deux pour votre confiance.

Je tiens à remercier également l'équipe de recherche de l'Institut en Biotechnologie (Animal Cell Technology) pour m'avoir si gentiment accueillie dans leurs laboratoires et pour m'avoir appris à travailler dans un milieu biotechnologique. Un merci tout spécial à Cynthia Élias pour m'avoir encadrée, supervisée et initiée au monde de la biotechnologie. Merci également pour toutes ces conversations sur la culture de cellules d'insectes, pour ta gentillesse et ton dévouement. Merci également au personnel de l'équipe des cellules d'insectes, Johnny Montès, Barbara Jardin, Roseanne Tom, Rosa Tran, Stéphane Lanthier et tous les autres pour avoir rendu mes études graduées agréables et instructives. Également, un merci tout spécial à Imed Laouini. Merci pour ton support moral, technique et mathématique sans lequel ce mémoire ne serait pas complet.

Je me dois finalement aussi de remercier ma famille et mes amis qui m'ont soutenue tout au long de cette démarche et qui m'ont écoutée et encouragée tout au long de ce projet. Le dernier de mes remerciements est pour Hélène Gagnon, merci pour tes corrections et tes remarques toujours pertinentes.

Merci beaucoup à vous tous.

Résumé

L'objectif premier de ce mémoire est de développer de manière systématique un modèle dynamique général pour un système de croissance de cellules d'insecte.

Un survol du système de croissance des cellules *Spodoptera frugiperda* (Sf-9) est proposé afin de comprendre les enjeux de la modélisation de celui-ci. Suivent ensuite les résultats expérimentaux avec leur analyse et interprétation en vue de valider les théories sur la croissance des cellules d'insecte. Le métabolisme de ces cellules est comparé avec celui des cellules *Trichoplusia ni* (High-Five™). De ce chapitre, deux observations se dégagent : d'une part, la croissance des cellules d'insecte est limitée par deux facteurs principaux, soient l'oxygène dissous et la concentration en glucose dans le milieu, et, d'autre part, la croissance des cellules d'insecte ne semble pas être inhibée par la production de métabolites secondaires.

Forts de ces constatations, deux schémas réactionnels sont alors esquissés, regroupant les principaux enjeux de la culture des Sf-9. Les coefficients pseudo-stœchiométriques des réactions biochimiques sont subséquentement identifiés en utilisant la procédure de Bogaerts (2001). Ces coefficients sont facilement identifiables dans le cas d'un système simulé sans bruit sur les mesures. Par contre, l'introduction de bruit blanc rend difficile l'identification pratique de ces derniers. Nous présentons aussi les coefficients identifiés à partir de données expérimentales. Et ce, pour les deux différents schémas réactionnels.

Le vecteur d'état expérimental n'est pas complètement observable. Seul l'état transformé (η) l'est. La procédure de Bogaerts semble parfaitement fonctionner (identification et observabilité du vecteur d'état) avec des données non bruitées. Toutefois, l'introduction du bruit ou l'utilisation de données expérimentales fragilise l'observabilité de ce système.

Ce mémoire présente également une partie exploratoire sur la possibilité de contrôler ce procédé par sondages. Des résultats ont été obtenus suite à des essais pratiques testant la réponse du système à des impulsions de cocktail nutritif. Ceux-ci ne semblent pas indiquer de corrélation directe entre la respiration cellulaire et la consommation de glucose.

Abstract

As the main purpose of this thesis, a general dynamic model was systematically applied to an insect cells culture.

An analysis of the *Spodoptera frugiperda* (Sf-9) growth system led to the comprehension of the main factors necessary for the modelization. Afterwards, experimental results are analysed in order to validate insect cells growth theories. Their metabolism is compared to the one of *Trichoplusia ni* (High-Five™) cells. Two major conclusions are derived from the experimentations : the growth rate is limited by glucose concentration and dissolved oxygen and secondly, the growth rate is not inhibited by secondary metabolic production.

Based on these observations, two reactional pathways were defined using Bogaerts (2001) methodology to identify pseudo-stoichiometric coefficients. Data without noise provides easy identification of those coefficients. In fact, the procedure is fragilized by the introduction of noised data. From experimental data, coefficients are identified and presented for both reactional pathways. The transformed state is observable, experimental state variable remains unobservable. Bogaerts procedure proves to be reliable without noise, but the use of noised or experimental data seems to weaken system observability.

Using probing control theory is discussed as a pertinent possibility for future work. Indeed, results were experimentally obtained with feeding pulse session in bioreactor. Those results don't seems to show a direct relation between the cell respiration and the glucose consumption.

Table des matières

Remerciements	v
Résumé	vi
Abstract.....	viii
Table des matières.....	ix
Liste des tableaux	xiii
Liste des figures	xiv
Liste des sigles.....	xvii
Chapitre 1 Introduction	20
3.1 <i>Rappel historique</i>	20
3.2 <i>Problématique générale de la mise en culture des cellules animales</i>	21
3.3 <i>Présentation du projet de recherche et de ses objectifs</i>	22
Chapitre 2 Revue de la littérature	24
2.1 <i>Baculovirus et cellules d'insecte Sf-9</i>	24
2.1.1 Le baculovirus	24
2.1.2 La croissance cellulaire	25
2.1.3 La consommation de carbone.....	26
2.1.4 Le milieu de culture et cocktail ajouté	26
2.1.5 L'infection virale et la production de protéines	29
2.2 <i>Paramétrisation de la culture de Sf-9</i>	33
2.2.1 Sonde pour la biomasse.....	33
2.2.2 Mesure de la respiration OUR et CER.....	35
2.3 <i>Approches de modélisation</i>	36
2.3.1 Modèle de Power 1994	36
2.3.2 Modèle de Dutton.....	38
2.3.3 Autres types de modélisation	38
2.4 <i>Stratégies de contrôle des cuvées alimentées</i>	39

2.4.1	Stratégies possibles	39
2.4.2	Stratégies testées par des groupes de recherches utilisant <i>E.coli</i>	42
Chapitre 3	Méthodologie	45
3.1	<i>Description du système</i>	45
3.1.1	Le bioréacteur et son suivi en-ligne	45
3.1.2	Méthodes analytiques.....	46
3.2	<i>Matériel biologique et milieu de culture</i>	47
3.2.1	La cellule Sf-9	47
3.2.2	Le milieu nutritionnel.....	47
3.2.3	L'alimentation	47
Chapitre 4	Culture de cellules d'insectes Sf-9	48
4.1	<i>Cultures de Sf-9</i>	48
4.1.1	Production de dioxyde de carbone	49
4.1.2	La permittivité relative, le biovolume et la concentration cellulaire.....	50
4.1.3	Taux de consommation d'oxygène dissous.....	52
4.1.4	L'osmolalité	53
4.1.5	Consommation et production de métabolites.....	55
4.2	<i>Quantification des paramètres de culture des Sf-9 et des High-FiveTM</i>	57
4.2.1	Taux de croissance, de consommation et de production des métabolites	58
4.2.2	Taux spécifiques de consommation et production des acides aminés	60
Chapitre 5	Modélisation d'un bioprocédé.....	63
5.1	<i>Problématique de la bio-modélisation</i>	63
5.2	<i>Types de modèles</i>	63
5.3	<i>Modèle dynamique général</i>	64
5.3.1	Représentation matricielle.....	65
5.3.2	Partition du modèle dynamique général (Bastin & Dochain, 1990)	66
5.3.3	A-identifiabilité (Chen & Bastin, 1996)	67
5.4	<i>Élaboration d'un système matriciel</i>	69
5.4.1	Première étape : la liste des espèces biologiques et chimiques impliquées dans le procédé.....	69
5.4.2	Deuxième étape : déterminer le nombre de réactions macroscopiques indépendantes.....	70
5.4.3	Troisième étape : Identification de la structure du schéma réactionnel..	72
5.4.4	Quatrième étape : découplage des réactions cinétiques	72
5.4.5	Cinquième étape : Identification d'un modèle analytique pour les fonctions cinétiques.....	73
5.5	<i>Analyse de stabilité</i>	74

5.6	<i>Identification des paramètres</i>	75
5.6.1	Procédure de Bastin & Dochain (1990)	76
5.6.2	Procédure systématique de Bogaerts (Bogaerts & Hanus, 2001; Bernard & al., 1999)	77
Chapitre 6	Modèle dynamique général appliqué au procédé de Sf-9	81
6.1	<i>Construction d'un schéma réactionnel</i>	82
6.2	<i>Schéma A</i>	85
6.2.1	Identifiabilité de la matrice K	85
6.2.2	Partitions du modèle.....	92
6.2.3	Données expérimentales	95
6.3	<i>Schéma B</i>	98
Chapitre 7	Contrôle par sondages	102
7.1	<i>Introduction au contrôle par sondages</i>	102
7.2	<i>Application du contrôle par sondages au système de cellules d'insectes</i>	106
7.2.1	Hypothèses de travail	106
7.3	<i>Effet sur le système vivant des impulsions de cocktail</i>	108
7.4	<i>Effets immédiats des pulsations de cocktail nutritif</i>	113
Chapitre 8	Conclusion	119
8.1	<i>Les taux de consommations avec les coefficients pseudo-stœchiométriques</i>	119
8.2	<i>La modélisation</i>	120
8.3	<i>Le contrôle par sondages</i>	122
Chapitre 9	Bibliographie	124
Annexe 1	Composition du milieu de culture IPL-41	132
Annexe 2	Cocktail alimenté	134
Annexe 3	Affiche sur les High-Five™	136
Annexe 4	Taux de consommation et de production des Sf-9 et des High-Five™	138
Annexe 5	Validation de la structure de la matrice A	139
Annexe 6	Paramètres à définir pour le contrôle par sondages	140

<i>A6.1 Temps de réponse maximal du système</i>	<i>140</i>
A6.1.1 Temps de sondage	141
A6.1.2 Temps de contrôle	141
A6.1.3 Réaction de la concentration d'oxygène dissous.....	141
A6.1.4 Niveau de tolérance sur la réaction de la concentration en oxygène dissous	141
A6.1.5 Amplitude de pulsation dans le débit d'alimentation.....	142
<i>A6.2 Lois de commande de l'oxygène dissolvant.....</i>	<i>142</i>
A6.2.1 PID par linéarisation du bilan de matière.....	142
Annexe 7 Réaction de la DO à un pulse en glucose.....	145
A7.1 Bilan sur l'oxygène dissous.....	145
A7.2 Bilan sur la concentration en glucose.....	146

Liste des tableaux

Tableau 4.1 : Plan expérimental.....	48
Tableau 4.2 : Osmolalité des composants du cocktail d'alimentation	54
Tableau 6.1 : Solutions équivalentes avec $\xi_a(t)=[X P_2(t)]'$	87
Tableau 6.2 : Solutions de K en fonction de la variance du bruit	89
Tableau 6.3 : Solutions pour K avec les données simulées 1 pour toutes les partitions sans bruit ($K_{\text{départ}}=5, \text{tol}_x=\text{tol}_r=10^{-6}$).....	92
Tableau 6.4 : Solutions pour K avec les données simulées 1 pour toutes les partitions avec un bruit 0.01 de variance ($K_{\text{départ}}=5, \text{tol}_x=\text{tol}_r=10^{-6}$).....	93
Tableau 6.5 : Résultats avec les données simulées 2 pour les six partitions.....	94
Tableau 6.6 : Résultats avec les données simulées 2 avec $K_{\text{départ}}=1$ et $\text{tol}=10^{-6}$	95
Tableau 6.7 : Résultats avec les données simulées 2 avec $K_{\text{départ}}=5$ et $\text{tol}=10^{-6}$	95
Tableau 6.8 : Coefficients pseudo-stœchiométriques obtenus à partir de l'expérience 6	97
Tableau 6.9 : Coefficients pseudo-stœchiométriques obtenus à partir de l'expérience 6 sans les bilans des gaz	97
Tableau 6.10 : Validation des K obtenus par les observateurs	98
Tableau 6.11 : Coefficients pseudo-stœchiométriques obtenus à partir de l'expérience 6 avec le schéma B	99
Tableau 6.12 : Régression avec le schéma B avec partitions combinées	99
Tableau 7.1 : Enchaînement des étapes d'un algorithme de contrôle par sondages.	104
Tableau 8.1 : Comparaison des taux spécifiques de rendement et des coefficients pseudo-stœchiométriques.....	120
Tableau A4.1 : Taux spécifique de consommation et de production et taux de croissance des Sf-9 et High-Five™	138

Liste des figures

Figure 1.1 : Papillon des légions d'automne.....	21
Figure 1.2 : Schéma des facteurs affectant la culture de cellules animales (Doverskog2000).....	22
Figure 2.1 : Réplication du baculovirus dans une cellule d'insecte (Goolijer & al, 1989)	25
Figure 2.2 : Cycle cellulaire	31
Figure 2.3 : Profil typique du CER et de permittivité relative pour une culture de cellules d'insecte	34
Figure 2.4 : Diagramme bloc du contrôleur en « feedback » indirect (Lee & al., 1999)	40
Figure 2.5 : Diagramme bloc d'une stratégie d'alimentation basée sur les gaz de sortie (Lee & al., 1999)	41
Figure 2.6 : Diagramme bloc d'une stratégie d'alimentation utilisant un modèle mathématique (Lee & al., 1999)	42
Figure 3.1 : Schéma du bioréacteur	46
Figure 4.1 : CER, taux de production de dioxyde de carbone.....	50
Figure 4.2 : Permittivité relative et biovolume.....	51
Figure 4.3 : OUR, consommation en oxygène dissous	53
Figure 4.4 : Osmolalité	55
Figure 4.5 : Concentration résiduelle des métabolites	57
Figure 4.6 : Comparaison des cellules Sf-9, High-Five™ host et PYC :	
a) taux de croissance, taux de consommation et de production de métabolites	
b) quantification comparée de la respiration cellulaire	59

Figure 4.7 : Taux spécifiques de consommation et de production d'acides aminés comparés pour les trois types de cellules	62
Figure 5.1 : nombre de réactions macroscopiques nécessaires pour la modélisation d'une culture de cellules VERO	71
Figure 6.1 : Variables d'état des données simulées 1 sans bruit	86
Figure 6.2 : Données simulées 1 bruitées avec une variance de 0,01	88
Figure 6.3 : Données simulées 1 bruitées avec une variance de 0,05	89
Figure 6.4 : Schéma pour la validation des observateurs	91
Figure 6.5 : Données simulées 2 sans bruit	94
Figure 6.6 : Données expérimentales 6	96
Figure 6.7 : Observateur pour la partition S_1 des $\xi_b(t)$ par $\xi_a(t)$ pour les données expérimentales 6	100
Figure 6.8 : Observateurs avec la partition S_1 des $\eta_b(t)$ par $\eta_a(t)$ pour les données expérimentales 6	101
Figure 7.1 : Schéma d'un algorithme de contrôle par sondages	103
Figure 7.2 : a) système non saturé, b) système presque saturé, c) système saturé ...	105
Figure 7.3 : OUR et CER lors des expériences avec pulsations de cocktail nutritif	109
Figure 7.4 : Permittivité relative et biovolume lors des expériences avec pulsations de cocktail nutritif	110
Figure 7.5 : Osmolalité et diamètre cellulaire lors des expériences avec pulsations de cocktail nutritif	111
Figure 7.6 : Concentrations résiduelles de nutriments lors des expériences avec pulsations de cocktail nutritif	112

Figure 7.7 : Concentrations résiduelles de métabolites secondaires produit lors des expériences avec pulsations de cocktail nutritif	113
Figure 7.8 Lecture de la sonde à oxygène dissous lors des périodes de pulsations de l'expérience 6	114
Figure 7.9 : OUR et CER lors des périodes de pulsations de l'expérience 6	115
Figure 7.10 : Permittivité relative et biovolume lors des périodes de pulsations de l'expérience 6	116
Figure 7.11 : Osmolalité et diamètre cellulaire lors des périodes de pulsations de l'expérience 6	117
Figure 7.12 : Concentrations résiduelles de métabolites lors des périodes de pulsations de l'expérience 6	118
Figure A6.1 : paramètres à définir pour l'algorithme le contrôle par sondage.....	140

Liste des sigles

Sigle ou abréviation	unité	Description
A	--	Matrice des coefficients pseudo-stœchiométriques (modèle dynamique général)
α	--	Constante d'attachement des virus aux particules non infectées (modèle de Power)
α_{PP}	--	Constante de la production des protéines (modèle de Power)
α_{VP}	--	Constante de la production des virus (modèle de Power)
B/R	--	"Batch and Replacement" dialyse
BEVS	--	"Baculovirus Expression Vector System"
BIBS	--	"Bounded Input Bounded Bounded state Stability"
C	mmol/L	Concentration en oxygène dissous
C*	mmol/L	Concentration d'oxygène dissous à saturation
CC _d	--	Compte cellulaire à un diamètre cellulaire donné
CC	--	Compte cellulaire total
Cap	pF	Capacitance
CER	mmol/L/h	"Carbon evolution rate"
CH _{vol}	e ⁶ cell/mL/h	Cellules par volume cumulé (modèle de Dutton)
CTR	mmol/L/h	"Carbon Transfert Rate"
D	1/h	Taux de dilution
DO	%	Pourcentage d'oxygène dissous
d	μ m	diamètre des cellules
ϵ'	F/m	Permittivité relative
ϵ_0	F/m	Permittivité relative dans le vide
F, F _a , F _b	mL/h	Taux d'alimentation au réacteur
F _{in}	mL/h	Débit d'alimentation au réacteur
f _{eval}	--	Valeur de la fonction des résidus (minimisation fminsearch)
ϕ , r		Matrice des cinétiques de réactions
H	atmL/mol	Constante de Henry
High-Five	--	<i>Trichoplusia ni</i> (High-Five™)

hpi	h	Heure post infection
η , η_a , η_b , η_{bcal}	mmol/L	Variables d'état transformé
K, K_a , K_b	--	Matrice des coefficients pseudo-stoechiométriques
k_d	h^{-1}	Taux de mortalité intrinsèque (modèle de Power)
$K_{départ}$	--	Matrice des coefficients de la matrice K pour le début des itérations
K_i	mmol/L	Constante d'inhibition
k_{m1} , k_{m2} , k_{m3}	mmol/L	Constante de Monod
K_{La} , kla_{O_2} , kla_{CO_2}	h^{-1}	Coefficient du taux de transfert d'oxygène
m	mmol/e ⁹ cell/h	Coefficient de maintenance cellulaire
M	--	Rang de la matrice K
MOI	--	« multiplicity of infection »
μ_1 , μ_2	h^{-1}	Taux de croissance
μ_1^{max} , μ_2^{max}	h^{-1}	Taux de croissance maximal (modèle de Monod)
OTR	mmol/L/h	“oxygen transfert rate”
OUR	mmol/L/h	“oxygen uptake rate”
P		Rang de la matrice ϕ
P_1	Mmol/L	Concentration en dioxyde de carbone dissous
P_1^*	Mmol/L	Concentration en dioxyde de carbone dissous à saturation
P_{CO_2}	atm	Pression partielle en gaz carbonique à la sortie
P_2	mmol/L	Concentration en acide lactique
P_{O_2}	atm	Pression partielle d'oxygène dissous
$P_{O_2,cal}$	atm	Pression partielle d'oxygène dissous à saturation lue par la sonde
$P_{O_2}^*$	atm	Pression partielle d'oxygène dissous à saturation
PID	--	« proportional integral derivative control »
q_d		Taux de mortalité des cellules infectées (modèle de Power)
Q	mmol/L/h	Taux de sortie des composants du réacteur
$Q_{au\ choix}$	mmol/e ⁹ cell/h	Taux spécifique de consommation ou de production
Q_{bull}	L/h	Débit des gaz bullés dans le réacteur
Q_{tot}	L/H	Débit total de gaz entrants ou sortants du réacteur

R	atmL/mol/K	Constante des gaz parfaits
S ₁	mmol/L	Concentration en glucose
S ₂	mmol/L	Concentration en glutamine
S _{1,in}	mmol/L	Concentration en glucose dans le cocktail
S _{2,in}	mmol/L	Concentration en glutamine dans le cocktail
Sf-9		<i>Spodoptera frugiperda</i>
T	K	Température du réacteur
T _{VPS} , T _{VPE}	h	Temps du début et de fin de la production des virus
T _{PFS} , T _{PPE}	H	Temps du début et de fin de la production des protéines
TOI	H	« time of infection »
tol _x		Critère d'arrêt sur la taille du simplexe
tol _f		Critère d'arrêt sur la valeur de la fonction de résidu
V	L	Volume utile du réacteur
V _b	mm ³	Biovolume
ν	Pfu/L	Concentration des virus
W		Fonction de Weibull
X	e ⁹ cell/mL	Concentration cellulaire
X _u et X _i	μm	Diamètre inférieur et supérieur des cellules
X _{NVNI}	e ⁹ cell/mL	Concentration cellulaire non viable non infectée
X _{NVI}	e ⁹ cell/mL	Concentration cellulaire non viable infectée
X _{VNI}	e ⁹ cell/mL	Concentration cellulaire viable non infectée
X _{VI}	e ⁹ cell/mL	Concentration cellulaire viable infectée
ξ		Vecteur des variables d'état
Y _{X/S}	e ⁹ cell/mmol	Rendement cellulaire sur un substrat

Chapitre 1 Introduction

1.1 Rappel historique

La biotechnologie prend un très grand essor dans les années 1940 grâce à la production industrielle de la pénicilline. La bioproduction se diversifie et permet la fabrication d'acides organiques, d'alcools, d'acides aminés, de précurseurs d'antibiotiques, de métabolites primaires et de plusieurs autres composés simples. La synthèse de matériel biologique complexe, comme les protéines recombinantes avec une activité biologique, commence dans les années 1970 grâce à l'introduction de la biologie moléculaire. La culture de cellules procaryotes, *E. coli* en tête, se développe, suivront ensuite les organismes unicellulaires eucaryotes, telles les levures (i.e. *Saccharomyces cerevisiae*, levure à pain). D'autres souches de cellules, telles les cellules de mammifères seront ensuite utilisées, telles les CHO (« chinese hamster ovary »), les BHK (« baby hamster kidney ») et les HEK 293 (« human embryonic kidney ») (revu par Doverskog, 2000).

Les cellules d'insectes ont un comportement similaire à celui des cellules mammifères, mais leur histoire est un peu différente. La synthèse de biopesticides constitue le premier intérêt de la culture des cellules d'insectes. Il s'agit alors de production de baculovirus de type sauvage, sans aucune modification génétique. Ce n'est que vers les années 1980 que le BEVS (« baculovirus expression vector system ») intéresse le monde de la recherche. Il existe aujourd'hui plusieurs applications pour le BEVS, citons par exemple : la production de réactifs de diagnostic et de vaccins, de même que les traitements pharmaceutiques. Le baculovirus permet d'exprimer des

polypeptides tels que des récepteurs fonctionnels pour les cellules mammifères, des protéines, des antigènes viraux, des enzymes, des anticorps et des hormones (revu par Doverskog 2000).

La cellule d'insectes la plus couramment utilisée en biotechnologie est *Spodoptera frugiperda* (Sf-9), cellule ovarienne d'un ver de légions d'automne (« fall armyworm »). Le suffixe 9 a été retenu lors du premier clonage. La souche Sf-9 a été développée par G.E. Smith & C.L. Cherry en 1983 (lignée mère IPLB-SF 21 AE, dérivée des tissus ovariens « pupal » de Vaughn & al en 1977).

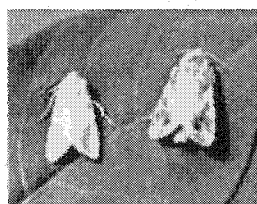


Figure 1.1 : Papillon des légions d'automne

1.2 Problématique générale de la mise en culture des cellules animales

La conformation des protéines produites par les cellules animales, comparativement à celle des cellules procaryotes, constitue le principal avantage de leur mise en culture. Ces protéines possèdent une activité biologique : aucun traitement ultérieur ne sera nécessaire pour changer leur conformation afin de retrouver leur activité biologique. De plus, les protéines produites peuvent être de tailles plus importantes et de formation plus complexe lorsqu'elles sont produites par des cellules animales. Par contre, la culture de cellules animales est de loin plus complexe que celle des bactéries.

La culture de cellules d'insecte tout comme celle des autres cellules animales dépend de plusieurs facteurs. On ne connaît pas encore complètement ce système. Plusieurs paramètres ont un effet sur les cellules, mais les liens entre ces facteurs et leur optimisation ne sont pas entièrement déterminés. Dans le schéma qui suit, on réalise très bien la dépendance des cellules à leur environnement (Doverskog 2000).

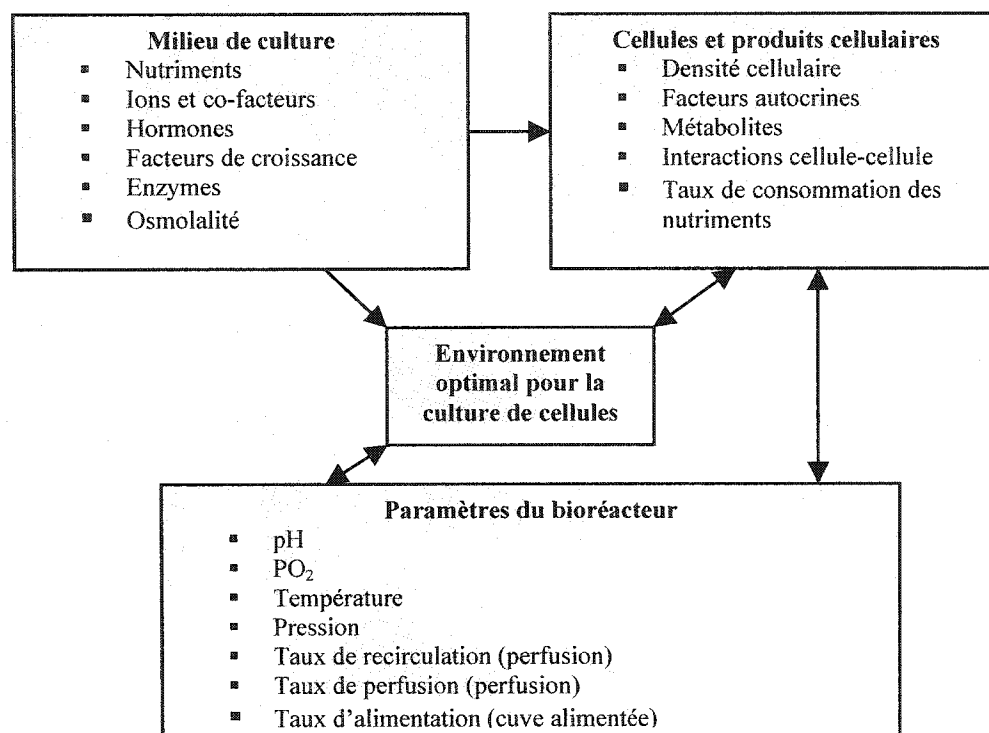


Figure 1.2 : Schéma des facteurs affectant la culture de cellules animales (Doverskog2000)

1.3 Présentation du projet de recherche et de ses objectifs

Ce projet s'inscrit dans une démarche scientifique qui a été développée à l'Institut de recherche en biotechnologie (division du CNRC). Afin de permettre la culture de cellules d'insecte Sf-9 à haute densité cellulaire, la culture en cuvée semie alimentée a été introduite dans le projet. Cette culture est possible grâce au développement fait à

l'IRB d'un cocktail nutritif riche en glucose, acides aminés et surnageant d'extrait de levure (« yeastolate »). Une nouvelle stratégie d'alimentation en oxygène dissous a été installée afin de permettre un meilleur transfert d'oxygène (augmentation du k_La et de C^*). Ce projet s'insère à ce stade de développement du procédé. Dans l'optique d'automatiser la culture de cellules d'insectes, les objectifs de ce projet sont de modéliser la phase de croissance des cellules Sf-9, de la contrôler par l'alimentation d'un cocktail de nutriments approprié afin d'en maximiser la densité cellulaire à l'infection.

Chapitre 2 Revue de la littérature

2.1 Baculovirus et cellules d'insecte Sf-9

2.1.1 Le baculovirus

Le système de cellules d'insectes infecté par un baculovirus est basé sur la construction d'un baculovirus recombinant dans lequel le gène de la polyhédrine est remplacé par une séquence d'ADN qui code pour une protéine spécifique d'intérêt. Le virus s'intègre ensuite dans une cellule. Le baculovirus utilise alors la machinerie de synthèse des protéines de la cellule pour exprimer ses gènes, les répliquer, et produire la protéine d'intérêt. Le gène de la polyhédrine possède un promoteur extrêmement puissant qui n'est activé qu'à la fin du cycle d'infection. La polyhédrine n'est pas essentiel à la réplication du baculovirus. En plaçant le gène d'intérêt sous le contrôle du promoteur de la polyhédrine, les protéines ciblées peuvent être produites en quantité. Le rendement maximal théorique est de 1000 mg/L, ce qui correspond à la polyhédrine normalement produite suite à l'infection du baculovirus non modifié. Cependant, le degré d'expression de la protéine dépend fortement des propriétés du gène à coder, des paramètres de la culture, et du degré d'infection (Caron & al., 1990). La figure 2.1 schématise les principales étapes de l'infection virale d'une cellule par un baculovirus.

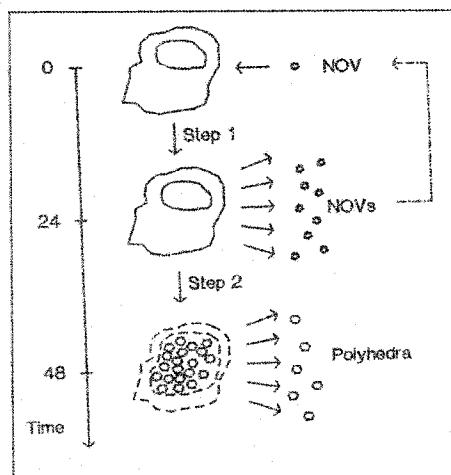
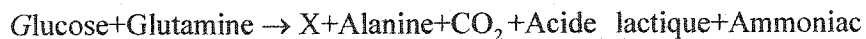


Figure 2.1 : Réplication du baculovirus dans une cellule d'insecte (Gooijer & al, 1989)

Les principaux avantages des systèmes impliquant le baculovirus sur d'autres systèmes sont nombreux pour la production protéique. Comparé aux systèmes de cellules de mammifère, le système Sf-9/baculovirus offre une plus grande productivité et une plus grande facilité lors des manipulations génétiques (Kioukia & al., 1995). Le degré d'expression de protéines est plus élevé chez les cellules d'insectes (Wickham & al., 1991). Elles possèdent également la capacité d'effectuer la glycolysation et la phosphorylation ainsi que des modifications post-translationnelles que les systèmes bactériens ne peuvent effectuer.

2.1.2 La croissance cellulaire

La principale réaction biochimique responsable de la croissance cellulaire peut être simplifiée et ramenée selon Kamen, 1992 :



2.1.3 La consommation de carbone

Bédard & al. (1994) démontrent que les cellules Sf-9 consomment du glucose, du fructose et du maltose, mais pas du sucrose. Il apparaît cependant que le glucose constitue la clé du métabolisme de ces cellules. Son taux de consommation dépasse ceux des autres hydrates de carbone. L'utilisation des substrats, calculée en termes de carbone, montre une utilisation plus rapide du glucose que de n'importe quel acide aminé simple ou acide carboxylique quantifié. À la lumière de ces phénomènes métaboliques, la glutamine et le glucose représentent d'importants facteurs limitant la croissance dans les cultures de cellules d'insecte Sf-9 (le glucose sert de source principale de carbone et la glutamine, d'azote).

2.1.4 Le milieu de culture et cocktail ajouté

2.1.4.1 IPL-41

Le milieu IPL-41 se compose de vitamines, de sucres, d'acides aminés ainsi que de sels organiques et inorganiques (l'annexe 1 fournit la composition exacte). Le glucose est la source de carbone qui limite la densité cellulaire dans l'IPL-41 (Drews & al., 1995). L'ajout de « yeastolate » dans ce milieu a permis à certains chercheurs d'atteindre des densités cellulaires de 4 fois supérieures (Lee & al., 1994). Cependant, la nature exacte des composés présents dans le « yeastolate » nécessaire à la croissance n'a pas encore été défini (Drews & al., 1995). L'osmolalité optimale pour la croissance des Sf-9 se situe entre 250 et 450 mOsm/kg (Schmid 1996).

2.1.4.2 Milieu avec ou sans sérum

Les sérums animaux protègent les cellules contre divers agents stressants auxquels elles peuvent être confrontées. Le sérum augmente les coûts d'achat du milieu et les difficultés de séparation des protéines produites. Il diminue la reproductibilité des résultats (Cruz & al., 1997). Le sérum est notamment remplacé par une émulsion de lipides et de Pluronic F-68 dans l'IPL-41 (Maiorella & al., 1988). Selon l'hypothèse la plus acceptée, la composante hydrophobe de la molécule de pluronique F-68 s'accroche aux parois cellulaires, alors que la partie hydrophile crée des ponts hydrogène avec l'eau. Il en résulte la formation d'une couche protectrice autour des cellules, ce qui permet de remplacer avantageusement les sérums animaux.

2.1.4.3 « Yeastolate »

Lorsque la concentration de « yeastolate » est de 8 g/L et que le glucose est abondant, la densité cellulaire maximale atteinte peut être de 18×10^6 cell/mL. Ces résultats suggèrent que le « yeastolate » contienne des composés qui favorisent la croissance des cellules Sf-9. Les acides aminés, les peptides et les acides nucléiques du « yeastolate » contribuent en partie à augmenter la densité cellulaire, cependant ils n'expliquent pas entièrement l'effet de celui-ci sur la croissance cellulaire. En effet, on observe une inhibition de la croissance lorsqu'on augmente la concentration de « yeastolate » à 16g/L. Ceci pourrait être dû à une molécule inconnue et inhibitrice contenue dans le « yeastolate » (Bédard & al., 1994).

2.1.4.4 Les acides aminés

Jusqu'à maintenant, il a été impossible d'établir les besoins en acides aminés des cellules pour la synthèse d'acides nucléiques. Par contre, on sait que la croissance de cellules d'insectes ne requiert pas l'addition de purines et de pyrimidines. L'hypothèse de la consommation des nucléotides du « yeastolate » ne peut donc pas être écartée à ce stade. Il semblerait toutefois que les taux de consommation des acides aminés dépendent du mode de culture des Sf-9 (Licari et Bailey, 1992).

L'acide aminé limitant la croissance cellulaire est la cystine. La limitation de cet acide aminé entraîne une diminution de la production de protéines (Radford & al., 1997).

2.1.4.5 La production de métabolites secondaires

De récentes études démontrent que la baisse de productivité en protéines et le ralentissement de la croissance sont causés par l'épuisement de nutriments plutôt que par des produits secondaires inhibiteurs de la croissance. Des publications indiquent également que les cultures de cellules d'insectes ne sont pas affectées par l'accumulation de métabolites inhibiteurs. Selon Licari & al (1992), les cellules Sf-9 en présence d'une trop grande concentration de glucose produisent plus d'alanine, mais cet acide aminé en concentration élevée ne semble pas être un inhibiteur de la croissance cellulaire. L'alanine est un excellent indicateur du bon fonctionnement des voies métaboliques de la cellule.

