

Titre: Développement d'un bioréacteur de petite échelle pour des mesures de RMN in vivo
Title: measures de RMN in vivo

Auteur: Dorra Gmati
Author:

Date: 2004

Type: Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

Référence: Gmati, D. (2004). Développement d'un bioréacteur de petite échelle pour des mesures de RMN in vivo [Master's thesis, École Polytechnique de Montréal].
Citation: PolyPublie. <https://publications.polymtl.ca/7252/>

Document en libre accès dans PolyPublie

Open Access document in PolyPublie

URL de PolyPublie: <https://publications.polymtl.ca/7252/>
PolyPublie URL:

Directeurs de recherche: Mario Jolicoeur
Advisors:

Programme: Unspecified
Program:

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

DÉVELOPPEMENT D'UN BIORÉACTEUR DE PETITE ÉCHELLE POUR DES
MESURES DE RMN *IN VIVO*

DORRA GMATI

DÉPARTEMENT DE GÉNIE CHIMIQUE
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

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

JANVIER 2004



National Library
of Canada

Acquisitions and
Bibliographic Services

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque nationale
du Canada

Acquisitions et
services bibliographiques

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file *Votre référence*

ISBN: 0-612-89204-2

Our file *Notre référence*

ISBN: 0-612-89204-2

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.

Canadä

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé :

DÉVELOPPEMENT D'UN BIORÉACTEUR DE PETITE ÉCHELLE POUR DES
MESURES DE RMN *IN VIVO*

présenté par : GMATI Dorra

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

M. PERRIER Michel, Ph.D., président

M. JOLICOEUR Mario, Ph.D., membre et directeur de recherche

M. CARREAU Pierre, Ph.D., membre

À Alia, Inès et Rim...

Remerciements

Je tiens à remercier mon directeur de recherche, Mario Jolicoeur, pour m'avoir acceptée dans son équipe et pour m'avoir encadrée tout au long de ma maîtrise. Je remercie le professeur Jamal Chaouki, le professeur François Bertrand ainsi que Pierre Sauriol pour leur précieuse aide.

Je remercie tous mes collègues pour la très bonne ambiance de laboratoire dans laquelle nous avons travaillé. Merci à Jingkui Chen pour le travail qu'il a fait en RMN et pour sa bonne humeur et sa gentillesse.

Je me dois finalement de remercier ma famille et mes amis, particulièrement Marie-Christine Locas, qui m'ont soutenue tout au long de ce projet. Je tiens particulièrement à remercier Alexandre Boullay d'avoir été à mes côtés et sans qui je n'aurais jamais eu la volonté de continuer.

Résumé

Ce travail s'inscrit parmi les travaux de culture de cellules de plantes de l'unité de recherche Bio-P² et représente une des bases d'une nouvelle chaire de recherche du Canada en développement d'outils de génie métabolique. L'objectif principal de ce projet de maîtrise était de développer et de caractériser un bioréacteur de faible volume visant à effectuer des mesures non invasives, telles que des lectures de résonance magnétique nucléaire (RMN) *in-vivo*. Le bioréacteur développé est construit à partir d'un tube pour une sonde de RMN de 10 mm de diamètre. En se basant sur la littérature, un système de bioréacteur en perfusion est conçu. Des cellules d'*Eschscholtzia californica*, Pavot de Californie, sont choisies comme modèle pour les cultures en bioréacteur.

Dans la sonde de RMN, l'échantillon cellulaire à l'étude doit être dense et homogène et les cellules doivent être dans un état physiologique stable pour toute la durée des mesures *in-vivo*, ce qui peut requérir plusieurs heures. La suspension cellulaire est cultivée sous forme de lit compact de cellules de 2,5 cm de hauteur; ceci pour obtenir une densité cellulaire maximale et permettre une meilleure lecture en RMN en terme de ratio signal à bruit. De plus, de récents travaux effectués au laboratoire démontrent que l'oxygène dissous doit être au-delà de 50 % de la saturation en air pour que l'état physiologique des cellules (la consommation spécifique des cellules) soit stable. En se

basant sur ces données, les débits de perfusion minimaux sont calculés pour des cellules à différents stades de la croissance: la phase de latence (cellules de 1 jour post-inoculation), la phase exponentielle (cellules de 5 jours) et la phase stationnaire (cellules de 10 jours). Les débits minimums calculés sont de 0,8 mL/min pour les cellules en phase stationnaire, de 1,6 mL/min pour les cellules en phase de latence et de 2,6 mL/min pour les cellules en phase exponentielle.

La caractérisation du bioréacteur se fait en deux étapes. La première est de s'assurer de l'homogénéité de l'échantillon cellulaire dans le tube de RMN. D'abord, une modélisation de l'hydrodynamique dans le lit de cellules est effectuée. Le modèle appliqué est la dispersion axiale. Des tests de traçage sont réalisés avec du NaCl 1 M. Les expériences de traçage sont effectuées en triplicat pour des cellules à différents stades de croissance et à différents débits de perfusion minimaux. Les nombres de Peclet obtenus pour les essais varient de 0,0014 à 0,0336. Ce qui indique une dispersion élevée. Le mélange dans le lit cellulaire est adéquat.

Ensuite, l'homogénéité du lit cellulaire est vérifiée en effectuant une simulation portant sur le bilan de matière du phosphate inorganique dans le lit compact. Les résultats de la simulation montrent un profil plat de la concentration du Pi extracellulaire selon la position dans le lit de cellules. Ce qui indique que le lit cellulaire est parfaitement bien mélangé.

La deuxième étape est de s'assurer de la viabilité des cellules. D'abord, des cultures en perfusion sont effectuées dans le bioréacteur de RMN en faisant un suivi de l'oxygène dissous durant une période de 4 heures. Cette étude permet, en premier lieu, de vérifier la disponibilité de l'oxygène dissous pour les cellules et, en second lieu, de s'assurer de la stabilité de l'état physiologique des cellules sur la période prévue pour les mesures en RMN. Les résultats ont permis de conclure en une disponibilité suffisante de l'oxygène.

Ensuite un test de viabilité est fait. Celui-ci est effectué sur des cultures issues dans le bioréacteur en perfusion pour une période de 4 h. Le test de viabilité est un test enzymatique visant à déterminer l'activité des enzymes estérases libérées dans le milieu de culture avant et après la culture en bioréacteur. Les enzymes estérases présentes dans l'échantillon provoquent le clivage de la fluorescéine di-acétate (incolore) en fluorescéine libre (composé jaune fluorescent). La concentration en fluorescéine est déterminée en mesurant l'absorbance à 490 nm. Les résultats obtenus démontrent que les cellules ne subissent pas de lyse significative durant la culture dans le système de RMN.

Pour terminer, des essais en RMN *in vivo* sont effectués par mon collègue Jingkui Chen (étudiant M.Sc.A.) avec le système de perfusion développé. Les résultats obtenus confirment que le système développé maintient la stabilité physiologique des cellules et

l'homogénéité du lit cellulaire et qu'il est possible d'observer diverses formes de Pi intracellulaires.

Abstract

This work is part of the plant cells research group of Bio-P². The primary objective of this research is to develop and characterize a low volume bioreactor in order to perform non invasive measurements, such as in vivo nuclear magnetic resonance (NMR) assays. The developed bioreactor is made for a 10 mm diameter NMR probe. Based on literature, a perfused bioreactor system is developed. *Eschscholtzia californica* cells are chosen as a cell model.

In the NMR probe, the sample has to be homogenous and the cells have to be in a stable physiological state. The oxygen uptake rate become DO (oxygen dissolved concentration) dependent below 50 % of air saturation for the *E. californica* cells we used. The DO must be higher than 50% of the air saturation to get a stable physiological state. Based on that, the minimum perfusion flow rate is established for cells at different ages. The minimum perfusion flow rates vary between 0,8 mL/min (stationary phase: between 7 and 10 days), 1,6 mL/min (latence phase: between 1 and 2 days) and 2,6 mL/min (exponential phase: between 3 and 7 days).

The cell bed has to be homogenous. The hydrodynamic modelisation is done to study the homogeneity of the cell bed. The axial dispersion model was chosen. All the tests are done on different cells at different stage of growth and with different flow rates (0,8 mL/min, 1,6 mL/min and 2,6 mL/min). All the tests are done in triplicate. The Peclet

numbers obtained vary between 0,0014 à 0,0336. This dispersion coefficient means a rapid spreading in the cell bed.

Mass balance on intracellular Pi was developed to simulate Pi uptake by the cells and evaluate the homogeneity of the cell bed. From the results suggesting perfectly mixed conditions into the cell bed, we obtain a simulation showing homogenous conditions along the cell bed for a culture time of 4h, which is the duration of an expected experiment in NMR. The simulation also suggests that all the cells may be at a similar physiological state, which is one of the major constraints in selecting or designing a high-throughput bioreactor.

The oxygen studies also show that the oxygen is sufficient and the physiological state of the cells is stable. A viability study was evaluated by comparing the esterase activity of the culture medium before and after a 4 hours culture in the bioreactor. Culture conditions in the bioreactor did not favor cell lysis or loss in cell integrity since no significant release of intracellular esterases was measured in the used culture media. The high – throughput bioreactor developed is adequate for the in vivo NMR study with plant cells suspension.

Table des matières

DÉDICACE	IV
REMERCIEMENTS.....	V
RÉSUMÉ.....	VI
ABSTRACT	X
LISTE DES TABLEAUX.....	XV
LISTE DES FIGURES.....	XVI
LISTE DES ANNEXES	XX
NOMENCLATURE.....	XXI
CHAPITRE 1.....	1
1 INTRODUCTION.....	1
1.1 Problématique.....	3
1.2 Objectifs de recherche	5
2 REVUE DE LA LITTÉRATURE	6
2.1 Nutrition des cellules de plantes.....	8
2.1.1 Le phosphate	8
2.1.2. L'azote.....	9
2.1.3 Les glucides.....	9
2.1.4 Transport des nutriments	10
2.2 La RMN : un outil d'analyse de phénomènes biologiques	11
2.2.1 Analyses <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i>	14
2.2.2 Utilisation de la RMN <i>in vivo</i>	15
2.3 Modélisation de l'hydrodynamique	17

2.3.1 La fonction de distribution du temps de séjour	17
2.3.2 Méthodes expérimentales pour déterminer les DTS	18
2.3.3 L'intégrale de convolution	22
2.3.4 Modèle de dispersion	23
2.3.5. Modèle de réacteurs en série	27
3 DEVELOPMENT OF A HIGH-THROUGHPUT BIOREACTOR: APPLICATION TO IN VIVO NMR MEASUREMENT.....	29
3.1 Abstract.....	31
3.2 Key Words	32
3.3 Introduction.....	32
3.4 Material and Methods.....	36
3.4.1 Biological Material.....	36
3.4.2 Description of the Bioreactor System	36
3.4.3 Oxygen Consumption Study in the Bioreactor	39
3.4.4 Residence Time Distribution Measurement.....	39
3.4.5 Cell Integrity Test.....	40
3.4.6 Determination of the Cell Bed Porosity	41
3.4.7 ^{31}P -NMR Measurements	41
3.4.8 Computational Methods	42
3.5 Establishing the Bioreactor Capacity for Cell Culture.....	43
3.5.1 Modeling of the Hydrodynamic within the Cell Bed	43
3.5.2 Modeling of Extra and Intracellular Nutrient Concentrations with Time along the Cell Bed.....	45
3.5.3 Operating Conditions Supporting Cells Oxygen Demand	48
3.6 Results and Discussion.....	50
3.6.1 The Bioreactor can Maintain Cell Viability.....	50
3.6.2 The Bioreactor Allows for Perfectly Mixed Conditions within the Cell Bed...56	56
3.6.3 The Cell Bed is Homogenous in Extra and Intracellular Nutrient Profile with Time	58
3.6.4 The perfused bioreactor allows for <i>in vivo</i> ^{31}P NMR Spectroscopy	61
3.7 Conclusion.....	66
3.8 Acknowledgements.....	67
3.9 References	67

4 CONCLUSION	73
ANNEXES.....	85

Liste des tableaux

Tableau A.1: Composition du milieu B5	86
Tableau A.2: Débit minimal de perfusion pour chaque jour de culture, les valeurs de qO ₂ sont tirés de Lamboursain et al. (2002)	88
Tableau A.3: Volume de suspension cellulaire introduit dans la sonde de RMN pour former un lit cellulaire de 2 cm en fonction de l'âge de la suspension cellulaire ..	88
Tableau A 4: Tableaux des coefficients de dispersion axiale	97
Tableau A.5: Nombre de Peclet et vitesse superficielle U.....	100

Liste des figures

Figure 2.1: Concentration du traceur en fonction du temps suite à une injection type impulsion. (A) Injection type impulsion. (B) Réponse à l'injection à la sortie du réacteur.....	19
Figure 2.2: Concentration du traceur en fonction du temps suite à une injection de type échelon. (A) Injection échelon. (B) Réponse à l'injection à la sortie du réacteur.....	21
Figure 2.3: Illustration des signaux d'entrée et de sortie du traceur dans le réacteur...	22
Figure 3.1: The perfused bioreactor system used for in vivo NMR.	
(a) Complete bioreactor system.	
(b) Detailed outline of the NMR tube modified as a bioreactor.....	38
Figure 3.2: Bioreactor outlet dissolved oxygen concentration with <i>Eschscholtzia californica</i> plant cell bed and a medium perfusion rate of 1,6 mL/min.	
(a) 1d-old cells at lag phase. (b) 5d-old cells at exponential growth.	
(c) 6d-old cells at late exponential growth. (d)-10d old cells at stationary growth. Cells were obtained from shake flask culture as described in Material and Methods.	51
Figure 3.3: Specific oxygen consumption rate for <i>Eschscholtzia californica</i> plant cell at a medium perfusion rate of 1,6 mL/min. Data points were calculated from an oxygen mass balance around the bioreactor for the dissolved oxygen	

data shown in Figure 3.2.

(a) 1d-old cells. (b) 5d-old cells. (c) 6d-old cells. (d) 10d-old cells..... 53

Figure 3.4: Esterase activity in used media from the perfused bioreactor. The cell samples culture time correspond to the culture time in shake flask. Empty bar: Medium at time zero. Solid bar: Medium at the end of the culture in the bioreactor. Hatched bar: Medium with 100% lysed cells. Error bars represent the standards deviation for the dispersion coefficient ($n = 3$)..... 55

Figure 3.5: Axial dispersion coefficient (D) with culture time in the bioreactor and different perfusion rates. (□) 0,8 mL/min, (○) 1,6 mL/min and (△) 2,6 mL/min. (a) 1d-old cells. (b) 5d-old cells. (c) 10d-old cells. Error bars represent the standards deviation of the dispersion coefficient. ($n = 3$)..... 57

Figure 3.6: Simulated intracellular (a) and extracelllular (b) Pi concentration with axial position into the cell bed. A perfusion rate of 1,6 mL/min and a D of 1,2 m/s^2 were used..... 60

Figure 3.7: In vivo ^{31}P NMR cumulative spectra with time for 4h old *Eschscholtzia californica* cells cultured in shake flasks. 10d old cells were placed into fresh B5-F medium for 4h prior to the experiment. ^{31}P NMR spectra were recorded at 500, 1500, 3000, and 5000 scans, corresponding to acquisition times of 10min, 30min, 60min and 100min, respectively. a: G-6P; b: F-6P; c: Cytoplasmic Pi; d: Vacuole Pi; e: ADP β +ATP γ ; f: ATP α +ADP α ; g: NADP+NDPG; h: NDPG; i: ATP β . 2M methanephosphonic acid solution was

used as an external concentration standard, sealed in a capillary and put at the centre of the NMR tube into the medium outlet tube within the cell bed region... 62

Figure 3.8: ^{31}P NMR chemical shift with pH for B5-F and intracellular-like synthetic media. (■) 90mL of B5 medium free of paramagnetic elements (B5-F), 10mL D_2O , glucose 1,50g and 0,50g KH_2PO_4 . (★) Intracellular-like synthetic media I containing: 0,124g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1ml 10mMKCl, 1mL 0,1M KH_2PO_4 and 10mL D_2O , adjusted to 100 ml with pure water. (\triangle) Intracellular-like synthetic medium II containing: 0,124g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2ml 10mMKCl, 1mL 0,1M KH_2PO_4 and 10mL D_2O , adjusted to 100 ml with deionized water. The different pH solutions were adjusted using 1M HCl and 1M NaOH..... 63

Figure 3.9: In vivo ^{31}P NMR spectra with culture time for *Eschscholtzia californica* cells cultured in shake flasks. a: G-6P; b: F-6P; c: Cytoplasmic Pi; d: Vacuole Pi; e: $\text{ADP}_\beta + \text{ATP}_\gamma$; f: $\text{ATP}_\alpha + \text{ADP}_\alpha$; g: $\text{NADP} + \text{NDPG}$; h: NDPG ; i: ATP_β . The spectra were acquired with 10000 scans corresponding to the total acquisition time is 200min. 65

Figure A. 1: Courbe de croissance d'*Eschscholtzia californica*..... 85

Figure A.2: Photographie des agrégats de cellules (*E. Californica*) sur une culture âgée de 2 jours. Contraste de phase 1, 40 X..... 87

Figure A.3: Courbes de calibration de la sonde d'oxygène (échelle de 6.5):
 (a) 100% d'air correspond à une lecture de la sonde de 6.0.
 (b) 0% d'air (100% azote) correspond à une lecture de la sonde de 3.3 91

Figure A 4: Suivi de l'oxygène dissous dans le lit cellulaire formé de cellules âgées de 2 jours et un avec un débit de perfusion de 1,6 mL/min	92
Figure A.5: Suivi de l'oxygène dissous dans le lit cellulaire formé de cellules âgées de 3 jours et un avec un débit de perfusion de 2,6 mL/min	92
Figure A.6: Suivi de l'oxygène dissous dans le lit cellulaire formé de cellules âgées de 4 jours et un avec un débit de perfusion de 2,6 mL/min	93
Figure A.7: Suivi de l'oxygène dissous dans le lit cellulaire formé de cellules âgées de 7 jours et un avec un débit de perfusion de 1,6 mL/min	93
Figure A.8: Suivi de l'oxygène dissous dans le lit cellulaire formé de cellules âgées de 8 jours et avec un débit de perfusion de 0,8 mL/min	94
Figure A.9: Suivi de l'oxygène dissous dans le lit cellulaire formé de cellules âgées de 9 jours et avec un débit de perfusion de 0,8 mL/min	94
Figure A.10: Schémas du montage expérimental du test d'injection saline	95
Figure A.11: Exemples des signaux obtenus suite à une impulsions saline dans le lit cellulaire.....	96
Figure B.1: Discrétisation du domaine.....	105

Liste des annexes

ANNEXE A. RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX	85
A.1 Culture des cellules.....	85
A.3 Résultats de la modélisation hydrodynamique: Dispersion axiale	95
ANNEXE B. RÉSOLUTION DU BILAN DE MATIÈRE SUR LE PHOSPHATE EXTRA- ET INTRA-CELLULAIRE PAR LA MÉTHODE DES ÉLÉMENTS FINIS	101
B.1 Exposition du problème	101
B.2 Résolution du problème par la méthode des éléments finis.....	104
ANNEXE C. MODÉLISATION HYDRODYNAMIQUE DU LIT CELLULAIRE	113
ANNEXE D. PROGRAMMES INFORMATIQUES	118
D.1 Programme pour la résolution du modèle hydrodynamique	118
D.2 Programme pour la résolution du bilan sur le phosphate.....	121

Nomenclature

B_0	Champ magnétique
C_{in}	Concentration du traceur à l'entrée du lit cellulaire (M)
C_{out}	Concentration du traceur à la sortie du lit cellulaire (M)
C_t	Concentration du traceur (M)
D	Coefficient de concentration ($m^2 s^{-1}$)
DO	Concentration de l'oxygène dissous (% de la saturation en air)
ΔE	Niveau d'énergie
γ	Rapport gyromagnétique
h	Constante de Planck
I	Spin
K_{Pi_HA}	Constante de transport à haute affinité du phosphate (0.005 mM) Jolicoeur et al. (2002)
K_{Pi_LA}	Constante de transport à basse affinité du phosphate (0.5 mM) Jolicoeur et al. (2002)
l	Longueur du lit cellulaire (cm)
mu	moment magnétique
μ	Taux de croissance cellulaire spécifique (0.14 d^{-1}) (résultats de laboratoire non publiés)
OTR	Taux de transfert de l'oxygène ($\text{mmol O}_2 \text{h}^{-1}$)
OUR	Taux de consommation de l'oxygène ($\text{mmol O}_2 \cdot \text{h}^{-1}$)

Pe	Nombre de Peclét
Pi _{intra}	Concentration du phosphate inorganique intracellulaire (mmol/gDW)
Pi _{extra}	Concentration du phosphate inorganique extracellulaire (mmol/L)
Q	Débit de perfusion ($m^3 s^{-1}$)
RMN	Résonnance magnétique nucléaire
RTD	Distribution du temps de résidence
ρ	Porosité du lit cellulaire
S	Surface de la section du tube de RMN (m^2)
V _{cell bed}	Volume du lit cellulaire (L)
v	Fréquence de résonance
v _{max_HA_Pi}	Taux de transport maximum à haute affinité du Pi (0.001 mmol/gDW/d) Jolicoeur et al. (2002)
v _{max_LA_Pi}	Taux de transport maximum à basse affinité du Pi (0.8 mmol/gDW/d) Jolicoeur et al. (2002)
X	Biomasse (gDW)
Y _{X/P}	Rendement de la biomasse sur le phosphate (12 gDW/mmol Pi) (résultats de laboratoire non publiés)

Chapitre 1

1 Introduction

Les plantes constituent une source majeure de produits d'intérêt pharmaceutique.

Plusieurs substances végétales ayant un potentiel médical important sont des métabolites secondaires, soit des molécules produites par les plantes pour se défendre contre diverses agressions. Par exemple, un alcaloïde tel que la sanguinarine est un antibactérien utilisé pour ses effets anti-inflammatoires sur les gencives. Plusieurs plantes produisent cette molécule, le pavot de Californie en est une qui nous intéresse particulièrement dans cette étude.

Les alcaloïdes sont présents en concentrations très faibles chez certaines espèces végétales. Souvent ces plantes sont exotiques et vivent dans des environnements fragiles. La récolte à grande échelle devient difficilement réalisable. La voie de production par synthèse chimique de métabolites secondaires ne peut constituer une solution pour leur production massive. Malheureusement, cette voie est coûteuse car elle requiert plusieurs dizaines d'étapes de synthèse et souvent les molécules synthétisées chimiquement sont instables. La culture des cellules de plante en bioréacteurs représente donc une alternative pour la production d'alcaloïdes. Cette

approche *in vitro* permet d'obtenir la molécule recherchée dans un volume restreint et dans un environnement contrôlé, facilitant le potentiel de validation par divers organismes de régulation tel que la FDA. Le problème cependant est que le rendement de productions de ces métabolites est faible. L'optimisation du procédé de production est requise pour atteindre une rentabilité commerciale. Plusieurs méthodes sont alors à considérer. L'amélioration des taux naturels de production par sélection des lignées et par le contrôle des cultures, l'optimisation des taux de croissances, la sélection d'une agitation douce car les cellules végétales sont sensible au cisaillement (Jolicoeur et al. 1992). Au niveau biologique, des problèmes importants demeurent sur la sélection et le maintien de lignées cellulaires stables. De nombreuses inconnues concernant le mécanisme de croissance et de production cellulaire persiste. Pour comprendre le métabolisme cellulaire il faut avoir des données permettant en premier lieu de déterminer les flux de nutriments entre le milieu de culture et la cellule, et en second lieu, de déterminer la concentration des nutriments intra et extracellulaires. Les cellules de plantes ont la capacité de stocker les nutriments dans divers vacuoles, expliquant pourquoi la détermination des concentrations en nutriments intra et extracellulaire est importante. La détermination des concentrations intra et extracellulaire peut être effectuée par des extractions compartimentales (difficiles à réaliser) ou par un outil analytique capable d'analyser les données sur des cellules vivantes.

Il existe un besoin pour le développement d'un système de bioréacteur à petite échelle qui permet d'effectuer des mesures non invasives sur des cellules en culture. Les

contraintes pour designer ou pour choisir un tel bioréacteur sont nombreuses. Les cultures cellulaires à petite échelle doivent fournir aux cellules la même qualité d'environnement qu'une culture à grande échelle. Les essais *in vivo* actuels sont réalisés avec de l'équipement analytique hautement sophistiqué, tel que des sondes optiques for UV, IR, microscope *in situ* (Ulber et al., 2003) et la spectroscopie à résonance magnétique nucléaire (RMN) *in vivo* (Castro et al., 1999). Les bioréacteurs à petite échelle présentés dans la littérature peuvent être classifiés d'après les mesures non invasives utilisées. Dans cette étude, l'objectif est de développer un design d'un bioréacteur permettant la conduite de mesures de RMN *in vivo*.

1.1 Problématique

L'utilisation de la RMN *in vivo* afin d'étudier la concentration des composés intracellulaires sur les cellules de *Eschscholtzia californica* vivantes, nécessite le maintien des cellules dans des conditions stables de survie. Pour utiliser cet outil, on se heurte à plusieurs problèmes. D'abord, le temps d'acquisition pour la RMN *in vivo* peut être très long car les cellules sont faiblement concentrées en composés mesurés. Pour y remédier, on doit maximiser la densité cellulaire. Pour une suspension cellulaire, le meilleur moyen d'obtenir une haute densité cellulaire est de créer un lit cellulaire compact à partir de l'échantillon en suspension. Or, une haute densité cellulaire crée des problèmes quant à l'alimentation des cellules en nutriments et en oxygène, à l'évacuation des déchets toxiques de la cellule et à la sédimentation.

cellulaire. En effet, les cultures de cellules végétales forment des agrégats (Figure A.2.) qui peuvent mesurer plusieurs millimètres de diamètre, ce qui favorise leur sédimentation rapide. Pour maintenir vivantes les cellules végétales à haute densité, il faudra donc un mélange efficace menant à des conditions environnementales homogènes.

Un mélange conventionnel à l'aide d'agitateur n'est pas facile à effectuer dans une sonde de RMN étant donné ses petites dimensions ainsi que l'obligation de libérer le volume de lecture de l'appareil. Les cellules végétales sont très sensibles au cisaillement à cause de leur paroi cellulaire rigide, de leur large vacuole et de leur grande taille (Scragg, 1995). L'emploi d'agitateur peut donc cisailier les cellules de plantes et perturber le champ magnétique, ce qui n'est pas souhaitable pour une lecture en RMN.

La littérature propose un système de bioréacteur en perfusion. Inspirés par les travaux de Roby et al., Aubert et al. ont conçu un système permettant de confiner la suspension cellulaire entre deux plaques perforées et de garder ainsi les cellules dans la zone de lecture de la RMN avec une haute densité. Cependant, aucune caractérisation du mélange dans le lit cellulaire n'a été effectuée et la stabilité de l'état physiologique des cellules n'a pas été démontrée.

1.2 Objectifs de recherche

L'objectif principal de ces travaux de maîtrise est de développer un système bioréacteur pour des cellules végétales, *Eschscholtzia californica*, à partir d'un tube de RMN de 10 mm, pour effectuer des lectures *in vivo* non-invasive. Le système recommandé par la littérature est la culture en perfusion. Le deuxième objectif est de caractériser le système bioréacteur perfusé développé. Dans un premier temps, la caractérisation de l'écoulement dans le lit cellulaire sera effectuée afin de connaître le degré du mélange dans ce dernier. Un modèle d'écoulement dispersif est utilisé. Ensuite, un bilan de matière sur un nutriment, le phosphate inorganique, est établi pour s'assurer de l'homogénéité de l'échantillon à l'étude.

Un troisième objectif consiste en la validation du système de bioréacteur avec des cellules de *E. californica* à titre de cellules modèles. D'abord, un suivi de l'évolution de la concentration en oxygène dissous du milieu nutritif pour différents débits de perfusion est effectué, le but étant de vérifier la disponibilité de l'oxygène dans le lit compact de cellules. Par la suite, un test d'intégrité cellulaire est effectué pour vérifier qu'il n'y a pas eu de cisaillement au cours de la formation du lit compacte ou durant la culture en perfusion. Pour terminer, une mesure en RMN valide le système. Des mesures ^{31}P -RMN sur les cellules de pavot de Californie sont utilisées dans ce travail.

Chapitre 2

2 Revue de la littérature

La recherche de nouvelles thérapies implique la disponibilité de plusieurs composés pouvant être exploités pour leur activité chimique ou biologique. Ces molécules peuvent être fournies par la synthèse chimique ou par la biodiversité chimique naturelle. Une fois l'activité de celles-ci connue, on peut l'appliquer au développement d'un médicament. Souvent, les molécules synthétisées en laboratoire pour avoir une activité chimique spécifique sont instables et il est souvent préférable d'extraire la molécule d'intérêts de la nature.

En 1988, la base de donnée NAPRALERT répertoriait quatre-vingt-huit mille métabolites secondaires. Depuis, environ quatre mille nouveaux sont rapportés chaque année (Verpoorte, 1998). Ces composés ayant un rôle médical sont généralement le résultat de l'interaction des espèces les unes avec les autres dans le sol ou dans l'environnement des plantes. Les champignons se défendent des bactéries à coup d'antibiotiques, les plantes produisent des métabolites secondaires pour interagir avec leur environnement. Les plantes sont une source importante de métabolites secondaires ayant des propriétés antibiotiques, insecticides, mollusquicides, hormonales et plusieurs autres toutes ayant un rôle pharmacologique important pour l'homme. Par exemple,

Eschscholtzia californica produit de la Sanguinarine, qui est un antibiotique, lorsqu'elle interagit avec son environnement.

La récupération de ces métabolites secondaires de plantes représente une difficulté que la science tente de surmonter. La culture des cellules végétales *in vitro* devient une solution lorsque la plante source est difficile à cultiver. Cependant, un autre problème se présente : le faible rendement des produits. L'augmentation de la productivité peut se faire en optimisant le taux de croissance cellulaire, la concentration cellulaire et le rendement des métabolites secondaire. À ce stade, la connaissance du métabolisme cellulaire est cruciale pour augmenter la productivité de la cellule.

L'étude du métabolisme cellulaire doit être soutenue par des analyses permettant dans un premier lieu de déterminer les flux de nutriments entre la cellule et le milieu ainsi que la concentration des nutriments dans différents compartiments de la cellule et dans un second lieu, de déterminer la concentration des nutriments dans le milieu de culture. Les cellules de plantes ont la capacité de stocker les nutriments dans des vacuoles (Plaxton, 1998; Yu, 1999; Schachtman et al., 1998), c'est pourquoi la détermination de la concentration des nutriments intra et extracellulaire est importante. Ces tests sont effectués par la spectroscopie à résonance nucléaire magnétique sur des cellules vivantes et des extraits cellulaires respectivement. La section 2.1 décrit le principe de la RMN ainsi que les outils développés pour effectuer des tests de RMN *in vivo*.

2.1 Nutrition des cellules de plantes

Les cellules de plantes sont des eucaryotes ayant une paroi cellulaire rigide. La cellule est composée principalement de lipides et de phospholipides qui constituent les membranes de différents compartiments cellulaires. L'ensemble des constituants cellulaires est constitué d'atomes de carbone (45%), d'oxygène (45%), d'hydrogène (6%), d'azote (1.5%), de potassium (1%), de calcium (0.5%), de magnésium (0.2%), de phosphate (0.2%), de soufre (0.1%) et de silicium (0.1%) (Epstein, 1972 cité par Tikhomiroff, 2001). D'autres éléments entrent dans la composition des cellules mais sont en très faible concentration. Dans notre laboratoire, l'influence de trois nutriments (le phosphate, l'azote et le saccharose) sur l'état physiologique des cellules de plantes est particulièrement étudiée (Jolicoeur et al., 2002). La cellule de plante contient plusieurs compartiments comme la vacuole qui joue un rôle important dans la gestion des nutriments et des métabolismes primaires et secondaires.

2.1.1 Le phosphate

Le phosphate est utilisé par la cellule sous forme de phosphate inorganique (Pi) essentiellement. Le phosphate joue un rôle structural et énergétique. Il constitue plusieurs molécules tels que les phospholipides, les acides nucléiques etc. De plus, le phosphate contenu dans l'ATP et le GTP fourni à la cellule des molécules extrêmement riches en énergie. Le Pi sert à réguler l'activité des protéines par leur phosphorylation

et leur déphosphorylation. Le phosphate est disponible en très faible concentration dans le sol (Schachtman et al. 1998), les plantes doivent stocker le phosphate dans leur vacuole pour continuer à croître lorsqu'elles n'en trouvent plus dans leur environnement. Pour que le métabolisme fonctionne normalement, la concentration cytoplasmique du Pi doit rester stable. C'est la concentration vacuolaire qui varie en servant de réservoir tampon.

2.1.2. L'azote

L'azote est le nutriment le plus consommé par les plantes. Dans la plupart des cas, il constitue avec le phosphate le nutriment limitant face à la croissance des cellules. L'azote est essentiel pour les cellules pour former plusieurs molécules tel que les acides aminés, les acides nucléiques, les protéines etc. Les plantes sont capables de se servir du nitrate (NO_3^-), de l'ammonium (NH_4^+) et du diazote (N_2) comme source d'azote. Pour utiliser le nitrate, la cellule doit le réduire en nitrite et ensuite en ammonium. La plupart du nitrate intracellulaire est stocké dans les vacuoles (Kharitonashvili *et al.*, 1997).

2.1.3 Les glucides

Le carbone est l'élément majeur constituant les macromolécules, l'ADN, l'ARN et d'autres constituants de la cellule. Il représente un intermédiaire crucial pour le

métabolisme respiratoire. Le saccharose est le glucide que l'on retrouve dans une plante entière sous forme stockée suite à la photosynthèse. Il est constitué d'une molécule de glucose et de fructose. Dans la cellule, le fructose et le glucose sont rapidement phosphorylés pour rentrer dans la glycolyse et la voie des pentoses phosphate. Ainsi, le métabolisme du saccharose est intimement lié à la disponibilité du Pi dans le cytosol. Le carbone est essentiel pour la croissance cellulaire. L'épuisement de la source de carbone peut entraîner plusieurs réponses cellulaires, incluant l'inhibition de la croissance et un changement dans la dynamique du stockage des autres nutriments (Yu, 1999).

2.1.4 Transport des nutriments

Les nutriments sont transportés dans la cellule selon plusieurs mécanismes. Le plus simple est la diffusion passive où les molécules diffusent à travers la membrane selon le gradient de concentration. D'autres molécules sont hydrophiles et passent difficilement la membrane plasmique. La membrane plasmique dispose de canaux protéiques pour ce type de molécules. La vitesse de leur transport, V, est gouvernée par une loi de type Monod :

$$V = V_m \frac{S}{S + K_m} \quad (\text{éq 2.1})$$

où V_m est la vitesse maximale enzymatique et K_m , l'affinité de l'enzyme (protéine transporteuse) pour le substrat.