Bédard & al ont testé les Sf-9 avec un milieu enrichi en alanine jusqu'à 40 mM sans jamais observer d'effet inhibiteur sur la croissance. Ce même groupe de recherche a montré que la production de métabolites secondaires (acide lactique, ammonium et

alanine) diminue lorsque les cellules sont dans un environnement limité en glucose et en glutamine. Ceci implique une augmentation de l'efficacité énergétique de la cellule. Ces résultats ont été validés pour des réacteurs opérés en cuvée aussi bien qu'en cuve alimentée. Reuveny & al (1993) n'ont pas noté d'effet d'inhibition sur la croissance ni sur la production de protéines recombinantes par la concentration élevée d'acide lactique dans le milieu de culture. Ils notent aussi un lien entre l'aération et la production d'acide lactique. La production d'acide lactique serait anaérobie.

Lorsque le glucose est entièrement consommé, les cellules dégradent l'acide lactique préalablement produit (Ohman et al., 1995). L'accumulation d'acide lactique dans le milieu cellulaire est responsable de la chute du pH. Il est intéressant de noter que l'accumulation d'ions ammonium par les cellules a un effet inverse sur le pH, rendant le milieu de culture cellulaire alcalin. Le ratio de production d'acide lactique par consommation de glucose a été établi à 1.6 par Zeng & al. (1998). Une constance dans le ratio de production d'ions ammonium par mole de glutamine consommée a été également observée par cette même équipe de recherche.

2.1.5 L'infection virale et la production de protéines

2.1.5.1 Impact sur la consommation

L'infection cellulaire a un effet important sur la consommation des nutriments et la production de métabolites secondaires chez les Sf-9. Schmid (1996) remarque une augmentation de 60 à 70 % des taux de consommation de glucose, de glutamine et d'oxygène dissous 24 heures après l'infection virale. L'augmentation de la production de dioxyde de carbone dans cette même période est probablement due à

l'augmentation de consommation des nutriments plutôt que simplement lié à la présence de virus.

2.1.5.2 MOI et TOI

La qualité de l'infection dépend de la densité cellulaire, de la respiration cellulaire et du ratio virus/cellules (MOI) ainsi que du temps d'infection (TOI) (Kioukia & al., 1995).

L'infection virale peut se comparer à un catalyseur inorganique. La qualité du matériel biologique au moment de l'infection influence la production de protéines recombinantes. Des travaux ont démontré que la qualité de l'inoculum viral a un effet sur la production de protéines (Wickham & al., 1991). La physiologie des cellules est également un facteur clé lors de l'infection. Les cellules et le stock viral doivent être dans un état optimal afin de ne pas nuire au processus infectieux.

Les paramètres régissant normalement l'infection sont : le MOI (« multiplicity of infection ») et le TOI (« time of infection »).

Le MOI donne la probabilité qu'une cellule rencontre un virus. Lorsque le MOI est faible (<1), on observe une infection secondaire. Une fois les virus introduits dans la culture, seule une partie des cellules sera infectée. Après qu'une première réplication virale soit complétée, les cellules infectées lysent. Ce premier groupe de cellules relargue ainsi des nouveaux virus dans le milieu. Ces virus infecteront le reste des cellules viables. Pour éviter que l'infection virale se produise en deux étapes, on privilégie un MOI de plus de un (1).

Le TOI est un paramètre crucial. Plusieurs groupes ont établi qu'une infection en phase exponentielle donne de meilleurs résultats qu'une infection en phase

stationnaire. Les cellules Sf-9 en phase exponentielle seraient majoritairement dans la phase S de la division cellulaire (le cycle cellulaire complet d'une cellule est présenté dans la figure 2.2), ce qui expliquerait qu'il est plus facile d'avoir une infection synchronisée. En phase de division cellulaire S, l'augmentation de l'ADN cellulaire aiderait à la réplication de l'ADN viral, du moins c'est l'hypothèse émise par Kioukia & al. (1995). Les croissances post-infection sont surtout observées lors d'infection en phase stationnaire ou lorsque les cellules en cours de division cellulaire au moment de l'infection complètent leur cycle de division (donnant l'impression que la croissance cellulaire continue). La respiration cellulaire demeure toutefois comparable avant et après l'infection. Les cellules cessent de croître, car elles transcrivent et expriment les gènes viraux qui ont été introduits dans leur noyau.

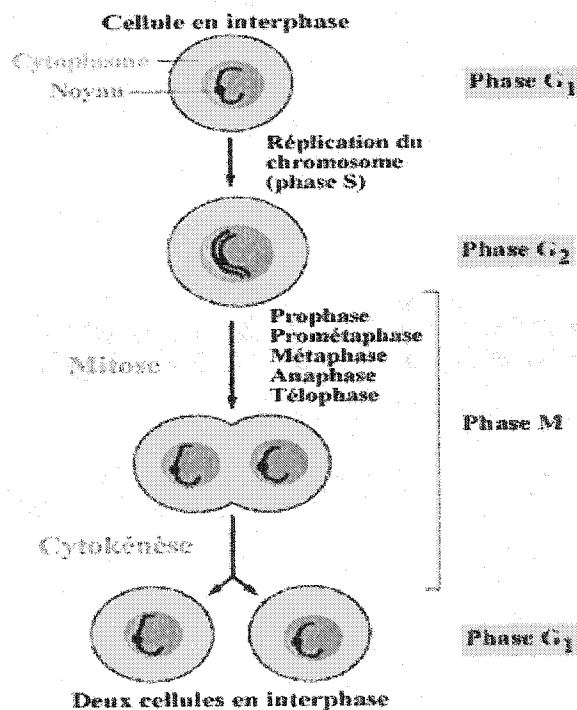


Figure 2.2 : Cycle cellulaire

2.1.5.3 Alimentation en nutriments post-infection

Récemment, Bédard & al. (1997) ont remarqué qu'une alimentation contrôlée en nutriments permet d'atteindre une concentration de cellules de $11,5 \times 10^6$ cell/mL. Ces expériences ont été réalisées en flacons agités et les cellules ont probablement été limitées en oxygène dissous lors de l'infection (Elias & al., 2000). La productivité spécifique de protéine a été maintenue pour une densité de 14×10^6 cell/mL en mode de culture semie-alimentée (Elias & al., 2000).

L'infection virale à haute densité cellulaire est limitée par la quantité de nutriments et d'oxygène disponible. Carpentier & al (2001) ont proposé une alimentation pré-infection pour répondre à cette contrainte. Pour éviter les limitations en nutriments lors d'une infection à haute densité cellulaire, on peut également envisager de remplacer le milieu par du milieu frais (« batch and replacement », B/R). Il s'agit de centrifuger les cellules avant l'infection et de les resuspendre dans un milieu frais avant de les infecter. Selon Kioukia & al (1995), cette technique permet une moins grande dépendance de l'efficacité infectieuse face au MOI. Bédard & al. (1994) montre que le MOI a une incidence sur le rendement de la production de protéines. L'option de l'alimentation d'un cocktail de nutriments en semi-continu apporte à la culture plus qu'un simple changement de milieu (B/R), car il augmente le rendement en production de protéines. Toutefois, l'osmolalité a une incidence négative sur la production de protéines (Dutton & al., 1998), il faut donc optimiser le cocktail des nutriments ajouté au bioréacteur afin de ne pas induire une osmolalité trop élevée dans celui-ci. Dutton & al (1998) ont observé que la stratégie de « fed-batch » augmente non seulement la

densité cellulaire, mais aussi la productivité volumétrique des protéines sans en changer la productivité spécifique.

2.2 Paramétrisation de la culture de Sf-9

2.2.1 Sonde pour la biomasse

Le suivi en temps réel de la permittivité relative et du taux de production de CO₂ du milieu de culture facilite l'optimisation et le contrôle d'une culture semi-alimentée. En effet, Zeiser & al. (2000) identifient que le profil de permittivité est une mesure fiable du biovolume pendant toute la durée de la culture, incluant la phase de post-infection. La permittivité relative (ϵ') est obtenue à partir des mesures de capacitance :

$$\epsilon' = \frac{Cap \cdot K}{\epsilon_0} \quad (\text{éq 2.1})$$

Où Cap, est la capacitance (pF), ϵ_0 est la permittivité dans le vide ($8,854 \times 10^{-12}$ F/m) et K est une constante qui dépend de la géométrie de la sonde ($0,07 \text{ cm}^{-1}$). La relation observée entre la permittivité et le biovolume est linéaire selon Zeiser & al. (2000).

A l'aide d'une distribution de tailles des cellules obtenues lors de différents échantillonnages, il est possible de calculer le biovolume (V_b) en supposant que le volume des cellules correspond à celui d'une sphère : $V_b = [\text{Densité cellulaire viable}] \cdot [\text{volume cellulaire}]$. Il est plus représentatif d'utiliser une distribution de tailles des cellules plutôt qu'une taille moyenne afin de calculer le volume cellulaire :

$$\text{volume cellulaire} = \frac{4}{3} \cdot \pi \sum_{d=X_L}^{X_U} \frac{CC_d}{CC} \cdot \left(\frac{d}{2}\right)^3 \quad (\text{éq 2.2})$$

$$\text{Ou } CC = \sum_{d=X_L}^{X_U} CC_d$$

Où d est le diamètre de cellules (μm), x_u le diamètre supérieur de la distribution (μm), x_L le diamètre inférieur de la distribution (μm) et CC_d le nombre de cellules comptées à un diamètre donné.

La mesure de la permittivité permet également d'avoir des indications sur le processus d'infection. Une infection synchronisée présente un plateau dans la valeur de la permittivité dans les heures post-infection, tel qu'illustré sur la figure 2.3. Généralement, pour les cellules Sf-9, ce plateau est atteint entre 18 et 24 heures post-infection (hpi) et correspond à un pic dans la valeur de la respiration (CER) (Zeiser & al., 2000).

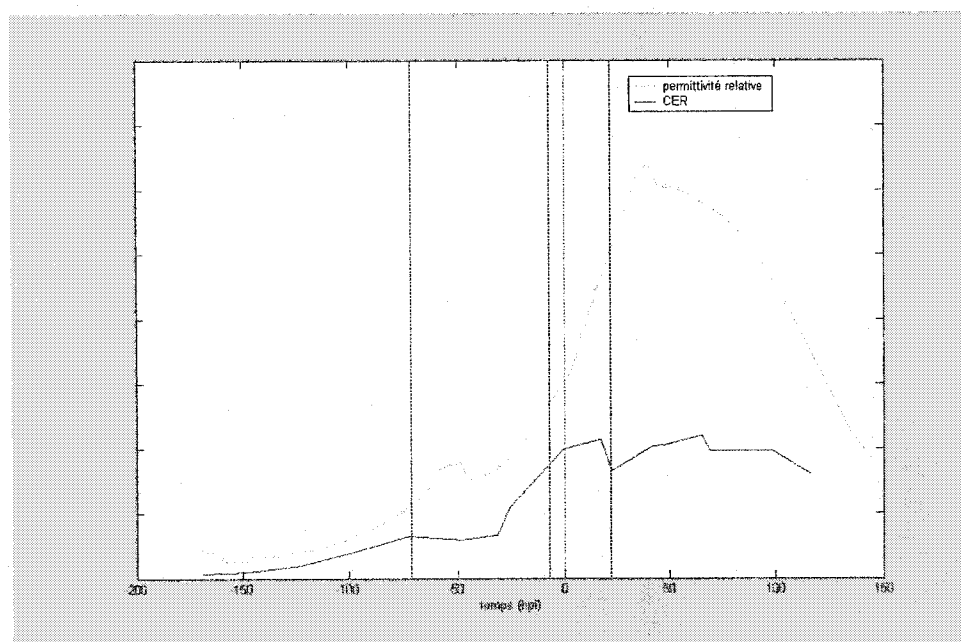


Figure 2.3 : Profil typique du CER et de permittivité relative pour une culture de cellules d'insecte

2.2.2 Mesure de la respiration OUR et CER

La mesure de la respiration cellulaire permet également d'avoir de nombreux renseignements sur l'état du système. Pour mesurer la demande en oxygène (« oxygen uptake rate », OUR), Kamen & al (1995) propose la relation suivante avec les mesures disponibles en-ligne :

$$OUR = KLa(H \cdot pO_2^* - H \cdot DO \cdot pO_{2cal}) \quad (\text{éq 2.3})$$

Où H est la constante d'Henry dans l'eau pure, pO_2^* la pression partielle d'oxygène à saturation, pO_{2cal} la pression partielle d'oxygène à saturation lue par la sonde (0,2 atm). La concentration maximale d'oxygène qui peut être dissoute à 25°C dans l'eau pure est de 7,8 mg/L (Ruffieux & al., 1998). Une valeur typique de OUR pour des cellules animales se situe aux environ $0,2 \times 10^{-12} \text{ molO}_2/(\text{cell} \cdot \text{h})$ (Ruffieux & al., 1998).

Le OUR est une mesure proportionnelle à la croissance cellulaire, tant pré-infection que post-infection pour autant que la viabilité cellulaire soit au-delà des 95%. La vitesse de décroissance du OUR après-infection est également proportionnelle à la diminution de la concentration cellulaire viable. Lorsque cette chute commence, on est dans le début de la phase de mortalité cellulaire. Le pic dans le OUR observé correspond à la réplication virale ainsi qu'à un arrêt de la production de protéines cellulaires (Wong & al., 1994).

La respiration peut aussi être quantifiée par la production de dioxyde de carbone rejeté par les cellules, le « carbon evolution rate » (CER), calculé de la façon suivante :

$$CER = \frac{pCO_2 \cdot Q_{tot}}{RTV} \quad (\text{éq 2.4})$$

Où $p\text{CO}_2$ est la pression partielle de dioxyde de carbone à la sortie (atm), Q_{tot} est le débit des gaz de sortie (L/h), T la température (K), R la constante des gaz parfaits (atmL/(molK)) et V le volume utile du réacteur (L).

2.3 Approches de modélisation

2.3.1 Modèle de Power 1994

Le modèle de Power prédit la production de virus et de protéines recombinantes avant et après infection. Il s'agit d'un modèle non-structuré et ségrégué pour un système en cuvée. La population cellulaire est divisée en quatre sous-populations : non-infectée, infectée, viable et non viable. Ce modèle propose une croissance exponentielle avant et après infection et ne tient pas compte des limitations en nutriments ou des accumulations de métabolites toxiques. On pose l'hypothèse que le procédé est une dialyse (B/R). Le système ne peut donc pas avoir de limitation nutritionnelle ou d'intoxication induite par la production de métabolites secondaires.

Le bilan de masse pour la croissance pré-infection :

$$\frac{dX_{VNI}}{dt} = \mu X_{VNI} \quad (\text{eq 2.5})$$

Où X_{VNI} densité cellulaire viable non infectée, μ est le taux de croissance intrinsèque.

À l'infection, la population cellulaire viable infectée est proportionnelle à la population cellulaire viable non infectée :

$$\frac{dX_{VI}}{dt} = \alpha_1 v X_{VNI} \quad (\text{eq 2.6})$$

Où α_1 est la constante d'attachement du virus aux particules non infectées et v la concentration en virus et X_{VI} viable infectée. L'infection est supposée synchronisée

pour tout MOI de plus de deux. La distribution des cellules dans le cycle de croissance a un impact sur l'infection, mais le modèle n'en tient pas compte.

Un court laps de temps après l'infection, le nombre de cellules infectées est égal au nombre de cellules viables dans la culture. S'en suit la mort des cellules :

$$\frac{dX_{VI}}{dt} = -q_D X_{VI} \quad (\text{eq 2.7})$$

Où q_d est le taux de mortalité des cellules infectées et X_{VI} viable infectée. Le cycle des événements après infection dépend du temps post infection. La première période à considérer est : $[T_{VPS}, T_{VPE}]$ du début de production des virus jusqu'à la fin de celle-ci. L'équation suivante décrit la production de ces derniers (V est la concentration virale et α_{VP} est la constante de multiplication virale) :

$$\frac{dV}{dt} = \alpha_{VP} X_{VI} \quad \text{de } T_{VPS} \text{ à } T_{VPE} \quad (\text{eq 2.8})$$

La deuxième période est : $[T_{PPS}, T_{PPE}]$ du début de la production des protéines jusqu'à la fin de la production de celles-ci. Cette production est modélisée par l'équation suivante (P est la concentration de protéines et α_{PP} est la constante de production protéique) :

$$\frac{dP}{dt} = \alpha_{PP} X_{VI} \quad \text{de } T_{PPS} \text{ à } T_{PPE} \quad (\text{eq 2.9})$$

Où P est la concentration en protéines et α_{VP} et α_{PP} sont des constantes déterminées expérimentalement. Le modèle ne tient pas compte de la dégradation des protéines ni de la désactivation des virus parce que ces deux phénomènes n'ont pas été observés. Certaines fonctions sont définies par morceaux :

$$\begin{aligned}
 q_D(t) &= \begin{cases} q_D & T_{\text{infection}}, T_{\text{mori}} \\ \text{inf} & \text{ailleurs} \end{cases} \\
 \alpha_{VP}(t) &= \begin{cases} \alpha_{VP} & T_{VPS}, T_{VPE} \\ 0 & \text{ailleurs} \end{cases} \\
 \alpha_{PP}(t) &= \begin{cases} \alpha_{PP} & T_{PPS}, T_{PPE} \\ 0 & \text{ailleurs} \end{cases}
 \end{aligned} \tag{eq 2.10}$$

Les temps de production de virus et de production de protéines peuvent s'enchâsser.

2.3.2 Modèle de Dutton

Dutton a introduit en 1998 la notion de « cellules par volume cumulé ». Il appuie sa théorie sur le fait que toutes les cellules ne sont pas dans la même phase de division cellulaire. Le taux spécifique apparent de croissance n'est égal au vrai taux intrinsèque de croissance que si la population est complètement viable, qu'elle est en phase de division cellulaire synchronisée et que le taux de croissance est maximal.

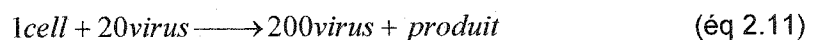
2.3.3 Autres types de modélisation

Différentes autres approches ont été évaluées par plusieurs groupes de recherches.

En voici une courte liste non exhaustive :

- Valentine & Allison (1959,1960) ont construit un modèle dans le but de prédire la cinétique d'attachement de *vaccinia* à une surface non biologique et en suspension cellulaire
- Chillakura (1991) a intégré les travaux de Valentine & al en ajoutant un facteur d'agglomération des cellules pour les cultures en suspension
- Licari & Bailey (1992) ont fait le premier modèle pour l'infection du baculovirus dans les cellules d'insectes
- Tramper & Vlak ont fait un modèle pour la synthèse du baculovirus

- Shuler (1990) a fait un modèle sur les interactions du baculovirus avec les récepteurs des cellules d'insectes
- Sanderson (1999) a fait un modèle tenant compte des vitesses de réactions biochimiques ainsi que des vitesses de transports des composants
- Wu (1993) a proposé un modèle de collisions pour prédire l'infection des cellules. Ce modèle se base sur une loi de Poisson
- Xie & al (1994) ont fait un modèle stœchiométrique dans le but de faire le design d'une alimentation avec des proportions stœchiométriques
- Wickham & al (1991) ont proposé un modèle où le taux d'infection est limité par le taux d'attachement des virus. Le taux maximum d'attachement des virus est atteint si seule la diffusion est limitante, c'est-à-dire si chaque collision cellule/virus résulte en un attachement
- Gooijer & al (1989) proposent la réaction biochimique suivante pour modéliser l'infection :



Cette revue partielle dresse un portrait global et juste de recherche sur la modélisation de ce type de culture.

2.4 Stratégies de contrôle des cuvées alimentées

2.4.1 Stratégies possibles

Shimizu (dans Lee & al., 1999) souligne que le développement des systèmes de contrôle pour les bioréacteurs est difficile notamment parce qu'il y a peu de modèles fiables décrivant la croissance cellulaire et la formation des produits. De plus, la nature non linéaire des bioprocédés complexifie largement la situation. La théorie du contrôle

a été développé pour les systèmes électriques (avec une constante de temps rapide). Elle doit être adaptée pour les systèmes lents, tel que les systèmes biologiques.

2.4.1.1 « Feedback » indirect simple

Ce type de contrôleurs relie le débit d'alimentation de la pompe avec une mesure en ligne tel que le pH (pH-stat) ou la DO (DO-stat). Le débit de la pompe est manipulé de telle sorte que le pH ou la DO reste stable au moyen d'un contrôle on/off, la pompe est activée si le pH ou la DO sort d'une bande prédéterminée de valeurs acceptables, tel que représenté dans la figure 2.4. Le contrôle basé sur le pH implique que le système produit des ions d'ammonium qui font augmenter le pH.

Celui sur la DO est basé sur l'hypothèse que la DO augmente rapidement lorsque qu'il y a limitation en nutriments.

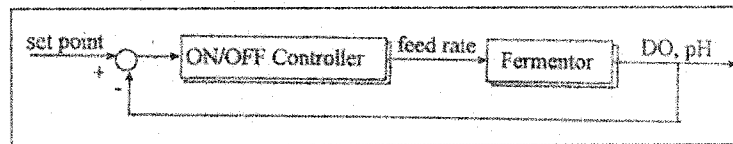


Figure 2.4 : Diagramme bloc du contrôleur en « feedback » indirect (Lee & al., 1999)

2.4.1.2 Alimentation prédéterminée

L'alimentation exponentielle de la pompe est une méthode très efficace pour suivre le taux de croissance des cellules. Cette méthode est limitée par la production de métabolites toxiques ou inhibiteurs (celle-ci n'étant pas contrôlée). Le débit de la pompe est déterminé à partir du bilan de masse sur la biomasse :

$$F(t) = \left(\frac{\mu}{Y_{X/S}} + m \right) x(t_0) V(t_0) e^{\mu(t-t_0)} \quad (\text{éq 2.12})$$

Où $F(t)$ est le débit de la pompe, μ le taux spécifique de croissance, Y_{XS} le rendement cellulaire sur le substrat, m le coefficient de maintenance, x la concentration en biomasse et V le volume utile du réacteur. Ce type de contrôleur ne prévoit aucun correctif pour une perturbation du système.

2.4.1.3 Contrôle axé sur le taux de consommation de glucose

La mesure en-ligne de la concentration de glucose permet de calculer le taux de consommation de glucose et ainsi déterminer le débit de la pompe. Les mesures en ligne de glucose sont cependant instables, peu fiables, et présentent un délai dans le temps de réponse de la sonde. Le calcul du taux de consommation de glucose à partir de ces valeurs est donc très risqué. Pour contourner le problème de la fiabilité de la sonde, Konstantinov (dans Lee & al., 1999) a envisagé la possibilité de prédire le taux de consommation du glucose à partir de la mesure de la composition des gaz de sortie, tel qu'illustré ci-dessous.

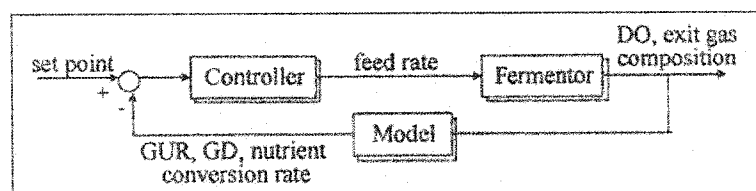


Figure 2.5 : Diagramme bloc d'une stratégie d'alimentation basée sur les gaz de sortie (Lee & al., 1999)

2.4.1.4 Contrôle axé sur la concentration de substrat ou avec le taux de croissance spécifique

Grâce aux données en-ligne disponibles, un modèle mathématique ainsi qu'un estimateur de paramètres (taux de consommation, de croissance, concentrations des variables d'état non disponible en-ligne) sont construits. Ces nouvelles variables sont utilisées pour définir les paramètres du contrôleur. Ce système de contrôle plus

avancé permet de déterminer le débit de la pompe par un contrôleur qui est paramétrisé par rapport à l'estimation de ces paramètres clé.

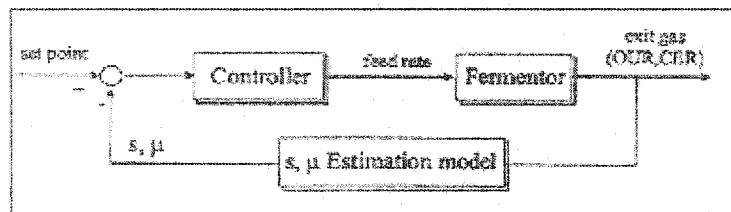


Figure 2.6 : Diagramme bloc d'une stratégie d'alimentation utilisant un modèle mathématique (Lee & al., 1999)

2.4.2 Stratégies testées par des groupes de recherches utilisant *E.coli*

La très grande majorité des travaux de recherche réalisés sur l'automatisation et le contrôle des bioréacteurs implique des systèmes microbiens (plus particulièrement sur la bactérie *E.coli*). Le premier paramètre que les scientifiques doivent contrôler est le taux d'oxygène dissous dans le réacteur. Plus souvent qu'autrement la variable manipulée dans ces cas est la vitesse d'agitation. Le k_La dépend de façon linéaire dépendant de la vitesse d'agitation. Le contrôle de l'oxygène dissous par la vitesse d'agitation peut être simplement fait par un PID. Les cellules eucaryotes ne supportent pas les mêmes taux de cisaillement que les bactéries, car elles ne possèdent pas les mêmes parois cellulaires. Le contrôle du taux d'oxygène dissous doit donc se faire sur la composition du mélange gazeux à alimenter et sur le débit d'alimentation (ce deuxième choix doit être minimisé, toujours à cause du cisaillement).

Afin d'augmenter la densité de la biomasse bactérienne, quelques stratégies d'alimentation de nutriments (principalement des sucres) ont été développées. Un résumé de ces diverses stratégies est présenté.

Kleman & al (1991) ont pensé à quatre types de contrôleurs du débit de la pompe d'alimentation pour une culture de *E.coli* en cuvée alimentée:

1. Un système en boucle ouverte basé sur les données des fermentations antérieures.
2. Un contrôleur indirect basé sur les paramètres secondaires de culture (pH, température,...)
3. Un contrôleur indirect basé sur les bilans de matières.
4. Contrôleur direct basé sur les données en-ligne des substances organiques.

De ces quatre contrôleurs, le dernier est retenu pour son efficacité. À haute densité cellulaire, le système nécessite un gain très élevé afin d'éviter les limitations en glucose, qui entraîne des oscillations dans le système. Le taux de consommation de glucose se calcule directement par régression linéaire sur les points antérieurs. Le taux de croissance demeure fixe. Ce contrôleur présente l'avantage d'avoir un gain adaptatif, grâce à la mesure du taux de consommation de glucose. De plus, ce contrôleur ne nécessite pas de connaissances particulières du métabolisme des bactéries. Toutefois, les sondes détectant les concentrations des nutriments ne s'utilisent pas couramment (i.e. problèmes de fiabilité et de difficultés de stérilisation). Le milieu de culture doit donc passer par une boucle externe afin de mesurer la concentration en glucose.

Konstantinov & al. (1990) ont également étudié la possibilité de contrôler la croissance de *E.coli*. Ils ont envisagé trois stratégies différentes :

1. La dialyse (B/R)
2. Contrôle de la DO par DO-stat (Chen 1997 l'a aussi testé)
3. Contrôle de la DO par DO-stat combiné avec une alimentation exponentielle de glucose

Aucune de ces stratégies n'est adaptative, c'est-à-dire que le contrôle se définit à d'avance et il ne peut pas être modifié en cours de culture. Ceci peut fonctionner avec des systèmes extrêmement simples dont on connaît très bien tous les paramètres.

Chapitre 3 Méthodologie

3.1 Description du système

3.1.1 Le bioréacteur et son suivi en-ligne

Le bioréacteur utilisé, un Chemap 3.5 L type SG en acier 316 (Männedorf, Suisse), est muni d'une chemise de refroidissement afin de contrôler la température. Le réacteur comporte trois ports latéraux utilisés pour la sonde à oxygène dissous, la sonde à dioxyde de carbone dissous et pour la sonde à pH. Un des ports du couvercle a été employé pour fixer la sonde de capacitance de Biomass Monitor (BM) modèle 214M (Aber Instruments Ltd., Aberystwyth, U.K.). Deux voies servent à l'alimentation gazeuse: une aération de surface et une aération par bullage. Le bullage se fait grâce à une membrane poreuse de 1 cm de diamètre et 2 cm de longueur, faite de polypropylène et la dimension des pores est de 250 μm (Porex Technologies, Fairburn, GA). La sortie des gaz est fixée sur le couvercle, sa composition est déterminée par un analyseur infrarouge Servomex 1410B (Norwood, MA). L'alimentation du bouillon de culture ainsi que l'inoculation se fait par un même port sur le couvercle. La bouteille d'alimentation est également reliée au couvercle du réacteur. Enfin, un port sert à l'échantillonnage pour les analyses faites hors-ligne. Une sonde de température, fixée dans le fond du bioréacteur, communique avec une unité de contrôle qui fait varier l'entrée d'eau dans la chemise afin de maintenir la culture dans des conditions optimales.

L'intérieur du bioréacteur se compose de deux chicanes de surfaces non inclinées et non profilées de 2,6 cm de largeur et 5,0 cm de hauteur. Deux « pitched blade » de trois pales viennent se fixer sur un arbre d'agitation, relié à un moteur situé sous le

bioréacteur. Un joint mécanique double assure l'étanchéité. Un drain se trouve également sur le dessous du bioréacteur. Le système Chemap comprend, en plus du bioréacteur, une unité de base où circule l'eau de refroidissement et la vapeur pour la stérilisation. Cette unité contient également : le moteur d'agitation, un module de contrôle pour ce dernier, le contrôle de la température et l'unité pour la procédure de la stérilisation. Le système Chemap comprend aussi un module de contrôle d'oxygène dissous. Une unité SAFE-8000 (Control Microsystems, Toronto, Canada) assure un contrôle de l'oxygène dissous et sert également de système d'acquisition de données.

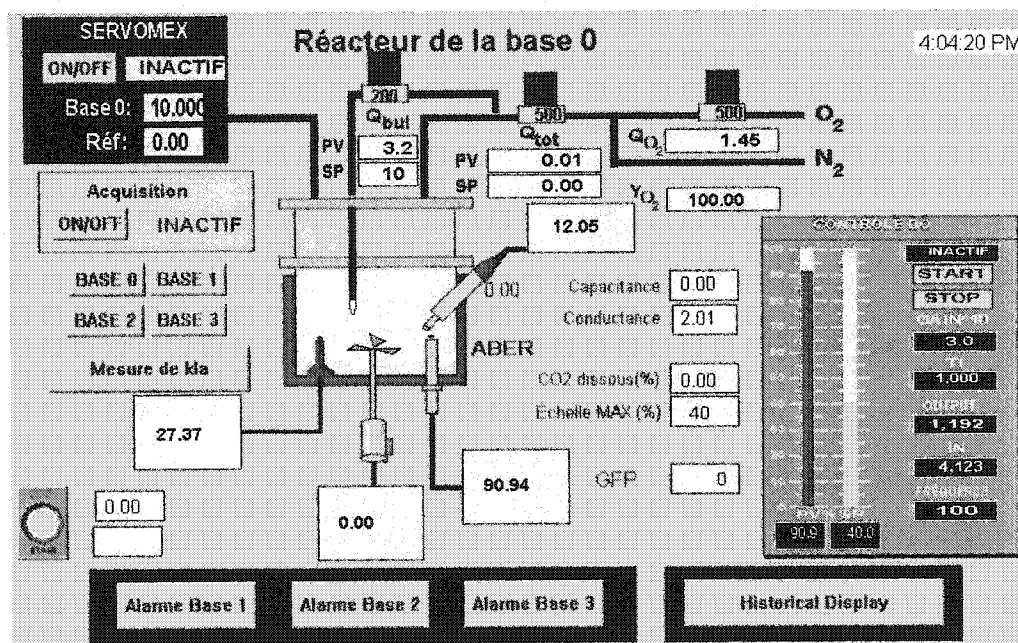


Figure 3.1 : Schéma du bioréacteur

3.1.2 Méthodes analytiques

Les analyses hors-ligne effectuées sont le compte cellulaire avec un microscope optique à l'aide d'un hémocytomètre (exclusion au Trypan Blue, Neubauer Counting chamber), et avec un Coulter Counter (Coulter Z2, Coulter Particle Characterization, Hialeah, FL). Une analyse des acides aminés est faite à l'aide d'un HPLC utilisant une

version modifiée de la méthode de Waters AccQ.Tag™. Les concentrations de glucose, d'acide lactique et d'ions ammonium sont mesurées par un IBI Bioanalyser Rapid Analysis System (Kodak, New Haven, CT). L'osmolalité est mesurée par un Advanced™ micro-osmometer model 3MO (Advanced Instruments inc, Needham Heights, MA).

3.2 Matériel biologique et milieu de culture

3.2.1 La cellule Sf-9

Les cellules utilisées proviennent de la souche *Spodoptera frugiperda* (Sf-9) utilisée à l'Institut de recherche en biotechnologie de Montréal (IRB). La lignée est maintenue en flacon sous une agitation de 120 RPM et une température de 27°C.

3.2.2 Le milieu nutritionnel

Le milieu nutritionnel de base est le IPL-41 (JRH Biosciences, Lenexa, KS) dont la composition se trouve en annexe 1. Au milieu de base, on rajoute du « yeastolate » et des lipides (Gibco/Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA). Les cellules sont d'abord maintenues dans le milieu SF900II (Gibco/Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) avant d'être adapté dans le IPL-41. On utilise aussi le EXcell-420 (JRH Biosciences, Lenexa, KS) pour la maintenance des cellules High-Five™.

3.2.3 L'alimentation

Le cocktail alimenté au réacteur a été développé par le groupe de recherche de l'IRB. Il s'agit d'un mélange d'acides aminés, de vitamines, d'éléments traces, de « yeastolate », de lipides et de glucose. L'annexe 2 présente la composition exacte de ce cocktail.

Chapitre 4 Culture de cellules d'insectes Sf-9

Ce chapitre présente l'aspect biotechnologique de la mise en réacteur des cellules d'insectes Sf-9. Les principaux paramètres des quatre expériences présentées sont analysés et expliqués afin de cerner les enjeux importants de ce système. L'annexe 3 présente un travail complémentaire sur la culture des cellules *Trichoplusia ni* (High-Five™). Ce travail permet de conclure qu'il est possible de faire croître à des densités cellulaires importantes ces cellules dans différents modes de culture, et ce malgré leur fragilité au cisaillement, leur importante demande en oxygène dissous et leur métabolisme méconnu.

4.1 Cultures de Sf-9

Quatre cultures, infectées avec le baculovirus, impliquant les cellules Sf-9 ont été réalisées. Les expériences se sont déroulées en cultures en cuvées semi-alimentées. Le tableau 4.1 qui suit résume les conditions expérimentales entourant ces quatre cultures.

Tableau 4.1 : Plan expérimental

Numéro de l'expérience	Nombre d'alimentations	Type de milieu de culture	Début de l'aération par bullage (hpi)
1	4	Excell 420	-31,4
2	4	IPL-41	-24,3
3	3	Excell 420	-48,5
4	5	IPL-41	-24,25

Toutes les lignes verticales vertes dans les figures subséquentes indiquent le début ou la fin d'une période d'alimentation. La ligne rouge indique le moment de l'infection.