Enfin, beaucoup de nutriments doivent être assimilés par la plante dans le sens contraire du gradient. La cellule dispose de systèmes de transport actif dans lesquels un apport d'énergie est nécessaire pour transporter une molécule contre le gradient électrochimique. Cette énergie est fournie par l'hydrolyse de l'ATP ou par l'utilisation de co-transporteurs qui utilisent le gradient électrochimique d'une autre espèce chimique en contre poids. Le phosphate qui doit passer du milieu extérieur vers le cytosol utilise des co-transporteurs en symport avec l'ion H⁺. Le phosphate a deux transporteurs, un transporteur à haute affinité ($K_m \approx 0,005$ mM) et un à basse affinité ($K_m = 1-10$ mM). Les valeurs des V_m à haute et basse affinité pour plusieurs espèces sont disponibles dans la littérature (Jolicoeur et al. 2002).

2.2 La RMN : un outil d'analyse de phénomènes biologiques

En 1946, deux groupes de recherche, celui de Bloch et de Purcell ont observé pour la première fois les signaux de résonance magnétique nucléaire (RMN) (Friebolin 1993). Depuis, la RMN est un outil d'analyse indispensable pour les chimistes, les physiciens et les biologistes. Au début, toutes les mesures en RMN étaient en une dimension. Ce qui veut dire que les spectres n'ont qu'un seul axe de fréquence. L'autre axe donne l'intensité du signal. L'application majeure de la RMN est la détermination de la structure des molécules. Par la résonance des atomes, surtout le ¹³C et ¹H, on peut déduire la structure de molécules organiques. Le spectre de RMN est un diagramme représentant des signaux de résonance émis par certains noyaux atomiques présents

dans un échantillon. L'échantillon est soumis à l'action conjointe de deux champs magnétiques. L'un est intense et constant, et est produit par un électro-aimant. L'autre est environ 10000 fois plus faible et variable. Le second est produit par une source de radiations électromagnétiques du domaine des radiofréquences, dont la direction est perpendiculaire au champ produit par l'aimant. Les fréquences présentes dans la source électromagnétique sont absorbées par les atomes de l'échantillon qui entrent en résonance, ce qui conduit aux signaux de RMN. Pour comprendre l'origine des signaux il faut faire appel au spin des noyaux (ou niveaux d'énergie).

La plupart des atomes possèdent certaines caractéristiques intrinsèques tel que le spin I. Ce paramètre vectoriel permet d'expliquer le comportement des atomes dans les milieux où règne une direction privilégiée. Ainsi un atome placé dans un champ magnétique reconnaît comme orientation de l'espace, celle correspondant à ce champ. La norme du spin toujours un multiple positif de $\frac{1}{2}$ (y compris de la valeur 0) dépend du noyau à l'étude (Canet, 1991). Une autre caractéristique des atomes est le moment magnétique, μ , colinéaire à I.

$$\mu = \gamma h I / 2\pi \quad (\text{éq 2.2})$$

où h est la constante de Planck, la constante γ est appelée rapport gyromagnétique et est une caractéristique intrinsèque des atomes (Canet, 1991).

Certains atomes, tel que l'isotope ^{12}C ou le ^{16}O , ont un spin = 0, et par conséquent leur moment magnétique est nul. Ce qui veut dire que les constituants majeurs des composés organiques ne peuvent être observés par la RMN. C'est pourquoi souvent, les

études de RMN seront faites sur le carbone-13, qui est très peu abondant dans la nature mais dont la spectroscopie complémente celle du proton.

Un spin peut être considéré comme une aiguille aimantée dont l'orientation est quelconque sauf si elle est placée dans un champ magnétique B_0 . Elle peut alors s'orienter parallèlement à ce champ (E2) ou antiparallèlement (E1). Deux niveaux d'énergie sont créés dont l'écart d'énergie peut être calculé à partir d'interactions entre le moment et le champ magnétique.

$$\Delta E = \gamma h B_0 / 2\pi \quad (\text{éq 2.3})$$

D'un point de vue analytique, si on peut repérer cette différence d'énergie on peut identifier le noyau correspondant (Rouessac et Rouessac, 1997). Pour évaluer cette différence d'énergie, on provoque le passage de l'un à l'autre des niveaux d'énergie. Il faut exciter les noyaux par un champ magnétique avec une source électromagnétique de fréquence variable dont la direction de propagation est perpendiculaire au champ B_0 . Il y aura absorption si $\Delta E = v h$, où v est la fréquence de résonance. Une des originalités de la RMN est que la fréquence à laquelle a lieu la transition, $v = \gamma B_0 / 2\pi$, appelée fréquence de Larmor, est proportionnelle au champ appliqué B_0 . Dans la partie de l'instrument appelé sonde, l'endroit où l'échantillon est introduit, on provoque la résonance en superposant au champ magnétique B_0 un champ faible B_1 , oscillant. Quand la fréquence de la source et la fréquence de précession sont les mêmes, les conditions sont favorables pour qu'il y ait transfert d'énergie de la source vers les noyaux. Les noyaux dans l'état E1 passent alors à l'état E2. Chaque atome de la molécule reçoit un champ magnétique différent à cause de son environnement

chimique immédiat distinct. Une faible fraction de chaque type de protons capte la fréquence qui provoque leur résonance. Pendant le retour à l'équilibre, l'appareil enregistre un signal complexe, dû à la combinaison des différentes fréquences de résonance présentes, dont l'intensité décroît de façon exponentielle. Ces courbes de décroissances de la fréquence (Decay curves appelées Free Induction Decay, FID) superposées (Friebolin, 1993) ne peuvent pas être analysées, les signaux peuvent être obtenus par une opération mathématique : la transformée de Fourier. Avec cet outil, on ramène les spectres dans le domaine fréquentiel et l'interprétation des signaux devient plus facile.

Suite à l'opération de la transformée de Fourier, l'intensité des courbes de fréquences est faible, et les signaux sont très petits par rapport au bruit. C'est encore plus vrai pour des isotopes peu sensibles et peu abondants dans la nature comme les ^{13}C et ^{15}N . Pour y remédier, il faut additionner les FID ensembles successivement par ordinateur. C'est ce qu'on appelle l'accumulation des spectres. Le temps de l'accumulation des spectres est appelé le temps d'acquisition qui peut prendre plusieurs heures. C'est pourquoi, il est important d'avoir la plus grande densité de l'échantillon possible. Plus la densité de l'échantillon est élevée plus le temps d'acquisition est court.

2.2.1 Analyses *in vivo* et *in vitro*

La plus importante contribution de la RMN aux études métaboliques provient de la spectroscopie *in vivo*. Mais les analyses *in vitro* apportent une meilleure séparation des

spectres et un meilleur ratio signal-bruit car les échantillons sont plus homogènes. Ce qui permet d'identifier et de quantifier facilement les métabolites cellulaires. Il arrive parfois quand les cellules subissent un stress, qu'elles produisent des métabolites secondaires inattendus. Avec la RMN in vitro, il est possible de les distinguer. L'accumulation de ces métabolites peut être analysée par la suite en faisant subir aux cellules le même traitement et de les passer par la suite en RMN in vivo. Ceci permettrait de retracer l'origine de ces métabolites et leurs localisations dans la cellule. C'est ainsi que l'on peut observer et comprendre le métabolisme cellulaire. La RMN in vivo permet cependant de déterminer les concentrations intra cellulaire dans les différents compartiments de la cellule. La quantification des nutriments ou des métabolites cellulaires peut être effectuée aussi par chromatographie en phase liquide de haute performance HPLC (Horvath, 1980) mais seulement sur des extraits cellulaires, et donc sans possibilité facile de mesurer la compartmentation.

2.2.2 Utilisation de la RMN in vivo

Le but de RMN in vivo est d'étudier les réactions chimiques qui ont lieu dans les cellules vivantes et à l'extérieur de façon non invasives. Pour effectuer ce type d'expériences, on se heurte à plusieurs problèmes. Le plus important est que les cellules sont hétérogènes et contiennent plusieurs substances dans des concentrations faibles. Une haute densité cellulaire est nécessaire pour obtenir une sensibilité suffisante pour une étude métabolique en RMN. Or, une haute densité cellulaire

complique la culture de cellules tel que l'alimentation en nutriments, en oxygène, l'évacuation des déchets et la sédimentation cellulaire.

Un système de perfusion offre généralement une bonne solution au problème. La consommation cellulaire en oxygène peut être très rapide, il faut donc que le transfert de matière soit aidé par la convection forcée. De plus, le mélange risque de perturber le champ magnétique, ce qui n'est pas souhaitable pour une bonne lecture en RMN (Rouessac et Rouessac, 1997).

Kramer et Baily (1991) ont introduit des cellules bactériennes dans un bioréacteur qui était opéré comme un air-lift. En bullant de l'oxygène dans le tube central, l'oxygénéation et la convection sont effectuées simultanément. Ce type de bioréacteur a été utilisé à des levures (Fox et al. 1989). Un bioréacteur en perfusion a été développé pour maintenir les racines de *Catharanthus roseus* en vie pendant une période de 3 à 6 semaines (Rijhwani et al. 1999). Durant ce temps, une étude en RMN a été effectuée. L'alimentation du réacteur se fait par un tube central qui atteint le fond du réacteur et la sortie se fait par le haut du réacteur au niveau du milieu de culture. Le réacteur est muni d'un filtre qui aide à maintenir l'échantillon de racines dans la zone de lecture du RMN. Les suspensions cellulaires ont aussi été étudiées dans un bioréacteur en perfusion (Aubert et al. 1996).

Inspiré par les travaux de Roby et al. (1987), Aubert et al. (1996) ont conçu un arrangement permettant de comprimer la suspension cellulaire entre deux plaques

perforées en Teflon et de garder ainsi les cellules dans la zone de lecture de la RMN à une haute densité.

2.3 Modélisation de l'hydrodynamique

Les modèles sont utiles pour représenter l'écoulement dans les réacteurs réels et pour diagnostiquer un faible écoulement. Plusieurs types de modèles sont utilisés, le choix du modèle dépend du type d'écoulement (plutôt piston, parfaitement mélangé ou entre les deux). Les déviations de réacteurs réels face à des réacteurs idéaux sont habituellement causées par l'établissement de chemins préférentiels durant l'écoulement du fluide, par la recirculation du fluide et par la création de volumes morts dans le réacteur. Modéliser l'écoulement dans un réacteur peut se faire sans connaître parfaitement la distribution de la vitesse du fluide dans le réacteur. Il suffit de connaître le temps de séjour des molécules individuellement dans le réacteur, ou plutôt, la distribution du temps de séjour (DTS). Pour décrire le mélange dans un réacteur réel, trois volets doivent être couverts : la distribution du temps de séjour, la qualité du mélange et le modèle utilisé pour décrire le système.

2.3.1 La fonction de distribution du temps de séjour

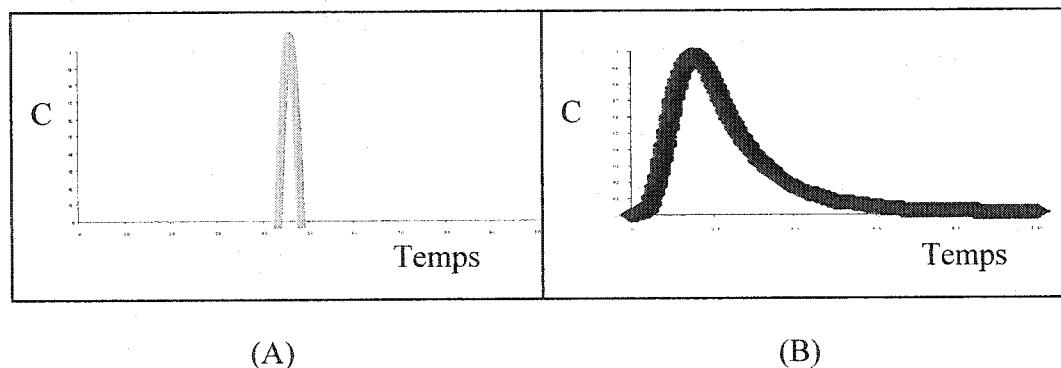
Lors d'un écoulement du fluide à travers un réacteur de volume V, les diverses molécules du fluide séjournent à l'intérieur du volume V pendant des temps qui

dépendent directement de type d'écoulement. Dans un réacteur idéal, parfaitement mélangé ou piston, les molécules quittant le réacteur passent à l'intérieur de celui-ci le même temps. C'est ce qu'on appelle le temps de résidence. Pour tous les autres réacteurs réels, le temps de résidence des molécules change. Certaines molécules entrant dans le réacteur le quittent aussitôt et d'autres ne sortent jamais du réacteur en restant emprisonnées dans des zones mortes. La distribution du temps de séjour est une caractéristique du mélange dans le réacteur. La fonction de distribution du temps de séjour E , est la fonction qui décrit les différents temps que les éléments de fluide ont passé dans le réacteur.

2.3.2 Méthodes expérimentales pour déterminer les DTS

La distribution du temps de résidence est déterminée expérimentalement en injectant un traceur au temps zéro, et en mesurant la concentration du traceur à la sortie du réacteur en fonction du temps. Un traceur doit être un composé chimique mesurable et inerte, ayant des propriétés physiques similaires à celles du fluide à l'étude, et doit être parfaitement soluble dans le fluide. Le traceur ne doit pas être adsorbé sur les parois du réacteur ou des tubes d'alimentations. Souvent les traceurs utilisés sont des colorants, des sels ou des substances radioactives. Les méthodes d'injections les plus utilisées sont l'impulsion et l'échelon.

Lors d'une injection par impulsion une quantité de traceur est introduite d'un seul coup dans le flux d'alimentation du réacteur, très rapidement. La concentration du traceur à la sortie du réacteur est mesurée en fonction du temps. La courbe obtenue est la courbe $C(t)$. La réponse typique à une impulsion pour un réacteur quelconque est montrée à la figure 2.1. Pour déterminer la courbe de la fonction $E(t)$ à partir de la courbe $C(t)$, il faut diviser C_{imp} par l'aire sous la courbe. M est la quantité de traceur injectée et v est le débit d'alimentation au réacteur.



$$E = \frac{C_{imp}}{M/v} = \frac{C_{imp}}{\int_0^{\infty} C_{imp} dt} \quad (\text{éq 2.4})$$

Figure 2.1: Concentration du traceur en fonction du temps suite à une injection type impulsion. (A) Injection type impulsion. (B) Réponse à l'injection à la sortie du réacteur.

L'autre fonction de distribution du temps de séjour est E_θ qui est souvent utilisée pour des modèles comme la dispersion axiale. Pour E_θ , le temps est mesuré en fonction du temps de séjour moyen, θ , de façon à obtenir t/θ . Pour comparer les fonctions DTS, il est très commun de comparer ses moments plutôt que de comparer toute la fonction. Deux moments sont souvent utilisés, le temps de séjour moyen et la variance. Le premier moment de la fonction DTS est définie par l'équation 2.5. On peut noter que la moyenne t_m devrait en principe être égale au temps de séjour moyen $\theta=V/Q$, cependant des anomalies liées aux caractéristiques particulières de l'écoulement conduisent à des valeurs différentes.

$$t_m = \frac{\int_0^\infty t E(t) dt}{\int_0^\infty E(t) dt} \quad (\text{éq 2.5})$$

Le deuxième moment de cette fonction est la variance σ^2 , définie par l'équation 2.6.

$$\sigma^2 = \int (t - t_m)^2 E(t) dt \quad (\text{éq 2.6})$$

Lors d'une injection de type échelon, un taux constant de traceur est ajoutée au flux d'alimentation du réacteur à partir d'un temps zéro. La concentration du traceur dans l'alimentation C_0 , est maintenue à ce niveau jusqu'à ce que la concentration du traceur à la sortie soit égale à celle à l'entrée. Typiquement, la courbe de concentration en réponse à une injection échelon est donnée à la figure 2.2. La fonction $E(t)$ est donnée par l'équation 2.7 (Fogler, 1999).

$$E = \frac{d}{dt} \left(\frac{C}{Co} \right)_{échelon} \quad (\text{éq 2.7})$$

Le rapport C/Co est appelé la fonction F(t) qui est obtenue en ayant la concentration du traceur augmenté de zéro à un.

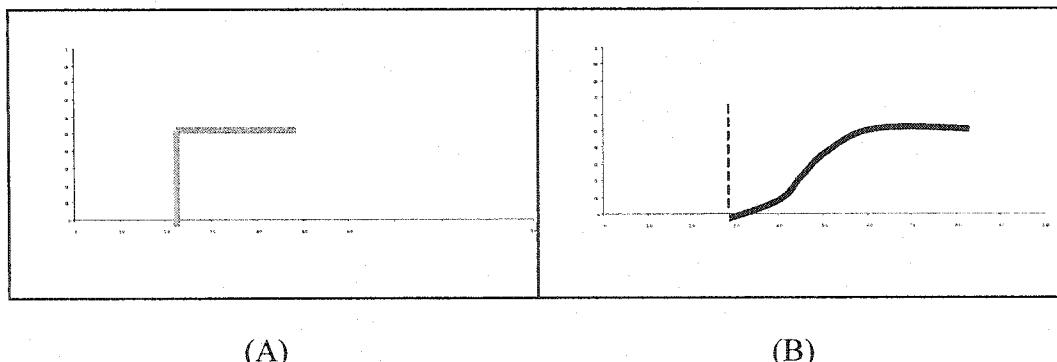


Figure 2.2: Concentration du traceur en fonction du temps suite à une injection de type échelon. (A) Injection échelon. (B) Réponse à l'injection à la sortie du réacteur.

L'avantage de l'injection échelon est que la quantité totale de traceur dans l'alimentation durant le test n'a pas besoin d'être connue comme pour l'injection impulsion. Par contre, le désavantage de cette technique est qu'il est parfois difficile de maintenir la concentration du traceur dans l'alimentation constante. L'obtention du DTS par ce test implique la dérivation des données expérimentales. Cela pourrait engendrer plusieurs erreurs. Le troisième obstacle de l'injection échelon est que l'expérience pourrait nécessiter une quantité importante de traceur, si le coût du traceur est élevé, il est préférable d'utiliser l'injection type impulsion. Mais aussi, cela pourrait avoir un impact négatif sur la viabilité cellulaire.

2.3.3 L'intégrale de convolution

Le traceur introduit par impulsion dans le réacteur avec un signal d'entrée C_{in} , subit des changements quand il passe dans le réacteur et donne à la sortie le signal C_{out} . Ce changement est bien sûr dû à l'écoulement dont la fonction DTS lui est propre. Il est donc possible de relier la fonction $E(t)$, le signal d'entrée et le signal de sortie.

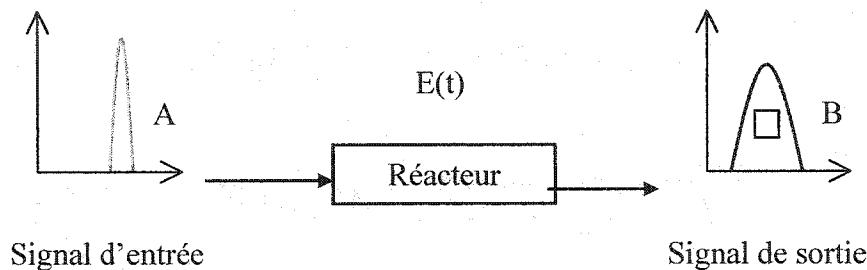


Figure 2.3: Illustration des signaux d'entrée et de sortie du traceur dans le réacteur.

Par cette représentation l'explication de la convolution sera simple (Levenspiel, 1999). Une quantité de traceur représentée par le rectangle B quitte le réacteur à un temps t (figure 2.3). La quantité de traceur B est égale à la quantité de traceur entrant dans le réacteur t' secondes plus tôt et passant un temps t' dans le réacteur. En d'autres termes, la quantité de traceur B quittant le réacteur au temps t est équivalente à la somme des quantités A de traceur entrant dans le réacteur avant le temps t multiplié par la fraction ayant passé un temps t' dans le réacteur. L'expression suivante met en équation ce qui a été illustré ci-haut.

$$C_{out}(t) = \int_0^t C_{in}(t-t') E(t') dt' = \int_0^t C_{in}(t') E(t-t') dt' \quad (\text{éq 2.8})$$

C_{out} est la convolution de la fonction E avec C_{in} et s'écrit de cette façon : $C_{out} = E * C_{in}$.

Il arrive parfois de faire la convolution inverse pour aller chercher la fonction E. C'est un problème plus difficile à résoudre que celui de la convolution. Cependant, avec un ordinateur et des outils mathématiques appropriés, l'opération est possible. La DFT (Discrete Fourier Transform) est un outil qui permet de transformer le signal du domaine du temps dans le domaine fréquentiel, la convolution devient une multiplication. L'opération devient alors plus facile et on peut calculer E et ensuite faire la DFT (Kreyszig, 1999) inverse pour revenir dans le domaine du temps.

2.3.4 Modèle de dispersion

Les faibles déviations de l'écoulement piston peuvent être modélisés selon le modèle de la dispersion axiale ou selon le modèle des réacteurs en séries. Dans le modèle de la dispersion il y a une dispersion axiale qui est gouvernée par une analogie à la loi de Fick et une dispersion convective qui résulte du mouvement du fluide. Le modèle de dispersion considère un écoulement type piston avec un certain degré de rétro-mélange. Il n'y a pas de volumes morts ni de court-circuitage durant l'écoulement. Le processus de mélange implique une redistribution ou un mélange du matériel par glissement ou par des eddies (vortex). Ces phénomènes vont se répéter plusieurs fois durant l'écoulement du fluide dans le réacteur, on peut alors considérer que ces phénomènes

sont statistiquement dans la nature, et donc comme une diffusion moléculaire. Par analogie à la loi de Fick, la dispersion du fluide suivant la direction z est donnée par l'équation suivante.

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial z^2} \quad (\text{éq 2.9})$$

D est le coefficient de dispersion axiale, qui caractérise uniquement le degré de rétromé lange durant l'écoulement. Le coefficient de dispersion axiale D (m^2/s) représente le degré de mélange du fluide. Une grande valeur de D signifie que le fluide se répand dans le réacteur de façon très rapide, une petite valeur de D représente une faible expansion du fluide, et une valeur nulle de D signifie qu'il n'y a aucune expansion et que le réacteur est un réacteur piston. La dispersion radiale a un effet moins important sur l'écoulement que la dispersion axiale, elle est généralement due à la diffusion moléculaire seulement.

La concentration molaire du traceur (C) suite au transport convectif et à la dispersion est donnée par l'équation suivante:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial z^2} - U \frac{\partial C}{\partial z} - \text{consommation} \quad (\text{éq 2.10})$$

Dans cette expression U est la vitesse superficielle (m/s). Celle-ci peut être obtenue en divisant le débit d'écoulement par la surface de la section d'écoulement. Le terme de consommation est nul dans le cas d'un traceur. Si des particules sont à l'intérieur du réacteur, il faut aussi diviser par la porosité du lit. Le nombre de Peclet est un nombre

adimensionnel qui représente le rapport entre le taux de transport par convection divisé par le taux de transport par diffusion ou par dispersion.

$$Pe = \frac{Ul}{D} \quad (\text{éq 2.11})$$

Le coefficient de dispersion axial est déterminé à l'aide des tests de traçage. En utilisant le temps de séjour moyen et la variance, on peut calculer D. Pour qu'un modèle d'équations aux dérivées partielles soit complet, il faut déterminer ses conditions aux frontières. Dans le cas d'un réacteur représenté par des équations hyperboliques, une seule condition aux frontières est requise. La concentration à l'entrée du réacteur est généralement utilisée. Dans le cas d'un réacteur représenté par des équations paraboliques, deux conditions aux frontières doivent être posées. Il y a deux cas que l'on peut considérer, les conditions aux frontières de réacteur fermé-fermé et de réacteur ouvert-ouvert.

Conditions aux frontières de réacteur fermé-fermé :

Pour le réacteur fermé-fermé, la dispersion juste à l'entrée et à la sortie du réacteur est nulle. Les conditions aux frontières généralement utilisées sont celles de Danckwerts. La première condition est un bilan de flux à l'entrée du réacteur. La deuxième est de poser un gradient de concentration nul à la sortie. À $z = 0+$ et à $z = L$ la dispersion est non nulle et les conditions aux frontières sont les suivantes :

(éq 2.12)

$$\begin{aligned} \text{à } z = 0+ & \quad Co = \frac{-D}{U} \left(\frac{\partial C}{\partial z} \right)_{z=0+} + C(0+, t) \\ \text{à } z = L- & \quad \frac{\partial C}{\partial z} = 0 \end{aligned} \quad (\text{éq 2.13})$$

À partir de ces conditions, on peut tirer les expressions du premier moment de la fonction DTS, le temps de séjour moyen et de la variance pour ce genre de conditions.

Le développement de ces expressions est disponible dans Fogler (Fogler, 1999).

$$t_m = \frac{L}{U} = \theta \quad (\text{éq 2.14})$$

$$\sigma_\theta^2 = \frac{\sigma^2}{t_m^2} = \frac{2}{Pe} - \left(\frac{2}{Pe^2} \right)^* (1 - e^{-Pe}) \quad (\text{éq 2.15})$$

Conditions aux frontières de réacteur ouvert-ouvert :

Quand la dispersion à l'entrée du réacteur et à la sortie du réacteur est la même que la dispersion dans le réacteur, les conditions ouvert-ouvert s'appliquent. Les conditions aux frontières sont les suivantes:

$$C(0-, t) = C(0+, t) \quad (\text{éq 2.16})$$

$$-D \left(\frac{\partial C}{\partial z} \right)_{z=0-} + UC(0-, t) = -D \left(\frac{\partial C}{\partial z} \right)_{z=0+} + UC(0+, t)$$

$$C(L-, t) = C(L+, t) \quad (\text{éq 2.17})$$

$$-D \left(\frac{\partial C}{\partial z} \right)_{z=L-} + UC(L-, t) = -D \left(\frac{\partial C}{\partial z} \right)_{z=L+} + UC(L+, t)$$

En utilisant ces conditions aux frontières, la fonction de distribution de temps de séjour ainsi que le temps de résidence moyen et la variance peuvent être déterminés (Fogler, 1999).

$$E_\theta(t) = \frac{1}{2\sqrt{\pi\theta/Pe}} \exp\left[\frac{-(1-\theta)^2}{4\theta/Pe}\right] \quad (\text{éq 2.18})$$

$$t_m = \left(1 + \frac{2}{Pe}\right)\theta \quad (\text{éq 2.19})$$

$$\sigma_\theta^2 = \frac{2}{Pe} + \frac{8}{Pe^2} \quad (\text{éq 2.20})$$

2.3.5. Modèle de réacteurs en série

Ce modèle représente le réacteur comme une combinaison de N réacteurs parfaitement mélangés de volumes égaux en série. En analysant correctement la distribution de temps de séjour on peut calculer le nombre de réacteurs parfaitement mélangés. Ce modèle a l'avantage d'être simple à utiliser.

$$E_\theta = N \frac{(N\theta)^{N-1}}{(N-1)!} e^{-N\theta} \quad (\text{éq 2.21})$$

$$\sigma_\theta^2 = \frac{1}{N} \quad (\text{éq 2.22})$$

En se basant sur les définitions des deux moments de DTS, on obtient la fonction de temps de séjour ainsi que le nombre de réacteurs en série théorique.

Chapitre 3

3 Development of a high-throughput bioreactor: Application to *in vivo* NMR measurement

Ce chapitre présente le développement d'un bioréacteur visant à effectuer des mesures de RMN *in vivo*. Les cellules à l'étude sont les cellules *Eschscholtzia californica*. Les cellules forment un lit cellulaire compact dans le bioréacteur.

Une caractérisation du bioréacteur a été effectuée. Le mélange dans le lit cellulaire a été modélisé. Le modèle de dispersion axiale a été appliqué pour modéliser l'hydrodynamique. Ensuite, l'homogénéité du lit cellulaire a été testée en effectuant une simulation portant sur le bilan de matière du phosphate inorganique dans le milieu de culture du lit cellulaire et intra cellulaire. Les résultats indiquent que le liquide dans le lit cellulaire est bien mélangé. Le coefficient de dispersion axiale varie de 0,2 à 1,3 m/s^2 .

Une étude de viabilité des cellules a été effectuée en effectuant un suivi de l'oxygène dissous durant la culture en bioréacteur ainsi que par un test enzymatique. Des essais en RMN *in vivo* ont été effectués par mon collègue Jingkui Chen avec le système de perfusion développé. Les résultats obtenus sont discutés dans ce chapitre.

Les annexes contiennent des données qui sont complémentaires à ce chapitre.

L'annexe A contient une courbe de croissance des cellules *Eschscholtzia californica*, ainsi que des figures de suivi de l'oxygène dissous pour les cultures de cellules âgées de 2, 3, 4, 7, 8 et 9 jours. Tous les résultats annexes à la modélisation hydrodynamique se trouvent dans l'annexe A. L'annexe B présente toute la démarche de la méthode de résolution du bilan de matière sur le phosphate inorganique extra et intra cellulaire par la méthode des éléments finis. L'annexe C contient la démarche suivie pour effectuer la modélisation hydrodynamique du bioréacteur. Dans l'annexe D on peut voir les programmes informatiques.

Soumis à : Biotechnology and Bioengineering.

Development of a high-throughput bioreactor: Application to *in vivo* NMR measurement

Dorra Gmati, Jingkui Chen and Mario Jolicœur*

Canada Research Chair on the Development of Metabolic Engineering Tools

Bio-P² Research Unit, Department of Chemical Engineering, École Polytechnique de Montréal, P.O. Box 6079, Centre-ville Station, Montréal, Québec, Canada, H3C 3A7.

***Corresponding Author**

3.1 Abstract

A perfused bioreactor allowing *in vivo* NMR measurement was developed and validated for *Eschscholtzia californica* cells. The bioreactor was made of a 10-mm NMR tube. NMR measurement signal-to-noise ratio was optimized using a sedimented compact bed of cells that were retained in the bioreactor by a supporting filter. Liquid medium flow through the cell bed was characterized from a mass balance on oxygen and a dispersive hydrodynamic model. Cell bed oxygen demand for 4 h perfusion required a minimal medium flow rate of 0,8 ml/min. Residence time distribution assays

at 0,8 to 2,6 ml/min showed the medium flowing into cell bed to have a good dispersion with an axial dispersion coefficient of 0,2 and 1,3 m/s² respectively. Cell integrity was maintained for all culture conditions since extracellular esterase activity had not increased after 4 h of perfusion. *In vivo* NMR was performed for ³¹P NMR and spectrum can be recorded after only 10 min of spectral accumulation (500 scans) with peaks identified as G-6P, F-6P, cytoplasmic Pi, vacuolar Pi, ATP_γ and ADP_β, ATP_α and ADP_α, NADP and NDPG, NDPG and ATP_β. Cell viability was shown to be maintained as ³¹P chemical shifts were constant with time for all the identified nuclei, thus suggesting constant intracellular pH.

3.2 Key Words

High-throughput bioreactor, perfused bioreactor, *in vivo* NMR, *Eschscholtzia californica*, dispersion model, esterase activity.

3.3 Introduction

There is a need for small-scale bioreactor systems which allow a high number of non-invasive measurements to be performed on a single cell culture sample. The constraints in designing or the criteria in selecting such a high-throughput bioreactor from the literature are numerous. In accordance with the process intensification paradigm, a

scaling-down approach has to result in the intensification of information quantity and quality on each single cell culture sample. Therefore, on what basis—from a single cell to a fully instrumented bioreactor—should the optimal scale be defined? Major breakthroughs describing cell architecture and cell physiology have required single cell studies. However, it is widely accepted that obtaining averaged values on a cell population may be more representative of bioprocesses at large scale. Culture conditions at small scale have to favor similar cell behavior as would be observed under large-scale conditions. Significant process parameters have been identified, such as the capacity to transfer oxygen (OTR) and maintain homogenous environmental conditions. However, these classical criteria partly account for cells' physiological parameters. For instance, cell-to-cell signaling and quorum sensing phenomena have to occur similarly whatever the scale of the culture system. In addition, the small-scale bioreactor has to contain enough cells to be capable of performing non-invasive *in vivo* as well as *ex vivo* assays. Current non-invasive *in vivo* assays or those under development are based on highly sophisticated analytical equipment, such as optical sensors for UV, IR, Raman and fluorescence spectroscopy, *in situ* microscopy (Ulber et al., 2003), dielectric spectroscopy (Ducommun et al., 2002) and *in vivo* nuclear magnetic resonance (NMR) (Castro et al., 1999). These different analytical techniques are highly complementary and may be most necessary to obtain an adequate description of cell population physiological, nutritional and metabolic states and dynamic behaviors. Furthermore, *ex vivo* measurements require a minimal cell number both to determine growth and sample enough units of DNA, RNA, proteins, and diverse

metabolites. There is thus a minimal cell concentration required which defines a minimal size for a high-throughput bioreactor.

In this work, the objective was to select or design a bioreactor that would allow *in vivo* NMR measurements as well as the use of optical sensors. NMR was selected because it is one of the most demanding (i.e. restrictive) analytical techniques for a bioreactor design. *In vivo* NMR has been shown to be efficient in describing intracellular pH, carbon balancing and compartmentalization processes. Data (spectra) acquisition time may be long (hours) and a high cell density is required to obtain an adequate signal-to-noise ratio. Furthermore, cell population physiological, nutritional and metabolic states must be homogenous within the whole volume of measurement, which is in the order of a few ml. Small variations in cell viability could induce intracellular pH changes resulting in data of poor quality owing to evolving chemical shifts during NMR spectra accumulation. Kramer and Bailey (1990) have performed *in vivo* NMR with bacterial cells using an airlift type bioreactor. This bioreactor has also been used to study yeast cells (Fox et al., 1989). A hollow-fiber bioreactor has been developed to perform ^{31}P NMR on chick chondrocytes (Petersen et al., 2000). For plant cells, intracellular pH differences between the cytoplasm ($\text{pH} \sim 7,5$) and the vacuole ($\text{pH} \sim 5,5$) are used to quantify nutrient and metabolite compartmentalization (Blingny and Douce, 2001; Aubert et al., 1996; Roby et al., 1986; Rijhwani et al., 1999). Diverse bioreactor configurations have thus been developed to perform *in vivo* NMR. The bioreactor's level of versatility in culturing different cell types is a determinant parameter. Mechanically stirred configurations such as those of Lamping et al. (2003) and Kostov

et al. (2001) may not be suitable for shear-sensitive cells, such as animal and plant cells, and may perturb the coherence of the NMR magnetic field. Airlift bioreactors are likely to generate a significant amount of foaming, which complicates long-term bioreactor operation, and may not be limited to low-density cell suspension. Membrane-based systems such as hollow fibers are interesting, but may reduce the working volume and create a high level of heterogeneity if placed within the magnetic field.