4.1.1 Production de dioxyde de carbone

Tel que mentionné dans le chapitre 2 de la revue de la littérature, le suivi de la production de dioxyde de carbone permet de suivre l'évolution du procédé infectieux. La figure 4.1, qui exprime le CER en mmol//h en fonction du temps post infection, montre que le taux de production de dioxyde de carbone augmente proportionnellement à la croissance cellulaire (celle-ci est exponentielle avant l'infection). Lors d'une infection synchronisée, on observe un plateau dans la mesure du CER de 18 à 24 heures après l'infection. Le plateau est atteint, lorsque la croissance s'arrête. La respiration ne sert plus qu'au maintien des cellules présentes dans le réacteur. L'expérience 2 ne présente aucun plateau. On note une croissance post-infection lors de cette culture provoquée par une infection non synchronisée. Deux hypothèses permettent d'expliquer cette croissance. Premièrement, le titre viral (concentration des virus), l'infectivité des virus ainsi que la concentration de particules virales totales dans un stock posent des problèmes lors de leur quantification puisque les particules virales sont très petites et qu'elles forment facilement des agrégats. La deuxième explication suggère que la majorité des cellules étaient en cours de division lors de l'infection. Par conséquent elles ont complété leur cycle après l'infection. Les croissances post-infection peuvent compromettre la production protéique.

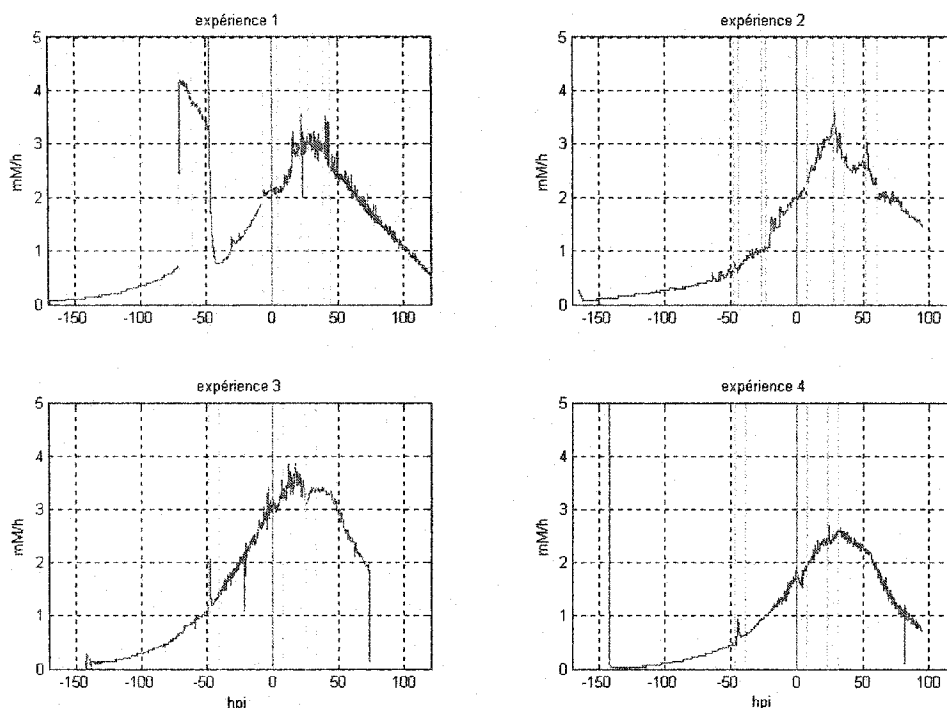


Figure 4.1 : CER, taux de production de dioxyde de carbone

4.1.2 La permittivité relative, le biovolume et la concentration cellulaire

La permittivité relative constitue une indication précieuse pour la phase infectieuse tout comme pour la phase de croissance. La permittivité relative, calculée à partir de la lecture de la capacitance (chapitre 2 – revue de la littérature), permet de suivre le biovolume. Le biovolume est une mesure dérivée de la concentration cellulaire qui mesure le volume occupé par les cellules dans le réacteur. Cette mesure est le reflet de la concentration cellulaire avant l'infection puisque le diamètre des cellules est constant. L'infection cellulaire a notamment pour effet de faire varier le volume des cellules. Les cellules augmentent de volume et provoquent une augmentation du biovolume (de la permittivité relative) et celui-ci n'a donc plus de lien avec la

concentration cellulaire. L'augmentation de la permittivité relative post-infection indique que le virus est bien intégré dans la cellule. Le changement drastique de pente de 24 à 48 heures post infection démontre que les cellules lysées déversent les virus dans le milieu (figure 4.2). Lors de la production de protéines intracellulaires, la récolte doit impérativement s'exécuter avant la lyse cellulaire afin de conserver la conformation des protéines. Si toutefois il s'agit d'une production de protéines sécrétées hors de la cellule, la récolte s'effectue durant la période la lyse cellulaire. Celle-ci doit être faite avant que les débris cellulaires n'endommagent les protéines produites en suspension dans le milieu.

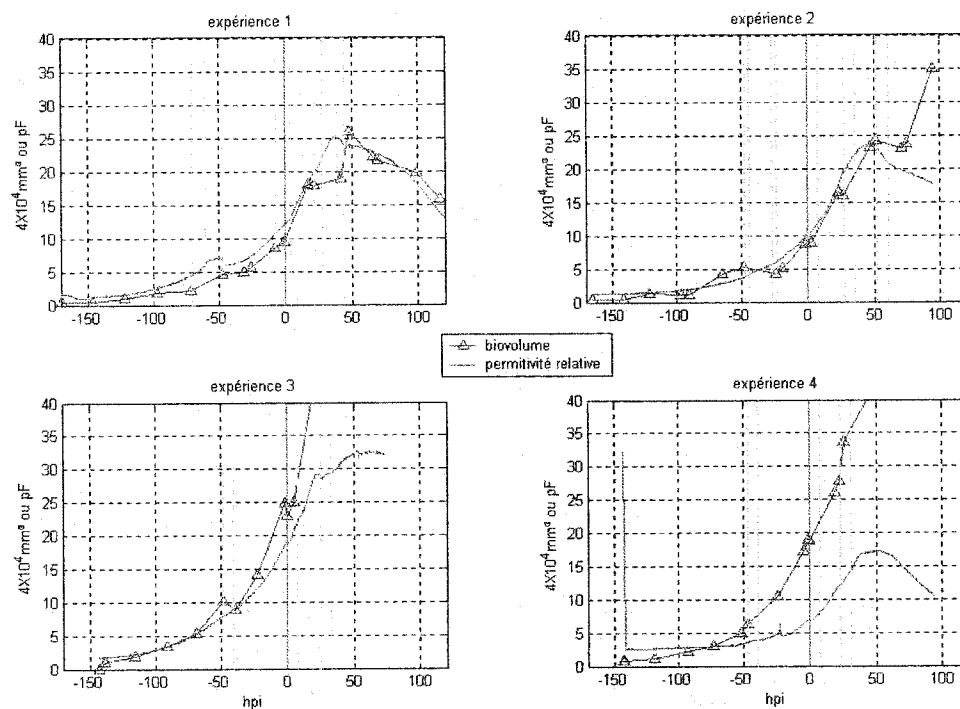


Figure 4.2 : Permittivité relative et biovolume

4.1.3 Taux de consommation d'oxygène dissous

La consommation de l'oxygène dissous est un bon indicateur de la croissance cellulaire. La demande en oxygène double avec la multiplication des cellules. La baisse drastique dans la courbe préinfection est due au début de l'aération par bullage. Pour cultiver les cellules à de fortes densités cellulaires, l'aération de surface ne peut suppléer à la demande en oxygène des cellules. L'alternative la moins stressante pour les cellules est de buller le mélange gazeux afin d'augmenter C^* (concentration d'oxygène dissous à saturation). Dans les systèmes microbiens, lorsque que le transfert est insuffisant on procède à l'augmentation de l'agitation, augmentant ainsi le k_La . Cette alternative s'avère certes plus efficace, mais les cellules d'insectes ne peuvent supporter les taux de cisaillement que provoquerait une augmentation de la vitesse d'agitation. Après l'infection, le OUR est relativement constant pour une période qui correspond à la réplication virale. La lyse cellulaire commence avec la diminution de ce signal tel qu'observé dans la figure 4.3.

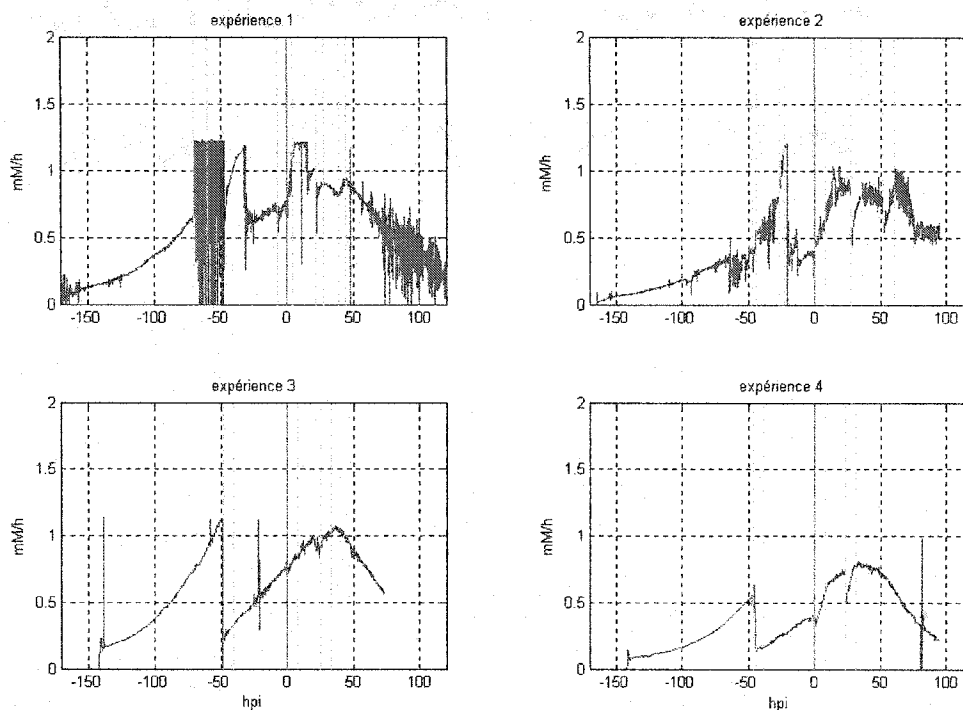


Figure 4.3 : OUR, consommation en oxygène dissous

4.1.4 L'osmolalité

L'osmolalité est une mesure de la concentration de soluté dissous dans un solvant, normalisée par le nombre de particules totales dans la solution (soit les molécules ioniques et non ioniques). L'osmolalité du milieu de culture a un impact direct sur la physiologie des cellules. Les cellules baignant dans un milieu où l'osmolalité est la même que celle du cytoplasme cellulaire seront de tailles optimales et parfaitement sphériques. En cas d'hyper-pression osmotique, les cellules gonflent tandis qu'inversement, dans un environnement de dépression osmotique, elles se ratatinent. La pression osmotique sur les cellules animales affecte aussi les taux de production de protéines. L'osmolalité optimale pour les cellules d'insectes se situe entre 350-450 mOsm/kg. Lors d'une culture en cuvée, l'osmolalité ne varie pratiquement pas, les

seuls changements dans la composition du milieu étant les échanges avec les cellules. L'ajout de nutriments peut avoir par contre un effet notable sur l'osmolalité. Certains composants du cocktail d'alimentation, comme le glucose, ont une osmolalité très forte (tableau 4.2).

Tableau 4.2 : Osmolalité des composants du cocktail d'alimentation

Cocktail complet	1000 mOsm/kg
Glucose (500g/L)	2690 mOsm/kg
Solution de tyrosine	290 mOsm/kg
Solution de vitamines	350 mOsm/kg
Solution d'acides aminés (AA8.2)	770 mOsm/kg
« Yeastolate » 100X	1455 mOsm/kg
Émulsion de lipides 100X	585 mOsm/kg

Lorsque les nutriments alimentés au réacteur sont consommés rapidement par les cellules, l'osmolalité du milieu demeure dans des bornes acceptables. Lors d'une surabondance de nutriments, l'osmolalité du milieu augmente. Celle-ci peut redescendre si les nutriments à très haute osmolalité sont consommés. La stratégie couramment employée par le centre de recherche consiste à alimenter le réacteur au plus faible débit possible afin de minimiser à la fois le volume ajouté au réacteur et les effets de la pression osmotique. Lors de la culture en 3,5L, le volume utile maximal disponible est de 3L et le volume utile minimal est de 2,3L. Plus le volume est élevé, plus la contribution au transfert d'oxygène en surface est mauvais. La figure 4.4 illustre très bien l'impact des alimentations sur l'osmolalité.

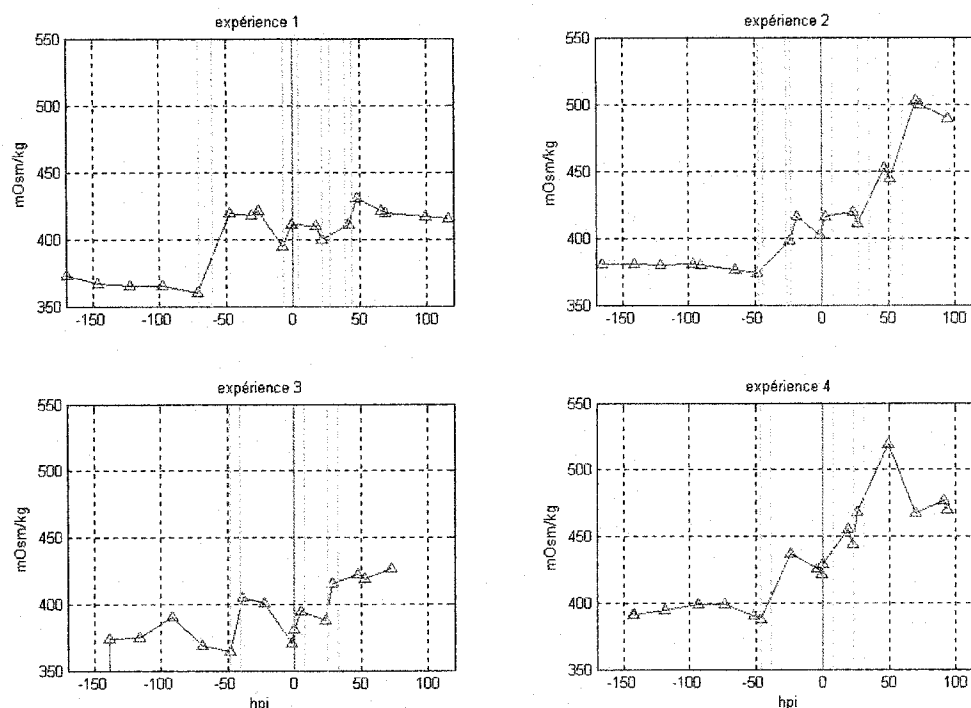


Figure 4.4 : Osmolalité

Lors de chaque période d'alimentation, l'osmolalité augmente. La consommation des nutriments à osmolalité élevée contribue à ramener celle-ci vers sa valeur optimale. Tel qu'observé lors de l'expérience 3. Au moment de l'alimentation à 48 hpi, l'osmolalité passe de 360 mOsm/kg à 410 mOsm/kg, redescendant ensuite à 370 mOsm/kg au moment de l'infection.

4.1.5 Consommation et production de métabolites

Les expériences 1 et 3 ont été réalisées dans un milieu complexe et riche (40 mM de glucose), tandis que les expériences 2 et 4 ont été réalisées dans un milieu complexe, mais pauvre en glucose (12 mM). Les milieux riches en glucose sont souvent privilégiés lors de la culture cellulaire pour éviter une déplétion de ce nutriment. Une idée répandue veut que les cellules produiraient plus de métabolites secondaires dans

les milieux pauvres en glucose. En fait, la figure 4.5 montre que la production d'acide lactique n'est pas plus importante pour une culture en milieu pauvre qu'en milieu riche. Le problème de l'accumulation d'acide lactique et éventuellement d'ions ammonium est relié davantage à une limitation en oxygène dissous (problème souvent observé dans la culture en flacons agités). L'usage à privilégier pour les milieux riches demeure la culture en cuvée. Il est pratiquement impossible d'entrevoir la culture en cuvée avec un milieu pauvre, puisque le risque de limitation en nutriment est grand. Les milieux pauvres en glucose présentent l'avantage d'être moins coûteux, mais imposent le défi du contrôle de la concentration en glucose. Une déplétion en glutamine peut également devenir problématique lorsqu'elle n'est pas contrôlée. Toutefois le cocktail possédant dès le départ une forte concentration en glutamine, tout problème subséquent à ce niveau est écarté et ne peut nuire à la croissance des cellules. Lors des expériences 1 et 2, la glutamine s'accumule même dans le milieu (figure 4.5).

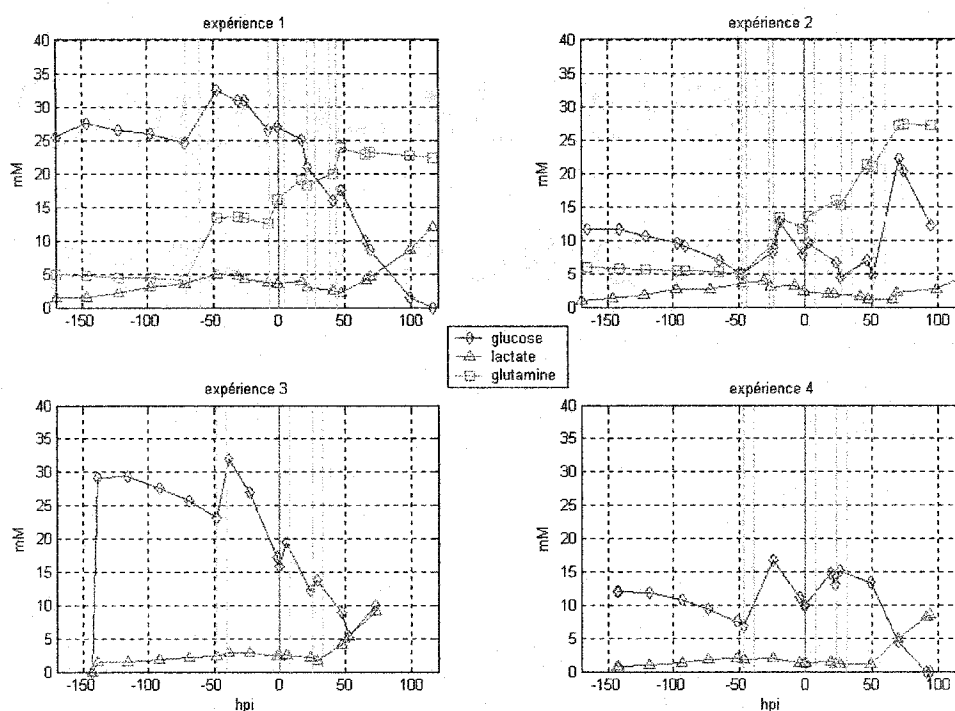


Figure 4.5 : Concentration résiduelle des métabolites

4.2 Quantification des paramètres de culture des Sf-9 et des High-Five™

Les cellules d'insecte Sf-9 sont les plus répandues dans le domaine de la culture cellulaire d'insectes (chapitre 2 – revue de la littérature). Il existe toutefois plusieurs autres lignées cellulaires qui sont utilisées dans ce champ d'application. Nous comparons dans ce sous-chapitre les métabolismes cellulaires des cellules Sf-9 avec ceux des cellules High-Five™ non transfectées (host) et avec celui des High-Five™ contenant le gène PYC. Pour en savoir plus sur la culture de cette lignée cellulaire, un travail complémentaire sur la culture des cellules High-Five™ est présenté en annexe 3 sous forme d'affiche (cette affiche a été présentée par le groupe des cellules animales de l'Institut de recherche en biotechnologie lors du 18th ESACT Meeting, Granada,

Espagne, du 11 au 14 mai 2003). Cette annexe contient une seconde affiche qui a été récemment présenté à la 6^e édition de la conférence PEACe (« Protein Expression in Animal Cell ») qui s'est tenue du 7 au 11 septembre 2003 au Mont-Tremblant, Canada. Cette deuxième affiche démontre qu'il est possible de transfecté la cellule High-Five™ host avec un gène d'expression de protéine (ici la protéine SEAP) et que cette nouvelle lignée cellulaire puisse exprimer de manière stable la protéine dans les trois modes de cultures suivant : cuvée, cuvée alimentée et perfusion.

4.2.1 Taux de croissance, de consommation et de production des métabolites

La figure 4.6 compare graphiquement différents taux spécifiques de consommation et de production de métabolites ainsi que les taux de croissance pré-infection de ces cellules (dont les valeurs numériques apparaissent en annexe 4). La taille des cellules High-Five™ est supérieure de quelques microns à celles des cellules Sf-9 (17µm pour les High-Five™ contre 14,5µm pour les Sf-9).

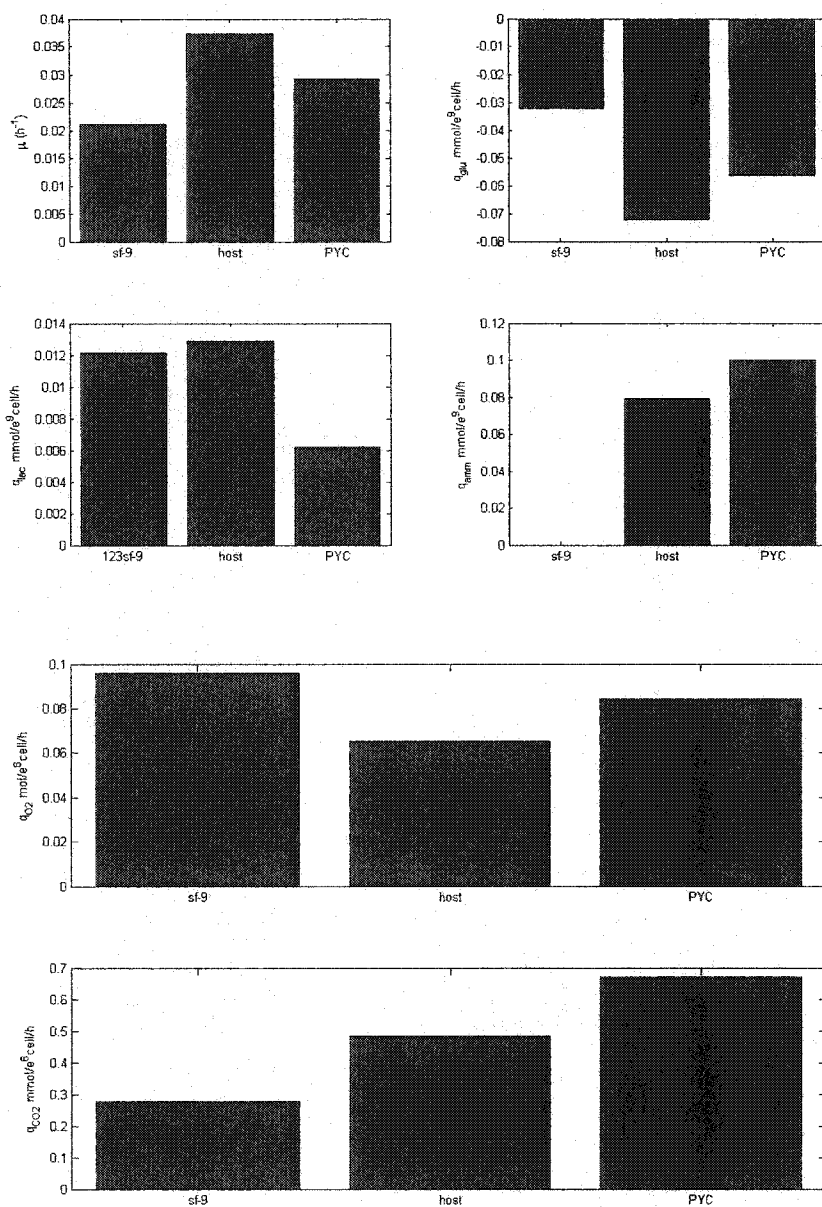


Figure 4.6 : Comparaison des cellules Sf-9, High-Five™ host et PYC : a) taux de croissance, taux de consommation et de production de métabolites b) quantification comparée de la respiration cellulaire

Comme on peut le constater, le taux de croissance des cellules High-Five™ est légèrement supérieur à celui des cellules Sf-9 (0,0211 h^{-1} pour les Sf-9 versus 0,0373 h^{-1} pour les host et 0,0292 h^{-1} pour les PYC). Par contre, la production spécifique de

CO₂ est légèrement inférieure pour les cellules Sf-9. Les taux spécifiques de consommation d'oxygène, paramètre le plus critique pour le contrôle de ce type de procédé, sont sensiblement les mêmes pour les trois types de cellules (Sf-9 : 0,0957 mol/e⁹cell/h, host : 0,0653 mol/e⁹cell/h et PYC : 0,0843 mol/e⁹cell/h). Ce constat sous-tend une hypothèse importante voulant que le développement d'un système automatisé d'une culture de cellules Sf-9 pourrait être facilement transférable à d'autres types de cellules d'insectes (les conclusions du chapitre 7 sur le contrôle par sondage pourrait donc s'appliquer à la culture des High-FiveTM).

D'autre part, la consommation spécifique de glucose est moindre pour les cellules Sf-9, ce qui s'explique facilement par la taille des cellules. En effet, plus les cellules ont un volume important, plus la réplication de celles-ci nécessite de l'énergie. Les cellules High-FiveTM PYC produisent nettement moins d'acide lactique que les deux autres lignées. Ceci est parfaitement normal puisqu'elles ont été transfectées afin de minimiser la quantité de rejet de ce métabolite secondaire. Il existe, dans la communauté scientifique, un doute quant à la possibilité de maintenir une culture de cellules High-FiveTM en réacteur, car celles-ci rejettent de nombreux métabolites présumés toxiques dans leur environnement. Le clone PYC a donc été créé afin de vérifier cette hypothèse. Les résultats présentés en annexe 3 montrent qu'il est possible et réalisable de cultiver les deux clones dans divers modes de culture.

4.2.2 Taux spécifiques de consommation et production des acides aminés

L'utilisation des acides aminés dans les cellules d'insectes constitue un enjeu important pour la culture de celles-ci. Les protéines dont sont constituées les cellules d'insectes

sont formées de différentes combinaisons d'acides aminés. Il est donc important de voir à ce que ces composants ne limitent pas les cultures. Les cellules d'insectes, contrairement aux bactéries, ne sont pas des organismes autonomes. Leur métabolisme de base a été modifié tout au long des étapes nécessaires à l'obtention d'une lignée stable. Il se peut aussi que leur métabolisme change au cours d'une culture. Étrangement d'ailleurs, certains acides aminés sont produits et non pas consommés. Un acide aminé peut très bien être consommé à un certain moment de la division cellulaire et rejeté à un autre. Ces taux ne font pas de distinction entre l'utilisation intracellulaire de ces acides aminés puisqu'il s'agit de taux spécifiques de consommation globale. La tendance générale qui se dégage de ces résultats (dont les valeurs numériques sont présentées en annexe 4) veut que la machinerie métabolique des Sf-9 nécessite de plus petites quantités d'acides aminés que celle des High-FiveTM (figure 4.7). Encore une fois, ceci s'explique biologiquement par la taille moins imposante de ces cellules par rapport aux High-FiveTM. On note également que la transcription du gène PYC supplémentaire dans les High-FiveTM transfectées nécessite un plus grand apport en acides aminés.

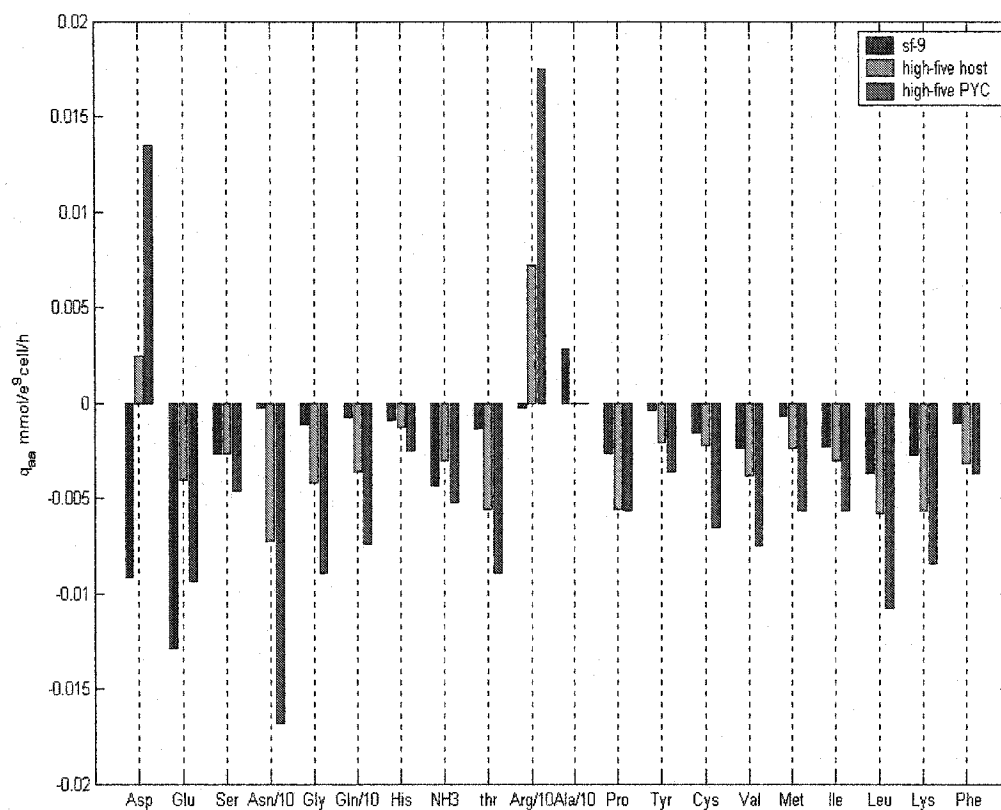


Figure 4.7 : Taux spécifiques de consommation et de production d'acides aminés comparés pour les trois types de cellules

Chapitre 5 Modélisation d'un bioprocédé

5.1 Problématique de la bio-modélisation

La construction d'un modèle pour un bioprocédé doit s'orienter sur l'usage que l'on fera de ce modèle. Du point de vue de l'ingénierie, la structure du modèle doit pouvoir être utilisée à des fins de simulation, d'estimation d'états (observateur d'état) et de contrôle.

Un observateur d'état doit se baser sur un modèle dit observable. L'observabilité d'un système est la capacité de reconstruire la trajectoire des états dans un temps fini avec uniquement la connaissance des valeurs des variables mesurées (Bogaerts & Hanus, 2001). De la même façon, un modèle destiné à l'élaboration d'une stratégie de contrôle doit comporter des variables contrôlables. Les paramètres de ce modèle doivent être identifiables par les données expérimentales recueillies. Une structure de modèle trop simple ne peut pas reproduire adéquatement la trajectoire des données expérimentales et un modèle trop complexe risque de surparamétriser le système si le nombre de données expérimentales est limité.

5.2 Types de modèles

L'avantage principal d'un modèle non structuré et non ségrégué est sa simplicité. Un modèle est dit non structuré s'il considère la biomasse comme un seul élément. Par opposition, un modèle structuré sera basé sur le métabolisme intracellulaire (celui-ci comprend une quantité impressionnante de bioréactions). Un modèle est non ségrégué s'il considère la biomasse comme une population homogène, sans distinction des phases du cycle cellulaire ou de la taille des cellules. Enfin, un modèle est

ségrégué lorsqu'il comprend une étude de l'influence de la position de la cellule dans son cycle de division cellulaire ainsi que de l'influence de la taille de celle-ci sur certains composants, notamment sur les produits.

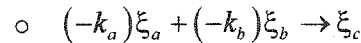
Quelques uns des groupes de modèles mathématiques recensés :

- *Metabolic Control Analysis* : analyse de sensibilité des flux métaboliques (modèle structuré, non ségrégué).
- *Cybernetic Modelling* : modèle non structuré, non ségrégué, comprenant plusieurs substrats limitants. Un contrôle optimal est introduit pour maximiser un critère (i.e. la production de biomasse)
- *General Dynamical Model* : modèle non structuré et non ségrégué se basant sur les bilans de matière macroscopique.
- *General Modelling Methodology* : modèle dynamique général utilisé pour les cellules animales où les coefficients de rendements sont modélisés par des lois de puissances. Le modèle considère que les coefficients de rendements, contrairement à ceux des bactéries, ne sont pas constants dans le temps. La modélisation faite avec des lois de puissances n'a pas de valeur physique, il s'agit d'un artéfact pour suivre l'évolution des coefficients dans le temps.

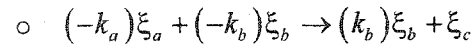
5.3 Modèle dynamique général

Les réactions macroscopiques ne respectent pas la stœchiométrie des éléments chimiques. Il s'agit de coefficients pseudo-stœchiométriques. En général, ce type de modélisation comprend de une à six macro-réactions. Il existe trois types de réactions macroscopiques (Bogaerts et Hanus, 2001) :

- Les réactions non catalysées ni autocatalysées :

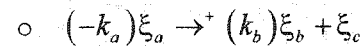


- Les réactions catalysées :



ξ_b est le catalyseur de la réaction (souvent il s'agit d'enzymes)

- Les réactions autocatalysées :



ξ_b est l'autocatalyseur de la réaction, il est produit par celle-ci et il l'active.

5.3.1 Représentation matricielle

À partir des réactions biochimiques décrites précédemment, on peut tirer des bilans de matière. De la même façon qu'avec des réactions chimiques standard (ne faisant pas intervenir de matériel vivant), on dresse les bilans suivants pour chacune des variables d'état :

$$\text{taux de variation} = \text{entrée} - \text{sortie} + \text{production} - \text{consommation}.$$

Ce qui se traduit typiquement de la façon suivante pour les réacteurs biochimiques :

$$\frac{d\xi}{dt} = K\varphi(\xi) - D\xi + F(\xi) - Q(\xi) \quad (\text{éq 5.1})$$

Où ξ est le vecteur des variables d'état, K la matrice des coefficients pseudo-stœchiométriques, D le taux de dilution, F le vecteur des flux alimentés, Q le vecteurs des flux de sortie du réacteur. L'élaboration de cette représentation a été réalisée par Bastin & Dochain (1990).