The choice of a biological model system is crucial to assess the potential of a high-throughput bioreactor. Plant cells have numerous unique characteristics that make them a useful model system for testing a bioreactor. The cells are large (30 μm), form aggregates of different sizes ($\leq 1 \text{ mm}$), are shear sensitive, present a shear thinning rheological behavior, and have a large capacity for accumulating diverse nutrients and metabolites (Yu, 1999; Plaxton, 1998; Schachtman et al., 1998). Plant cells are studied for their production of therapeutic compounds (Scragg, 1995), and as hosts for recombinant protein production (Daniell et al., 2001). *In vitro* plant cell culture benefits from well-defined low-cost serum-free culture medium which does not promote human viruses. Unfortunately, plant cell culture is also known for showing non-reproducible productivity. The cell instability phenomenon is seen as a metabolic instability induced from non-adapted culture conditions and practices. Small variations in culture conditions can then result in significant fluctuations at the metabolic level. Consequently, it is highly challenging for a small-scale bioreactor system to meet all of the above-mentioned constraints.

Suspension cells of *Eschscholtzia californica* producing antibacterial sanguinarin were used as a biological model system. Cells were placed as a compact bed into a perfused 10-mm NMR tube. The bioreactor capacity to support cell viability was characterized in terms of hydrodynamics, oxygen and inorganic phosphate mass transfer and other stresses of mechanical or physiologic origin. The potential of using this small-scale bioreactor as a high-throughput bioreactor for *in vivo* NMR studies was validated.

3.4 Material and Methods

3.4.1 Biological Material

The experiments were conducted using *Eschscholtzia californica* suspension cells taken from shake flask culture. Erlenmayer flasks of 500 ml containing 170 g of B5 medium were covered with foil cap and sterilized in an autoclave. Standard B5 medium (Gamborg et al., 1968) with 30 g/l of glucose was used. Flasks were inoculated with 80 g of cell suspension. The cultures were grown at 25°C on a gyratory shaker at 120 rpm. Suspension cell cultures were sub-cultured when the sedimented cell volume reached 70–80% of the total liquid volume after 5 minutes (+/- 10 days).

3.4.2 Description of the Bioreactor System

The bioreactor is composed of a 10-mm OD screw-cap NMR tube (Fisher, Montréal, Québec, Canada) (Figure 3.1 A). An insert that is held by the screw cap was designed to ensure inlet, outlet and vent tubings were aseptically sealed. Oxygenated medium was pumped (Masterflex peristaltic pump, Labcor, Montréal, Québec, Canada) from a reservoir (aerated flask) into the bioreactor inlet tubing, which is made of a glass capillary of 0,8 mm ID. The medium is drawn along the center tube (outlet) by capillary effect, flows first through the cell-free zone over the cell bed and then into the cell bed to finally reach the outlet tube at the bottom of the NMR tube. The cells were kept in the NMR tube by a filter (Miracloth, Calbiochem, San Diego, USA) supported on a perforated disk (Figure 3.1 B). The perforated disk was placed on 1,0 cm of glass beads ($D=1,0$ mm) which help ensure equal flow distribution at the filter surface. The outlet tubing was made of polyetheretherketone (PEEK) (Victrex, Montréal, Québec, Canada) or glass and had an ID of 0,75 mm or 0,8 mm respectively. The outlet tube is held at the center of the NMR tube by a PEEK sleeve installed at mid-height of the NMR tube and by the perforated disk. The cell suspension was rapidly introduced into the bioreactor using a cut-end 10-ml plastic sterile pipette to obtain a cell bed of 2,5 cm after decantation while the medium is circulating. This cell bed height is required because the reading zone for the 10-mm Varian NMR probe is 1,5 cm. Perfusion medium mixing and oxygenation were provided by an air flow rate of 1500 ml/min through a porous (2 μm) stainless steel sparger. The global design of the bioreactor was based on that of Aubert et al. (1996) and Rijhwani et al. (1999). A dissolved oxygen (DO) probe (polarographic: Ingold, Urdorf, Switzerland) was installed at the outlet of

the bioreactor in an in-house 316 SS chamber which was designed to allow adequate liquid circulation at the probe membrane and thus avoid a film stagnation effect at any flow rate.

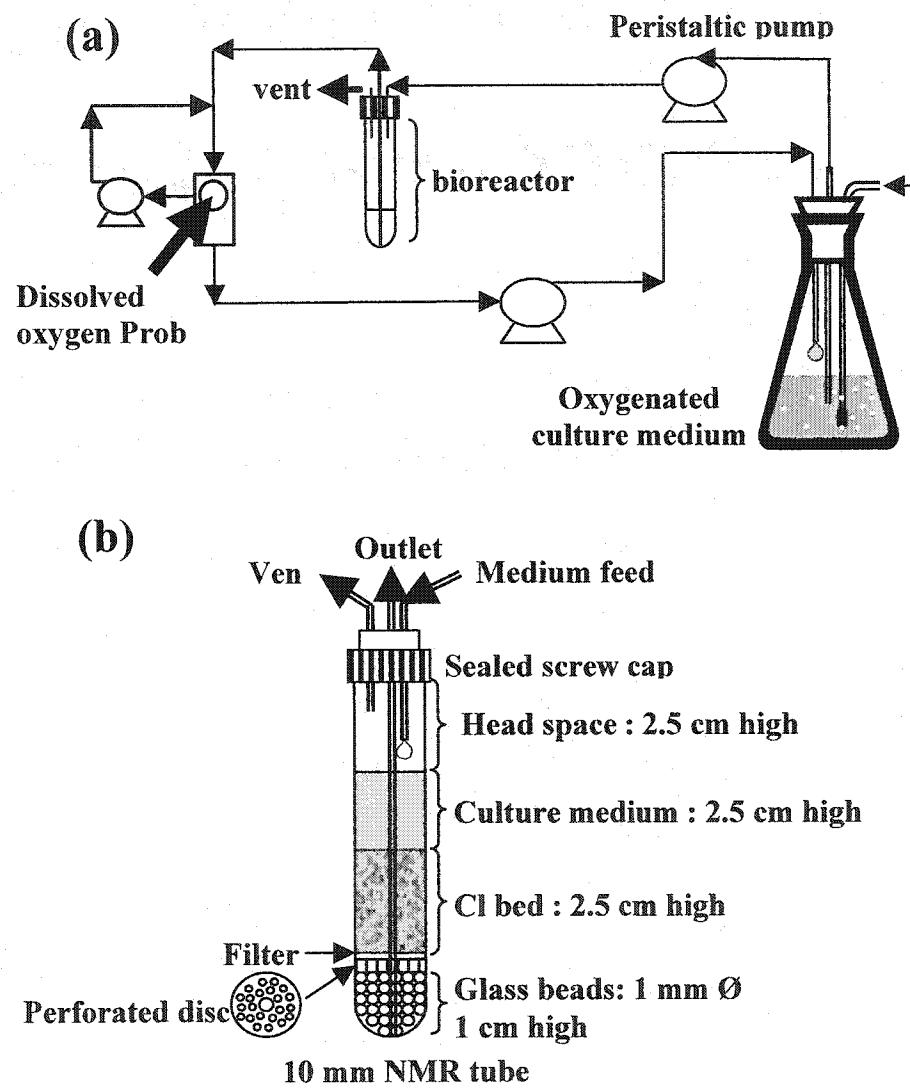


Figure 3.1: The perfused bioreactor system used for *in vivo* NMR. (a) Complete bioreactor system. (b) Detailed outline of the NMR tube modified as a bioreactor.

3.4.3 Oxygen Consumption Study in the Bioreactor

The DO probe was calibrated online immediately before each bioreactor culture without cells. Two point calibrations at 0% and 100% air saturation were obtained by feeding the liquid medium reservoir with N₂ and air, respectively. The materials of all tubings, connectors and the sealing cap were selected to prevent gas exchange with the environment. Assays were performed for cells at different ages, such as 1 d, 5 d, 6 d and 10 d, which correspond respectively to lag phase (1 d), exponential phase (5–6 d) and stationary phase (10 d). Perfusion flow rates of 0,8 ml/min, 1,6 ml/min and 2,6 ml/min were used, based on the oxygen demand calculated for a cell bed of *E. californica* (see below). The bioreactor cultures were performed for up to 4 h and the outlet DO was monitored assuming the inlet medium to be at air saturation.

3.4.4 Residence Time Distribution Measurement

The salt injection method was used. A pulse was preferred to a step salt injection because obtaining the residence time distribution (RTD) from a step experiment involves differentiation from the data dynamic, inducing an additional source of error. The pulse experiment requires a low amount of tracer which limits its effect on the viability and the physiology of the cells. A pulse of 0,15 µL of tracer composed of a solution of B5 culture medium supplemented with 1 M NaCl was injected rapidly at the inlet of the bioreactor at the junction between the inlet tube and the sealing cap. The

conductivity was measured at the entrance and the exit of the cell bed. In-house conductivity probes composed of two 316 stainless steel electrodes (12 kHz, 8 V) were connected to a data acquisition system (Virgo, Longueuil, Québec, Canada). The experiments were performed in triplicate for three different cell ages (1 d, 5 d and 10 d) and three perfusion rates (0,8 ml/min; 1,6 ml/min; 2,6 ml/min).

3.4.5 Cell Integrity Test

The effect of the culture conditions in the perfused bioreactor on cell viability and lysis was estimated from the release of intracellular esterases into the culture medium, as previously described (Lamboursain et al., 2002). Esterases hydrolyse fluorescein diacetate (FDA), releasing free fluorescein which can be followed at 490 nm using a spectrophotometer. Maintenance of cell integrity was evaluated before and after culture in the bioreactor system. A calibration curve (not shown) was established prior to the measurements as follows. A sample of the cell suspension from the shake flask was centrifuged (5000 g, 5 min) and the supernatant was considered as 0% broken cells (i.e. used medium base line in esterase activity). A second cell sample was crushed into its culture medium, centrifuged, and the supernatant was taken as 100% broken cells (i.e. maximal esterase activity).

3.4.6 Determination of the Cell Bed Porosity

Cell bed porosity was measured as follows. A cell bed was first formed in the NMR tube as described previously. The liquid level was then adjusted to the top of the cell bed by pumping the liquid out of the bioreactor. Free liquid was then pumped until the free liquid level in the cell bed reached the bottom of the cell bed. The collected liquid was weighted, as was the cell bed fresh weight. The porosity of the cell bed was then estimated by dividing the weight of the free liquid in the cell bed by the weight of the cell bed with the free liquid. Cell density was assumed to be similar to that of the culture medium.

3.4.7 ^{31}P -NMR Measurements

In vivo ^{31}P NMR spectroscopy was performed on a Varian Unity Inova 400 MHz NMR spectrometer with a 10-mm Broad-Band probe. ^{31}P spectra were acquired at 161,839 MHz at 298,15 K with a delay time of 0,5 seconds and 45° pulses. The acquisition time was set to 0,69 seconds and spectra width was 10 kHz. The spectra were acquired with 10,000 scans corresponding to a final acquisition time of 200 min, unless otherwise specified. Proton decoupling was applied by WALTZ-16 software. 2M methanephosphonic acid solution was used as an external chemical shift (30,60 ppm down shift from 85% H_3PO_6) and concentration standard. This external standard was sealed in a capillary and put at the centre of the NMR tube in the outlet tube within the

cell bed region. The NMR data were transferred and processed on a personal computer by Mestrec 301 NMR software. The spectra were phased, no zero filling. The line boarding was 10 Hz. The perfusion system was rinsed with bleach, then deionized water, and sterilized in an autoclave for 25 min at 121°C. The perfusion medium was composed of 90 ml B5 medium free of Pi and paramagnetic elements (Fe, Mn, Co) (B5-F) and 10 ml deuterated water (D_2O) (CDN, Montréal, Québec, Canada), which was used to lock the NMR signal. The perfusion medium was sterilized in an autoclave for 25 min at 121°C and the bioreactor was inoculated and operated as previously described. Approximately 1,0 g WW of cell was loaded in the NMR bioreactor to obtain a cell bed height of 2,5 cm. The medium was pumped in and out of the bioreactor by a peristaltic pump at a flow rate of 1,6 ml/min. The first 10 ml of used medium were purged from the system.

3.4.8 Computational Methods

All calculations were performed using MATLAB (Mathworks 6.1) software. The "FFT" (Fast Fourier Transform) function was used for the convolution step and the least squares method was performed using "fmins" function. The matrix system obtained from the finite elements method on the mass balance on Pi has been solved using the LU method.

3.5 Establishing the Bioreactor Capacity for Cell Culture

The major objective of this study was to develop a bioreactor showing a high level of homogeneity in its environmental conditions and in extension in the cells physiological state. A model describing the flow of the culture medium through the cell bed was developed and is presented at first. Secondly, the kinetic describing nutrient uptake was included to the hydrodynamic model and used to study the establishment of a profile in nutrient concentration along the cell bed with time. The study has been limited to Pi. Finally, a mass balance on dissolved oxygen was performed to estimate the required flow rate for the oxygenated liquid medium.

3.5.1 Modeling of the Hydrodynamic within the Cell Bed

An axial dispersion model was used to describe the flow of the culture medium within the cell bed since it can be assimilated to a piston flow. An axial dispersion model describes the transport in the axial direction with a piston flow and retro-mixing. Radial dispersion was not incorporated into the model as it is generally considered to be of minor influence (Berger et al., 2002). A reactor-in-series model was also used to qualify the mixing within the cell bed with N perfectly mixed reactors of equal volume in series (CSTRs).

The mass balance equation for the axial dispersion model is as follows:

$$\frac{\partial C_T}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C_T}{\partial z^2} - U \frac{\partial C_T}{\partial z} - consumption \quad (\text{éq 3.1})$$

By analogy to the Fick law for diffusion (Levenspiel, 1999), the axial dispersion coefficient D characterizes the retro-mixing level, and the convective transport is represented by the superficial velocity U ,

$$U = \frac{Q}{S * \rho} \quad (\text{éq 3.2})$$

The higher the axial dispersion coefficient as compared to convective transport, the greater the level of mixing in the cell bed. The Peclet number (Pe) is also useful as it represents the ratio of convective transport to dispersive and diffusive transport.

$$Pe = \frac{Ul}{D} \quad (\text{éq 3.3})$$

The axial dispersion coefficient was determined from the residence time distribution (RTD) measurements of the internal mixing in the reactor (Haas et al., 1997).

3.5.1.1 Model Resolution

RTD measurements were performed by the sudden injection of a salt tracer as previously described. Two independent output signals were monitored using two conductivity probes, one at the entrance of the cell bed ($z=0$) and one at the outlet of the cell bed ($z=l$). Conductivity signals were normalized to obtain the RTD functions.

The RTD function at the cell bed outlet contains cumulative effects of the RTD function at the cell bed entrance and of the cell bed itself. However, the RTD function of the cell bed can be obtained by decoupling the entrance signal from the output signal using the convolution method previously described by Levenspiel (1999) and Fogler (1999). Boundary conditions of an open-open system were considered with non-zero dispersion conditions above and below the cell bed. The Fast Fourier Transform (FFT) method was used in the convolution procedure as described by Smith (1999).

3.5.2 Modeling of Extra and Intracellular Nutrient Concentrations with Time along the Cell Bed

This study has focused on inorganic phosphate (Pi) because this nutrient is depleted within 4h from B5 culture medium over a 10 days culture period (Lamboursain and Jolicoeur, 2002). Then, the importance of Pi intracellular compartmentalization studies to understand plant cell behavior in vitro was a major argument for choosing this nutrient. A mass balance on Pi was performed on the cell bed volume with the following hypothesis. Since hydrodynamic parameters were observed to change with cell age and the perfusion flow rate (see the Results section), simulations were performed for a flow rate of 1,6 mL/min and 5d old cells. Cells were taken at exponential growth with constant specific growth rate (μ). Initial ($t=0$) intracellular Pi concentration was arbitrarily fixed to zero to amplify cell accumulation kinetic. Perfused B5 medium at 1,1 mM Pi was considered. This condition is not realistic but

allowed to emphasize cell capacity for Pi uptake and thus the potential for the establishment of extra and intracellular Pi concentration profiles within the cell bed.

3.5.2.1 Mass balance on extracellular Pi

A mass balance on extracellular Pi can be developed as follows.

$$[\text{input flux}] - [\text{output flux}] - [\text{consumption flux}] = \text{accumulation}$$

corresponding to:

$$S * F_z - S * F_{z+\Delta z} - X * v_{inPi} = \frac{\partial P_i_{extra}}{\partial t} \quad (\text{éq 3.4})$$

where:

$$v_{inPi} = v_{\max_{HA-Pi}} \frac{P_i_{extra}(z, t)}{P_i_{extra}(z, t) + K_{Pi_HA}} + v_{\max_{LA-Pi}} \frac{P_i_{extra}(z, t)}{P_i_{extra}(z, t) + K_{Pi_LA}} \quad (\text{éq 3.5})$$

Since the Pi flux, F, is due to convection and dispersion:

$$F = -D \frac{dP_i_{extra}(z, t)}{dz} + U P_i_{extra}(z, t) - X * v_{inPi} \quad (\text{éq 3.6})$$

By substitution, we obtain:

$$D \times \frac{d^2 P_i_{extra}(z, t)}{dz^2} - U \times \frac{dP_i_{extra}(z, t)}{dz} - X * v_{inPi} = \frac{dP_i_{extra}(z, t)}{dt} \quad (\text{éq 3.7})$$

Net Pi uptake was described by a double affinity Michaelis-Menten kinetic as described by Jolicoeur et al. (2002), the parameters of which were adjusted for *Eschscholtzia californica* cell suspensions (unpublished results).

3.5.2.2 Mass Balance on Pi Intracellular Concentration

Entering Pi (v_{inPi}) goes into cell material ($Y_{x/P}$) and into cytoplasmic and vacuolar Pi pools (P_i).

$$\frac{dP_i(z,t)}{dt} = v_{inPi} - \mu \left(\frac{1}{Y_{x/P}} + P_i(z,t) \right) \quad (\text{éq 3.8})$$

Mass balance on extracellular Pi (equation 3.7) and the rate of transport of Pi (equation 3.5) have first to be solve, and then the mass balance on intracellular Pi (equation 3.8) can be solved as described below.

3.5.2.3 Model Resolution

A finite element method was used to solve the system of equations formed by the mass balance on extracellular Pi (equation 3.7) and the rate of transport of Pi (equation 3.5). The cell bed was taken as a linear segment of length "l". It was then assumed that diffusion only occurs in the axial direction (z axis). The problem can thus be simplified

to a one-dimensional case in space with a stationary term $\partial P / \partial t$. The domain partition was applied on the bioreactor section in the interval $[z=0, z=l]$ where the nutrient consumption occurs. All the elements were of equal dimension in a uniform mesh. The Crank-Nicholson method (Riggs, 1988) was used to estimate the stationary term of the differential equations. Equation (3.7) is solved first using the finite element method at a time "t", and the rate of transport is then calculated at a time "t+1" using extracellular Pi concentration at time t. Danckwerts' boundary conditions were used as described below.

A flux balance is developed at the entrance of the bioreactor:

$$D \frac{\partial P_i(0, t)}{\partial z} = U(P_i(0, t) - P_i(t)) \quad (\text{eq 3.9})$$

and a nil concentration gradient is proposed at the exit of the bioreactor:

$$\frac{\partial P_i(L, t)}{\partial z} = 0 \quad (\text{eq 3.10})$$

These boundary conditions are generally used for a closed-closed type reactor (Fogler, 1999). This is the case here since it was assumed that there is neither radial dispersion nor Pi concentration variation upstream and downstream outside of the cell bed.

3.5.3 Operating Conditions Supporting Cells Oxygen Demand

The minimal perfusion flow rate of culture medium required to support cell respiration was estimated from a mass balance on oxygen in the cell bed.

$$\frac{dC_{out}}{dt} = OTR - OUR + \frac{F}{V_{cellbed}} C_{in} - \frac{F}{V_{cellbed}} C_{out} \quad (\text{éq 3.11})$$

The oxygen transfer rate (OTR) from the head gas phase of the bioreactor is not significant because the DO in the liquid medium above the cell bed (C_{in}) is supposed to be at equilibrium with the gas phase (air @1 atm and 25°C). C_{in} at air saturation for standard B5 medium is 0,210 mM (Quiker et al., 1981). The oxygen uptake rate (OUR) is given by:

$$OUR = q_{O_2} X \quad (\text{éq 3.12})$$

where the specific oxygen uptake rate (q_{O_2}) has been shown previously to be function of the DO. A critical DO of 0,105 mM was measured for suspension cells of *Eschscholtzia californica* (Lamboursain et al., 2002). This value represents 50% of the oxygen solubility at air saturation. The criterion for the DO at the outlet of the cell bed is thus $C_{out} \geq 0,105$ mM so all the cells can experience non-limiting conditions. Thus, the minimal medium flow rate is estimated at 0,8 ml/min to 2,6 ml/min for 1-d-old cells (inoculation) and 5-d-old cells (exponential growth) respectively from data presented by Lamboursain et al. (2002).

3.6 Results and Discussion

Preliminary studies have been performed to qualify the appropriateness of the bioreactor as well as to precise adequate culture conditions.

3.6.1 The Bioreactor can Maintain Cell Viability

3.6.1.1 Satisfying Cells' Oxygen Demand

Dissolved oxygen concentration was maintained above 50% of air saturation for 4 hours of cell culture into the perfused bioreactor using air feed and a medium perfusion rate of 1,6 ml/min (Figure 3.2). However, cell sampling from a shake flask and its transfer into the bioreactor showed to induce a high level of stress. A short-term and rapid decrease in the dissolved oxygen concentration (DO) at the outlet of the bioreactor was observed immediately after inoculating the cells into the bioreactor for the 1d-old cells (lag phase) and the 6d-old cells (late exponential growth) (Figure 3.2). Results also suggest that the cells do recover from inoculation stress and the DO then showed to increase at equilibrium (OUR ~ OTR). The 10d-old cells which were at stationary phase did not show the same rapid decrease but a slower one, reaching equilibrium at 54% from air

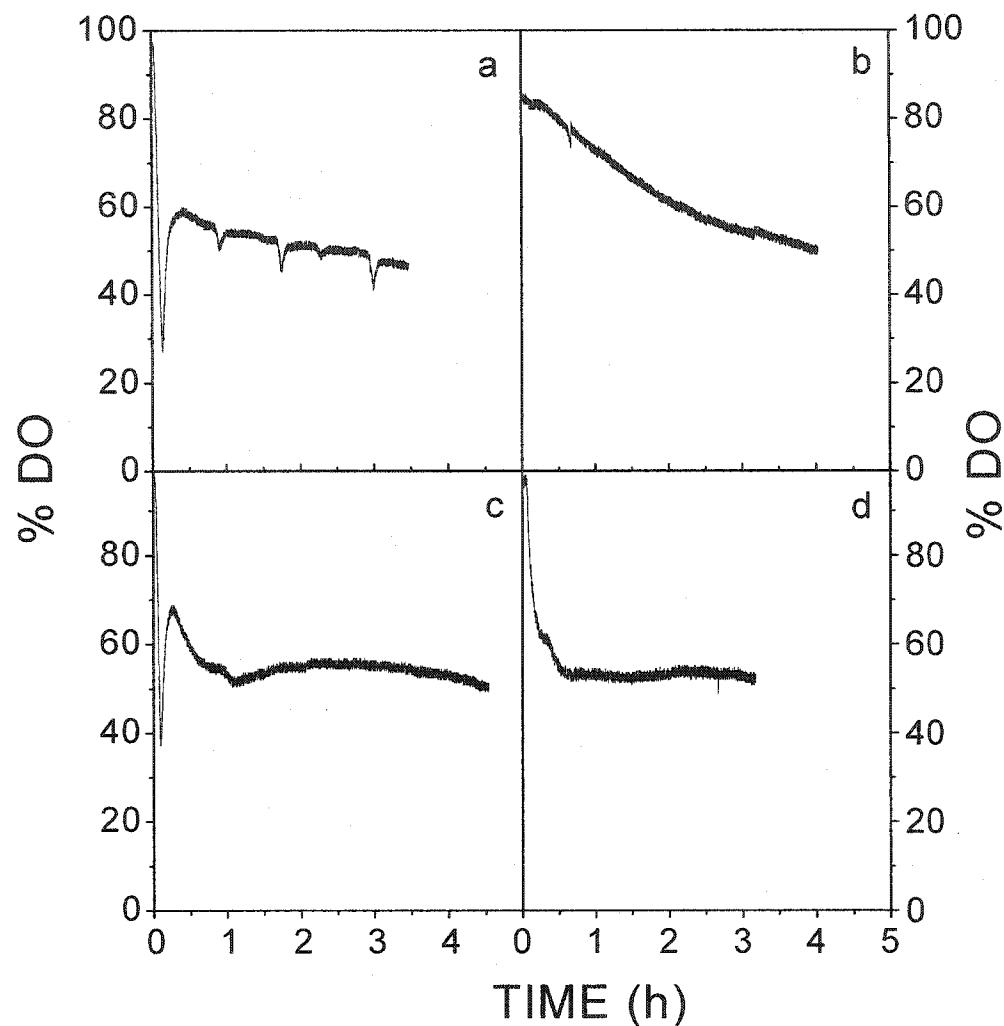
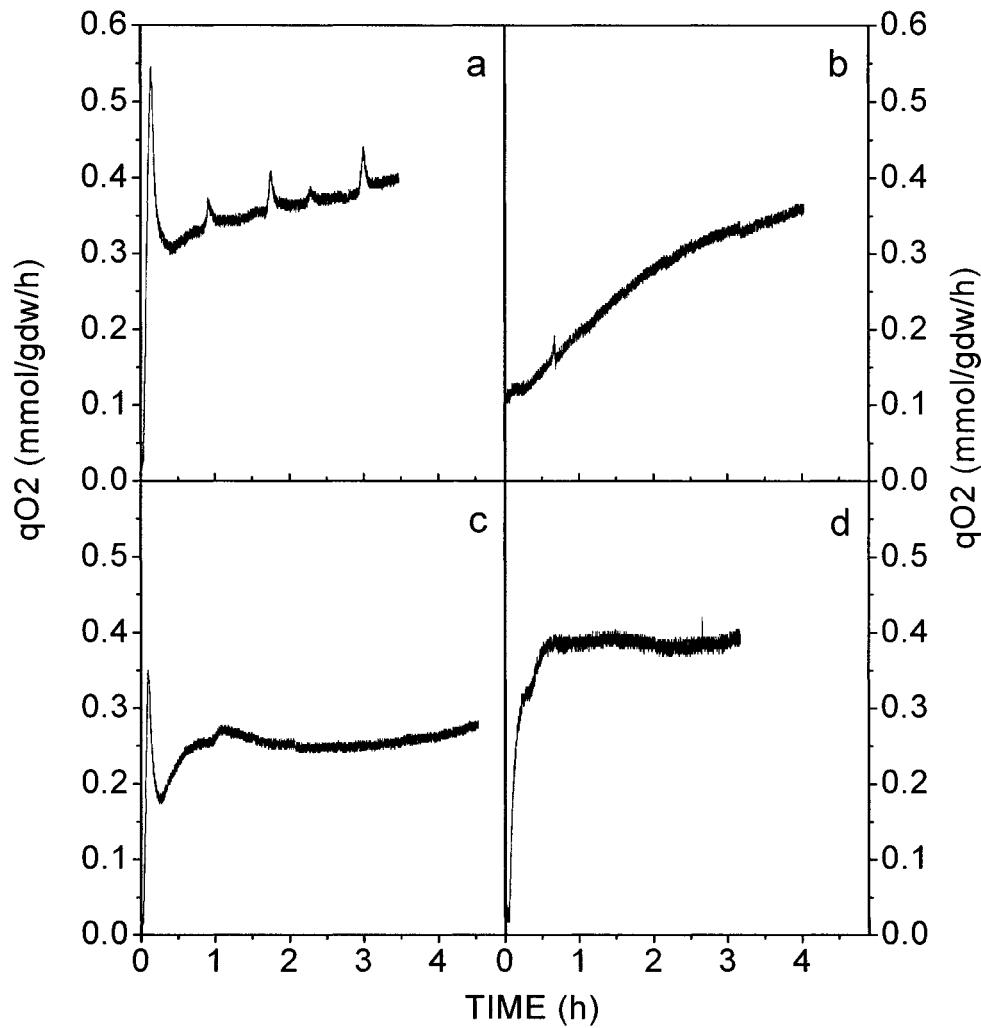


Figure 3.2: Bioreactor outlet dissolved oxygen concentration with *Eschscholtzia californica* plant cell bed and a medium perfusion rate of 1.6 mL/min. (a) 1d-old cells at lag phase. (b) 5d-old cells at exponential growth. (c) 6d-old cells at late exponential growth. (d)-10d old cells at stationary growth. Cells were obtained from shake flask culture as described in Material and Methods.

saturation. Surprisingly, the 5-d-old cells at exponential growth showed a lower oxygen demand as DO did not decrease rapidly, but slowly and almost linearly from bioreactor inoculation. The 1-d-old and 5-d-old cells, which are close when entering exponential growth and within exponential growth respectively, did not reach equilibrium in DO for the time of experiment. Variation of specific oxygen uptake rate (q_{O_2}) with time is even more useful in interpreting the DO results (Figure 3.3). q_{O_2} is a function of DO as well as of the cells' physiological state. The former implies that q_{O_2} may vary even at a DO higher than the critical value, which may be the case here. The q_{O_2} only increased for the metabolically active 1-d-old and 5-d-old cells, remaining at equilibrium for the less metabolically active 6-d-old and 10-d-old cells. It was observed that the 5-d-old and 6-d-old cells showed lower q_{O_2} than the 1-d-old and 10-d-old cells. An increase in cell number and cell bed density could not be involved in this phenomenon since the maximal cell growth rate of $0,14\text{h}^{-1}$ observed in shake flask cultures (unpublished results) can only account for a 4% increase in cells' dry weight after 4 h. Nor could a variation in the cells' viability be involved as shown in the next section. Plant cells are unfortunately known to show high variability levels in growth and secondary metabolite production. Their robustness towards diverse and additive stresses induced by changes in the environmental conditions when the cells are manipulated may be a function of the cells' metabolic activity. Overall, these results suggest that cells should be allowed one hour to recover from diverse stresses and reach stable metabolic activity. Then the experiment can proceed for three hours under non-limiting oxygen

conditions. Moreover, there are two adjustable parameters that allow the time of an experiment to be extended if required.



*Figure 3.3: Specific oxygen consumption rate for *Eschscholtzia californica* plant cell at a medium perfusion rate of 1.6 mL/min. Data points were calculated from an oxygen mass balance around the bioreactor for the dissolved oxygen data shown in Figure 3.2. (a) 1d-old cells. (b) 5d-old cells. (c) 6d-old cells. (d) 10d-old cells.*

The oxygen level in the gas oxygenating the culture medium can be increased and the medium flow rate to the bioreactor can also be increased up to 2.6 ml/min, beyond which channeling may become significant.

3.6.1.2 Maintaining Cell Integrity

The induction of multiple stresses on the cells from the experimental procedures has been discussed already in the previous section. Results on the q_{O_2} variation may be biased by variations in cell viability. A loss in cell viability will result in an increase in cell membrane permeability and, at worst, in cell lysis. An abnormal release of cell material such as enzymes will then occur. Lamboursain et al. (2002) have shown that loss of cell integrity can be related to the esterase activity of the culture medium. Perfused culture medium was harvested after 4 h at the outlet of the bioreactor and tested for esterase activity (Figure 3.4). It seems clear from the results that the bioreactor culture conditions do not significantly affect the integrity of the cells. The esterase activity of the medium from the shake flask cultures was not different to that observed after culture in the bioreactor and stayed at low levels compared with the 100% broken cells.

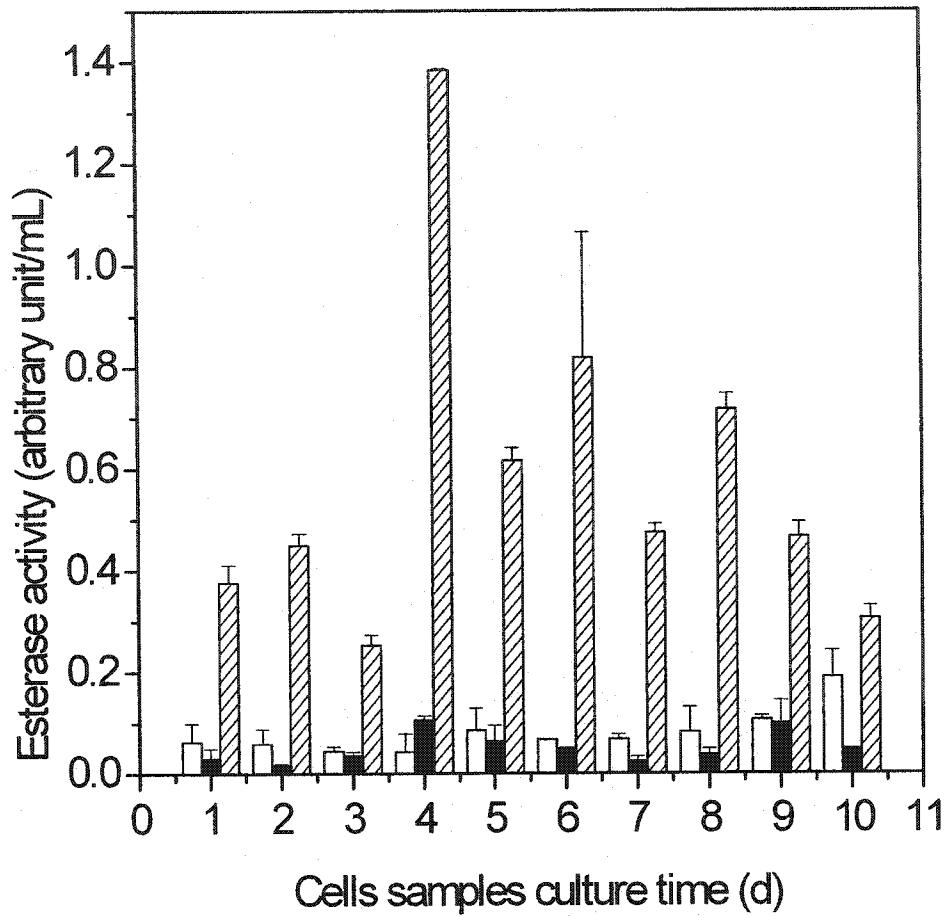


Figure 3.4: Esterase activity in used media from the perfused bioreactor. The cell samples culture time correspond to the culture time in shake flask. Empty bar: Medium at time zero. Solid bar: Medium at the end of the culture in the bioreactor. Hatched bar: Medium with 100% lysed cells. Error bars represent the standards deviation for the dispersion coefficient ($n = 3$).