5.3.2 Partition du modèle dynamique général (Bastin & Dochain, 1990)

Dans la représentation matricielle précédente, on note que K et φ sont inconnues. Il est très difficile d'identifier de manière simultanée les coefficients de rendements et les paramètres des cinétiques. Dans l'optique d'identifier ces deux matrices inconnues de façon séparée, Bastin et Dochain (1990) proposent un changement de base et une manipulation des matrices. Cette transformation est nommée transformation en état clé, indépendante des cinétiques de réactions. Définissons P , le rang de la matrice K , M , le nombre de réactions biochimiques et N , le nombre de variables d'état. En partitionnant la matrice K en deux sous matrices de dimensions respectives de $P \times M$ (nommons la K_a) et $(N-P) \times M$ (nommons-la K_b). Le système peut donc se réécrire en deux systèmes distincts :

$$\begin{aligned}\frac{d\xi_a}{dt} &= K_a \varphi(\xi_a, \xi_b) - D\xi_a + F_a - Q_a \\ \frac{d\xi_b}{dt} &= K_b \varphi(\xi_a, \xi_b) - D\xi_b + F_b - Q_b\end{aligned}\tag{eq 5.2}$$

Il existe une transformation d'état :

$$z = A\xi_a + \xi_b\tag{eq 5.3}$$

où A est une matrice de dimension $(N-P) \times P$ qui valide l'expression suivante (l'annexe 5 présente une validation du choix de cette relation) :

$$AK_a + K_b = 0\tag{eq 5.4}$$

Le système équivalent à celui présenté en 5.1 utilisant la transformation d'état, est :

$$\frac{dz}{dt} = -Dz + A(F_a - Q_a) + (F_b - Q_b)\tag{eq 5.5}$$

Et ce nouveau système est indépendant des cinétiques de réactions. La procédure de la transformation d'état clé n'est valide que si et seulement si l'identifiabilité structurelle des coefficients de rendements est respectée (Chotteau & Bastin, 1992).

5.3.3 A-identifiabilité (Chen & Bastin, 1996)

L'identifiabilité des coefficients de rendements dépend de la structure de la matrice K . Nous devons examiner cette structure afin de savoir s'il est possible d'identifier les valeurs des paramètres contenus dans cette matrice. Le système non-linéaire de l'équation 5.5 nous permet de penser à deux approches différentes pour identifier la matrice K . La première approche possible est de trouver directement K par une technique d'estimation des paramètres non-linéaires. Les algorithmes de régressions numériques non-linéaires ne sont pas nombreux et souvent difficiles à utiliser. La deuxième approche possible consiste à identifier tout d'abord la matrice A et de retrouver la matrice K grâce à la relation suivante : $AK_a + K_b = O_{(N-P) \times N}$, et ce, par régression linéaire. C'est cette avenue qui a été privilégiée pour la simplicité de son application numérique, même si elle peut causer certaines difficultés, notamment quant à la suridentification des coefficients pseudo-stœchiométriques. Néanmoins, ces deux approches demeurent valides uniquement si K est structurellement identifiable.

5.3.3.1 Identifiabilité structurelle

Nous devons émettre quatre hypothèses pour vérifier l'identifiabilité structurelle de la matrice K :

H1 : Le vecteur d'état est complètement mesuré

H2 : La structure de la matrice K est connue :

a) la dimension de K est connue

b) la disposition des coefficients nuls et non-nuls est connue

H3 : Chaque colonne de K contient un coefficient égal à un (1), qui correspond au composant de normalisation de cette réaction.

H4 : Chaque coefficient inconnu entre une seule fois dans la matrice K de manière linéaire.

À partir de l'équation 5.3, il est trivial de montrer que l'on peut récupérer la matrice A à partir de l'état $z(t)$. Il faut toutefois montrer que l'on peut récupérer K à partir de A.

Définissons un certain nombre de variables :

n_j : le nombre d'éléments non nuls de la j^{e} colonne de K, $n_j > 0$

$k^{(j)}$: vecteur des éléments inconnus de la j^{e} colonne de K

$c^{(j)}$: vecteur des éléments inconnus de la j^{e} colonne de A

$$k^T = \begin{bmatrix} k^{(1)T} & \dots & k^{(m)T} \end{bmatrix}$$

$$\theta^T = \begin{bmatrix} c^{(1)T} & \dots & c^{(m)T} \end{bmatrix}$$

La dimension de k est égale à la somme sur j des dimensions des $k^{(j)}$, ce qui équivaut à la somme sur j des $(n_j - 1)$.

De manière théorique, on sait que K sera identifiable s'il existe une unique solution pour l'équation 5.4 ou de manière équivalente $k^{(j)}$ sera identifiable s'il existe une unique solution de $Aa^{(j)} + b^{(j)} = O_{(n-p) \times 1}$. Où $a^{(j)}$ et $b^{(j)}$ sont respectivement la j^{e} colonne de K_a et de K_b . On pourrait également rajouter que K est A-identifiable si $k^{(j)}$ l'est pour $j=1$ à m. Ce théorème est vrai, mais il n'est pas très facile à valider en pratique.

Chen & Bastin (1996) ont montré qu'une condition nécessaire pour que $k^{(j)}$ soit A-identifiable est que $n_j - 1 \leq N - P$ et ce pour tout $j=1..m$. Ils ont également montré qu'une condition nécessaire et suffisante pour que $k^{(j)}$ soit A-identifiable s'énonce comme suit : s'il existe une partition de K , tel que $\text{rang}(K_a) = P$ et que $N > M \geq P$ et que $\dim(K_a^{(j)}) = 0$ (i.e. K_a ne contient aucun élément de $k^{(j)}$), alors $k^{(j)}$ est A-identifiable. Un corollaire à ce théorème est que si $M \leq 2$, et que $n_j - 1 \leq N - P$, alors $k^{(j)}$ est A-identifiable.

La partition du modèle n'est pas unique, mais si $k^{(j)}$ n'est pas A-identifiable pour une partition, il ne le sera pour aucune. Ce qui implique que la partition n'est peut-être pas unique, mais les partitions sont toutes équivalentes du point de vue de l'identification structurelle (Chen & Bastin, 1996).

5.4 Élaboration d'un système matriciel

Afin d'être en mesure d'identifier un schéma réactionnel, il faut tout d'abord s'assurer de respecter les deux hypothèses suivantes (Bastin & al., 1997):

H1 : Les composants impliqués dans les réactions sont connus et mesurables

H2 : Les composants et les entrées du système sont mesurés avec une période d'échantillonnage raisonnable.

5.4.1 Première étape : la liste des espèces biologiques et chimiques impliquées dans le procédé

Afin de définir un schéma réactionnel adéquat à un procédé, il faut préalablement définir les facteurs qui ont un rôle dans le procédé. Évidemment, il faut que la quantification de ces composants soit disponible (Chotteau & Bastin, 1994).

5.4.2 Deuxième étape : déterminer le nombre de réactions macroscopiques indépendantes

Afin de savoir combien de réactions sont nécessaires à la modélisation d'un procédé, on définit $C(t)$, la matrice de tous les composants candidats identifiés à l'étape précédente, de dimension $E \times n$ (où E est le nombre d'échantillons et n le nombre de composants candidats). Du modèle dynamique général, on peut isoler les réactions cinétiques et intégrer cette nouvelle équation (Chotteau & Bastin, 1994; Bastin & al., 1997) :

$$\zeta_i(t) = K \int_0^t r(\xi(\tau)) d\tau = C_i(t) - C_i(0) - \int_0^t [F_i - DC_i(\tau) - Q_i] d\tau \quad (\text{eq 5.6})$$

La matrice M , dont le rang nous indique le nombre théorique de réactions cinétiques nécessaires à la modélisation du procédé :

$$M = \begin{bmatrix} \zeta_1(t_0) & \dots & \zeta_n(t_0) \\ \dots & \ddots & \dots \\ \zeta_1(t_E) & \dots & \zeta_n(t_E) \end{bmatrix} \quad (\text{eq 5.7})$$

Ce test est rarement utilisé étant donné que les valeurs expérimentales sont bruitées. En pratique, on prend le nombre de valeurs significativement non nulles dans chaque colonne (i), nommons-le a_i , et on compte le nombre de colonnes dont le a_i est significativement non nul. Ceci s'illustre facilement sur un diagramme. Par exemple, posons $n=15$ et $E=30$ dans un procédé de croissance de cellules VERO (exemple pris dans Chen & Bastin, 1996) :

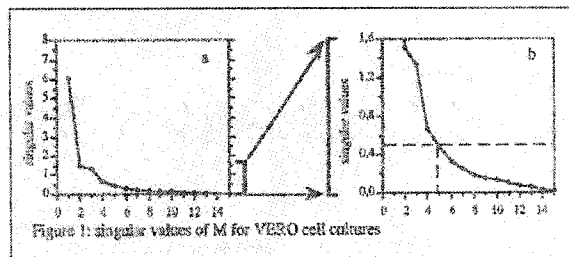


Figure 5.1 : nombre de réactions macroscopiques nécessaires pour la modélisation d'une culture de cellules VERO

Dans cet exemple, cinq réactions seront nécessaires à la modélisation des réactions cinétiques. Le modèle dynamique général est identifiable si et seulement si les réactions cinétiques sont distinguables par les données expérimentales.

Il y a quatre raisons principales qui expliquent que l'on ne puisse pas distinguer les réactions cinétiques par les données expérimentales :

- une matrice K de rang incomplet;
- de cinétiques dépendant les unes des autres;
- des réactions réversibles;
- des coefficients de rendements proportionnels entre eux.

Les cinétiques sont indépendantes si et seulement si l'espace vectoriel généré par $r_1(\xi) \dots r_m(\xi)$ est de dimension M. Les réactions sont indépendantes si et seulement si la matrice des coefficients de rendements est de plein rang et que les cinétiques sont indépendantes. Seules les réactions indépendantes sont identifiables (Bastin & al., 1997).

5.4.3 Troisième étape : Identification de la structure du schéma réactionnel

Afin de pouvoir continuer l'identification du schéma réactionnel, on doit poser une autre hypothèse, H3 : $N > M$ (Bastin & al., 1997). La structure d'un schéma réactionnel demande la connaissance des entrées nulles et non nulles de la matrice K . L'étape d'identification du schéma est un processus itératif. Il faut d'abord choisir un schéma réactionnel qui semble être en accord avec les connaissances actuelles du procédé. Ensuite, on identifie les valeurs des coefficients de rendement par la transformation d'état clé en minimisant l'erreur sur les paramètres par un algorithme des moindres carrés (que l'on peut normaliser par rapport à la valeur maximale de chaque variable) :

$$J(A) = \sum_i \left[\xi_b - \hat{\xi}_b(A) \right]^2 \quad (\text{éq 5.8})$$

Si le modèle reconstruit les trajectoires des composants, le modèle est valide et la procédure est terminée. Si le modèle ne répond pas aux exigences fixées, on recommence la procédure jusqu'à ce que l'on trouve un schéma réactionnel reproduisant convenablement les trajectoires des divers composants (Chotteau & Bastin, 1994). Un critère de sélection plus systématique est proposé dans Bastin & al., 1997, qui consiste à utiliser la théorie classique d'identification des systèmes.

5.4.4 Quatrième étape : découplage des réactions cinétiques

Il faut trouver une transformation d'état permettant de découpler les réactions les unes des autres afin de pouvoir les identifier séparément.

$$\begin{aligned} K^+ K &= I_M \\ y &= K^+ \xi \\ \dot{y} &= r(\xi) + K^+ u \end{aligned} \quad (\text{éq 5.9})$$

Où K^+ est le pseudo-inverse de gauche de K (Bastin & al., 1997). Une façon de faire proposée par Chotteau & Bastin (1994). Chacune des trajectoires des composants impliqués dans une réaction est approximée par une fonction de Weibull ($w(t) = a - (a - b) \exp[-e^{(-c+d \ln(t))}]$). Ainsi :

$$\begin{aligned}\xi(t) &\rightarrow \xi(w(t)) \\ r(\xi) &\rightarrow r(w(t))\end{aligned}\tag{eq 5.10}$$

Ce système transformé possède M fonctions cinétiques ne dépendant que du temps et des paramètres de Weibull. Cette technique semble bien fonctionner sur de petits systèmes.

5.4.5 Cinquième étape : Identification d'un modèle analytique pour les fonctions cinétiques

Cette étape consiste à choisir un modèle pour les réactions cinétiques en accord avec les connaissances acquises sur le procédé. Ensuite, un critère à minimiser est choisi pour identifier les paramètres cinétiques. Afin d'identifier les réactions cinétiques, il faut poser l'hypothèse suivante, $H4 : \text{rang}(K)=M$.

Il existe toutes sortes de modèles analytiques pour les réactions cinétiques (annexe Bastin & Dochain, 1990). Ces modèles tentent de relier la physique du système à un modèle mathématique. Les plus connus sont ceux qui utilisent un substrat limitant, et/ou un composant inhibiteur, tel que Monod, Contois, et Haldane. Il existe aussi des modèles qui ne tiennent pas compte de la physique du système. Le système n'est souvent que partiellement connu, on peut alors simplement estimer la réaction par une fonction paramétrique, telles des splines ou des polynomiales. Il existe un autre type

de modèle ne tenant pas compte de la physique du système, celui de la grande famille des algorithmes d'apprentissage, tels les « neural network » et « genetic algorithms ».

Bogaerts & Hanus (2001) ont développé une approche générale qui demande un minimum de connaissances préalables du procédé. Il s'agit d'une structure de modèle de cinétique générale (Bogaerts & Hanus, 2001). Ce type de modélisation n'est pas analytique, mais il fait appel à des connaissances a priori du procédé. Les cinétiques sont définies par une combinaison de composants activant la réaction et de composants inhibiteurs. L'avantage de cette structure des réactions cinétiques est qu'elle est très générale et linéarisable.

$$\phi_j(\xi) = \alpha_j \prod_{k \in R_j^*} \xi_k^{\gamma_{k,j}}(t) \prod_{l \in P_j^*} e^{-\beta_{l,j} \xi_l(t)} \quad (\text{éq 5.11})$$

Où α est une constante réelle, R_j^* est l'ensemble des réactifs, produits, catalyseurs et autocatalyseurs activant la réaction j , P_j^* est l'ensemble des composants apparaissant dans la réaction j , $\gamma_{k,j}$ est un coefficient d'activation relié au composant k dans la réaction j , $\beta_{l,j}$ est un coefficient d'inhibition relié au composant l dans la réaction j .

5.5 Analyse de stabilité

La théorie de Bogaerts (1999) sur la stabilité d'un modèle implique que si l'état initial, $\xi(0)$, d'un système non linéaire est borné et que le profil des entrées $u(t)$ l'est aussi, alors la trajectoire de $\xi(t)$ est bornée. Cette théorie est développée dans la thèse de Bogaerts et se nomme BIBS (« bounded input bounded state stability »). Ce critère est

suffisant pour prouver que la stabilité d'un système non linéaire se traduit par l'un ou l'autre des deux critères suivants :

1. On définit un réactif de référence pour une réaction comme étant un composant qui n'agit ni à titre de catalyseur, ni à titre d'autocatalyseur et qui n'apparaît pas dans une autre réaction que celle dans laquelle il est le réactif de référence. Si chaque réaction possède au moins un réactif de référence, alors la trajectoire de $\xi(t)$ est positive et bornée par le haut pour tout t .
2. Si chaque réaction contient au moins un réactif de référence sauf la j^{e} réaction et que la j^{e} réaction contient un réactif qui n'est ni un catalyseur, ni un autocatalyseur, mais que ce réactif est produit par une autre réaction L , alors la trajectoire de $\xi(t)$ est positive et bornée par le haut si la réaction L possède au moins un réactif de référence.

$$\begin{aligned} \text{Si } D(t) > 0 \quad \forall t \\ 0 \leq \xi_{in}^{(i)}(t) \leq \xi_{\max, in}^{(i)} \quad \forall i, t \end{aligned}$$

5.6 Identification des paramètres

L'identification mathématique des paramètres des modèles à partir des données expérimentales entrées/sorties est laborieuse parce que les systèmes sont très complexes et fortement non-linéaires. De plus, les mesures expérimentales sont entachées d'erreurs. Il existe principalement deux obstacles à l'identification des cinétiques réactionnelles. Premièrement, la sélection des facteurs biologiques et physico-chimiques qui ont une influence supposée sur les cinétiques n'est pas évidente. De plus, il faut incorporer un maximum de ces facteurs dans les modèles.

Ainsi, le choix d'un modèle analytique se révèle être un choix complexe (Chen & Bastin, 1996).

5.6.1 Procédure de Bastin & Dochain (1990)

Une fois la transformation d'état clé effectuée et la vérification de la A-identification faite, il faut trouver un critère à minimiser afin de trouver les valeurs des coefficients de rendements. Définissons les variables des quantités totales cumulées dans le réacteur :

$$\eta(t) = \xi(t) * V(t) - \xi(0) * V(0) - \int_0^t (-D(\tau) * \xi(\tau) + F(\tau) - Q(\tau)) * V(\tau) d\tau \quad (\text{éq 5.12})$$

Ce vecteur d'état modifié ne dépend pas des cinétiques de réactions. On utilise la même partition que celle expliquée pour l'équation 5.2, soit $\eta_a(t)$ et $\eta_b(t)$, il existe la relation approximative suivante entre les deux :

$$Y_{cal} = \eta_b(t) = -A\eta_a(t) \quad (\text{éq 5.13})$$

On peut évaluer, à partir des données expérimentales, $\eta_a(t)$ et $\eta_b(t)$ et calculer une estimation de $\eta_b(t)$ par l'équation 5.13.

Afin de trouver les vraies valeurs de la matrice A, on minimise le critère J :

$$J = \frac{(\eta_b - Y_{cal})^2}{\max(\eta_b)} \quad (\text{éq 5.14})$$

Cette procédure est une simplification de l'approche de M. Bogaerts. La procédure de Bastin & Dochain ne tient pas compte du terme initial de l'intégration des $\eta(t)$. La procédure qui suit est donc plus complète, mais aussi plus complexe.

5.6.2 Procédure systématique de Bogaerts (Bogaerts & Hanus, 2001; Bernard & al., 1999)

Cette procédure comprend trois étapes. La première est largement inspirée de la théorie développée par Bastin & Dochain (1990). Il s'agit d'identifier les coefficients de rendement du procédé sans avoir de connaissances sur les cinétiques des réactions. La seconde étape propose un estimé initial des paramètres des cinétiques de réactions. La dernière étape consiste à raffiner les valeurs des paramètres des cinétiques de réactions trouvés lors de la linéarisation.

5.6.2.1 Première étape : identification des coefficients de rendements

Une fois la transformation d'état clé effectuée et la vérification de la A-identification faite, il faut trouver un critère à minimiser afin de trouver les valeurs des coefficients de rendement. Soit le système non linéaire affranchi des cinétiques de réactions :

$$\dot{z}(t) = -D(t)z(t) + Au_a(t) + u_b(t) \quad \text{éq.5.5=(éq 5.15)}$$

$$z(t) = A\xi_a(t) + \xi_b(t) \quad \text{éq.5.3=(éq 5.16)}$$

Après intégration de l'équation 5.15, on obtient :

$$z(t) = \left\{ z(0) + \int_0^t [Au_a(\tau) + u_b(\tau)] e^{\int_0^\tau D(\kappa) d\kappa} d\tau \right\} e^{\int_0^t -D(\kappa) d\kappa} \quad (\text{éq 5.17})$$

En combinant 5.16 et 5.17, on trouve le système linéaire en A suivant :

$$Y = \eta_b(t) = -A\eta_a(t) + z(0)e^{\int_0^t -D(\tau) d\tau} \quad (\text{éq 5.18})$$

On peut également évaluer $\eta(t)$ directement à partir des données expérimentales $\xi(t)$:

$$\eta_a(t) = \xi_a(t) - e^{\int_0^t -D(\tau) d\tau} \left\{ \int_0^t u_a(\tau) e^{\int_0^\tau D(\kappa) d\kappa} d\tau \right\} \quad (\text{éq 5.19})$$

$$\eta_b(t) = \xi_b(t) - e^{\int_0^t -D(\tau) d\tau} \left\{ \int_0^t u_b(\tau) e^{\int_0^\tau D(\kappa) d\kappa} d\tau \right\} \quad (\text{éq 5.20})$$

Il existe plusieurs critères pour minimiser une erreur. Essentiellement, il faut définir une distance entre les valeurs expérimentales et celles du modèle paramétré et la minimiser en changeant les valeurs des paramètres. Le critère le plus commun est celui des moindres carrés qui se définit dans notre cas comme étant : $(Y - \eta_b)^2$. Ce critère très simple est utile lorsque les mesures Y et $\eta_a(t)$ sont exactes, sans erreur et sans bruit. Or dans les procédés biotechnologiques, les mesures expérimentales sont bruitées et possèdent une erreur expérimentale importante. Il existe des estimateurs de l'erreur qui tiennent compte de ces facteurs. C'est le cas de l'estimateur du maximum de vraisemblance et de l'estimateur de Markov. L'estimateur de Markov est une simplification de l'estimateur du maximum de vraisemblance lorsque l'on considère seulement l'erreur sur les mesures Y et non celles sur $\eta(t)$. La paramétrisation effectuée à l'aide d'un estimateur de Markov peut donc servir de point de départ à la paramétrisation du modèle par un estimateur du maximum de vraisemblance.

5.6.2.2 Estimateur de Markov

On peut définir élément par élément le vecteur $\eta_b(t)$:

$$\eta_b^{(i)}(t) = -A^{(i,:)} \eta_a(t) + z^{(i)}(0) e^{\int_0^t -D(\tau) d\tau} \quad (\text{éq 5.21})$$

Caractérisons les échantillons par un couple (s,k) où s est l'indice représentant le numéro de l'échantillon (i.e. le temps) variant de 1 à S et k l'indice de l'expérience variant de 1 à N_s .

On peut réécrire le modèle d'état $\eta_b(t)$ comme étant une multiplication vectorielle :

$$Y_{s,k}^{(i)} = \varphi_{s,k}^T \theta_s^{(i)} (\theta_c^{(i)}) \quad (\text{éq 5.22})$$

Où

$$\begin{aligned} \varphi_{s,k}^T &= \begin{bmatrix} -\eta_a^T(t_{s,k}) & e^{-\int_0^{t_{s,k}} D(\kappa) d\kappa} \end{bmatrix} \\ \theta_s^{(i)T} (\theta_c^{(i)}) &= \begin{bmatrix} A^{(i)} & z_s^{(i)}(0) \end{bmatrix} \end{aligned} \quad (\text{éq 5.23})$$

Cette façon d'écrire le modèle permet de mettre en évidence le vecteur des paramètres à identifier. Il est à noter que l'on considère le vecteur initial de $z(t)$ comme étant inconnu, ce qui est parfaitement logique puisque celui-ci dépend des coefficients pseudo-stœchiométriques. Nous supposons que seules les mesures $Y_{m,s,k}$ de $Y_{s,k}$ sont entachées d'erreur ($Y_{m,s,k} = Y_{s,k} + \varepsilon_{y,s,k}$). Ainsi l'estimateur de Markov se définit comme suit :

$$\hat{\theta}_c^{(i)} = \underset{\theta_c^{(i)}}{\text{ArgMin}} J_M(\theta_c^{(i)}) \quad \text{avec} \quad J_M(\theta_c^{(i)}) = \frac{1}{2} \sum_{s=1}^S \sum_{k=1}^{N_s} \frac{\left(Y_{m,s,k}^{(i)} - \varphi_{s,k}^T \theta_s^{(i)} (\theta_c^{(i)}) \right)^2}{\sigma_{Y,s,k}^{(i)2}} \quad (\text{éq 5.24})$$

Les hypothèses sur les bruits de mesures sont celles faites habituellement : blancheur, moyenne nulle et distribution gaussienne (de variance $\sigma_{Y,s,k}^{(i)2}$).

La matrice de covariance de cet estimateur est la suivante :

$$Q = E[\tilde{\theta}_c^{(i)} \tilde{\theta}_c^{(i)T}] = \left(\sum_{s=1}^S \sum_{k=1}^{N_s} \frac{\Phi_{s,k} \Phi_{s,k}^T}{\sigma_{Y,s,k}^2} \right)^{-1} \quad (\text{eq 5.25})$$

Une propriété très intéressante de cet estimateur est qu'il conduit à une solution unique lorsqu'il est appliqué à un modèle linéaire en ces paramètres. Cette solution peut servir de point de départ pour l'estimateur du maximum de vraisemblance, bien qu'elle ne puisse pas être finale, étant donné qu'elle ne tient pas compte du bruit sur $\Phi_{s,k}^T$. Dans le cadre de ce projet, nous n'avons pas utilisé d'estimation ni de Markov ni du maximum de vraisemblance.

5.6.2.3 Deuxième étape : estimation des paramètres des cinétiques

La formulation des réactions cinétiques choisie par cet auteur a été présentée dans une section antérieure et se définit comme suit :

$$\phi_j(\xi) = \alpha_j \prod_{k \in R_j^*} \xi_k^{\gamma_{k,j}}(t) \prod_{l \in P_j^*} e^{-\beta_{l,j} \xi_l(t)} \quad \text{eq.5.11}=(\text{eq 5.26})$$

On peut linéariser cette équation par rapport aux paramètres en prenant le logarithme d'équation 5.26:

$$\ln(\phi_j) = \ln(\alpha_j) + \sum_{k \in R_j^*} \gamma_{k,j} \ln(\xi_k) - \sum_{l \in P_j^*} \beta_{l,j} \xi_l \quad (\text{eq 5.27})$$

La fonction à minimiser est la suivante :

$$\hat{\theta}_{cin} = \arg \min_{\theta_{cin}} \frac{1}{2} \sum_s \sum_k \left\{ \ln(\hat{\phi}) - \begin{bmatrix} 1 & \ln(\xi_{h..j}) & -\xi_{l..j} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \ln(\alpha_j) \\ \gamma_{h..j} \\ \beta_{l..j} \end{bmatrix} \right\}^2 \quad (\text{eq 5.28})$$

Où $\hat{\phi} = \hat{K}_a^{-1}(\xi_a + D\xi_a - F_a + Q_a)$ vient du modèle dynamique général.

Chapitre 6 Modèle dynamique général appliqué au procédé de Sf-9

L'identification d'un modèle est un processus itératif. Le cheminement décrit dans le plan suivant représente l'ensemble de cette démarche. Celle-ci commence par l'identification d'un schéma réactionnel. Suit la validation de la procédure d'identification numérique. Cette étape est réalisée avec des données simulées, afin de s'assurer que l'algorithme est en mesure de trouver les bonnes valeurs des coefficients pseudo-stœchiométriques. La deuxième étape de validation de la procédure consiste à tester l'algorithme avec un autre ensemble de données simulées afin de vérifier la robustesse de l'algorithme. L'étape clé est l'identification des coefficients pseudo-stœchiométriques des données expérimentales. Dans le cas présent, le schéma réactionnel A, a dû être rejeté à cette étape. L'étude d'un autre schéma réactionnel conclut cette procédure.

Plan 6-1 : Processus de modélisation

1. Validation de la procédure avec le schéma A (eq. 6.1) et les données simulées 1 (figures 6.1 à 6.3):
 - a. Pour un système sans bruit
 - i. Impact du point de départ de la minimisation de l'erreur sur la résolution de l'algorithme
 - ii. Impact des critères d'arrêt sur la résolution de l'algorithme
 - iii. Influence des différentes partitions sur la résolution de l'algorithme
 - b. Pour un système bruité :
 - i. Impact du bruit sur les mesure sur la résolution de l'algorithme
 - ii. Influence des différentes partitions sur la résolution de l'algorithme
2. Validation de la robustesse de la procédure avec le schéma A et les données simulées 2 (figure 6.5) :
 - a. Pour les différentes partitions
 - b. Pour le système complet
 - c. Pour le système sans les bilans des gaz
3. Identification des pseudo-stœchiométriques du schéma A de l'expérience 6 (figure 6.6)
4. Conclusion : rejet du schéma réactionnel A
5. Identification des pseudo-stœchiométriques de l'expérience 6 avec le schéma B (eq. 6.2)
6. Conclusion : adoption du schéma réactionnel B

6.1 Construction d'un schéma réactionnel

Pour la phase précédant l'infection virale, il est possible de concevoir deux schémas réactionnels distincts. Le premier se compose de deux réactions de croissance, l'une résultant du cycle des TCA et l'autre produisant un sous-produit, l'acide lactique de manière anaérobie. Le deuxième schéma combine ces deux réactions en une seule, produisant à la fois le gaz carbonique et l'acide lactique. L'avantage du premier est de définir la production d'acide lactique comme n'étant pas directement relié à la croissance totale cellulaire. L'avantage du second schéma est évidemment sa simplicité.

Schéma réactionnel A :

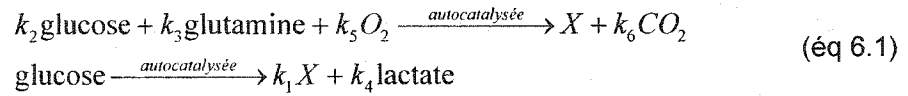
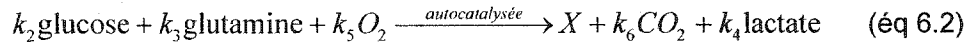


Schéma réactionnel B :



Les bilans de matières découlant du schème réactionnel A sont les suivants :

$$\frac{dX}{dt} = \mu_1 X + k_1 \mu_2 X - DX \quad (\text{éq 6.3})$$

$$\frac{dS_1}{dt} = -k_2 \mu_1 X - \mu_2 X + D(S_1^{\text{in}} - S_1) \quad (\text{éq 6.4})$$

$$\frac{dS_2}{dt} = -k_3 \mu_1 X + D(S_2^{\text{in}} - S_2) \quad (\text{éq 6.5})$$

$$\frac{dC}{dt} = OTR - OUR - DC \quad (\text{éq 6.6})$$

$$OTR = kla_{O_2} (Q_{\text{tot}}, Q_{\text{bul}}) (C^{\text{sat}} - C) \quad OUR = k_5 \mu_1 X$$

$$\frac{dP_1}{dt} = CTR + CPR - DP_1 \quad (\text{éq 6.7})$$

$$CTR = kla_{CO_2}(Q_{tot}, Q_{bul}) * (P_1^{sat} - P_1) \quad CPR = k_6 \mu_1 X$$

$$\frac{dP_2}{dt} = k_4 \mu_2 X - DP_2 \quad (\text{éq 6.8})$$

Les bilans de matières découlant du schème réactionnel B sont les suivants :

$$\frac{dX}{dt} = \mu_1 X - DX \quad (\text{éq 6.9})$$

$$\frac{dS_1}{dt} = -k_2 \mu_1 X + D(S_1^{in} - S_1) \quad (\text{éq 6.10})$$

$$\frac{dS_2}{dt} = -k_3 \mu_1 X + D(S_2^{in} - S_2) \quad (\text{éq 6.11})$$

$$\frac{dC}{dt} = OTR - OUR - DC \quad (\text{éq 6.12})$$

$$OTR = kla_{O_2}(Q_{tot}, Q_{bul})(C^{sat} - C) \quad OUR = k_5 \mu_1 X$$

$$\frac{dP_1}{dt} = CTR + CPR - DP_1 \quad (\text{éq 6.13})$$

$$CTR = kla_{CO_2}(Q_{tot}, Q_{bul}) * (P_1^{sat} - P_1) \quad CPR = k_6 \mu_1 X$$

$$\frac{dP_2}{dt} = k_4 \mu_1 X - DP_2 \quad (\text{éq 6.14})$$

où X, est la concentration cellulaire viable (e⁹cell/L), S₁, la concentration en glucose (mmol/L), S₂, la concentration en glutamine (mmol/L), C, la concentration en oxygène dissous (mmol/L), P₁, la concentration en dioxyde de carbone dissous (mmol/L), P₂, la concentration en acide lactique (mmol/L) et D, le taux de dilution (F_{in}/V, en h⁻¹). Les taux de réactions sont modélisés par une combinaison de Monod.

$$\mu_1 = \frac{\mu_1^{\max} S_1 S_2}{(k_{m1} + S_1)(k_{m2} + S_2)} \frac{K_i}{K_i + S_2}$$

$$\mu_2 = \frac{\mu_2^{\max} S_1}{(k_{m3} + S_1)}$$
(éq 6.15)

Les coefficients de transfert des gaz sont liés (Frahm, 2002) :

$$kla_{CO_2} = 0.89kla_{O_2}$$
(éq 6.16)

En représentation matricielle, le modèle dynamique général devient :

$$\dot{\xi} = K\phi(\xi) - D\xi + F$$
(éq 6.17)

Où, pour le schéma A :

$$\begin{bmatrix} \dot{X} \\ \dot{S}_1 \\ \dot{S}_2 \\ \dot{C} \\ \dot{P}_1 \\ \dot{P}_2 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 1 & k_1 \\ -k_2 & -1 \\ -k_3 & 0 \\ -k_5 & 0 \\ k_6 & 0 \\ 0 & k_4 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \mu_1 X \\ \mu_2 X \end{bmatrix} - \begin{bmatrix} D & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & D & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & D & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & D + kla_{O_2} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & D + kla_{CO_2} & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & D \end{bmatrix} \begin{bmatrix} X \\ S_1 \\ S_2 \\ C \\ P_1 \\ P_2 \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} 0 \\ DS_1^m \\ DS_2^m \\ kla_{O_2} C^{sat} \\ kla_{CO_2} P_1^{sat} \\ 0 \end{bmatrix}$$

(éq 6.18)

et pour le schéma B :

$$\begin{bmatrix} \dot{X} \\ \dot{S}_1 \\ \dot{S}_2 \\ \dot{C} \\ \dot{P}_1 \\ \dot{P}_2 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 1 \\ -k_2 \\ -k_3 \\ -k_5 \\ k_6 \\ k_4 \end{bmatrix} [\mu_1 X] - \begin{bmatrix} D & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & D & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & D & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & D + kla_{O_2} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & D + kla_{CO_2} & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & D \end{bmatrix} \begin{bmatrix} X \\ S_1 \\ S_2 \\ C \\ P_1 \\ P_2 \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} 0 \\ DS_1^m \\ DS_2^m \\ kla_{O_2} C^{sat} \\ kla_{CO_2} P_1^{sat} \\ 0 \end{bmatrix}$$
(éq 6.20)

6.2 Schéma A

6.2.1 Identifiabilité de la matrice K

Les matrices K présentées ci-haut sont identifiables au sens où Chen l'a exprimée. Toutefois, la solution n'est pas unique. En effet, un ensemble de valeurs pour la matrice K peuvent être utilisé pour modéliser le même système. Afin de vérifier cela, nous avons généré un système de données expérimentales (données simulées 1) à l'aide des bilans de matière du modèle d'état pour le schéma A.

Les matrices K et ϕ utilisées pour ce faire sont les suivantes (avec $k_{laO_2}=1 \text{ h}^{-1}$) :

$$\begin{aligned}
 &\mu_1^{\max} = 0.02 \\
 &\mu_2^{\max} = 0.01 \\
 &k_{m1} = 0.3 \\
 &k_{m2} = 0.5 \\
 &k_{m3} = 0.2 \\
 &k_1 = 5 \\
 &k_2 = 4 \\
 &k_3 = 1.5 \\
 &k_4 = 2 \\
 &k_5 = 1.2 \\
 &k_6 = 0.8
 \end{aligned}
 \rightarrow
 \begin{aligned}
 &\begin{bmatrix} \mu_1 = \frac{\mu_1^{\max} S_1 S_2}{(k_{m1} + S_1)(k_{m2} + S_2)} \\ \mu_2 = \frac{\mu_2^{\max} S_1}{(k_{m3} + S_1)} \end{bmatrix} \\
 &\begin{bmatrix} 1 & k_1 \\ -k_2 & -1 \\ -k_3 & 0 \\ -k_5 & 0 \\ k_6 & 0 \\ 0 & k_4 \end{bmatrix}
 \end{aligned}
 \quad (\text{éq 6.21})$$

Voici le système simulé 1 :

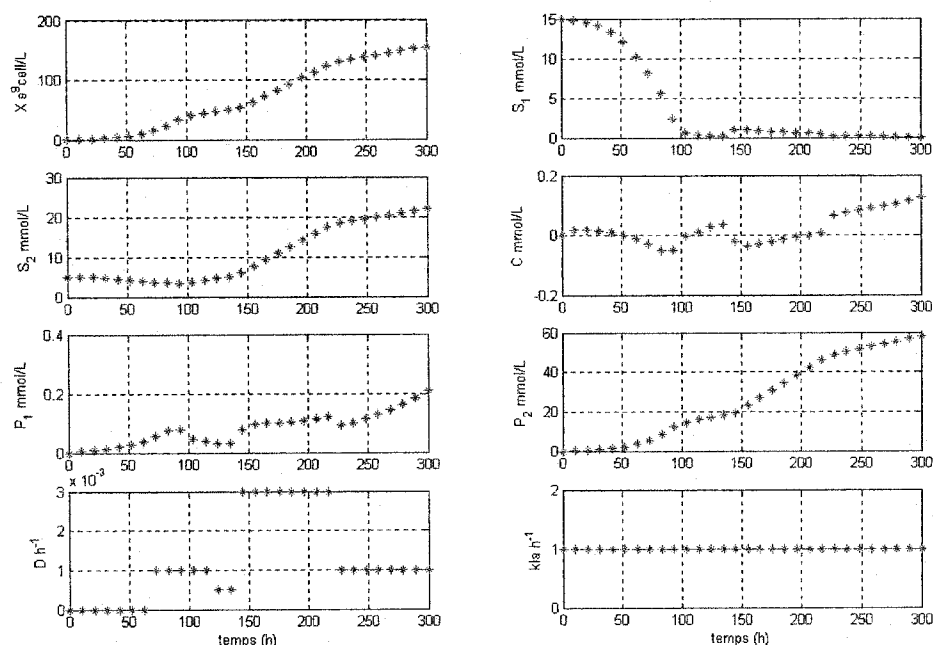


Figure 6.1 : Variables d'état des données simulées 1 sans bruit

La solution trouvée pour la matrice K par la procédure de Bogaerts, Bastin et Dochain dépend de plusieurs facteurs liés à la résolution numérique de l'algorithme. Afin de pouvoir commencer la procédure des itérations en vue de minimiser la variance entre les données expérimentales et celles du modèle, l'algorithme `fminsearch` (de Matlab), qui utilise une méthode de Nelder-Mead simplex, a besoin d'une matrice de départ et de deux critères d'arrêt. Le premier critère d'arrêt est sur la taille du diamètre du simplexe (tol_x), si celui-ci est en dessous de la valeur fixée, il y a alors convergence et la minimisation est réussie. Le deuxième critère est sur la différence entre deux évaluations de la fonction à minimiser (tol_f). Lorsque le résidu calculé varie d'une valeur plus petite que le critère fixé entre deux itérations, alors il y a également

convergence. Pour que la fonction `fminsearch` conclue que la minimisation est atteinte, ces deux critères doivent être satisfaits.

La solution trouvée par cet algorithme sera influencée par le point de départ de l'algorithme ainsi que par la valeur des critères d'arrêt. Toutefois, ces solutions, bien que numériquement différentes, peuvent toutes suivre la trajectoire des courbes expérimentales. Ceci est vrai pour des données sans aucun bruit. Nous avons utilisées les données simulées 1 afin d'illustrer la non unicité des valeurs de la matrice K . Il est à noter que l'algorithme aura tendance à trouver des valeurs faramineuses pour les coefficients de la matrice K , lorsque les critères d'arrêt sont très petits. Dans le tableau 6.1, seuls les quatre premiers coefficients ont été simulés, écartant ainsi les bilans de matière sur les gaz.

Tableau 6.1 : Solutions équivalentes avec $\xi_a(t)=[X P_2(t)]'$

Influence	$k_{\text{départ}}$	k_1	k_2	k_3	k_4	# itér	f_{eval}	$\text{tol}_x, \text{tol}_f$
$k_{\text{départ}}$	1	1,1405	0,8768	$-7,47 \cdot 10^{-9}$	$3,406 \cdot 10^{-8}$	593	93,1142	$1 \cdot 10^{-6}$
	5	4,9840	4,0218	1,5130	1,9926	495	0,0011	$1 \cdot 10^{-6}$
	10	4,9840	4,0218	1,5130	1,9926	796	0,0011	$1 \cdot 10^{-6}$
$\text{tol}_x, \text{tol}_f$	5	4,9827	4,0230	1,5137	1,9920	557	0,0011	$1 \cdot 10^{-9}$
	5	4,9840	4,0218	1,5130	1,9926	495	0,0011	$1 \cdot 10^{-6}$
	5	8,4684	4,1281	1,1795	3,4506	131	0,9438	$1 \cdot 10^{-3}$
k réels		5	4	1.5	2			

6.2.1.1 Le bruit

Avec des données bruitées, il est possible d'identifier la matrice K de la même manière que lorsque le bruit est absent. La difficulté supplémentaire qu'impose le bruit est le passage inverse du modèle d'état en $z(t)$ vers le modèle d'état en ξ . En effet, lorsque le bruit est absent, on retrouve les trajectoires du vecteur d'état grâce à un observateur sur $z(t)$ des ξ_b par ξ_a :

$$z(t) = \int (-D(t)z(t) + Au_a(t) + u_b(t))dt \quad \text{eq.5.3 et 5.5} = (\text{eq 6.22})$$

$$\xi_b(t) = z(t) - A\xi_a(t)$$

Cet observateur semble éprouvé des difficultés lorsque les données sont bruitées. En effet, les trajectoires des données simulées bruitées et celles de cet observateur ne sont plus superposées et ce, même avec un faible bruit. Le bruit introduit dans les données 1 est de forme gaussienne avec une moyenne nulle et une variance donnée.

Dans les figures qui suivent $K_{\text{départ}}$ est fixé à 5 et les critères d'arrêt à $1e^{-6}$.

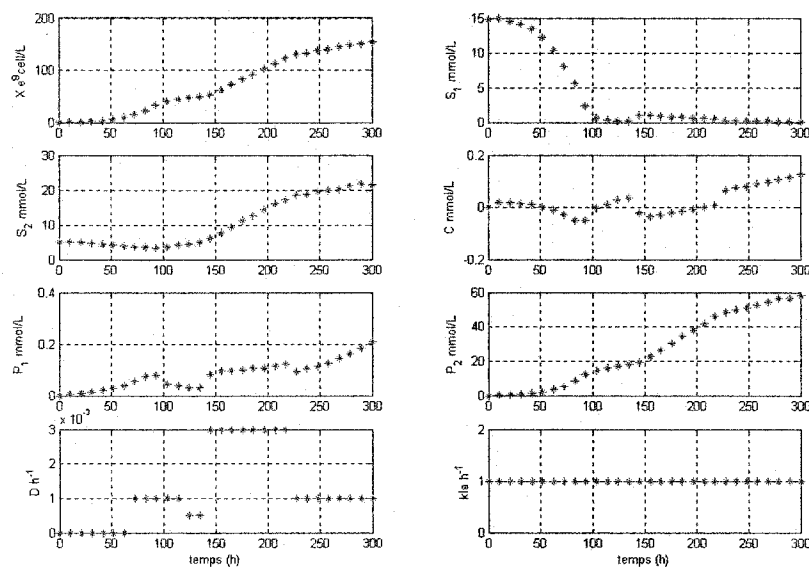


Figure 6.2 : Données simulées 1 bruitées avec une variance de 0,01

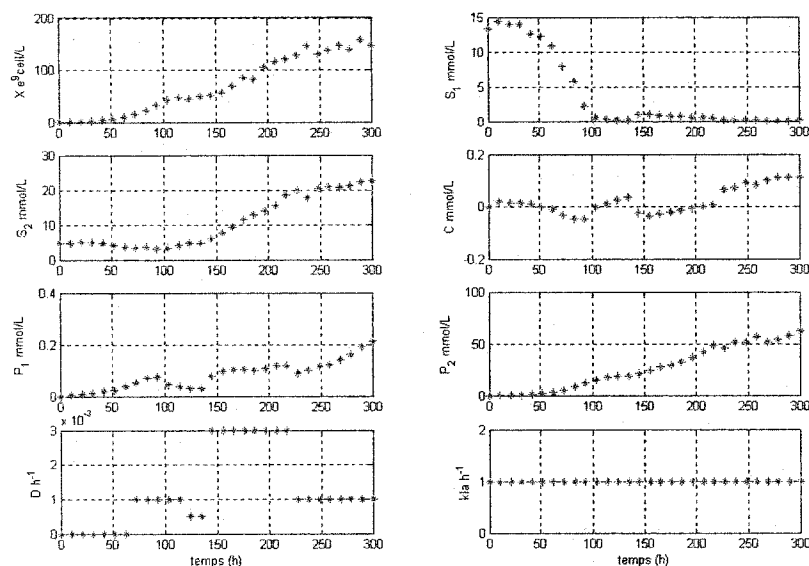


Figure 6.3 : Données simulées 1 bruitées avec une variance de 0,05

Tableau 6.2 : Solutions de K en fonction de la variance du bruit

Bruit	k_1	k_2	k_3	k_4	# itér	$f_{\text{eval}} \text{ final}$
0.01	4,3904	1,1458	0,4142	2,1310	652	64,9124
0.05	-5,24 ^{e14}	0,3457	0,0725	8,3056 ^{e14}	2261	165,616
k réels	5	4	1.5	2		

L'observateur du modèle d'état ne supporte peut être pas le bruit, mais le modèle d'état une fois transformé en $z(t)$, lui le supporte mieux.

$$\eta_a(t) = \xi_a(t) - e^{\int_0^t -D(\tau) d\tau} \left\{ \int_0^t u_a(\tau) e^{\int_0^\tau D(\kappa) d\kappa} d\tau \right\} \quad \text{éq.5.18 à 5.20} = (\text{éq 6.23})$$

$$\eta_b(t) = -A\eta_a(t) + z(0) e^{\int_0^t -D(\tau) d\tau}$$

La trajectoire des η_b prédites par η_a , nous permet de penser à faire un contrôle directement sur ces variables plutôt que sur le vecteur d'état original. Toutefois, rien ne garantit que la trajectoire optimale de η_b implique que ξ_b soit optimal, puisqu'on ne peut

pas prédire ξ_b à partir de η_b (contrairement aux données simulées non bruitées). Le schéma suivant résume graphiquement la situation de cette modélisation.

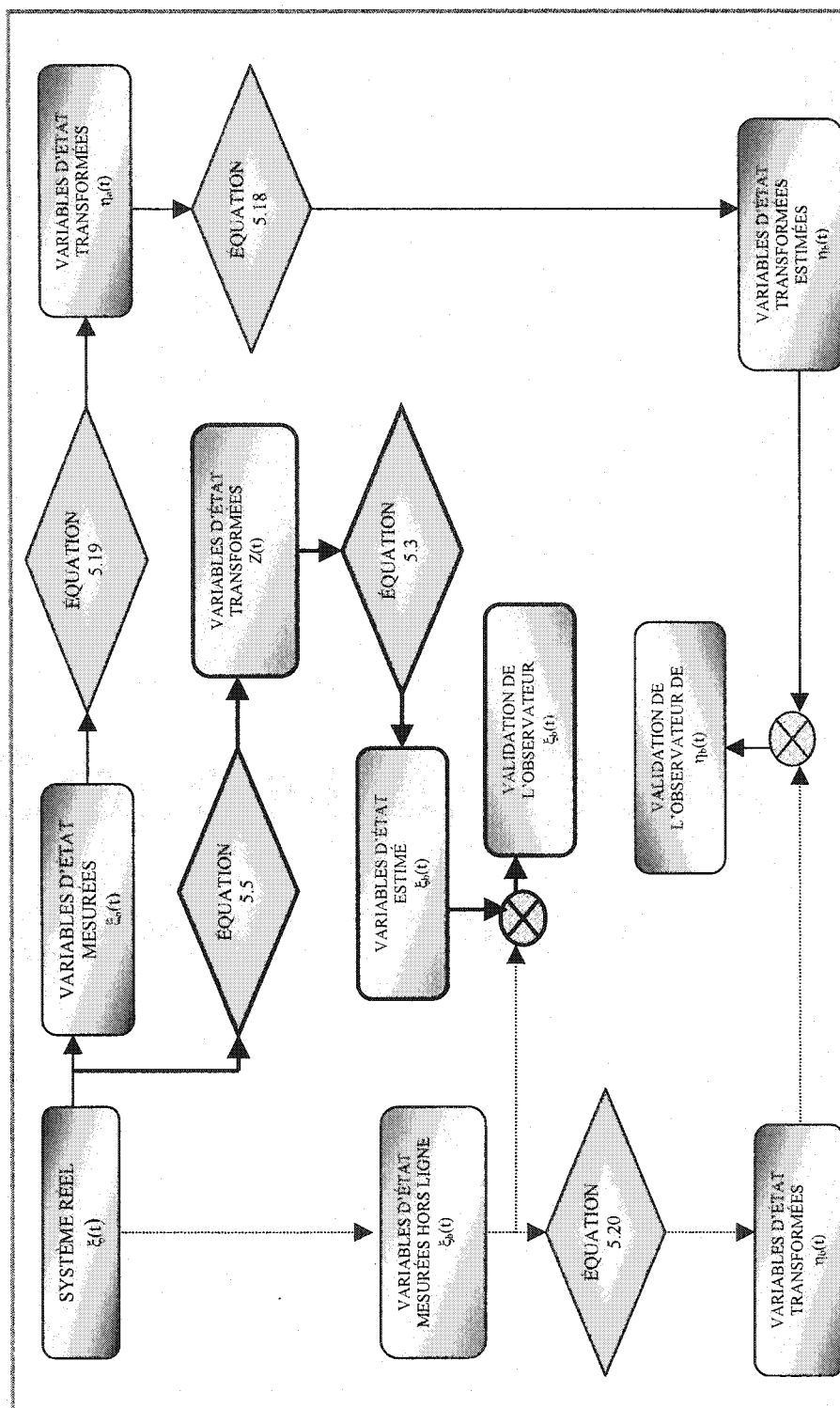


Figure 6.4 : Schéma pour la validation des observateurs

6.2.2 Partitions du modèle

Le vecteur d'état est de rang $N=6$, et la matrice K de rang $P=2$. Il y a donc 15 possibilités de partitions du modèle d'état. Des six variables d'état, nous écartons les deux gaz comme choix de variables possibles pour la partition. Et ce, parce que les valeurs de ces variables sont mesurées en-ligne par des sondes dans le bioréacteur, alors que les 4 autres variables sont des mesures faites par des analyses à partir de l'échantillon. En ne prenant que quelques points des valeurs en-ligne obtenues, on risque de perdre des renseignements sur les données des gaz. De plus, ces deux bilans sont plus difficile à estimer étant donné que l'on doit tenir compte du transfert gaz-liquide (nous verrons plus loin que ces deux bilans posent certains problèmes pour la modélisation du système). Il nous reste donc 6 partitions possible du modèle d'état. En s'appuyant sur la théorie de Chen, exposée dans le chapitre 5 sur la modélisation, toutes ces partitions sont mathématiquement équivalentes. Or, nous allons exposer dans ce chapitre quelques nuances pratiques à ce sujet. En effet, les partitions sont toutes mathématiquement valables et toutes équivalentes lorsque l'on possède des données ne présentant aucun bruit.

Tableau 6.3 : Solutions pour K avec les données simulées 1 pour toutes les partitions sans bruit ($K_{\text{départ}}=5, \text{tol}_x=\text{tol}_f=10^{-6}$)

Partition	k_1	k_2	k_3	k_4
X-S ₁	4,9827	4,0230	1,5137	1,9920
X-S ₂	4,9827	4,0230	1,5137	1,9920
X-P ₂	4,9840	4,0218	1,5130	1,9926
S ₁ -S ₂	4,9827	4,0230	1,5138	1,9200
S ₁ -P ₂	4,9827	4,0230	1,5137	1,9920
S ₂ -P ₂	4,9827	4,0230	1,5137	1,9920
Réels	5	4	1.5	2

Lorsque les données sont bruitées, toutes les partitions ne sont plus équivalentes.

Tableau 6.4 : Solutions pour K avec les données simulées 1 pour toutes les partitions avec un bruit 0.01 de variance ($K_{\text{départ}}=5, \text{tol}_x=\text{tol}_f=10^{-6}$)

Partition	k_1	k_2	k_3	k_4
X-S1	5,3690	10,7783	3,9627	2,0598
X-S2	4,8483	7,5812	2,9726	1,8826
X-P2	4,0518	1,0899	0,4209	1,9586
S1-S2	5,0318	6,3311	2,4083	1,9608
S1-P2	4,9944	3,4912	1,2995	2,0130
S2-P2	5,0383	3,2202	1,1734	2,0572
Réels	5	4	1,5	2

Nous avons répété ces simulations avec d'autres valeurs de la matrice K afin de corroborer les résultats obtenus et de vérifier la robustesse de l'algorithme. La matrice K utilisée ainsi que la matrice des cinétiques de réactions pour les données simulées 2 (avec $k_{a02}=1$) :

$$\begin{aligned}
 &\mu_1^{\max} = 0.025 \\
 &\mu_2^{\max} = 0.025 \\
 &k_{m1} = 5 \\
 &k_{m2} = 5 \\
 &k_{m3} = 10 \\
 &K_i = 5 \\
 &k_1 = 1 \\
 &k_2 = 1 \\
 &k_3 = 1 \\
 &k_4 = 0.05 \\
 &k_5 = 1 \\
 &k_6 = 1
 \end{aligned}
 \rightarrow
 \begin{bmatrix}
 \mu_1 = \frac{\mu_1^{\max} S_1 S_2}{(k_{m1} + S_1)(k_{m2} + S_2)} \frac{K_i}{K_i + S_2} \\
 \mu_2 = \frac{\mu_2^{\max} S_1}{(k_{m3} + S_1)}
 \end{bmatrix}
 \quad (\text{éq 6.24})$$

$$\rightarrow
 \begin{bmatrix}
 1 & k_1 \\
 -k_2 & -1 \\
 -k_3 & 0 \\
 -k_5 & 0 \\
 k_6 & 0 \\
 0 & k_4
 \end{bmatrix}$$

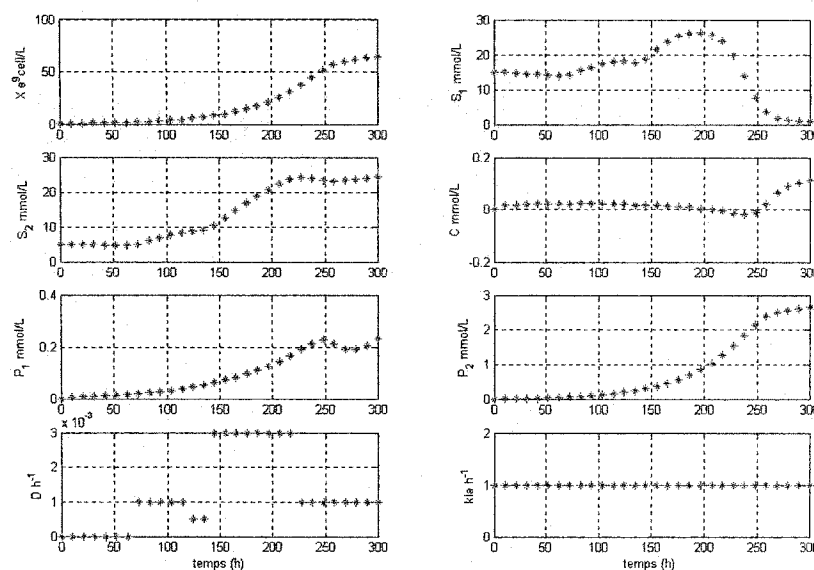


Figure 6.5 : Données simulées 2 sans bruit

La première série de simulations a été réalisée pour les six partitions avec un point de départ de 2 et deux critères d'erreur de 10^{-6} . Nous ne présentons pas ici les graphiques des deux observateurs afin d'alléger la lecture, toutefois il est indiqué dans le tableau qui suit si les trajectoires de ceux-ci sont fidèles et représentatives des données simulées.

Tableau 6.5 : Résultats avec les données simulées 2 pour les six partitions

Partition	X-S ₁	X-S ₂	X-P ₂	S ₁ -S ₂	S ₁ -P ₂	S ₂ -P ₂
k_1 (1)	1,0031	1,0049	1,4027 ^{e14}	1,0051	1,7205	1,1417
k_2 (1)	1,0586	1,0869	1,1976	1,0773	1,0051	2,8424
k_3 (1)	3,3525	3,1983	0,2041	2,7511	0,1725	2,6971
k_4 (0.05)	0,0438	0,0440	3,5200 ^{e14}	0,0440	6,0183	0,0506
k_5 (1)	4,7989	4,5674	0,2890	3,9288	0,2441	3,8522
k_6 (1)	2,6976	2,5850	0,1649	2,2236	0,1393	2,1807
ξ_b (éq 6.22)	X-S ₁ -P ₂	X-S ₁ -S ₂ -P ₂	S ₁ -S ₂	X-S ₁ -S ₂ -P ₂	X-S ₁ -S ₂	X-S ₁ -S ₂ -P ₂
η_b (éq 6.23)	tous	tous	S ₁ -S ₂ -C-P ₁	tous	X-S ₁ -S ₂ -C-P ₁	tous

De ces simulations, on s'aperçoit qu'il existe plusieurs combinaisons de K qui peuvent générer des systèmes équivalents. Il semble que les partitions contenant la variable

d'état S_2 soient celles qui donnent les meilleurs résultats. Pour la seconde série de simulations, nous avons conservé uniquement les trois partitions impliquant la variable S_2 et nous avons changé le point de départ pour une valeur de 1 et de 5.

Tableau 6.6 : Résultats avec les données simulées 2 avec $K_{\text{départ}}=1$ et $\text{tol}=10^{-6}$

Partition	$X-S_2$	S_1-S_2	S_2-P_2
$k_1(1)$	1,0048	1,0050	0,9917
$k_2(1)$	1,0241	1,0332	0,9614
$k_3(1)$	1,0140	1,3121	0,9624
$k_4(0,05)$	0,0501	0,0479	0,0500
$k_5(1)$	1,4481	1,8738	1,3743
$k_6(1)$	0,8196	1,0605	0,7778
$\xi_b(\text{éq 6.22})$	$X-S_1-S_2-P_2$	$X-S_1-S_2-P_2$	$X-S_1-S_2-P_2$
$\eta_b(\text{éq 6.23})$	tous	tous	Tous

Tableau 6.7 : Résultats avec les données simulées 2 avec $K_{\text{départ}}=5$ et $\text{tol}=10^{-6}$

Partition	$X-S_2$	S_1-S_2	S_2-P_2
$k_1(1)$	1,0048	1,0051	6,1276
$k_2(1)$	1,1596	1,0773	4,5369
$k_3(1)$	5,7583	2,7511	0,8931
$k_4(0,05)$	0,0430	0,0444	0,3142
$k_5(1)$	8,2234	3,9288	1,2797
$k_6(1)$	4,6541	2,2236	0,7218
$\xi_b(\text{éq 6.22})$	$X-S_1-S_2-P_2$	$X-S_1-S_2-P_2$	$X-S_1-S_2-P_2$
$\eta_b(\text{éq 6.23})$	tous	tous	Tous

Nous dégageons comme conclusion de ces simulations qu'il existe 3 partitions physiquement identifiables pour le schéma A.

6.2.3 Données expérimentales

Deux expériences de croissance des Sf-9 ont été faites afin de générer du matériel pour la modélisation et pour vérifier quelques hypothèses quant au contrôle par sondages. L'ensemble des données expérimentales de ces deux cultures sont présentés dans le chapitre 7 sur le contrôle par sondages. Pour la modélisation, les

données de la culture 6 ont été utilisés. Les données de l'expérience 6 sont évidemment entachées de nombreuses erreurs. Des erreurs expérimentales liées à la précision des machines, en passant par les erreurs de précisions des pipettes jusqu'aux erreurs de manipulations. Il est donc difficile de valider la matrice K avec l'observateur des $\xi_b(t)$. Toutefois, pour trois partitions, l'identification de la matrice K est similaire et l'observateur sur $\eta_b(t)$ fonctionne pour presque toutes les variables (les gaz faisant souvent l'exception). Les premières régressions présentées ont été faites pour une valeur de $K_{\text{départ}}$ de 2 et un critère d'arrêt de 0,1 avec les données expérimentales 6.

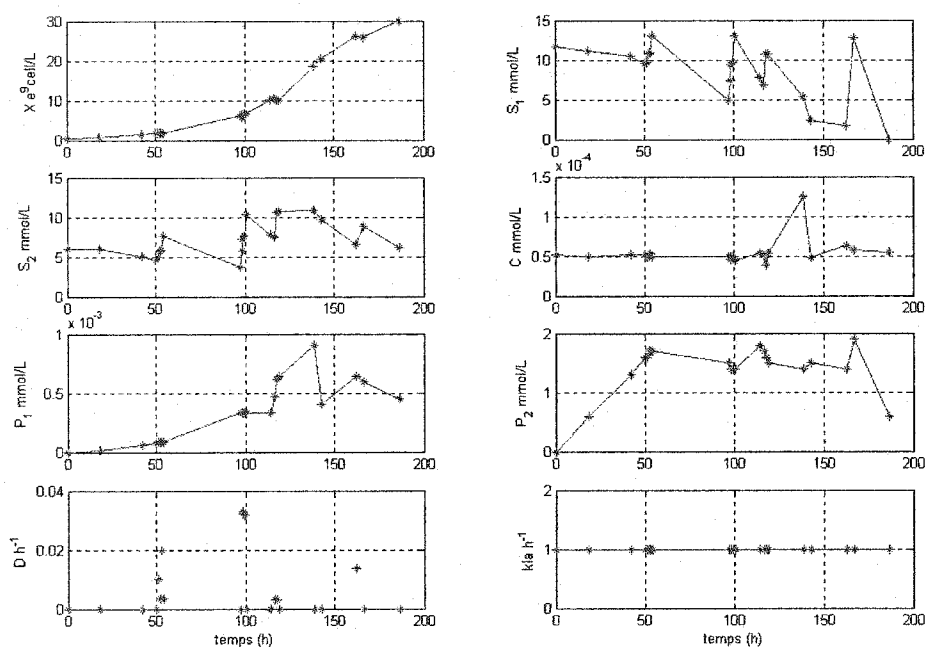


Figure 6.6 : Données expérimentales 6

Tableau 6.8 : Coefficients pseudo-stœchiométriques obtenus à partir de l'expérience 6

Partition	X-S ₂	S ₁ -S ₂	S ₂ -P ₂
k ₁	1,9358	0,4656	-1,6269e11
k ₂	5,2334	3,4572	2,3552
k ₃	2,7994	6,2609	1,0938
k ₄	0,2167	0,0513	1,4712e12
k ₅	0,0003	0,0023	3,5800e-4
k ₆	0,0010	0,0011	1,9953e-3
ξ _b (éq 6.22)	S ₁ -S ₂	X	S ₁ -S ₂
η _b (éq 6.23)	S ₁ -S ₂ -P ₁	X-S ₁ -C-P ₁	X-S ₁ -S ₂ -C-P ₁

L'estimation de la dynamique des gaz semble difficile à estimer par cette méthode, nous avons supprimé du modèle les bilans sur ces derniers afin de vérifier si cela permet aux observateurs d'être plus fidèle à la réalité. Nous écartons que les coefficients k₅ et k₆. Dans le tableau 6.9, on observe que le fait d'enlever la dynamique des gaz n'a pas permis de gagner en observabilité.

Tableau 6.9 : Coefficients pseudo-stœchiométriques obtenus à partir de l'expérience 6 sans les bilans des gaz

Partition	X-S ₂	S ₁ -S ₂	S ₂ -P ₂
k ₁	1,9251	0,4748	-1,0976
k ₂	6,2544	2,7109	2,1919
k ₃	3,4087	2,4391	1,0413
k ₄	0,2001	0,0743	1,5342
ξ _b (éq 6.22)	S ₁ -S ₂	X	X-S ₁ -S ₂
η _b (éq 6.22)	S ₁ -S ₂	X-S ₁ -S ₂ -P ₁	X-S ₁ -S ₂

Les observateurs utilisés pour valider les résultats obtenus pour la régression faite grâce à la partition X-S₂ ont été construits à partir de cette même partition. La question légitime qui se pose maintenant est à savoir si tous les observateurs sont équivalents. Pour vérifier ceci, on utilise les coefficients trouvés dans le tableau 6.9 précédent et pour tracer le profil des variables b par les autres observateurs (i.e. pour les K trouvés par la partition X-S₂, nous avons tracé les observateurs 6.22 et 6.23 pour la partition S₁-S₂ et S₂-P₂, et ainsi de suite pour les deux autres régressions).

Tableau 6.10 : Validation des K obtenus par les observateurs

Partition pour trouver K	$X-S_2$		S_1-S_2		S_2-P_2	
Partition pour les observateurs	S_1-S_2	S_2-P_2	$X-S_2$	S_2-P_2	$X-S_2$	S_1-S_2
Eq 6.22	$X-P_2$	S_1-S_2	$X-S_1$	$X-S_1$	$X-S_1$	$X-S_1$
Eq 6.23	$X-S_1-S_2-P_1-P_2$	$S_1-S_2-P_1$	$X-S_1-C-P_1$	$X-S_1-S_2-P_1$	$X-S_1-S_2-P_1$	$X-S_1-S_2-P_1$

L'ordre de grandeur des coefficients pseudo-stœchiométriques trouvés a un sens physique, mais il semble que ce ne soit pas suffisant pour que l'on puisse conclure que ces coefficients modélisent convenablement ce procédé. Nous remettons donc ici en question la validité du schéma réactionnel. Rappelons nous que le choix du schéma réactionnel d'un procédé est déterminé selon les connaissances que l'on possède sur celui-ci. De plus, le schéma choisit est une très grande simplification de toutes les réactions biochimiques qui peuvent être impliquées dans ce procédé. Nous écartons donc ce schéma comme étant représentatif de la réalité biocinétique du procédé de croissance des Sf-9.

6.3 Schéma B

Étant donné que nous avons rejeté l'application physique du schéma A à notre procédé, nous testons maintenant le schéma B. Il est inutile de présenter des résultats sur le système simulé, car nous avons déjà exposé que cette procédure est valable, mais qu'elle demeure fragile. Étant donné que la matrice K est de rang $P=1$ et que le vecteur d'état contient toujours $N=6$ variables, il y a donc 6 partitions possible pour ce schéma. Pour les mêmes raisons que dans le cas du schéma A, nous écartons les partitions impliquant des gaz dans le vecteur des états mesurés. Il nous reste donc 4 partitions : X , S_1 , S_2 et P_2 .

Tableau 6.11 : Coefficients pseudo-stœchiométriques obtenus à partir de l'expérience 6 avec le schéma B

Partition	X	S ₁	S ₂	P ₂
k ₂	2,2327	2,3723	2,3784	1,9888 ^{e6}
k ₃	1,0231	1,0813	1,1053	1,3663 ^{e6}
k ₄	0,0778	0,0898	0,0916	0,1665 ^{e6}
k ₅	-0,0080	0,0011	-0,0015	0,6372 ^{e6}
k ₆	0,0022	0,0005	-0,0020	0,5816 ^{e6}
ξ _b (éq 6.22)	S ₁ -S ₂ -P ₂	X-S ₁ -S ₂ -P ₂	X-S ₁ -S ₂	--
η _b (éq 6.23)	S ₁ -S ₂	X-S ₁ -S ₂ -P ₁ -P ₂	X-S ₁ -S ₂ -P ₂	--

Étant donné que les trois premières partitions semblent données des résultats comparables, nous avons tenté une régression minimisant l'erreur sur les trois partitions simultanément, nous avons ensuite testé ces coefficients sur les observateurs de ces trois mêmes partitions.

Tableau 6.12 : Régression avec le schéma B avec partitions combinées

k ₂		2,2639
k ₃		1,0517
k ₄		0,0848
k ₅		5,9288 ^{e-4}
k ₆		2,5589 ^{e-4}
X	Éq. 6.22	S ₁ -S ₂ -P ₂
	Éq. 6.23	S ₁ -S ₂ -P ₁
S ₁	Éq. 6.22	X-S ₁ -S ₂ -P ₁ -P ₂
	Éq. 6.23	X-S ₁ -S ₂ -P ₁ -P ₂
S ₂	Éq. 6.22	X-S ₁ -S ₂ -P ₂
	Éq. 6.23	X-S ₁ -S ₂ -P ₁ -P ₂

Nous présentons les graphiques des observateurs obtenus à partir de la partition S₁. Les données expérimentales sont représentées par les astérisques bleus et les traits verts continus ont été obtenus par la modélisation.