3.6.2 The Bioreactor Allows for Perfectly Mixed Conditions within the Cell Bed

Having confirmed that the bioreactor was adequate for culturing viable cells at high density, the hydrodynamic characterization of the bioreactor was performed. The axial dispersion coefficient (D) decreased with perfusion rate and increased with cell age (Figure 3.5). It is interesting to note that all experimental conditions led to stable D values with time. This may suggest that cell bed compaction with time was minor and that the hydrodynamic behavior does not evolve with time. At perfusion rates of 0,8 ml/min and 1,6 ml/min, D was in the range of 1,0–1,3 m²/s and in the range of 0,2–0,4 m²/s at 2,6 ml/min. A decrease in the axial dispersion coefficient is generally related to the presence of channeling. Particle aggregation has been identified as a significant parameter in the occurrence of channeling in a fixed bed with a greater effect on particles below 2 mm (Berger et al., 2002). *E. californica* cell suspension contains single cells of $30 \mu\text{m} \pm 5 \mu\text{m}$ and a large amount of aggregates of different size ($\leq 114 \mu\text{m} \pm 20 \mu\text{m}$) (unpublished results). Moreover, cell and aggregate size distribution increases with culture time (data not shown), which is coherent with the lower D values obtained for older cells (Figure 3.5). Thus there is a risk of channeling through the cell bed at high flow rates. At high perfusion rates the medium could flow dominantly through preferential channels, which may explain the lower axial dispersion coefficients observed. The stresses induced at inoculation (e.g. 1-d-old cells), such as osmotic and nutritional stresses, may thus reduce cell and aggregate size distribution, resulting in stable dispersion with perfusion flow rate. Overall, with D values in the

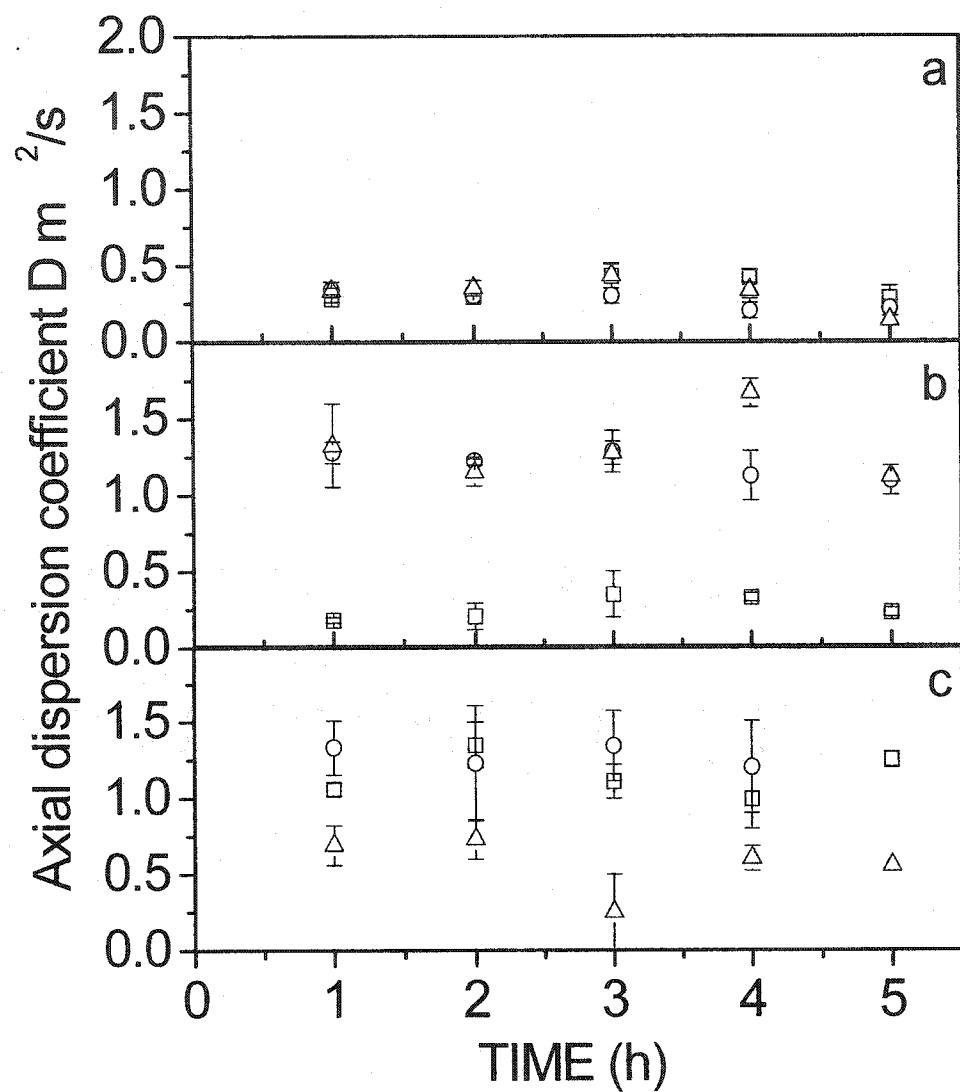
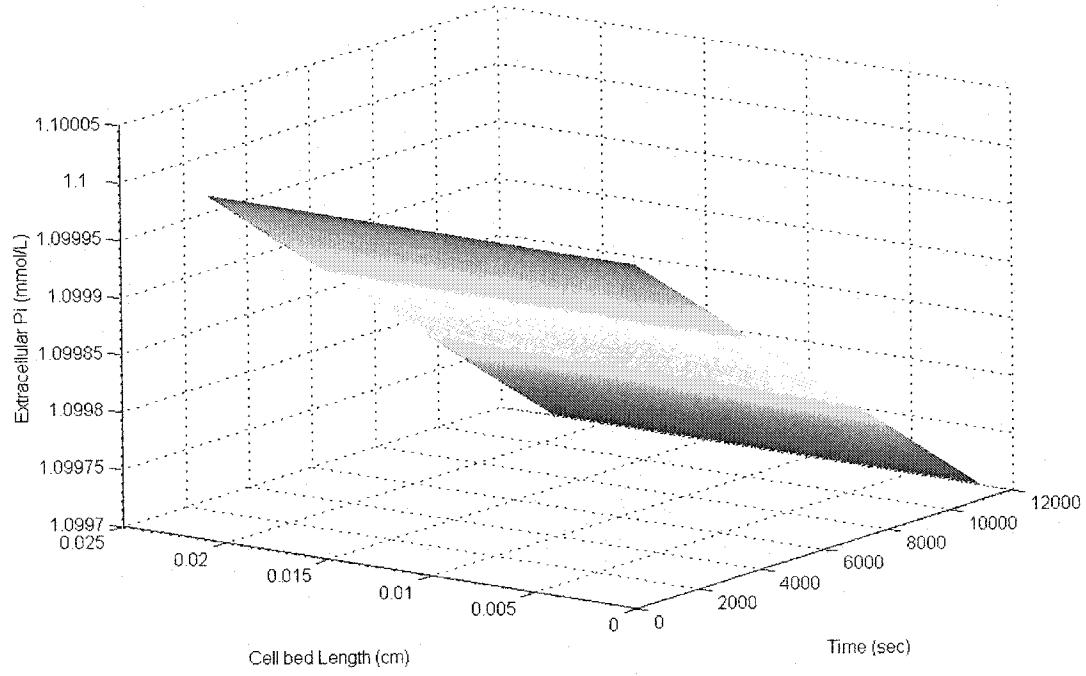


Figure 3.5: Axial dispersion coefficient (D) with culture time in the bioreactor and different perfusion rates. (\square) 0,8 mL/min, (\circ) 1,6 mL/min and (\triangle) 2,6 mL/min. (a) 1d-old cells. (b) 5d-old cells. (c) 10d-old cells. Error bars represent the standards deviation of the dispersion coefficient. ($n = 3$).

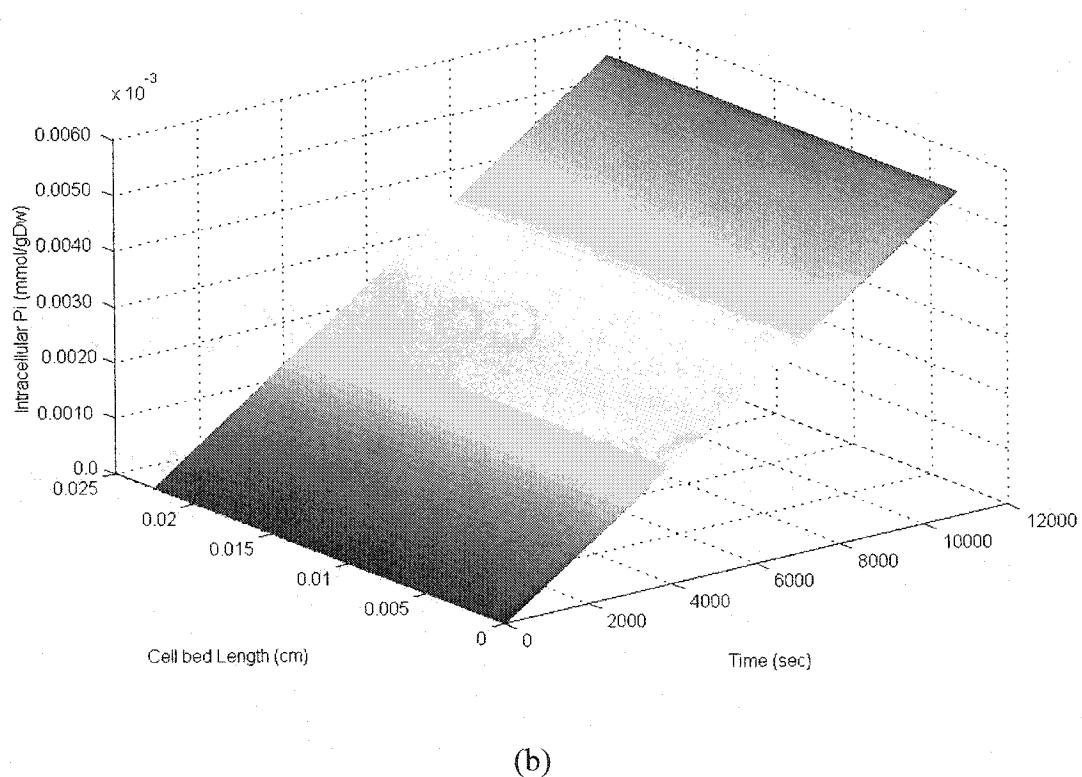
range of $0,2\text{--}1,3 \text{ m}^2/\text{s}$, it is clear that there is a large dispersion in the cell bed since the criteria for large dispersion is $0,2 \text{ m}^2/\text{s}$ as proposed by Babcock et al. (2002). This result suggests that the liquid medium is close to perfectly mixed within the cell bed (Levenspiel (1999)). The dispersion model may thus not represent the hydrodynamic within the cell bed, however, the use of a dispersion model is still useful to estimate cell bed compaction phenomena and qualify the level of channeling in the cell bed with time and cell age. In order to minimize the channeling, low to moderate perfusion rates are then recommended. Therefore, experiments were performed at a median value of $1,6 \text{ ml/min}$.

3.6.3 The Cell Bed is Homogenous in Extra and Intracellular Nutrient Profile with Time

Mass balance on intracellular Pi was developed to simulate Pi uptake by the cells and evaluate the potential for the establishment of non homogenous conditions in intracellular Pi among cells of the cell bed. From the results suggesting perfectly mixed conditions into the cell bed, it is not surprising to obtain a simulation showing homogenous conditions along the cell bed for a culture time of 4h, which is the duration of an expected experiment in NMR (Figure 3.6). The simulation also suggests that a perfusion rate of $1,6 \text{ ml/min}$ is higher than the cell uptake rate. Each cell in the bioreactor may thus sense the same extracellular Pi concentration and show the same



(a)



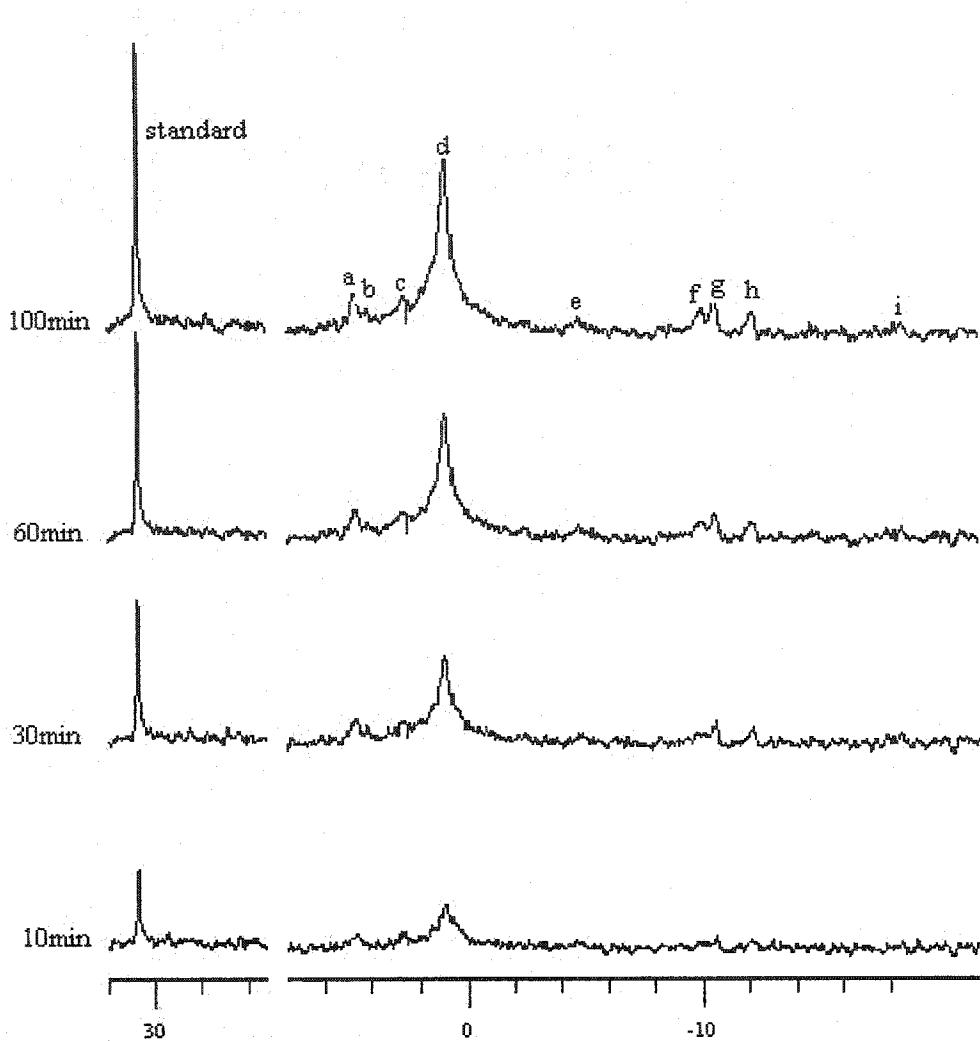
(b)

Figure 3.6: Simulated intracellular (a) and extracellular (b) Pi concentration with axial position into the cell bed. A perfusion rate of 1,6 mL/min and a D of 1,2 m/s² were used.

intracellular Pi contents as cytoplasmic and vacuolar. It is thought that all the cells may be at a similar physiological state, which is one of the major constraints in selecting or designing a high-throughput bioreactor. This result is highly important because the 10mm broad-band NMR probe measures average values for the cell bed volume analyzed (~70% of total cell bed). Heterogeneity within the cell bed or the presence of a profile can result in spectra of low significance with large broad peaks. The other nutrient showing a rapid uptake is oxygen and was investigated in a previous section.

3.6.4 The perfused bioreactor allows for *in vivo* ^{31}P NMR Spectroscopy

The perfused bioreactor's capacity to maintain cell viability with time was also assayed using *in vivo* NMR measurements to confirm the oxygen consumption assays. Cell intracellular pH changes with cell viability (Imai and Ohno, 1995) and ^{31}P NMR chemical shift is affected by the pH, resulting in diffused and ill-defined spectra. An *in vivo* experiment was then performed on 4-h-old *Eschscholtzia californica* cells in order to determine the acquisition time required to obtain an adequate signal-to-noise ratio (Figure 3.7). Cells were selected at early stage because of their large expected accumulation in Pi (Lamboursain and Jolicoeur, 2002). The identification of cytoplasmic and vacuolar Pi was verified from standard curves of ^{31}P chemical shift with pH in B5-F medium and in an intracellular-like synthetic medium (Figure 3.8), as described by Rijhwani et al. (1999). Cytoplasmic and vacuolar pH were estimated at around 7,0 and 5,0 respectively while comparing ^{31}P chemical shifts of 0,78 ppm and



*Figure 3.7: In vivo ^{31}P NMR cumulative spectra with time for 4h old *Eschscholtzia californica* cells cultured in shake flasks. 10d old cells were placed into fresh B5-F medium for 4h prior to the experiment. ^{31}P NMR spectra were recorded at 500, 1500, 3000, and 5000 scans, corresponding to acquisition times of 10min, 30min, 60min and 100min, respectively. a: G-6P; b: F-6P; c: Cytoplasmic Pi; d: Vacuole Pi; e: ADP β +ATP γ ; f: ATP α +ADP ω ; g: NADP+NDPG; h: NDPG; i: ATP β . 2M methanephosphonic acid solution was used as an external concentration standard, sealed in a capillary and put at the centre of the NMR tube into the medium outlet tube within the cell bed region.*

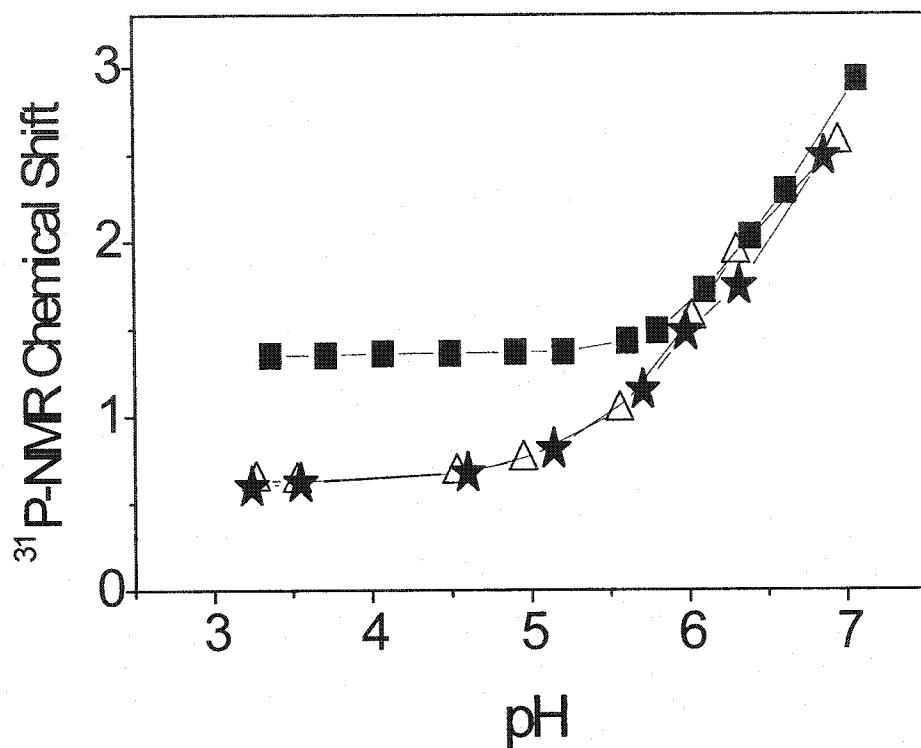


Figure 3.8: ^{31}P NMR chemical shift with pH for B5-F and intracellular-like synthetic media. (■) 90mL of B5 medium free of paramagnetic elements (B5-F), 10mL D_2O , glucose 1,50g and 0,50g KH_2PO_4 . (★) Intracellular-like synthetic media I containing: 0,124g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1ml 10mMKCl, 1mL 0,1M KH_2PO_4 and 10mL D_2O , adjusted to 100 ml with pure water. (△) Intracellular-like synthetic medium II containing: 0,124g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2ml 10mMKCl, 1mL 0,1M KH_2PO_4 and 10mL D_2O , adjusted to 100 ml with deionized water. The different pH solutions were adjusted using 1M HCl and 1M NaOH.