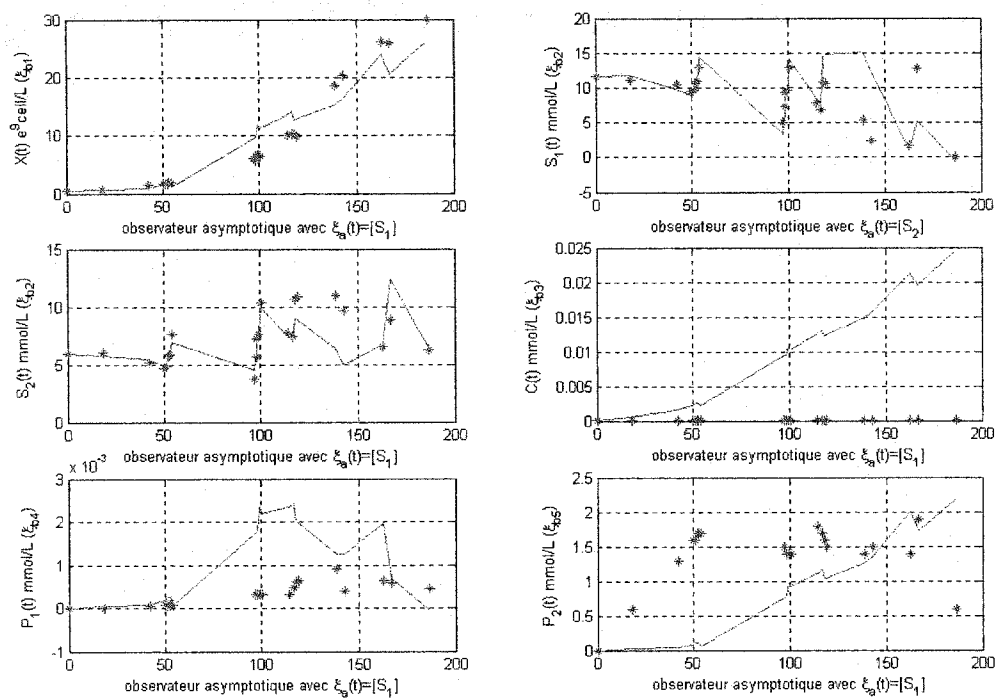


Figure 6.7 : Observateur pour la partition S_1 des $\xi_b(t)$ par $\xi_a(t)$ pour les données expérimentales 6

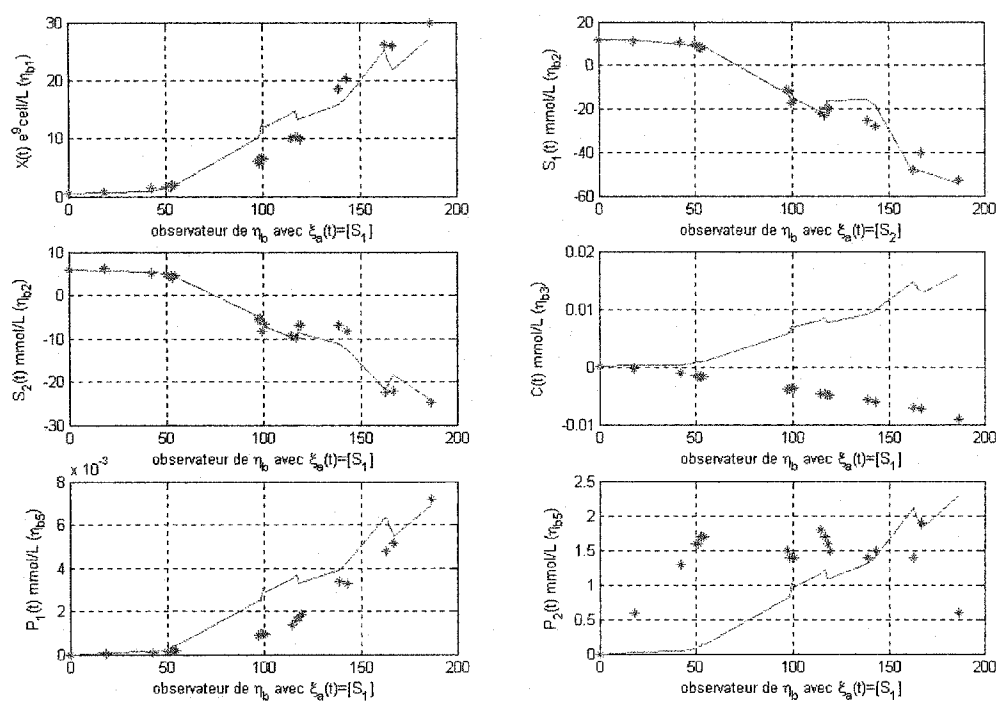


Figure 6.8 : Observateurs avec la partition S_1 des $\eta_b(t)$ par $\eta_a(t)$ pour les données expérimentales 6

Chapitre 7 Contrôle par sondages

7.1 Introduction au contrôle par sondages

Ce type de contrôleur a été développé dans l'optique de contrôler un bioréacteur faisant usage d'un système microbien. Cette approche de contrôle a été façonnée par Mats Åkesson qui en a fait l'objet de sa thèse et de quelques articles (Åkesson, 1999). Cette théorie du contrôle peut s'appliquer à n'importe quel système présentant une possibilité de saturation de son métabolisme. L'exemple qui est utilisé dans la thèse de M. Åkesson est la croissance bactérienne de *E.coli*. En effet, cette bactérie synthétise un sous-produit (l'acétate) lorsque son taux de consommation en glucose atteint une certaine valeur critique (difficilement déterminable expérimentalement et probablement variable dans le temps). L'objectif du système de contrôle est donc de maintenir le taux de croissance microbien à son maximum (correspondant à une consommation maximale de glucose) tout en minimisant la production d'acétate.

Le système étudié doit avoir un état de saturation face au composant qui doit être contrôlé. Cette idée de contrôle se base sur le fait qu'il existe une relation entre la demande en oxygène dissous et la consommation de glucose (voir l'annexe 6 et 7 pour le développement mathématique de cette relation). Afin de déterminer dans quelle position se trouve le système, on propose de pulser une certaine quantité de glucose à l'intérieur du réacteur. Suite à une augmentation de la quantité de glucose disponible, les bactéries, si leur métabolisme n'est pas saturé, l'assimileront rapidement. Suivra une augmentation dans le taux de consommation du glucose entraînant une augmentation dans la demande en oxygène dissous (OUR) et provoquant ainsi une chute dans la quantité d'oxygène dissous disponible. Si le métabolisme est presque

saturé, une légère réponse dans la demande en oxygène sera observée. Lorsque le métabolisme est complètement saturé et qu'il y a production de sous-produit, aucune réponse dans la respiration ne sera observée puisque la production d'acétate est anaérobie. L'ensemble des états et des possibilités d'action sont compilés dans le tableau 7.1.

Après avoir fait le diagnostic sur l'état du système, un algorithme de contrôle du débit de la pompe réagit selon la situation. Cet algorithme est schématisé dans la figure 7.1.

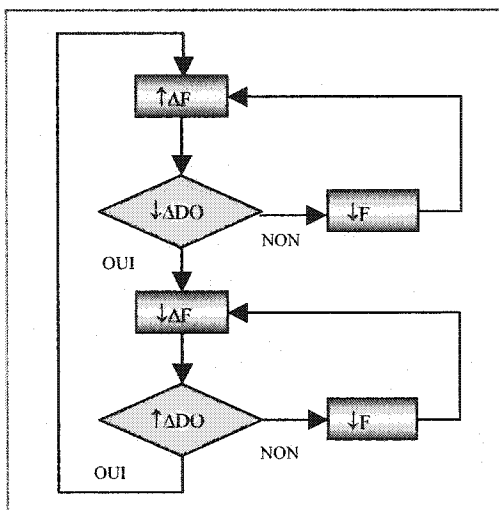


Figure 7.1 : Schéma d'un algorithme de contrôle par sondages

Quelques restrictions s'appliquent à l'application de la commande sur le débit de la pompe. Si le système est à capacité maximale d'oxygénation (i.e. aucun effort de commande de plus ne peut être effectué par le contrôleur d'oxygène dissous), le débit de la pompe ne peut pas être augmenté. La croissance bactérienne n'est pas affectée par les impulsions de glucose, car la dynamique de la respiration est beaucoup plus rapide que celle de la croissance cellulaire. La réponse dans la respiration est de l'ordre des secondes, voire des minutes, tandis que la croissance cellulaire a une dynamique qui relève de l'ordre de plusieurs heures.

Tableau 7.1 : Enchaînement des étapes d'un algorithme de contrôle par sondages

Action test	Réaction de la sonde	Réactions du système cellulaire	Conclusion et future action de sondage
Augmentation du débit de la pompe ($\Delta F \uparrow$)	OUI	La croissance est limitée par la concentration en glucose. La nouvelle disponibilité de glucose entraîne une augmentation dans le taux de consommation de glucose (uptake rate), ce qui entraîne une augmentation dans la demande en oxygène puisque la consommation du glucose est aérobique. Cette augmentation dans la demande en oxygène se traduit par une diminution de la concentration en oxygène dissous dans le réacteur.	Action : augmentation progressive du débit de la pompe Prochain test : Augmentation du débit de la pompe ($\Delta F \uparrow$) But : Afin de voir si les cellules sont toujours limitées par la concentration en glucose
	NON	Le glucose peut être accumulé parce que le système est saturé ou il a atteint un état optimal. Étant donné que la concentration de glucose ne semble pas limitée par la croissance, aucun changement dans la consommation de celui-ci n'est observé et donc aucune variation dans la demande en oxygène n'est observée. La concentration en oxygène dissous ne varie pas.	Action : aucun changement dans le débit de la pompe Prochain test : Diminution du débit de la pompe ($\Delta F \downarrow$) But : Afin de voir si les cellules sont toujours saturées
Diminution du débit de la pompe ($\Delta F \downarrow$)	OUI	La croissance peut être limitée par la concentration en glucose ou elle a atteint un état optimal. La diminution de la disponibilité de glucose entraîne une diminution dans le taux de consommation de glucose (uptake rate), ce qui entraîne une diminution dans la demande en oxygène puisque la consommation du glucose est aérobique. Cette diminution dans la demande en oxygène se traduit par une augmentation de la concentration en oxygène dissous dans le réacteur.	Action : aucun changement dans le débit de la pompe Prochain test : Augmentation du débit de la pompe ($\Delta F \uparrow$) But : Afin de voir si les cellules sont toujours limitées par la concentration en glucose
	NON	Le système est saturé, il accumule le glucose. Étant donné que la concentration de glucose ne limite pas la croissance, aucun changement dans la consommation de celui-ci n'est observé et donc aucune variation dans la demande en oxygène. La concentration en oxygène dissous ne varie pas. Les cellules sont saturées.	Action : Diminution dans le débit de la pompe Prochain test : Diminution du débit de la pompe ($\Delta F \downarrow$) But : Afin de voir si les cellules sont toujours saturées

Le système se situe dans une région optimale de croissance lorsque la réaction à une augmentation du débit de la pompe est une petite variation de la concentration en oxygène dissous ou encore ne génère aucune réponse. Lorsque l'on diminue le débit de la pompe et que le système se trouve dans un état optimal, on voit une réponse claire dans l'augmentation de la concentration en oxygène dissous. L'objectif est donc de maintenir le débit de la pompe dans cette région d'opération. Le schéma suivant illustre le comportement typique que l'on devrait observer pour chacun des états du système (Akesson, 1999).

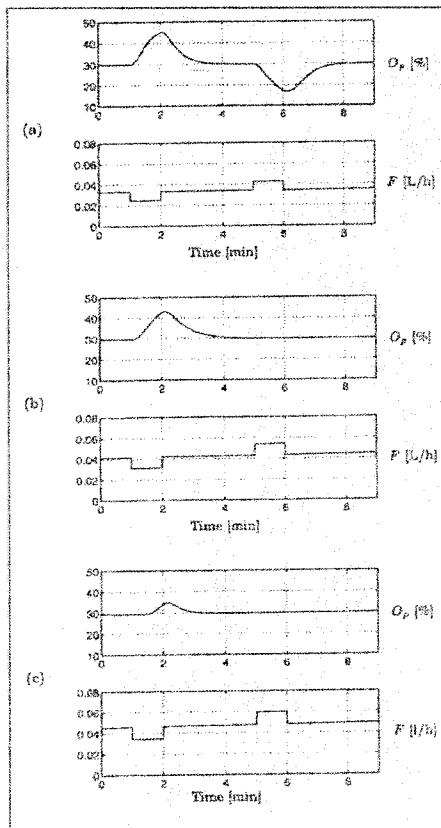


Figure 7.2 : a) système non saturé, b) système presque saturé, c) système saturé

7.2 Application du contrôle par sondages au système de cellules d'insectes

7.2.1 Hypothèses de travail

La culture cellulaire a une histoire plus courte que celle de la culture microbienne, si bien que les lois régissant les flux métaboliques des cellules d'insectes ne sont pas quantifiées comme celles des systèmes microbiens. Toutefois, grâce aux efforts de recherche qui sont faits dans ce domaine, certaines avenues semblent plus probables que d'autres. Généralement, les cellules d'insectes sont cultivées dans des milieux dits riches et complexes. Riches, car ces milieux contiennent beaucoup d'éléments (la composition de certains éléments n'est parfois même pas connue, par exemple le sérum animal et le « yeastolate »), et complexe, parce que la composition de ces milieux n'est connue que du fabricant. Il existe des milieux riches et de composition commercialement connue, ce qui facilite grandement le travail d'ingénierie et de recherche. Le milieu qui est utilisé ici est un milieu sans sérum, riche et de composition commercialement connue, soit le IPL-41 (l'annexe 1 présente la composition). Comparativement aux milieux de composition inconnue, sa concentration en glucose est faible (40 mmol/L pour excel-420, contre 12 mmol/L pour IPL-41). La différence majeure entre ces deux milieux se trouve dans les concentrations de sels. En effet, les cellules d'insectes sont très sensibles à l'osmolalité, il faut donc que les concentrations de sels soient balancées de façon à ce que l'osmolalité du milieu final soit sensiblement dans les environs de 350-400 mOsm/kg.

Les bactéries possèdent une limite dans leurs flux métaboliques puisqu'elles absorbent passivement les nutriments qui sont à leur disposition. Il n'a pas été clairement

démontré quel mécanisme est responsable de l'assimilation des nutriments chez les cellules d'insectes. On sait que chez les cellules mammifères (qui ressemblent dans leurs comportements beaucoup plus aux cellules d'insectes que les bactéries) le transport du glucose est assuré par un récepteur, l'insuline. Il se pourrait qu'il y ait un récepteur équivalent chez les cellules d'insectes, disponible dans les « yeastolate ». La possibilité de saturer des voies métaboliques chez ces cellules n'est donc pas une chose simple à déterminer. Par contre, l'hypothèse qui est faite ici est que l'on peut arriver à un résultat équivalent par un chemin détourné, celui du choc osmotique.

Nous savons que les cellules d'insectes peuvent vivre dans un milieu contenant une grande quantité de glucose, lorsque l'osmolalité est contrôlée. Le pari est de faire croître les cellules d'insecte dans un milieu défini (et donc moins coûteux) à faible teneur en glucose, d'alimenter celles-ci avec un cocktail (l'annexe 2 présente la composition exacte). L'objectif est de vérifier si les cellules atteindront un niveau de saturation dans leur consommation de glucose. Au fur et à mesure que les cellules doubleront, l'osmolalité du milieu changera, créant ainsi un stress chez les cellules d'insectes. Les cellules d'insectes (et les animales aussi), contrairement aux bactéries, sont très sensibles au stress. Lorsque celles-ci sont soumises à un stress, elles produisent des sous-produits, tel que de l'acide lactique et des ions ammonium. La production d'acide lactique provient d'une mauvaise utilisation de la principale source de carbone, le glucose, alors que la production d'ions ammonium provient d'une mauvaise utilisation de la glutamine, source d'azote. Dans ce travail, nous voulons contrôler la quantité de glucose dans le réacteur, supposant qu'il s'agit du principal nutriment limitant pour les cellules Sf-9. La production d'ions ammonium est marginale pour cette souche de cellule, par contre elle devient plus importante chez les cellules

High-Five™. Il est toutefois préférable de se limiter à contrôler un composant (le glucose) et d'assurer un excès de glutamine.

Si la dynamique de croissance chez les bactéries est de l'ordre de quelques heures, chez les cellules d'insectes on parle de presque une journée entière. Il est donc impossible de voir une fluctuation dans la lecture de la sonde à capacitance (relié au biovolume). Le contrôle de la concentration en oxygène dissous est assuré par la manipulation de la fraction d'oxygène dans l'alimentation de gaz et par le ratio entre le débit de gaz se retrouvant à la surface du liquide (« head space ») et celle qui est bullée sous la surface du liquide. Les cellules d'insectes n'éprouvent aucun problème au niveau de leur respiration tant que la pression partielle d'oxygène dissous est maintenue entre 20 et 70 % de la saturation en air.

7.3 Effet sur le système vivant des impulsions de cocktail

Deux expériences (5 et 6) ont été réalisées afin de vérifier expérimentalement la réponse de ce système à des impulsions de cocktail de nutriments. L'expérience 5 a servi de test afin de déterminer les variations dans le débit de la pompe que le système perçoit comme étant une impulsion. Les débits de la pompe testés sont 25mL/h, 50mL/h et 75mL/h respectivement. Aucun de ceux-ci n'ont eu d'impact sur la lecture de la sonde à oxygène dissous. Toutefois, l'osmolalité a augmenté de manière significative, créant un stress important sur la culture, ce qui l'a détruit. L'expérience 6 présente trois périodes différentes de pulsations, le débit de la pompe est toujours le même soit 88 mL/h. À ce débit, on observe une réponse dans la sonde à oxygène dissous. Le même débit a été utilisé afin de vérifier si la densité cellulaire a un impact sur la réponse de la sonde aux impulsions de cocktail. Dans les figures qui suivent, le

profil global des cultures 5 et 6 est présenté afin de visualiser les effets des impulsions sur la mesure des signaux. Les périodes de test n'ont pas eu d'effets significatifs ni sur le profil de la consommation d'oxygène (OUR), ni sur le profil de production de dioxyde de carbone (CER). Ceci confirme que les tests d'alimentation par pulsations n'ont pas d'effets à long terme sur la respiration cellulaire.

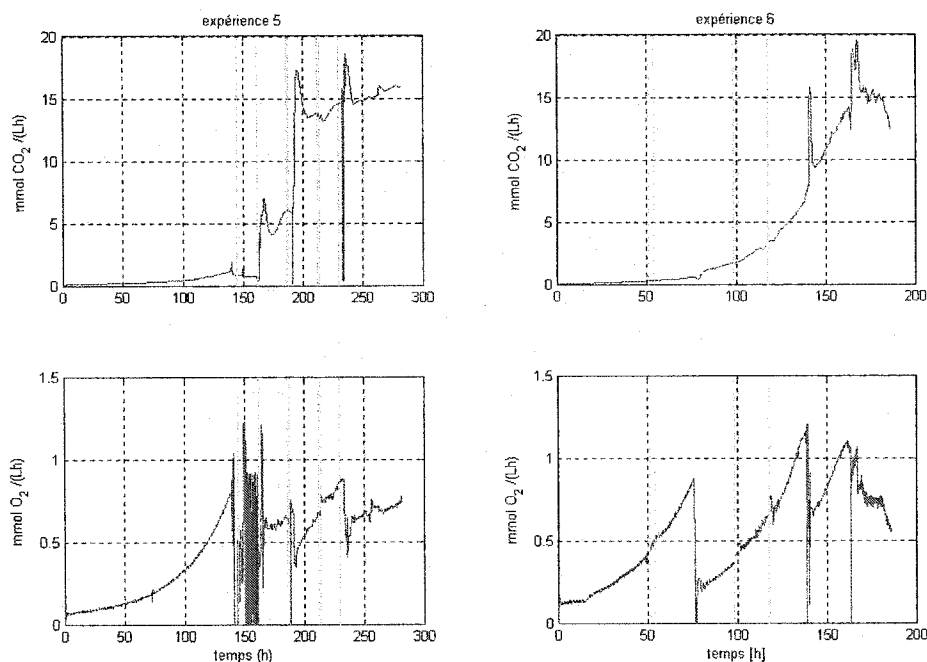


Figure 7.3 : OUR et CER lors des expériences avec pulsations de cocktail nutritif

Les effets de dilutions dues aux pulsations de cocktail nutritionnel n'ont pas eu d'impact sur le profil de croissance cellulaire. Ces additions sont de trop petits volumes et se déroulent sur une trop courte période de temps pour que la croissance cellulaire en soit affectée. Dans la figure 7.4 suivante, on n'observe pas de chute marquée de la concentration cellulaire ou de la permittivité relative suite à une impulsion de cocktail nutritif.

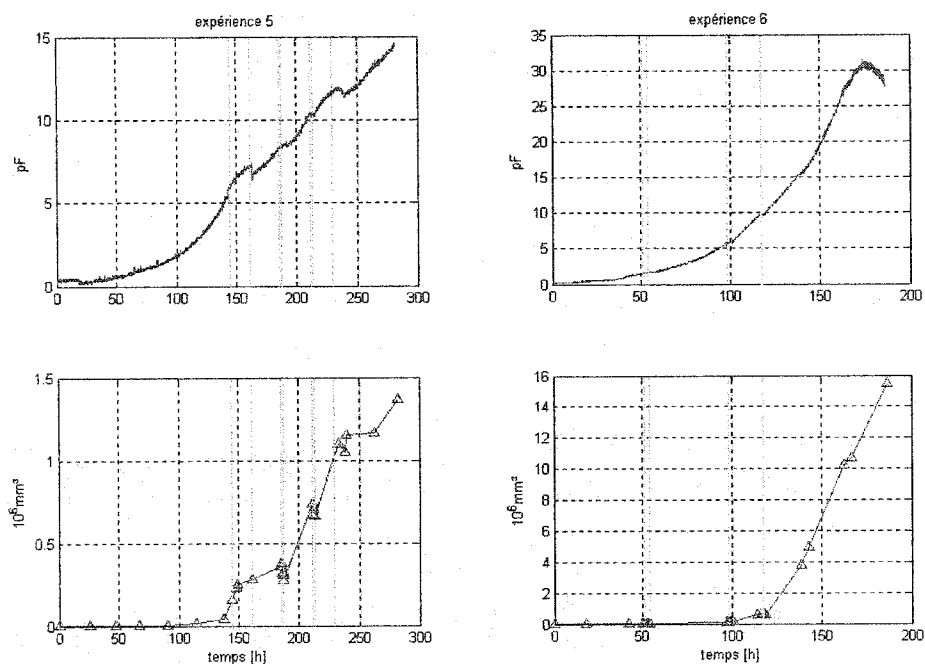


Figure 7.4 : Permittivité relative et biovolume lors des expériences avec pulsations de cocktail nutritif

L'osmolalité qui est directement reliée à la quantité de soluté dans le milieu a été affectée par les périodes de pulsations de cocktail nutritif. En effet, celle-ci a augmenté de manière beaucoup plus importante au cours de ces deux fermentations que lors des expériences 1 à 4 où le débit de la pompe était maintenu très bas et constant. Le diamètre des cellules suit également la même variation, dû à l'hyper-pression osmotique, tel qu'on peut l'observer dans la figure 7.5.

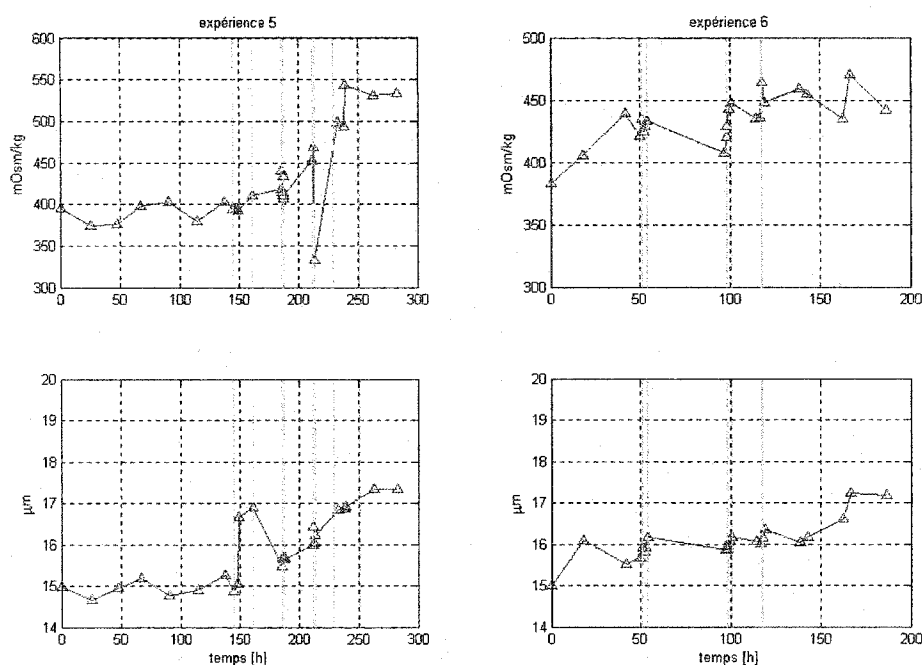


Figure 7.5 : Osmolalité et diamètre cellulaire lors des expériences avec pulsations de cocktail nutritif

Les périodes de pulsations de cocktail nutritif ont évidemment un effet sur les concentrations résiduelles de métabolites. L'excès de glutamine est facilement maintenu et les concentrations en glucose sont toujours demeures supérieures à 5 mM durant les périodes de pulsations assurant ainsi le bon fonctionnement des voies métaboliques des cellules (figure 7.6). Toutefois cet excès de nutriments ne s'est pas traduit par la production de métabolites secondaires indésirables. L'acide lactique est toujours demeuré en-deça de 5 mM (à l'exception de la culture 6 après les 150 premières heures, mais à ce moment-là les séances de pulsations étaient depuis longtemps arrêtées, ceci est illustré dans la figure 7.7). La hausse soudaine de ce métabolite est due à la diminution de la viabilité causée par un manque d'oxygénation. Les concentrations en ions ammonium sont très importantes dans la culture 5 à partir du moment où l'osmolalité dépasse les 450 mOsm/kg (figure 7.5 et 7.7). Ceci a été

corrigé dans l'expérience 6, l'osmolalité n'a jamais atteint ce seuil critique et, par conséquent, la production d'ions ammonium est demeurée faible.

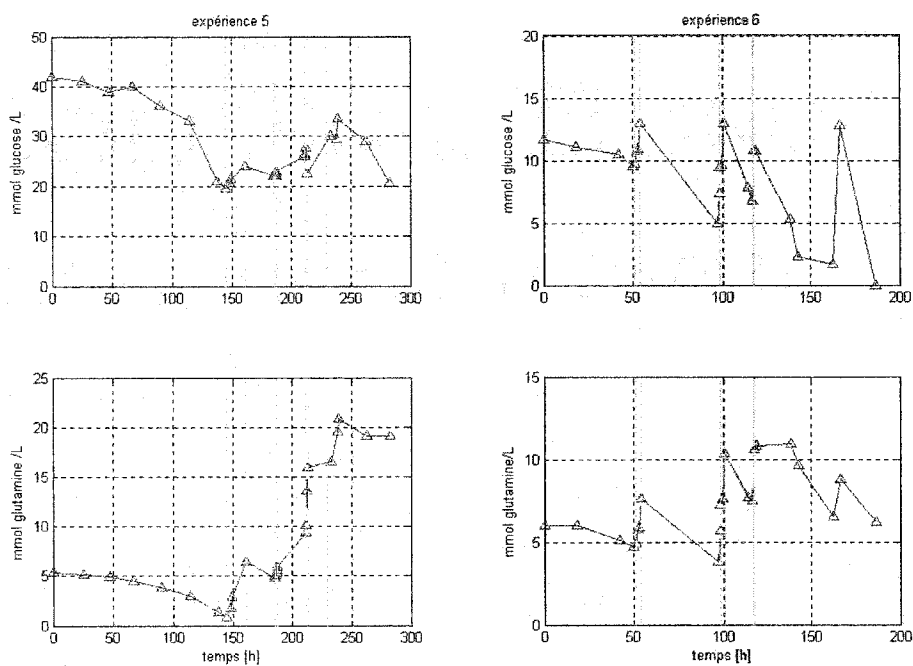


Figure 7.6 : Concentrations résiduelles de nutriments lors des expériences avec pulsations de cocktail nutritif

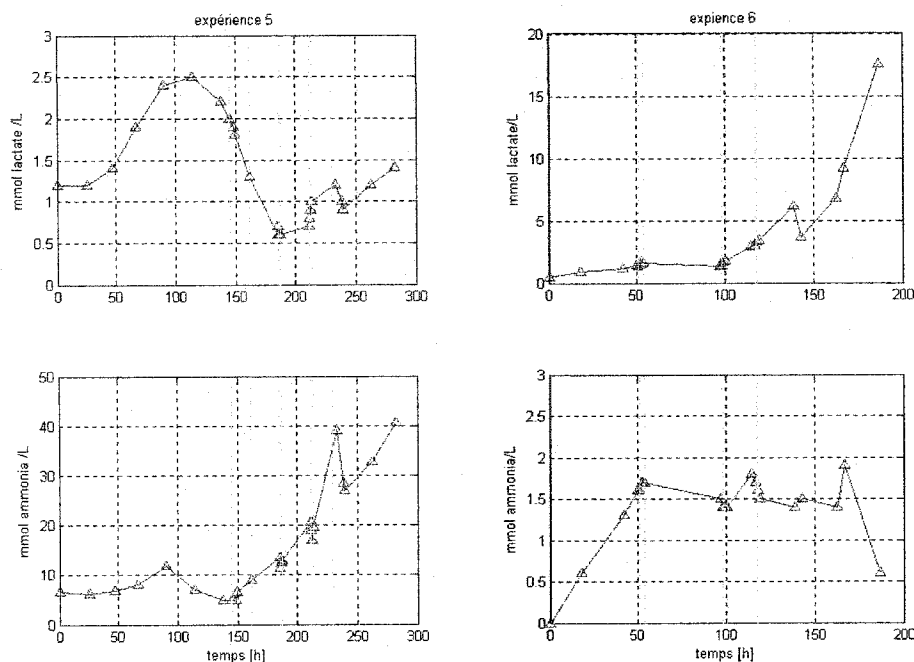


Figure 7.7 : Concentrations résiduelles de métabolites secondaires produit lors des expériences avec pulsations de cocktail nutritif

7.4 Effets immédiats des pulsations de cocktail nutritif

Les effets immédiats des pulsations de cocktail nutritif sur le système doivent être analysés afin de savoir si un contrôle basé sur l'analyse des réactions du système est possible.

Pour chacune des trois périodes de pulsation, le débit de la pompe est de 88 mL/h. Des débits de 25 mL/h, de 50 mL/h et de 75 mL/h ont été testés lors de l'expérience 5 et ceux-ci n'ont pas montré de réponse de la sonde à oxygène dissous. Dans la figure 7.8, on voit que la valeur de la lecture de la sonde à oxygène dissous diminue lors d'une période de pulsation (le débit de 88 mL/h est maintenu pendant une heure avant d'être arrêté ou diminué jusqu'à 9 mL/h, valeur minimale opérable de la pompe). La

réaction est proportionnelle à la densité cellulaire. La première période de pulsation s'est déroulée lorsque la densité cellulaire était d'environ $2.5 \times 10^6 \text{ cell/mL}$, la deuxième vers $6 \times 10^6 \text{ cell/mL}$ et la dernière vers $10 \times 10^6 \text{ cell/mL}$. Ceci s'explique facilement par l'augmentation de la demande respiratoire.

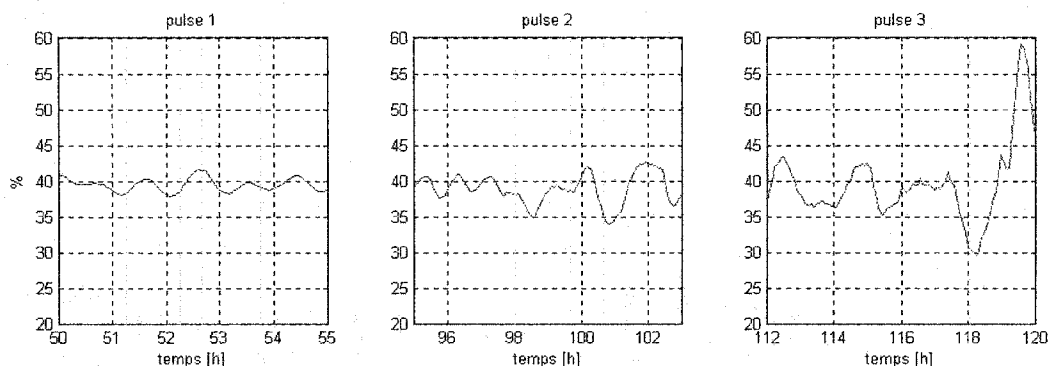


Figure 7.8 Lecture de la sonde à oxygène dissous lors des périodes de pulsations de l'expérience 6

D'après les résultats montrés dans la figure 7.9, il ne semble pas y avoir un effet à court terme sur la respiration cellulaire lors des pulsations de cocktail nutritif. Il est à noter que la mesure calculée du CER et du OUR est entachée de bruit et par conséquent de petites variations dans le signal ne sauraient être considérées comme étant des variations réelles de la mesure.

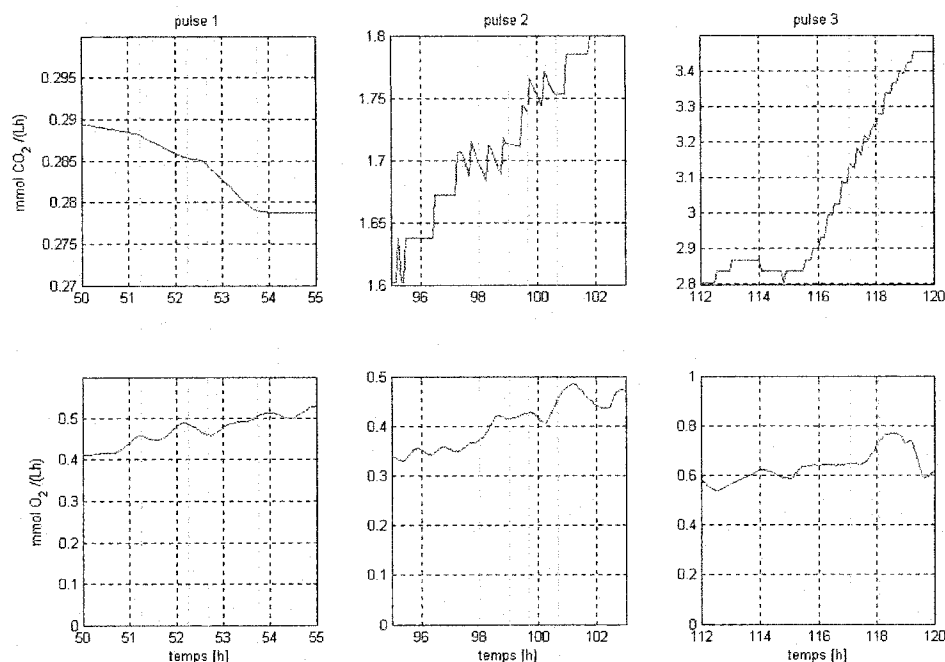


Figure 7.9 : OUR et CER lors des périodes de pulsations de l'expérience 6

Sur la figure 7.10 qui suit, on n'observe pas d'impact des pulsations de cocktail nutritif à court terme sur la croissance cellulaire. La croissance cellulaire se produit en quelques heures (les temps de doublements normaux des cellules étant de 18 à 24 heures). Il devient donc pratiquement impossible qu'une perturbation mineure du système, sur une échelle de temps plutôt réduite, ait un effet quelconque sur la croissance. Il existe des perturbations instantanées qui peuvent influencer le cours d'une culture, mais elles sont très rares (i.e. des problèmes électriques au niveau de l'agitation). Lorsque la concentration d'oxygène dissous quitte son point de consigne, cela peut prendre quelques heures avant que la croissance cellulaire n'en soit affectée.

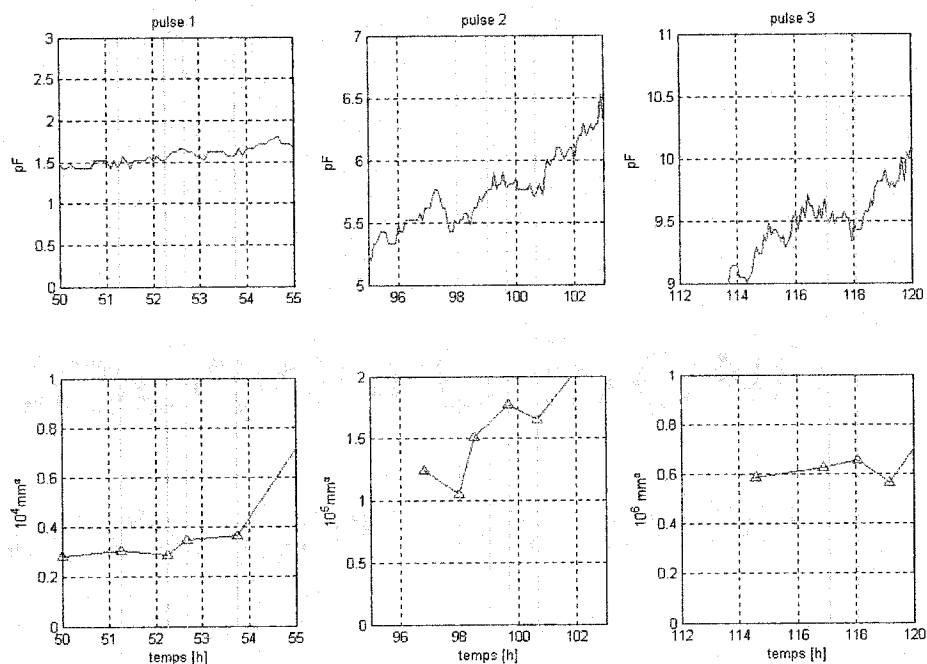


Figure 7.10 : Permittivité relative et biovolume lors des périodes de pulsations de l'expérience 6

L'osmolalité du milieu change lorsqu'il y a pulsation de cocktail nutritionnel. Toutefois, l'augmentation de l'osmolalité est raisonnable et peut être prévue, celle-ci étant proportionnelle au mélange composé de cocktail et de milieu. Les profils d'osmolalité sont présentés dans la figure 7.11.

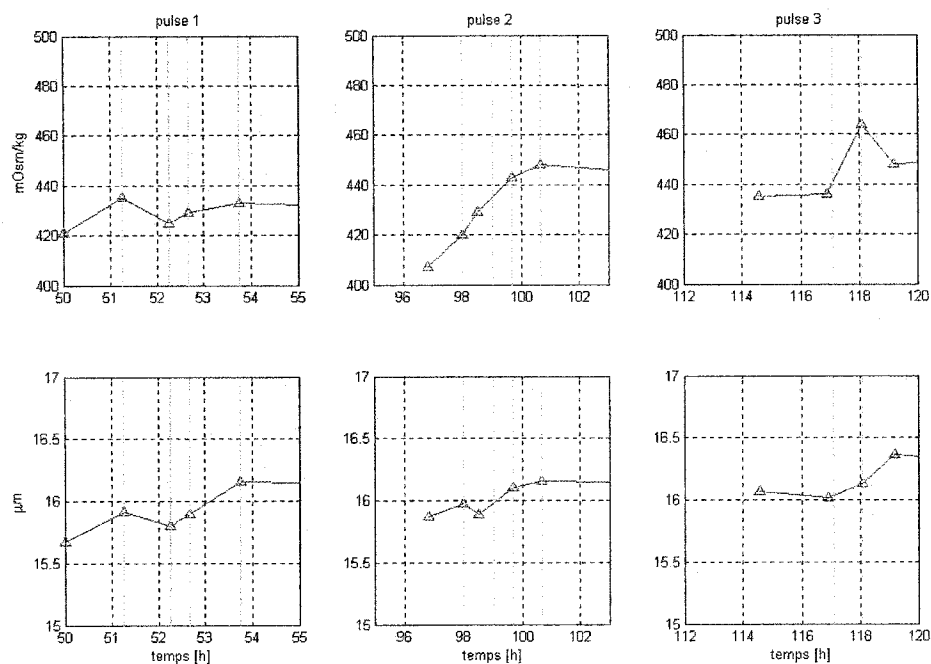


Figure 7.11 : Osmolalité et diamètre cellulaire lors des périodes de pulsations de l'expérience 6

La production de métabolites secondaires non désirés n'est pas influencée par les pulsations de cocktail nutritif. Comme on le remarque dans la figure 7.12 qui trace les différentes concentrations résiduelles de ceux-ci en fonction du temps. On remarque aussi les concentrations des nutriments ne prennent pas de valeurs disproportionnées par rapport à l'état original du système.

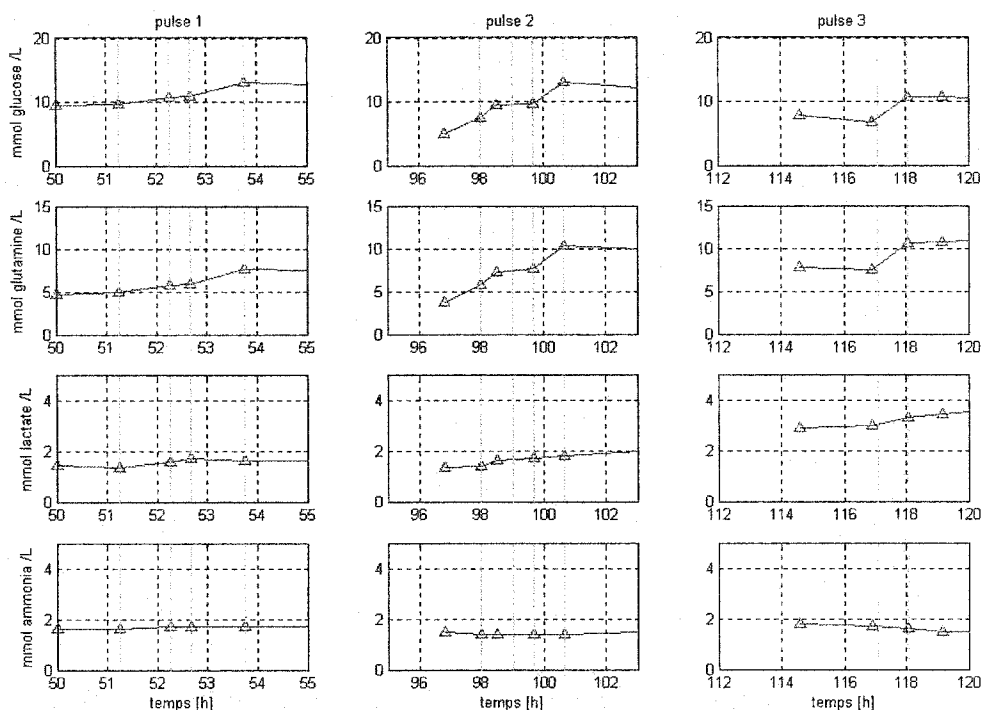


Figure 7.12 : Concentrations résiduelles de métabolites lors des périodes de pulsations de l'expérience 6

Cette analyse est une étape préalable à toute tentative de contrôle par sondages. De ces expériences se dégagent plusieurs choses. Premièrement, la consommation des nutriments chez les cellules Sf-9 n'est pas assez importante et rapide pour faire diminuer de manière significative l'osmolalité du milieu suite à une impulsion. Le système ne semble pas avoir un taux de consommation de glucose qui varie suffisamment dans le temps pour qu'on puisse observer une plus grande demande de celui-ci. Ceci ne laisse pas croire que ces cellules ont un métabolisme saturable. L'osmolalité du cocktail nutritif est très élevée, il pourrait être envisagé de répéter l'expérience 6 avec un cocktail dont l'osmolalité est en deça de 500 mOsm/kg.

Chapitre 8 Conclusion

8.1 Les taux de consommations avec les coefficients pseudo-stœchiométriques

Les coefficients pseudo-stœchiométriques trouvés pour les gaz (k_5 et k_6) n'ont pas donné de bons résultats (les observateurs n'arrivent pas à prédire de manière fiable leurs comportements). De plus, ils ne sont pas validés par les taux spécifiques calculés. L'échec de la modélisation des trajectoires des gaz peut s'expliquer d'un point de vue biochimique. La respiration cellulaire est un phénomène beaucoup plus rapide que la consommation de nutriments ou que la production de métabolites secondaires. La différence d'échelle entre ces dynamiques peut expliquer les difficultés rencontrées avec les bilans gazeux. On ne peut pas affirmer avec certitude quel pourcentage d'oxygène alimenté va dans le cycle des TCA pour la respiration à proprement dit. Divers chiffres ont déjà été avancés allant de quelques pourcents à plus de cinquante. Il se peut également que le problème des bilans des gaz ne vienne pas de la réalité physique du système, mais plutôt des erreurs de modélisation. L'approximation de ces bilans massiques n'est peut être pas valable pour des systèmes où l'oxygénation est un paramètre critique. L'estimation de la concentration en acide lactique semble être sensible à la partition utilisée. Afin de stabiliser l'observabilité de ce composant, des études sur un autre schéma sont à être envisager.

Afin de mettre les coefficients pseudo-stœchiométriques dans les mêmes unités que les taux spécifiques, nous avons utilisé $\mu=0,0211 \text{ h}^{-1}$ (tel que calculé dans le tableau 4.3). Le tableau suivant rassemble les coefficients pseudo-stœchiométriques (du tableau 6.12) ainsi que les taux spécifiques de consommation et de production trouvés à partir

des données expérimentales (tableau 4.3). Les valeurs de k_2 et k_3 trouvées par l'algorithme de modélisation sont validées par les valeurs des taux spécifiques.

Tableau 8.1 : Comparaison des taux spécifiques de rendement et des coefficients pseudo-stoichiométriques

(mol/e ⁶ cell/h)	Taux spécifiques	Coefficients pseudo-stoichiométriques
$Q_{\text{glucose}} (k_2)$	0,0321	0,04776
$Q_{\text{glutamine}} (k_3)$	$7,3e^{-3}$	0,0222
$Q_{\text{lactate}} (k_4)$	0,0121	$1,789e^{-3}$
$Q_{O_2} (k_5)$	0,0957	$1,250e^{-5}$
$Q_{CO_2} (k_6)$	$2,764e^{-4}$	$5,390e^{-6}$

8.2 La modélisation

La modélisation dynamique générale a fait l'objet de plusieurs applications par simulations. La majorité des systèmes étudiés utilisent des organismes autonomes. Le défi de ce projet était d'utiliser cette approche simple et très proche de l'ingénierie des procédés chimiques classiques, afin de pouvoir contrôler un système largement plus complexe et plus sensible. Ces travaux de recherche arrivent à un moment où le secteur de la recherche sur les procédés biotechnologiques commencent de plus en plus à considérer avec intérêt les cellules animales pour leur potentiel de synthèse protéique. Les travaux d'ingénierie au niveau du contrôle sont pour la plupart des essais ou des systèmes exploratoires. Ce projet s'inscrit dans la lignée de ces explorations afin d'arriver à maîtriser la culture des cellules évoluées et ce, avec un minimum de connaissances nécessaires sur ce procédé. L'apport de ces travaux est de montrer la difficulté de simplifier un système complexe tout en gardant les renseignements essentiels pour l'identifiabilité des paramètres du modèle.

Il est possible de retrouver les valeurs réelles de la matrice K , lorsque les données ne sont pas bruitées. Dans ce cas de figure, les deux observateurs fonctionnent

parfaitement. On peut reconstruire les trajectoires des ξ_b avec l'observateur z et reconstruire la trajectoire des variables transformées η_b à partir des mesures de η_a .

Lorsque les données sont bruitées (ce qui est le cas de toutes les données expérimentales), les observateurs perdent de la robustesse. En fait, l'observateur des η_b demeure assez stable, lorsque les bilans des gaz ne sont pas modélisés. L'autre observateur, ξ , perd toute sa signification lorsque le bruit est introduit dans les mesures des ξ . Cette conclusion est l'une des plus importantes de ce travail. La figure 6.4 illustre la démarche des diverses manipulations mathématiques nécessaires à la modélisation. Théoriquement, toutes ces manipulations sont réversibles. L'identification de la matrice A se fait sur les variables transformées η et ensuite les valeurs des coefficients de cette matrice sont validées sur l'observateur des ξ_b avec la matrice K (retrouvée à partir de A). Retrouver l'état des ξ depuis l'état des η n'est pas possible avec des données bruitées. Nous suggérons dans le chapitre 5, qui porte sur la modélisation de bâtir le contrôleur sur le système transformé (η). Ce contrôleur pourrait utiliser la modélisation présentée dans ce projet, mais une validation expérimentale de celui-ci s'impose. Il n'y a aucune indication à ce stade-ci qui indique que la trajectoire optimale des η corresponde à une trajectoire optimale des ξ .

Ce mémoire fait la synthèse sur le développement biotechnologique de la culture des cellules Sf-9, tout en intégrant ces développements dans une structure plus mathématique. Des connaissances biologiques, biochimiques et biotechnologiques sur le procédé ainsi que des connaissances mathématiques sur la modélisation des bioprocédés et sur les systèmes de contrôles sont intégrés dans ces travaux. Le

croisement de ces disciplines permette de synthétiser les informations disponibles sur un procédé afin de permettre et d'entrevoir son automatisation.

8.3 Le contrôle par sondages

Un des objectifs de ce projet était de tester la possibilité de contrôler le débit de la pompe d'alimentation par sondages (perturbations contrôlées). Pour tester cette possibilité, un modèle dynamique fiable et robuste est nécessaire afin de paramétrer le contrôleur (celui-ci doit impérativement comprendre les bilans des gaz). Ces tests n'ont pas été réalisés, le modèle étant trop fragile. Toutefois des tests en bioréacteurs ont été faits afin de voir la réaction du système à des impulsions de nutriments. Ce type de contrôleur a déjà été questionné pour les cultures de cellules mammifères, car la combinaison optimale des nutriments essentiels à la croissance de celles-ci est difficilement déterminable. Le cocktail développé à l'Institut de recherche en biotechnologie répond très bien aux besoins nutritifs des cellules d'insectes et leur fournit des lipides afin de les protéger contre les divers stress auxquels elles risquent d'être soumises. Toutefois, l'osmolalité de ce cocktail est très importante. Il se pourrait que ceci puisse limiter l'application du contrôle par sondages à ce procédé. Il serait intéressant dans des travaux futurs de tester les impulsions de différents cocktails nutritifs afin de voir leur impact sur la culture et son osmolalité et ainsi pouvoir déterminer avec plus de certitude si ce système possède un niveau de saturation.

Aucune conclusion quant à la possibilité de saturation du métabolisme cellulaire n'est possible à ce stade. Dans le cas de cultures bactériennes, le contrôle par sondages s'applique très facilement, parce que la respiration et la consommation de glucose sont directement reliées. D'après les résultats expérimentaux obtenus, on ne peut pas lier,

de la même manière que chez les bactéries, la respiration cellulaire à la consommation de glucose. Cette constatation nuit grandement à l'application éventuelle d'un tel système pour une culture de cellules évoluées.

Chapitre 9 Bibliographie

AKESSON M. & al. (1997). A Pulse Technique for Control of Fed-Batch Fermentations, *Proceedings of the 1997 IEEE international conference on control applications*, Hartford, 139-144

AKESSON M. (1999). *Probing Control of Glucose Feeding in Escherichia coli Cultivations*, PhD thesis, Lund Institute of technology, Suède

AKESSON M. et HAGANDER P. (1999). A Gain-Scheduling Approach for Control of Dissolved Oxygen in Stirred Bioreactors, *Proceedings of 14th world congress of international federation of automatic control*, eds. Chen et al, China, vol O, 505-510

ARZEN K.E. (1991). Sequential Function Charts for Knowledge-Based Real-Time Applications. *Artificial intelligence in real-time control*, California, USA, 91-96

ARZEN K E (1994). Grafcet for Intelligent Supervisory Control Applications. *Automatica*, vol 30, no 10, 1513-1525

BASTIN G. & DOCHAIN D. (1990). *On-line Estimation and Adaptive Control of Bioreactors*, Elsevier, Amsterdam

BASTIN G. & al. (1997). Identification of Mathematical Models for Bioprocess Control. *Med Fac Landbouww.Univ. Gent.*, 62/4b, 1559-1572

BÉDARD C. & al. (1994). Maximization of Recombinant Protein Yield in the Insect Cell/Baculovirus System by on-line Addition of Nutriments to High-Density Batch Cultures. *Cytotechnology*, vol 15, 129-138

BEDARD C. & al. Fed-Batch Culture of Sf-9 Cells Supports 3×10^7 cells/mL Andimproves Baculovirus-Expressed Recombinant Protein Yields, *Biotechnology Letters*, v.19, 629-632, 1997.

BERNARD O. & al. (1999). Mass Balance Modeling of Vanillin Production from Vanilic Acid by Cultures of the Fungus *Pycnoporus Cinnabarinus* in Bioreactors. *Biotechnology and bioengineering*, vol 65, no 5, 558-571

BERNARD O. & al. (2000). Observers for the Biotechnological Processes with Unknown Kinetics. Application to wastewater treatment. *Proceeding of the 39th IEEE conference on decision and control*, Australia, 4526-4531

BERNARD O. & al. (2001). Advanced Monitoring and Control of Anaerobic Wastewater Treatment Plants : Software Sensors and Controllers for an Anaerobic Digester. *Water science and technology*, vol 43, no 7, 175-182

BOGAERTS P.(1999). *Contribution à la modélisation mathématique pour la simulation et l'observation d'états des bioprocédés*, PhD thesis, Université libre de Bruxelles.

BOGAERTS P. & HANUS R. (2001). Macroscopic Modelling of Bioprocess with a View to Engineering Applications. *Engineering and Manufacturing for Biotechnology*, Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 77-109

BOGAERTS P. & WOUWER A. (2001). Parameter Identification for State Estimation of a Fed-Batch Bioreactor : Analysis Through Model Falsification. *CAB 8*, Québec, 436-441

CARPENTIER E. & al. (2001). Increased Production of Active Human β_2 -adrenergic/gas Fusion Receptor in sf-9 Cells using Nutriment Limiting Conditions. *Protein expression and purification*, vol 23, 66-74

CARON A.W. & al. High-Level Recombinant Protein Production in Bioreactors using the Baculovirus-Insect Cell Expression System, *Biotechnology and bioengineering*, v.36, 1133-1140, 1990.

CHEN L. (1992). *Modelling, Identifiability and Control of Complex Biotechnological Systems*, PhD thesis, Université catholique de Louvain

CHEN L. & BASTIN G.. Structural Identifiability of the Yield Coefficients in Bioprocess Models when the Reaction Rates are Unknown. *Mathematical Biosciences*,132:35-67,35-67

CHEN W & al. (1997). Automated Fed-Batch Fermentation with Feed-Back Controls based on Dissolved Oxygen (DO) and pH for Production of DNA Vaccines, *Journal of Industrial Microbiology and biotechnology*, vol 18, 43-48

CHEN L. & al (2000). Hybrid Modelling of Biotechnological Processes using Neural Networks. *Control engineering practice* 8, 821-827

CHOTTEAU V. & BASTIN G. (1992). Identification of a Reaction Mechanism for a Class of Animal Cell Cultures, *IFAC modeling and control of Biotechnical Process*, Colorado, 215-218

CHOTTEAU V. & BASTIN G. (1994). Identification of Mathematical Models for Biotechnological Processes : recipe and Application to a Culture of Animal Cells. *Proceedings of the 6th European Congress on Biotechnology*, edited L.Alberghina L Frontali P Sensi, 837-844

CRUZ P.E. & al. (1997). Insect Cell Growth Evaluation during Serum-Free Adaptation in Stirred Suspension Cultures, *Biotechnology techniques*, v.11, n.2, 117-120

DALAL N.G. & BENTLEY W.E. (1999). Mathematical Characterization of Insect Cell (Sf-9) Death in Suspended Culture, *Biotechnology letters*, vol 21, 325-329

DOCHAIN D. & BASTIN G. Adaptative Control of Fedbatch Bioreactors, *Chem. Eng. Comm.*, vol 87, 67-85

DOCHAIN D. (1994). Software Sensors and Adaptative Control in Biotechnology. *Automatic Control of food and biological processes*,J.J. Bimbenet, E. Dumoulin and G. Trystram eds, Elsevier Science B.V.,3-10

DOCHAIN D. & al. (1997). Asymptotic Observers as a Tool for Modeling Process Dynamics. *Wat. Sci. tech.*, vol 36, no 5, 259-268

DOCHAIN D. & PERRIER M.. Dynamical Modelling, Analysis, Monitoring and Control Design for Nonlinear Bioprocesses, *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, vol 56, 147-197

DOVERSKOG, M. (2000). On the Metabolism and Physiology of *Spodoptera frugiperda* Sf9 Cell Cultures. Royal Institute of Technology, Sweden, 66 pages

DREWS M & al. (1995). The Growth and Nutrient Utilization of the Insect Cell Line Sf-9 in Batch and Continuous Culture. *Journal of biotechnology*, vol 40, 187-198

DUTTON R.L. & al. (1998). Descriptive Parameter Evaluation in Mammalian Cell Culture. *Cytotechnology*, vol 26, 139-152

ELIAS C. & al. (2000). Enhanced Growth of Sf-9 Cells to a Maximum Density of 5.2×10^7 Cells per mL and Production of β -galactosidase at High Cell Density by Fed Batch Culture. *Biotechnology and Bioengineering*, vol 68, no 4, 381-388

FRAHM B. & al. (2002). Determination of Dissolved CO_2 Concentration and CO_2 Production Rate of Mammalian Cell Suspension Culture Based on Off-Gas Measurement. *Journal of biotechnology*, vol 99, p.133-148

GALVANAUSKAS V. & al. Model Based Design of a Biochemical Cultivation Process. *Bioprocess Engineering*, vol 18, 227-234

GEE, D.A. & RAMIREZ W.F. (1996). On-line State Estimation and Parameter Identification for Batch Fermentation, *Biotechnol. Prog.*, vol 12, 132-140

GOOIJER C.D. & al. (1989). A Model for Baculovirus Production with Continuous Insect Cell Cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* Vol 30, 497-501

GOOIJER C.D. & al. (1992). A Structured Dynamic Model for the Baculovirus Infection Process in Insect-Cell Reactor Configurations. *Biotechnology and bioengineering*, vol 40, 537-548

IGNATOVA M. & LUBENOVA V. (1995). An Approach for Estimation of Biotechnological Processes Variables, *Chem. Biochem. Eng*, vol 9, no1, 19-25

IKONOMOU L. & al. (2001). Design of an Efficient Medium for Insect Cell Growth and Recombinant Protein Production. *In vitro Cell Dev Biol*, vol 37, 549-559

JONHSTON W.A. & COONEY M.J. (2001). Implementation of an Integrated Control Structure in a Fed-Batch Fermentation System for Recombinant E coli. CAB 8, Québec, 201-206

KAMEN A. (1992). Caractérisation d'un bioréacteur à agitateur hélicoidal et chicanes de surface : application a la culture de cellules d'insectes Sf-9, Thèse de doctorat, École Polytechnique

KAMEN A & al. (1995). On-line Monitoring of Respiration in Recombinant-Baculovirus Infected and Uninfected Insect Cell Bioreactor Cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, vol 50, 36-48

KLEMAN G.L. & al. (1991). A Predictive and Feedback Control Algorithm Maintains a Constant Glucose Concentration in Fed-Batch Fermentations, *Applied and Environmental Microbiology*, vol 57 nu 4, 910-917

KIOUKIA N. & al. (1995). Physiological and Environmental Factors Affecting the Growth of Insect Cells and Infection with Baculovirus. *Journal of biotechnology*, vol 38, 243-251

KONSTANTINOV K.B.. Expert Systems in Bioprocess Control : requisite features, *Advances in biochemical engineering*, 169-191

KONSTANTINOV K & al. (1990). A Balanced DO-stat and its Application to the Control of Acetic Acid Excretion by Recombinant *Escherichia coli*, *Biotechnology and bioengineering*, vol 36, 750-758

KORZ D.J. & al. (1995). Simple Fed-Batch Technique for High Cell Density Cultivation of *Escherichia coli*, *Journal of biotechnology*, vol 39, 59-65

LAROSE A. & JORGENSEN S.B. (2001). State Estimation for a Biological Phosphorus Removal Process using an Asymptotic Observer. *Water science and technology*, vol 43, no 11, 205-213

LEE H.S. & al. (1994) Growth Limiting Factors Influencing High Density Culture of Insect Cell in Grace's Medium, *Biotechnology Letters*, v.16, n.4, 327-332

LEE J. & al. (1999). Research Review Paper : Control of Fed-Batch Fermentations, *Biotechnology Advances*, vol 17, 29-48

LEVISAUSKAS D. & al. (1999). Model Based Calculation of Substrate/Inducer Feed-Rate Profiles in Fed-Batch Processes for Recombinant Protein Production. *Biotechnology techniques*, vol 13, 37-42

LICARI P. & BAILEY J.E. (1992). Modeling the Population Dynamics of Baculovirus-Infected Insect Cells : Optimizing Infection Strategies for Enhanced Recombinant Protein Yields, *Biotechnology and bioengineering*, vol39, 432-441

LOVRECZ G. & GRAY P. Use of On-line Analysis to Monitor Recombinant Mammalian Cell Cultures. *Cytotechnology*, vol 14, 167-175

MAIORELLA B. & al. (1988), *Biotechnology*, v.6.1406-1410

MUTHUSWAMY K & al. Automatic Rule Generation for Supervision of Fermentation Processes. *CAB 8*, Québec, 155-160

NEELEMAN R & al. (2001). On-line Harvest Prediction for the Production of Biologicals, *CAB 8*, Québec, 430-435

O'CONNOR G.M. & al. (1992). Design and Evaluation of Control Strategies for High Cell Density Fermentations, *Biotechnology and bioengineering*, vol 39, 293-304

ÖHMAN L. & al.(1995). Induction of a Metabolic Switch in Insect Cells by Substrate-Limited Fed Batch Cultures. *Appl Microbial Biotechnol.*,vol 43, 1006-1013

OZTURK S.S. (1996). Engineering Challenges in High Density Cell Culture Systems. *Cytotechnology*, vol 22, 3-16

POWER J.F. & al. (1994). Modeling and Optimization of the Baculovirus Expression Vector System in Batch Suspension Culture. *Biotechnology and bioengineering*, vol44, 710-719

RADFORD K.M. & al. (1997). Substrate Limitation in the Baculovirus Expression Vector System, *Biotechnology and bioengineering*, vol 56, no 1, 32-44

REUVENY S. & al. (1993). Effect of Temperature and Oxygen on Cell Growth and Recombinant Protein Production in Cell Cultures. *Applied and microbiology biotechnology*, vol 38, 619-623

ROCHA & FERREIRA E.C. (2001). An Integrated System for Advanced Monitoring and Control of Fed-Batch Fermentations of Recombinant E coli. *CAB 8*, Québec, 353-358

RUFFIEUX P.A. & al. Minireview : Measurement of Volumetric (OUR) and Determination of Specific (qO_2) Oxygen Uptake Rates in Animal Cell Cultures, *Journal of Biotechnology*, vol 63, 85-95

SANDERSON C.S. & al. (1999). A Structured, Dynamic Model for Animal Cell Culture Systems. *Biochemical engineering journal*, vol 3, 203-211

SANDERSON C.S & al. (1999). A Structured, Dynamic Model for Animal Cell Culture Culture : application to Baculovirus/Insect Cell Systems. *Biochemical engineering journal*, vol 3, 219-229

SCHMID G (1996). Insect Cell Cultivations : Growth and Kinetics, *Cytotechnology*, vol 20, 43-56

WICKHAM & al (1991). Baculovirus Defective Interfering Particles are Responsible for Variations in Recombinant Protein Production as a Function of Multiplicity of Infection, *Biotechnology letters*, v.13, n.7, 483-488

WONG T.K.K. & al. (1994). Relationship Between Oxygen Uptake Rate and Time of Infection of Sf-9 Insect Cells Infected with a Recombinant Baculovirus. *Cytotechnology*, vol 15, 157-167

WU S.C. & al. (1993). Kinetic Characterization of Baculovirus-Induced Cell Death in Insect Cell Cultures, *Biotechnology and bioengineering*, vol 41, 104-110

XIE L. & WANG D. (1994). Fed-Batch Cultivation of Animal Cells using Different Medium Design Concepts and Feeding Strategies, *Biotechnology and bioengineering*, vol 43, 1175-1189

XIE L. & WANG D. (1996). High Cell Density and High Monoclonal Antibody Production Through Medium Design and Rational Control in a Bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, vol 51, 725-729

ZEISER A. & al (2000). On-line Monitoring of Physiological Parameters of Insect Cell Cultures during the Growth and Infection Process. *Biotechnol. Prog.*, vol 16, 803-808

ZENG A.P. & al. (1998). Variation of Stoichiometric Ratios and their Correlation for Monitoring and Control of Animal Cell Cultures. *Biotechnol. Prog.*, vol 14, no 3, 434-441

Annexe 1 : Composition du milieu de culture IPL-41

Tableau A1.1 : Composition du milieu de culture IPL-41

Composants	Concentration (mg/100mL)
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	116
NaHCO ₂	35
KCl	120
CaCl ₂	50
MgSO ₄ .7H ₂ O	188
Beta-Alanine	30
L-Arginine-HCl	80
L-Asparagine	130
L-Aspartic acid	130
L-cystine	10
L-Glutamid acid	150
Glutamine	100
Glycine	20
L-Histidine	20
Hydroxy-L-proline	80
L-Isoleucine	75
L-Leucine	25
L-Lysine-HCl	70
L-Methionine	100
L-Proline	50
L-Phenylalanine	100
DL—Serine	40
L-Threonine	20
L-Tryptophan	10
L-Tyrosine	25
L-Valine	50
Sucrose	1650
Glucose	250
Maltose	100
Maltic acid	5.36
Alpha-Ketoglutaric acid	2.96
Succinic acid	0.48
Fumaric acid	0.44
Thiamine-HCl	0.008
Riboflavin	0.008
Ca-pantothenate	0.0008
Pyridoxine-HCl	0.04
p-Aminobenzoic acid	0.032
Folic acid	0.008
Niacin	0.016
Isoinositol	0.04
Biotin	0.016
Cyanocobalamin	0.024

Choline chloride	2.0
ZnCl ₂	0.004
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.002
CuCl ₂ ·2H ₂ O	0.02
(NH ₄)Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	0.004
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.005
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.055
Osmolalité (mOsm/kg)	360-375

Annexe 2 : Cocktail alimenté

Tableau A2.1 : composition des additifs

Composants	Quantité (mL)
AA8.2	135
Yeastolate 100X	56.25
Glucose (500g/L)	15
Solution de Tyrosine ^a	7.5
Lipide en émulsion ^b	22
Vitamines et éléments trace	8.75
Total	244.5

- a. Pour une solution de 50 mL, dissoudre 1.39g of L-Tyrosine Disodium Salt (2 mol/mol H₂O) dans de l'eau stérile.
- b. 10% de lipide 1000X (Sigma) en émulsion avec du Pluronic F-68 10%.

Tableau A2.2 : composition de AA8.2

Substance	Formule chimique	Poids molaire (g/mol)	Concentration (g/L)
Asp	C ₄ H ₇ NO ₄	133.1	1.646
Glu	NA-C ₅	169.1	6.696
Ser	C ₃ H ₇ NO ₃	105.1	8.504
Gly	C ₂ H ₅ NO ₂	75.07	0.711
Gln	C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃	146.1	26.298
His	C ₆ H ₉ N ₃ O ₂	155.2	1.552
Thr	C ₄ H ₉ NO ₃	119.1	3.573
Arg	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	174.2	7.839
Pro	C ₅ H ₉ NO ₂	115.1	4.604
Cys	C ₃ H ₇ NO ₂ S	121.2	5.636
Val	C ₅ H ₁₁ NO ₂	117.1	4.099
Met	C ₅ H ₁₁ NO ₂ S	149.2	2.238
Ile	C ₆ H ₁₃ NO ₃	131.17	2.521
Leu	C ₆ H ₁₃ NO ₂	131.17	3.279
Lys	C ₆	182.6	4.211
Phe	C ₉ H ₁₁ NO ₂	165.2	1.552
Trp	C ₉ H ₁₁ NO ₂	204.2	0.715

Tableau A2.2 : Solution de vitamines et éléments trace

	substances	Concentration [mg/mL]
5A	ThiamineHCl/2H ₂ O	82
	Riboflavin	80
	D-Ca Pantothenate	8
	PyridoxineHCl	400
	para-aminobenzoic acid	320
	Nicotinic Acid	160
	I-Inositol	400
	Biotin	160
	Choline Chloride	20000
	Vitamine B12	240
5B	Folic Acid	87
6	Molybdic acid ammonium salt	40
	Cobalt chloride hexahydrate	50
	Cupric chloride	160
	Manganese chloride	20
	Zinc chloride	40
7	FeSO ₄ .7H ₂ O	550
	Aspartic acid	356

Prendre un volume égal de chacune des quatre catégories (5A,5B,6,7).

Engineering *Trichoplusia ni* (High-Five™) insect cells to express a cytosolic pyruvate carboxylase enzyme improves the viability of the cells in batch, fed-batch and perfusion cultures.

Marie-Christine Locas^{1,2}, Cynthia B. Elias¹, Stephane Lanthier¹, Louis Bisson¹, M. Perrier² and Amine Kamen^{1*}

INTRODUCTION

The insect cell-baculovirus expression system has traditionally been used with great success for the generation of large amounts of protein in a relatively short time for research or drug screening studies. Recent advances in the insect cell technology field such as: high cell density cultures, the ability to generate stable expression systems using insect cells, the demonstration of baculovirus mediated gene expression in mammalian cells, and the use of insect cells for the production of recombinant viral vectors for gene transfer applications have led to a renewal of interest in this technology. There is, however, a relative lack of information in the literature on the metabolism of cultured insect cells, which is one of the limitations in designing media and for large scale operations at high cell densities. In this work, we evaluated the metabolism of the *Trichoplusia ni* (High-Five™) insect cells with respect to the utilization of glucose and glutamine. Although these cells demonstrate higher productivity than the Sf-9 cells, their use has been relatively restricted. One of the limitations of the High-Five™ cells is the accumulation of large amounts of lactate and ammonia in the medium in batch culture, which may be deleterious to the cell growth and final product quality. We have used a metabolic engineering approach to overcome the problem and demonstrate the successful culture of these cells at high cell densities. The cells have been modified to express a cytosolic pyruvate carboxylase (PYC), an enzyme, which had been earlier, identified as a key enzyme in the flux of glucose to the TCA cycle (Neerman and Wagner 1998; Iran et al. 1999, 2002). Significantly this enzyme was found to be present in Sf-9 insect cells which coincidentally do not accumulate these toxic wastes in culture and have been successfully grown to very high cell densities using fed batch methods. The modified cells showed a more efficient utilization of glucose and glutamine and a marked decrease, in the amount of lactate (up to 70%) and ammonia (up to 80%) produced when compared to the non-modified host cells (Elias et al. 2003). This resulted in maintaining cells at a higher viability for a prolonged time, a major advantage in high cell density cultures especially when combined with stable insect cell lines. In the present work the effect of the changes in the metabolism have been evaluated under the three different conditions of operation: batch, fed-batch and perfusion cultures in a bioreactor (3 L scale) under controlled conditions. The performance of the transformed cells has been compared to the untransformed parent cells under similar conditions of growth.

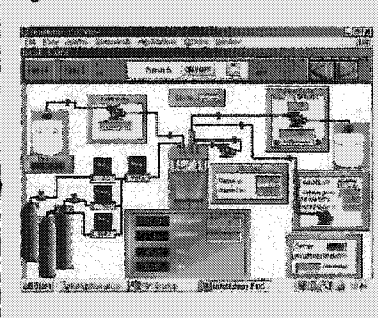
MATERIALS AND METHODS

- The generation of High-Five™ cells stably expressing the cytosolic pyruvate carboxylase enzyme have been described in detail in Elias et al. 2003.
- High-Five™ cells from Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, CA) were maintained at 27°C in spinner flasks at 110-120 rpm in Earle's 405 medium from GIBCO Biosciences, (Lexington, KS). These were then adapted to IPL-41 (GIBCO Biosciences, Lexington, KS), supplemented with yeastolate and lipids (GIBCO/Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA), and this was used for all the experiments carried out here.
- The batch, fed-batch and perfusion culture experiments were carried out in a Chemaps 3.5 L Type 66 bioreactor (Märkendorf, Switzerland). The reactor set up, the control system for the dissolved oxygen and the associated instrumentation have been described earlier (Kamen et al. 1996) and are illustrated schematically in Fig 1.
- Cell retention in the case of perfusion cultures was carried out using the Bio Sep 1616 automatic cell retention system (Sorbusap Biotech Inc. B.C. Canada).
- Capacitance (pF) and conductance (mS) were measured on-line using the Biomass Monitor (BM), model 214M (Aper Instruments Ltd, Abertysyth, U.K.). The CO₂ produced was measured in the outlet gas using an infrared analyzer (Servomex 140054, Norwood, MA).
- The cells were seeded at initial cell densities ranging from 3×10^4 to 5×10^5 cells/ml with exponentially growing cultures at an initial culture volume of 2.5 L.

ANALYTICAL METHODS

Cell counts were determined by counting with a microcoulometer (Neubauer Counting chamber). Trypan blue staining was used for viable cell count. Total cell counts were obtained by counting on a Coulter Counter (Coulter Z2, Coulter Particle Characterization, Hialeah, FL). The residual glucose concentration in the culture supernatants and the lactate and ammonia produced were measured using the IBI Bioalyzer Rapid Analysis System (Kodak, New Haven, CT). Amino acids were determined by HPLC using a modified version of the Waters AccQ Tag™ Method.

Figure 1 : Schematic of a bioreactor

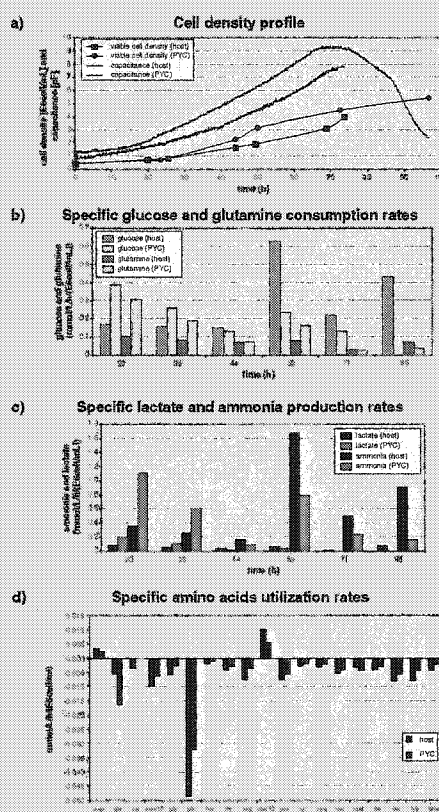


RESULTS AND DISCUSSION

Batch Culture

The growth of the transformed High-Five™ cells expressing the PYC enzyme were compared to that of the untransformed parent cells in a bioreactor under controlled conditions. The results showed that there were no significant differences in the growth rates of the two cell lines (Figure 2a). The final cell density obtained was higher in the case of the transformed cells. The viability profiles of the two cell lines indicated that the viability of the host cells decreased after about 30-55 h of culture whereas the transformed cells could be maintained above 65% for longer time periods (up to 75 h). The data obtained from the on-line monitoring of viable biomass using the capacitance probe supports the above observed trends in the viability. The profiles of glucose and glutamine consumption and lactate and ammonia production are shown in Fig 2b and 2c respectively. The specific growth rates for the two cell lines as well the corresponding specific rate of consumption of glucose and glutamine and production of lactate and ammonia are shown in Table 1. From the results it is evident that there is a decrease in the consumption of both glucose and glutamine accompanied by a decrease in the production of waste metabolites. The lower glucose consumption does not result in a lower growth rate and does not affect the final cell densities achieved. The specific consumption of amino acids is shown in Fig 2d, which indicate that the overall rate of consumption of the amino acids was lower for the transformed cells. Similar observations were made for amino acid utilization for PYC transformed High-Five and HEK 293 cells earlier in our laboratory (Elias et al. 2003).

Figure 2 : Batch culture of High-Five™ insect cells



Perfusion Culture

Perfusion culture experiments were carried out using IPL-41 medium and compared with the performance of the host cells under similar conditions of cultivation. The perfusion rate used in these experiments was 1VVD. Online monitoring of capacitance and CER was used to determine the viability in the culture. The profiles for the cell density and the capacitance measured during the perfusion culture of the PYC transformed cells could be maintained for a longer period at the plateau conditions in a perfusion mode. The results from the online monitoring of biomass and the carbon dioxide evolution rate (CER) are shown in Fig 3a which also demonstrates the above result. The profiles of the residual glucose, glutamine and lactate are shown in Fig 3b. The residual glucose and glutamine profiles support the observation that the steady state achieved with the PYC transformed cells is more stable than that of the host cells and was maintained for a longer time.

The results obtained above showed that similar trends with respect to glucose and glutamine consumption are observed under the three different conditions of operation i.e. batch, fed-batch and perfusion culture. The studies carried out here indicate that by suitable medium design such as using low initial glucose concentrations and employing feeding strategies the changes in the metabolism of glucose and glutamine can be exploited to achieve high cell density High-Five™ cell cultures. The production period can be prolonged by maintaining the cells viable for a longer time.

Figure 4 : Perfusion culture of High-Five™ insect cells

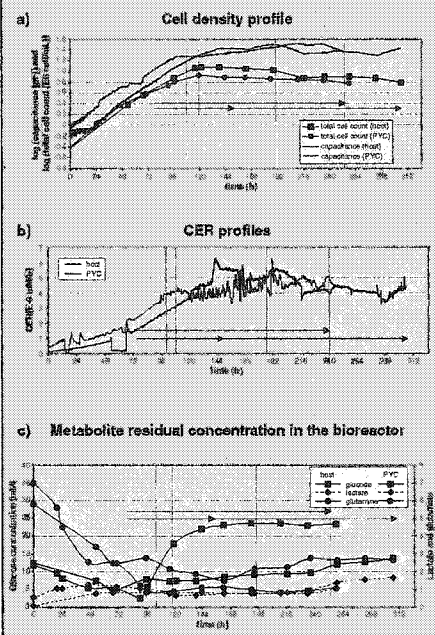


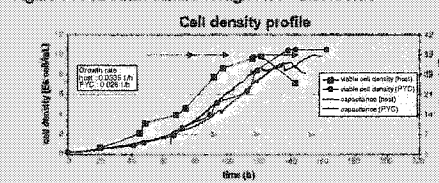
Table 1 : Metabolites consumption, production and specific growth rates in a batch culture

cell line	growth rate (1/h)	glucose (mmol/g cells/h)	glutamine (mmol/g cells/h)	lactate (mmol/g cells/h)	ammonia (mmol/g cells/h)
host	0.0318	0.096	0.046	0.018	0.110
PYC	0.0297	0.058	0.032	0	0.103

Fed-batch Culture

The ability to achieve high cell density using fed batch culture method with the High-Five™ cells has been difficult due partly to the large amounts of lactate and ammonia accumulated by these cells in culture. It was expected that the expression of the cytosolic PYC enzyme would alleviate the problem and facilitate fed batch culture of High-Five™ cells. The nutrient cocktail fed comprised glucose, amino acids, yeastolate, lipids and vitamins and trace elements. The details of feed composition and the feeding strategy used have been described earlier (Bédard et al. 1997; Elias et al. 2000). The results of the experiments with the High-Five™ cells transformed with the PYC2 gene as well as the host cells are shown in Fig 3. The time and duration of the feed addition are indicated by horizontal arrows. The viable cell density obtained with the PYC engineering cells was higher than in the case of the untransformed host cells and could be maintained at a higher viability for a longer time. These results are supported by the plateau observed in the capacitance at the corresponding period for the transformed cells as compared to the sharp decline in the case of the host cells. The ability to maintain the cells viable at high cell density for a prolonged period is especially advantageous when these cells are to be used as host cell lines for the stable non-viral expression of proteins in a perfusion system was studied.

Figure 3 : Fed-batch culture of High-Five™ insect cells



CONCLUSIONS

- The results obtained in this study confirm that the glucose and glutamine metabolism of cells can be changed by the introduction of the cytosolic PYC enzyme.
- There was no marked change in the growth rates of the transformed cells in batch culture.
- The PYC transformed cells achieved the same or higher final cell densities as the host cells. The transformed cells have a lower glucose consumption rate and glutamine consumption rate.
- The PYC transformed cells can be maintained at higher viabilities for longer time in fed batch cultures.
- These cells can be maintained at a stable high cell density for a prolonged time in perfusion culture.

REFERENCES

- Bédard C, Parent S, Kamen A.A. 1997 Biotechnol. Lett. 19: 429-432.
- Elias C.B, Zeller A., Bédard C and Kamen A.A. 2004 Biotechnol. Bioeng. 86(4): 351-355.
- Elias C.B, Carpentier E., Durocher Y., Bisson L., Wagner R. and Kamen A. 2003 Biotechnol. Prog. 19: 70-77.
- Kamen A.A., Bédard C, Tom R., Parent S., Järvin S. 1999 Biotechnol. Bioeng. 68: 30-45.
- Iran N., Wirth M., van der Hoven J., Wagner R. 1998 Biotechnol. Bioeng. 60: 236-242.
- Iran N., Becerra A.J., Wagner R. 2002 J. Biotechnol. 93: 281-291.
- Neumann J., Wagner R. 1996 J. Cell Physiol. 168: 150-160.

¹ Animal Cell Technology, Biotechnology Research Institute, 6700 Royalmount Avenue, Montreal, Qc H4P 2R2 Canada
² Ecole Polytechnique de Montreal, Montreal, Qc Canada
 *Corresponding author (phone: 514 496-2264; fax: 514 496-6755; email: amine.kamen@crnc.gc.ca)

Development of High Cell Density Culture Processes for Stable Non-Viral Expression of Recombinant Secreted Alkaline Phosphatase (SEAP) by *Trichoplusia ni* High Five™ Insect Cells

Cynthia Elias, Marie-Christine Locas, Jamal Meghrous, Stephane Lanthier and Amine Kamen

INTRODUCTION

The use of insect cells in conjunction with baculovirus expression system has been increasingly used to produce large amounts of recombinant protein. Although there are several reports on the production of insect cells to generate cells for better metabolism or glycosylation abilities (Hollister et al., 1989; Hollister and Jarvis, 2001) the use of stably transfected cells for production of recombinant proteins has so far been very limited (Jarvis et al., 1992; Jarvis et al., 1995). In this work we demonstrate that insect cells can be used as stable expression systems for production of large amounts of recombinant proteins. Recent advances in high cell density culture (HCD) techniques (Wickham et al., 1992; Wickham and Nemerow, 1995) has focused on recent years following reports of higher per cell productivity of recombinant proteins by these cells as compared to Sf6 cells (Devils et al., 1995).

MATERIALS AND METHODS

- The SEAP gene was cloned into the pCIS-1/55A (obtained from P.J. Farrell, Univ. of Calgary, Alberta, Canada) vector. The SEAP gene was then inserted into the pCIS-1/55A vector (obtained from P.J. Farrell, Univ. of Calgary, Alberta, Canada). The resulting construct was then transfected into insect cells by using the transfection of insect cells by using the electroporation method (Jarvis et al., 1995). The resulting construct was then transfected into insect cells by using the electroporation method (Jarvis et al., 1995).
- Cell selection in the case of perleukin cultures was carried out using the Bx-500 (1015) automatic cell selection system (Bioscreen Research Inc., B.C. Canada), which consists of the Bx-500 automatic cell selection system (Bioscreen Research Inc., B.C. Canada) and the Bx-500 automatic cell selection system (Bioscreen Research Inc., B.C. Canada).
- The baculovirus containing (AcMNPV-SEAP) was used to infect the SEAP-expressing insect cells. The resulting construct was then transfected into insect cells by using the electroporation method (Jarvis et al., 1995).
- Dispersed oxygen (DO) was monitored using a DO meter (DO-100, Yellow Springs Instrument Co., Ohio, USA). The DO was maintained at 40% of air saturation using a mechanical and control system as described in Kamen et al. (1995).
- Quantitative PCR was measured on-line using the Bx-500 (1015) automatic cell selection system (Bioscreen Research Inc., B.C. Canada).
- The cells were seeded at initial cell densities ranging from 3×10^5 to 5×10^5 cells/ml, with exponentially growing cultures at initial culture volume of 2.5 L. For the batch experiment with the baculovirus infection, cells were infected at a cell density of 1.5×10^5 cells/ml.
- Samplers were removed regularly and stored at -80°C for off-line analyses.
- The CO₂ produced was measured in the outlet gas using an infrared analyzer (Sartorius, 1400SA, Norwood, MA).

ANALYTICAL METHODS

The amount of SEAP produced was determined by enzymatic assay using para nitro phenyl phosphate (PNP) as the substrate and following the kinetics of hydrolysis. The assay procedure used is described in Borge et al. (1998).

RESULTS AND DISCUSSION

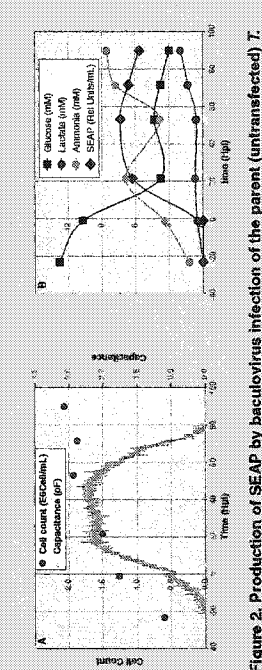


Figure 2. Production of SEAP by baculovirus infection of the parent (untransfected) *T. ni.* (High-Five™) insect cells in a batch culture.

The SEAP production starts about 24 h and the maximum SEAP production is achieved at about 48 h. The profiles of the metabolites glucose, lactate and ammonia during the batch culture show that there was no nutrient limitation under these conditions of infection. The consumption of these results to that obtained with these transfected cells.

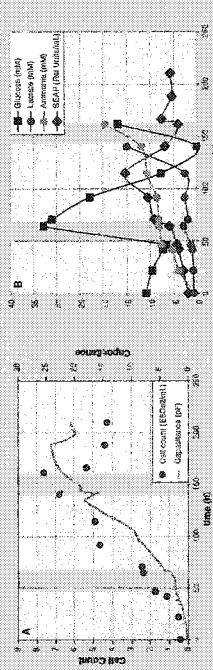


Figure 3. Production of SEAP by stably transfected *T. ni.* (High-Five™) insect cells in fed batch culture.

Our earlier results with the fed batch culture of SEAP cells resulted in very high cell densities up to 5×10^5 cells/ml. However, we found that in the case of the High-Five™ cells such high cell densities could not be achieved. We found that these cells accumulated high amounts of lactate and ammonia which are limiting to cell growth on the SEAP cells which do not accumulate toxic wastes. This is in agreement with earlier published reports on the culture of *T. ni.* (Hollister et al., 1989).

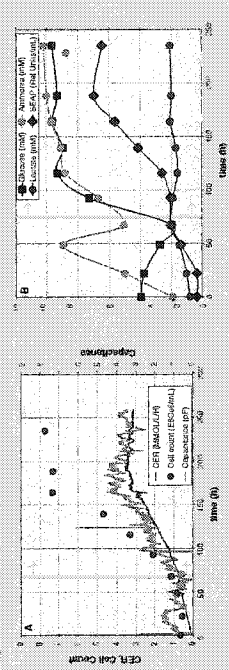


Figure 4. Perfusion culture of stably transfected *T. ni.* (High-Five™) insect cells expressing SEAP.

We further observed during the culture of these cells that although it was possible to achieve high cell density using fed batch or perfusion culture it was difficult to maintain them viable for prolonged periods of time. The stable period in the perfusion culture which corresponded to about 100 h could not be extended for longer periods without the need for replacement of the culture medium. The stable period in the perfusion culture which corresponded to about 100 h could not be extended for longer periods without the need for replacement of the culture medium. The stable period in the perfusion culture which corresponded to about 100 h could not be extended for longer periods without the need for replacement of the culture medium.

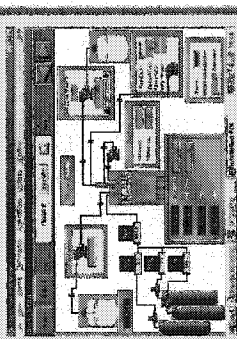


Figure 1. Schematic representation of the bioreactor and associated instrumentation used.

CONCLUSIONS

- Trichoplusia ni* (High-Five™) insect cells can be transfected to express recombinant protein stably.
- The recombinant protein (SEAP) production was comparable to the levels produced by baculovirus infection of untransfected cells.
- Volumetric productivity can be maximized by fed batch and perfusion culture of the stably transfected cells.
- Studies on overcoming the limitations to very high cell densities (greater than 10^5 cells/ml) are in progress.

REFERENCES

- Balard C, Peller S, Kamen A.A. 1997. Biotechnol. Lett. 19: 829-832.
- Berge J, Hauber J, Hauber P, Geiger R, Callen B.H. 1989. Gene. 66: 1-10.
- Davis T.B., Shuler M.G., Gonsky R. B. and H. A. Wood. 1995. In: Viro. Cellular and Developmental Biology, 29A, 342-346.
- Elias C, B. Zuber A., Salazar C and Kamen A.A. 2000. Biotechnol. Bioeng. 66 (4): 381-386.
- Hollister J.D., Shapiro J.H., and D.L. Jarvis. 1995. Glycobiology. 5: 473-480.
- Hollister J.D. and D.L. Jarvis. 2001. Glycobiology. 11: 119.
- Jarvis D.L., Fleming J.A., Kovacs G.R., Summers M.D. and L.A. Quinlan. 1990. Biotechnology. 6: 950-955.
- Jarvis D.L., Wehrli J. and L.A. Quinlan. 1995. Proc. Soc. Exp. Biol. 19: 203.
- Kamen A.A., Balard C., Tork R., Peral S., Jardin B. 1996. Biotechnol. Bioeng. 50: 96-106.
- Li M., Farrell P.J., Johnson R., Latou K. 1997. J. Biol. Chem. 272: 30724-30728.
- Rhodes M. C.M., Mitchell-Edwards D.W., Murrain, 1997. Biotechnol. Bioeng. 55: 909-920.
- Wickham T.J., Jarvis T.R., Shuler M.G., Gonsky R. B. and H. A. Wood. 1992. Biotechnol. Prog. 8: 391-396.
- Wickham T.J. and G.R. Nemerow. 1995. Biotechnol. Prog. 11: 25-30.

Annexe 4 : Taux de consommation et de production des Sf-9 et des High-Five™

Tableau A4.1 : Taux spécifique de consommation et de production et taux de croissance
des Sf-9 et High-Five™

	Sf-9					High-Hive™	
Taux spécifique de consommation et de production							
mmol /e ⁹ cell /h	Exp 1	Exp 2	Exp 3	Exp 4	Moy.	host	PYC
Q _{gluc}	-0.0259	-0.0419	-0.0174	-0.0431	-0.0321	-0.0723	-0.0565
Q _{lac}	N.D.	0.0220	0.0064	0.0080	0.0121	0.0129	0.0062
Q _{amm}	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.0793	0.1002
Asp	-0.0070	-0.0113	N.D.	N.D.	-0.0091	0.0024	0.0134
Glu	-0.0091	-0.0167	N.D.	N.D	-0.0129	-0.0041	-0.0094
Ser	0.0004	-0.0058	N.D.	N.D	-0.0027	-0.0027	-0.0046
Asn	-0.0019	-0.0035	N.D.	N.D	-0.0027	-0.0726	-0.1680
Gly	0.0001	-0.0024	N.D.	N.D	-0.0012	-0.0042	-0.0089
Gln	-0.0074	-0.0073	N.D.	N.D	-0.0073	-0.0360	-0.0740
His	-0.0011	-0.0008	N.D.	N.D	-0.0009	-0.0013	-0.0025
NH3	-0.0051	-0.0036	N.D.	N.D	-0.0043	N.D.	N.D.
Thr	-0.0008	-0.0020	N.D.	N.D	-0.0014	-0.0030	-0.0053
Arg	-0.0031	-0.0028	N.D.	N.D	-0.0029	-0.0056	-0.0089
Ala	0.0263	0.0348	N.D.	N.D	0.0306	0.0721	0.1747
Pro	-0.0024	-0.0029	N.D.	N.D	-0.0027	-0.0056	-0.0056
Tyr	-0.0001	-0.0007	N.D.	N.D	-0.0004	-0.0021	-0.0036
Cys	-0.0015	-0.0016	N.D.	N.D	-0.0016	-0.0023	-0.0065
Val	-0.0021	-0.0026	N.D.	N.D	-0.0024	-0.0038	-0.0075
Met	-0.0006	-0.0008	N.D.	N.D	-0.0007	-0.0024	-0.0056
Ile	-0.0025	-0.0021	N.D.	N.D.	-0.0023	-0.0030	-0.0057
Leu	-0.0036	-0.0038	N.D.	N.D.	-0.0037	-0.0058	-0.0058
Lys	-0.0032	-0.0023	N.D.	N.D.	-0.0027	-0.0056	-0.0056
Phe	-0.0017	-0.0004	N.D.	N.D.	-0.0011	-0.0032	-0.0032
Taux de croissance							
μ (h ⁻¹)	0.0172	0.0192	0.0239	0.0241	0.0211	0.0373	0.0292

Annexe 5 : Validation de la structure de la matrice A

Le changement d'état qui a été proposé dans l'équation 5.3 :

$$Z = A\xi_a + \xi_b \quad (\text{éq 5.1})$$

où :

$$\dot{Z} = A[-D\xi_a + F_a - Q_a] + [-D\xi_b + F_b - Q_b] \quad (\text{éq 5.2})$$

Le système partitionné en 5.2 (dans le chapitre 5) :

$$\begin{aligned} \frac{d\xi_a}{dt} &= K_a\varphi(\xi_a, \xi_b) - D\xi_a + F_a - Q_a \\ \frac{d\xi_b}{dt} &= K_b\varphi(\xi_a, \xi_b) - D\xi_b + F_b - Q_b \end{aligned} \quad (\text{éq 5.3})$$

En dérivant l'expression en 5.1, et en introduisant l'équation 5.3 on obtient :

$$\dot{Z} = A\dot{\xi}_a + \dot{\xi}_b \quad (\text{éq 5.4})$$

$$\dot{Z} = A[K_a\varphi(\xi_a, \xi_b) - D\xi_a + F_a - Q_a] + K_b\varphi(\xi_a, \xi_b) - D\xi_b + F_b - Q_b \quad (\text{éq 5.5})$$

$$\dot{Z} = AK_a\varphi(\xi_a, \xi_b) + K_b\varphi(\xi_a, \xi_b) + A[-D\xi_a + F_a - Q_a] + [-D\xi_b + F_b - Q_b] \quad (\text{éq 5.6})$$

$$\dot{Z} = [AK_a + K_b]\varphi(\xi_a, \xi_b) + A[-D\xi_a + F_a - Q_a] + [-D\xi_b + F_b - Q_b] \quad (\text{éq 5.7})$$

Pour que le changement de base soit valable, il faut que :

$$A[K_a + K_b]\varphi(\xi_a, \xi_b) = 0 \quad (\text{éq 5.8})$$

D'où :

$$AK_a + K_b = 0 \quad (\text{éq 5.9})$$

Annexe 6 Paramètres à définir pour le contrôle par sondages

Afin de pouvoir obtenir une réponse valable du système aux séances périodiques de pulse, il faut définir un certain nombre de paramètres afin d'encadrer convenablement cette stratégie de sondage.

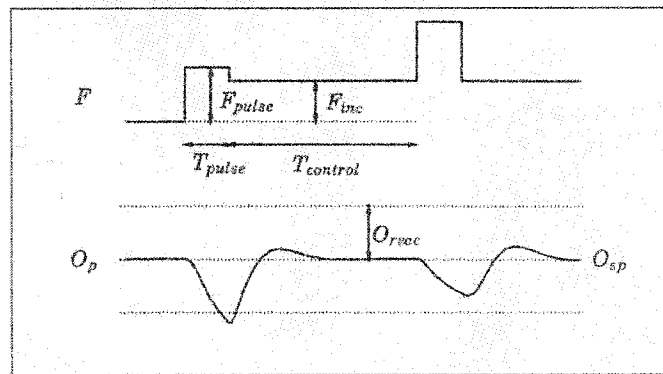


Figure A6.1 : paramètres à définir pour l'algorithme le contrôle par sondage

A6.1 Temps de réponse maximal du système

Le temps maximal de réponse du système est évalué comme étant la somme des différents temps suivants :

- Le temps de réponse de la sonde à oxygène (T_p)
- La constante de temps maximale de la dynamique de l'oxygène dissous.

$$T_o^{\max} = \frac{1}{kla_{\min}}.$$

- La constante de temps maximale de la dynamique du glucose (au taux de consommation critique). Ce paramètre dépend de la densité cellulaire, le pire des cas survient lorsque la densité cellulaire est basse ($T_g^{\max}$).

A6.1.1 Temps de sondage

La durée du temps de pulsation doit être au minimum celle du temps de réponse maximal du système.

$$T_{pulse} = T_{max} \quad (\text{éq 6.1})$$

A6.1.2 Temps de contrôle

Entre deux séances de pulsations, une action sur le contrôleur de débit est prise comme il est mentionné dans le tableau 6.1. Durant cette période, le contrôleur de l'oxygène dissous est actif ainsi que celui du débit de la pompe. Cette période de temps doit être suffisamment longue pour que le taux d'oxygène dissous retourne à son point d'opération. On fixe ce temps à quatre fois la période de sondage.

$$T_{control} = 4T_{pulse} \quad (\text{éq 6.2})$$

A6.1.3 Réaction de la concentration d'oxygène dissous

Après qu'un pulse ait été fait, il faut déterminer ce que l'on considère comme étant une réaction claire de la concentration en oxygène dissous. Toute réaction excédant une variation de 8% de variation dans la lecture de la sonde à oxygène est considérée comme une réaction à la pulsation de l'alimentation.

$$O_{reac} = 8\% \quad (\text{éq 6.3})$$

A6.1.4 Niveau de tolérance sur la réaction de la concentration en oxygène dissous

Afin de ne pas considérer les bruits de mesure et de ne pas considérer une variation du taux d'oxygène dissous dans la culture qui ne serait pas attribuable à une pulsation dans le débit de la pompe d'alimentation, nous devons définir une limite en deçà de

laquelle on ne considérera pas la réaction de la sonde. Cette valeur vaut dix pourcent de la valeur de la réaction claire.

$$O_{tol} = 0.1 * O_{reac} \quad (\text{éq 6.4})$$

A6.1.5 Amplitude de pulsation dans le débit d'alimentation

La pulsation faite dans l'alimentation doit être choisit en tenant compte de l'état du système au moment du sondage. La réponse dans la demande en oxygène est reliée au débit de l'alimentation, mais elle dépend aussi de la population cellulaire. La durée de pulsation est fixe, mais l'amplitude du débit varie dans le temps avec l'évolution du système. Afin d'évaluer ce paramètre, on utilise les bilans de matières de la concentration en glucose et en oxygène dissous. Voir le développement en annexe 7.

A6.2 Lois de commande de l'oxygène dissolvant

A6.2.1 PID par linéarisation du bilan de matière

Bilan de matière :

$$\frac{dVC}{dt} = kla_{O_2}(Q_{tol}, Q_{bul})(C^{sat} - C)V - k_s \mu_1 XV \quad (\text{éq 6.5})$$

Négligeons les quantités d'oxygène dissous perdu par l'entrée et la sortie de liquide :

$$\frac{VdC}{dt} + \frac{CdK}{dk} = kla_{O_2}(Q_{tol}, Q_{bul})(C^{sat} - C)V - k_s \mu_1 XV \quad (\text{éq 6.6})$$

Posons, comme étant le taux de consommation spécifique en oxygène dissous des cellules :

$$q_{O_2} = k_s \mu_1 \quad (\text{éq 6.7})$$

De plus, par la loi de Henry, il nous est possible de relié la concentration en oxygène dissous à la pression partielle de ce gaz dans le liquide :

$$P_{O_2} = HC \quad (\text{éq 6.8})$$

$$\frac{dP_{O_2}}{dt} = \underbrace{kla_{O_2}(Q_{tot}, Q_{bull})}_{f(t)} (P_{O_2}^{sat} - P_{O_2}) - \underbrace{q_{O_2}HX}_{\tilde{d}} \quad (\text{éq 6.9})$$

Posons les variables de déviations suivantes :

$$\begin{aligned} Q_{tot} &= Q_{tot}^* + \tilde{Q}_{tot} \\ Q_{bull} &= Q_{bull}^* + \tilde{Q}_{bull} \\ P_{O_2} &= P_{O_2}^* + \tilde{P}_{O_2} \end{aligned} \quad (\text{éq 6.10})$$

Linéarisons le bilan de matière en variables de déviation :

$$\frac{d\tilde{P}_{O_2}}{dt} = \left. \frac{\partial f}{\partial Q_{tot}} \right|_* \tilde{Q}_{tot} + \left. \frac{\partial f}{\partial Q_{bull}} \right|_* \tilde{Q}_{bull} + \left. \frac{\partial f}{\partial d} \right|_* \tilde{d} + \left. \frac{\partial f}{\partial P_{O_2}} \right|_* \tilde{P}_{O_2} \quad (\text{éq 6.11})$$

$$\frac{d\tilde{P}_{O_2}}{dt} = \frac{\partial kla}{\partial Q_{tot}} (P_{O_2}^{sat} - P_{O_2}^*) \tilde{Q}_{tot} + \frac{\partial kla}{\partial Q_{bull}} (P_{O_2}^{sat} - P_{O_2}^*) \tilde{Q}_{bull} - \tilde{d} - kla \tilde{P}_{O_2} \quad (\text{éq 6.12})$$

Loi de commande en transormée de Laplace pour Q_{tot}

$$\frac{\tilde{P}_{O_2}}{\tilde{Q}_{tot}} = \frac{\frac{\partial kla}{\partial Q_{tot}} (P_{O_2}^{sat} - P_{O_2}^*)}{\frac{1}{kla} s + 1} \quad (\text{éq 6.13})$$

Loi de commande en transormée de Laplace pour Q_{bull}

$$\frac{\tilde{P}_{O_2}}{\tilde{Q}_{bull}} = \frac{\frac{\partial kla}{\partial Q_{bull}} (P_{O_2}^{sat} - P_{O_2}^*)}{\frac{1}{kla} s + 1} \quad (\text{éq 6.14})$$

Modélisation de la sonde à oxygène dissous par un premier ordre avec retard :

$$T_p \frac{dDO(t)}{dt} + DO(t) = P_{O_2}(t - \tau) \quad (\text{éq 6.15})$$

en transformée de Laplace :

$$\frac{DO}{P_{O_2}} = \frac{e^{s\tau}}{T_p s + 1} \quad (\text{éq 6.16})$$

Lois de commande pour le contrôle de l'oxygène dissous :

$$\frac{DO}{\tilde{Q}_{tot}} = \frac{\frac{\partial kla (P_{O_2}^{sat} - P_{O_2}^*)}{\partial Q_{tot}}}{\frac{1}{kla} s + 1} \frac{e^{s\tau}}{T_p s + 1} \quad (\text{éq 6.17})$$

$$\frac{DO}{\tilde{Q}_{bull}} = \frac{\frac{\partial kla (P_{O_2}^{sat} - P_{O_2}^*)}{\partial Q_{bull}}}{\frac{1}{kla} s + 1} \frac{e^{s\tau}}{T_p s + 1} \quad (\text{éq 6.18})$$

Annexe 7 Réaction de la DO à un pulse en glucose

A7.1 Bilan sur l'oxygène dissous

Bilan de matière :

$$\frac{dVC}{dt} = kla_{O_2}(Q_{tot}, Q_{bul})(C^{sat} - C)V - k_5\mu_1 XV \quad (\text{éq 7.1})$$

Négligeons les quantités d'oxygène dissous perdu par l'entrée et la sortie de liquide :

$$\frac{VdC}{dt} + \frac{CdK}{dK} = kla_{O_2}(Q_{tot}, Q_{bul})(C^{sat} - C)V - k_5\mu_1 XV \quad (\text{éq 7.2})$$

Posons q_{O_2} , comme étant le taux de consommation spécifique en oxygène dissous des cellules :

$$q_{O_2} = k_5\mu_1 \quad (\text{éq 7.3})$$

Et considérons que le taux de consommation du glucose est proportionnel au taux de consommation d'oxygène dissous :

$$q_{O_2} = Y_{\frac{O_2}{S_1}} q_{S_1} \quad (\text{éq 7.4})$$

De plus, par la loi d'Henry, il nous est possible de relier la concentration en oxygène dissous à la pression partielle de ce gaz dans le liquide :

$$P_{O_2} = HC \quad (\text{éq 7.5})$$

$$\frac{dP_{O_2}}{dt} = kla_{O_2}(Q_{tot}, Q_{bul})(P_{O_2}^{sat} - P_{O_2}) - Y_{\frac{O_2}{S_1}} q_{S_1} HX \quad (\text{éq 7.6})$$

Posons les variables de déviation suivantes :

$$P_{O_2} = P_{O_2}^* + \tilde{P}_{O_2} \quad q_{S_1} = q_{S_1}^* + \tilde{q}_{S_1} \quad (\text{éq 7.7})$$

Équation différentielle en transformée de Laplace :

$$\frac{\tilde{P}_{O_2}}{\tilde{q}_{S_1}} = \frac{Y_{O_2} \frac{HX}{s_1} \frac{kla_{O_2}}{s}}{\frac{s}{kla_{O_2}} + 1} \quad (\text{éq 7.8})$$

A7.2 Bilan sur la concentration en glucose

Bilan de matière :

$$\frac{dVS_1}{dt} = -k_2\mu_1 VX - \mu_2 VX + FS_1^{in} \quad (\text{éq 7.9})$$

Négligeons les variations de volume:

$$\frac{VdS_1}{dt} + \frac{S_1 dV}{dV} = -k_2\mu_1 VX - \mu_2 VX + FS_1^{in} \quad (\text{éq 7.10})$$

Posons q_{S_1} , comme étant le taux de consommation total spécifique en glucose des cellules :

$$q_{S_1} = k_2\mu_1 + \mu_2 \quad (\text{éq 7.11})$$

$$\frac{dS_1}{dt} = -q_{S_1} X + \frac{FS_1^{in}}{V} \quad (\text{éq 7.12})$$

Chain rule :

$$\frac{dq_{S_1}}{dt} = \frac{dq_{S_1}}{dS_1} \frac{dS_1}{dt} \Leftrightarrow \frac{dS_1}{dt} = \left(\frac{dq_{S_1}}{dS_1} \right)^{-1} \frac{dq_{S_1}}{dt} \quad (\text{éq 7.13})$$

$$\left(\frac{dq_{S_1}}{dS_1} \right)^{-1} \frac{dq_{S_1}}{dt} = -q_{S_1} X + \frac{FS_1^{in}}{V} \quad (\text{éq 7.14})$$

Posons les variables de déviation suivantes :

$$\begin{aligned} F &= F^* + \tilde{F} \\ q_{S_1} &= q^*_{S_1} + \tilde{q}_{S_1} \end{aligned} \quad (\text{éq 7.15})$$

Équation différentielle en transformée de Laplace :

$$\frac{\tilde{q}_{S_1}}{\tilde{F}} = \frac{\frac{S_1^m}{VX}}{\left(X \frac{dq_{S_1}}{dS_1} \right)^{-1} s + 1} \quad (\text{éq 7.16})$$