2,77 ppm in intracellular-like synthetic medium and literature. ^{31}P chemical shift at a pH of 5 in B5-F medium was at 1,4 ppm as compared to 2,77 ppm in intracellular-like synthetic medium. The medium ionic strength was shown to significantly affect the chemical shift at low pH (vacuolar-like). ^{31}P NMR spectrum can be recorded after only 10 min of spectral accumulation (500 scans) with peaks at 4,90 ppm, 3,90 ppm, 2,77 ppm, 0,78 ppm, -4,96 ppm, -10,14 ppm, -10,67 ppm, -12,26 ppm and -18,66 ppm that were marked as G-6P, F-6P, cytoplasmic Pi, vacuolar Pi, ATP $_{\gamma}$ and ADP $_{\beta}$, ATP $_{\alpha}$ and ADP $_{\alpha}$, NADP and NDPG, NDPG and ATP $_{\beta}$, respectively (Figure 3.7) (Rijhwani et al., 1999). After 100 min, a spectrum can be obtained with clear peaks allowing quantitative measurements for ATP, ADP, cytoplasmic Pi, vacuolar Pi, G-6P and F-6P at the same respective chemical shifts as after 10 min, 30 min and 60 min. Thus this result suggests that there was no ^{31}P chemical shift with time for the cells cultured in the bioreactor and, therefore, that cell viability is maintained. A second set of *in vivo* ^{31}P NMR experiments was performed using different cell samples taken from flask culture (Figure 3.9). At log phase (1 d), the cells had uptaken Pi and transported it into the vacuole. At exponential phase (5 d), the vacuolar Pi had been depleted and was under the detection limit while other identified metabolites were still visible. At stationary phase (10 d), the peaks for ATP and ADP were under the detection limit. The perfused bioreactor was clearly shown to be efficient in maintaining cell viability and producing rapid (10 min) and useful *in vivo* NMR measurements.

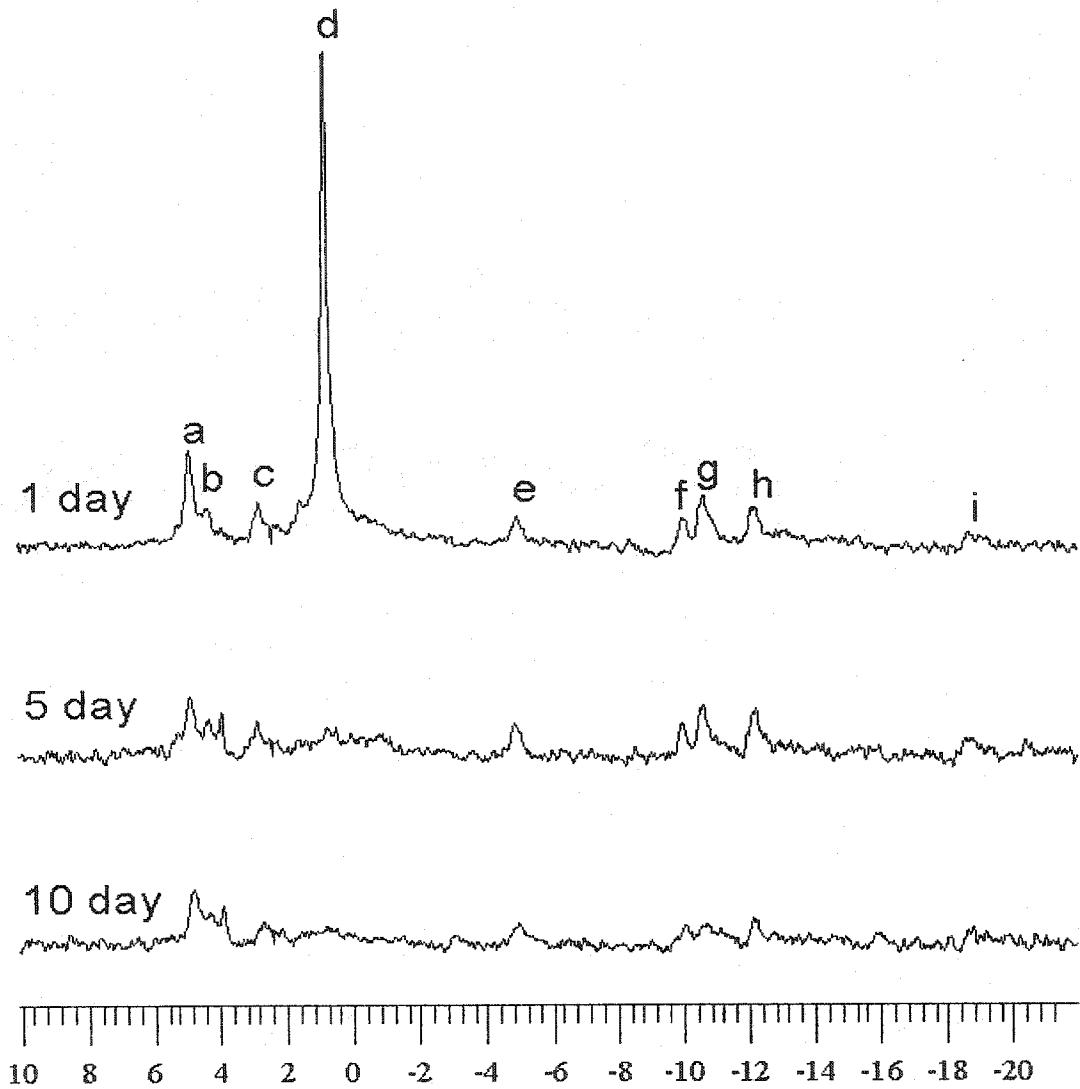


Figure 3.9: *In vivo* ^{31}P NMR spectra with culture time for *Eschscholtzia californica* cells cultured in shake flasks. a: G-6P; b: F-6P; c: Cytoplasmic Pi; d: Vacuole Pi; e: ADP β +ATP γ ; f: ATP α +ADP α ; g: NADP+NDPG; h: NADPG; i: ATP β . The spectra were acquired with 10000 scans corresponding to the total acquisition time is 200min.

3.7 Conclusion

The perfused bioreactor was shown to be suitable for maintaining the physiological state of high-density plant cells for up to 4 h under standard environmental conditions. This assumption of stable physiological state was based on two different parameters, namely, sufficient oxygen feeding and stable intracellular pH. Moreover, culture conditions in the bioreactor did not favor cell lysis or loss in cell integrity since no significant release of intracellular esterases was measured in the used culture media. It was also observed that the cell bed can be approximated to a perfectly mixed culture volume, thus suggesting that all cells will be submitted to the same environmental conditions. This result was a prerequisite for performing *in vivo* NMR. However, an important challenge will consist in improving the cell sampling procedure in order to reduce the time for recovering stable cell metabolic activity after perturbations resulting from cell transfer. The potential of using the perfused bioreactor for performing steady-state and transient metabolic studies on ^{31}P and on ^{13}C labeled sugar will be assayed on plant and animal cells. Finally, the bioreactor's capacity for performing multiple non-invasive analyses on a single cell sample using both optical sensors and *in vivo* NMR will be explored.

3.8 Acknowledgements

The Natural Science and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and the “Fonds québécois de la recherche sur la nature et les technologies” (FQRNT) operating grants funded this research project. The Canadian Foundation for Innovation (CFI) founded the NMR system used in this study.

3.9 References

- Aubert S, Bligny R, Douce R. 1996. NMR Studies of Metabolism in Cell Suspension and Tissues Cultures. Shachar-Hill Y, Pfeffer PE editors. Nuclear magnetic resonance in plant biology. Vol. 16. American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland, p 109 – 154.
- Babcock Jr RW, Malda J, Radway JC. 2002. Hydrodynamics and mass transfer in a tubular airlift photobioreactor. Journal of applied Phycology 14:169-184.
- Balcarcel RR, Clark LM. 2003. Metabolic screening of mammalian cell cultures using well-plates. Biotechnol Prog 19:98-108.

Berger RJ, Pérez-Ramírez J, Kapteijn F, Moulijn JA. 2002. Catalyst performance testing radial and axial dispersion related to dilution in fixed-bed laboratory reactors. Applied Catalysis 227:321-333.

Blanch HW, Clark DS. 1997. Biochemical Engineering. New York: Marcel Dekker. 702 p.

Bligny R, Douce R. 2002. NMR and plant metabolism. Current opinion in plant biology 4:191-196.

Brenda K, Shanks M, Shanks JV. 1996. Influence of aeration on cytoplasmic pH of yeast in an NMR airlift bioreactor. Biotechnol Prog 12:257-265.

Castro CD, Koretsky AP, Domach MM. 1999. Performance trade-offs in in situ chemostat NMR. Biotechnol Prog 15:185-195.

Daniel H, Streatfield SJ, Wycoff K. 2001. Medical molecular framing: Production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. Trends Plant Sci 6(5): 219-226.

Doran PM. 1995. In Bioprocess Engineering Principles. Doran PM, Ed.; San Diego: Academic press. 439 p.

Fogler HS. 1999. Element of chemical reaction engineering, 3rd ed. New Jersey: Prentice Hall. 937 p.

Gamborg OL, Miller RA, Ojima K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res* 50:151-156.

Haas CN, Joffe J, Heath MS, Jacangelo J. 1997. Continuous Flow Residence Time Distribution Function Characterisation. *Journal of environmental engineering* Feb:170-114.

Imai T, Ohno T. 1995. The Relationship between Viability and Intracellular pH in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* 61: 3604-3608

Jolicoeur M, Bouchard-Marchand E, Bécard G, Perrier M. 2002. Regulation of mycorrhizal symbiosis: development of a structured nutritional dual model. *Ecological Modelling* 158:121-142.

Kostov Y, Harms P, Randers-Eichhorn L, Rao G. 2001. Low-cost microbioreactor for high-throughput bioprocessing. *Biotechnol Bioeng* 72:346-352.

Lamboursain L, and Jolicoeur M. 2002. In Vitro of Secondary Metabolites by Plant Cells: The Crucial Role of the Cell Nutritional. Proceedings of the 10th International Association for Plant Tissue Culture and Biotechnology Congress, IK Vasil Ed, Kluwer Academic Publ. 491-495.

Lamboursain L, St-Onge F, Jolicoeur M. 2002. A lab built respirometer for plant and animal cell culture. *Biotechnology Prog.* 14:1377-1386.

Lamping SR, Zhang H, Allen B, Ayazi Shamlou P. 2003. Design of a prototype miniature bioreactor for high throughput automated bioprocessing. *Chem Eng Sci* 58:747-758.

Levenspiel O. 1999. *Chemical reaction engineering*. 3rd ed. New York: Wiley. 668 p.

Petersen EF, Fishbein KW, McFarland EW, Spencer RGS. 2000. ³¹P NMR spectroscopy of developing cartilage produced from chick chondrocytes in a hollow-fiber bioreactor. *Magnetic Resonance in Medicine* 44:367-372.

Plaxton C William. 1998. Metabolic aspects of phosphate starvation in plants. Lynch JP, Deikman J. (Eds), *Phosphorus in plant biology: Regulatory roles in molecular, Cellular, Organismic, and Ecosystem processes*. Vol. 19. American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland, p. 229-241.

Quiker GH, Schumpe A, König B, Dekwer WD. 1981. Comparison of measures and calculated oxygen solubilities in fermentation media. Biotechnol Bioeng 23:635-650.

Riggs JB. 1988. An Introduction to numerical method for chemical engineering. Ed. Texas : Texas tech. University Press. 560p.

Rijhwani SK, Ho CH, Shanks JV. 1999. In vivo ^{31}P and multilabel ^{13}C NMR measurements for evaluation of plant metabolic pathways. Metabolic Eng 1:12-25.

Schachtman DP, Reid RJ, Ayling SM. 1998. Phosphorus uptake by plants: from soil to cell. Plant physiol 116:447-453.

Scragg AH. 1995. The problems associated with high biomass levels in plant cell suspension. Plant cell, Tissue and organ culture 43:163-170.

Smith WS. 1999. The scientist and engineer's guide to digital signal processing. 2nd ed. California Technical Publishing. 640p.

Steward N, Martin R, Engasser JM. 1999. A new methodology for plant cell viability assessment using intracellular esterase activity. Plant cell Rep 19:171-176.

Ulber R, Frerichs JG, Beutel S. 2003. Optical sensor systems for bioprocess monitoring. *Anal Bioanal Chem* 376:342-348.

Yu Su-May. 1999. Cellular and genetic responses of plant sugar starvation. *Plant Physiol* 121:687-693.

4 Conclusion

L'objectif principal de ce projet de recherche était de concevoir et caractériser un bioréacteur de petite échelle capable de maintenir des cellules végétales dans un état physiologique stable afin d'effectuer des études en RMN *in vivo*. La suspension cellulaire est introduite dans le bioréacteur (tube de RMN de 10 mm) pour former un lit compact de cellules. Le lit compact est de 2,5 cm de haut (couvrant la zone de lecture du RMN). La densité cellulaire est maximisée et la lecture de la concentration en nutriments et métabolites devient possible et quantifiable. Pour maintenir les cellules en vie, il faut leur fournir les nutriments dont elles ont besoin et évacuer les déchets et produits qui peuvent être toxiques. Selon la littérature, un système alimenté en perfusion a semblé être le plus adéquat. Pour que l'état physiologique des cellules soit stable, la concentration en oxygène dissous doit être d'au moins 50% de la saturation en air. En se basant sur cette information, le débit de perfusion minimum a été établi pour chaque lit cellulaire selon l'âge des cellules qui le compose. Les débits de perfusion sont de 0,8 mL/min pour les cellules en phase stationnaire (entre 8 à 10 jours), de 1,6 mL/min pour les cellules en phase de latence entre (1 à 2 jours) et de 2,6 mL/min pour les cellules en phase exponentielle de croissance (entre 3 et 7 jours).

Le lit de cellules doit cependant être homogène car le signal RMN représente une moyenne sur le lit. Pour cela, une modélisation hydrodynamique du lit compact a été

effectuée. Le modèle de dispersion axiale a été choisi. Les tests ont été effectués sur des cellules à différentes phases de la croissance (phase de latence, phase exponentielle et phase stationnaire) et avec différents débits de perfusion (0,8, 1,6 et 2,6 mL/min). Tous les tests ont été effectués en triplicatas. Les coefficients de dispersion axiale varient de 0,2 à 1,3 m/s², ce qui indique une dispersion élevée. Le mélange dans le lit cellulaire est adéquat. L'homogénéité du lit cellulaire a été testée en effectuant une simulation portant sur le bilan de matière du phosphate inorganique dans le lit compact (milieu nutritif perfusant et milieu intracellulaire). Les résultats de la simulation montrent un profil plat de la concentration du Pi extracellulaire selon la position dans le lit de cellule, ce qui indique que le lit cellulaire est parfaitement bien mélangé.

Par la suite, plusieurs cultures de cellules d'*E. californica* ont été effectuées dans le bioréacteur perfusé sur des cellules à différents stades de croissance et à des débits de perfusion minimum déjà calculés. Chaque culture a duré 4 h avec un suivi de l'oxygène dissous a été effectué. Les résultats de ces cultures en bioréacteur perfusé montrent que l'oxygène est suffisant et que l'état physiologique des cellules est stable.

Pour terminer la caractérisation du bioréacteur, une vérification du taux de cisaillement des cellules dans le lit compact a été faite. Le test de viabilité représente un test enzymatique visant à déterminer l'activité des enzymes estérases présentes dans le milieu de culture avant et après la culture en bioréacteur. Les résultats étaient concluants, les cellules ne subissent aucune lyse durant la culture dans le système de

RMN. Ainsi le bioréacteur en perfusion développé est adéquat pour faire de la RMN *in vivo* avec des suspensions de cellules végétales.

Finalement, suite aux résultats obtenus, quelques recommandations sont à faire. Tout d'abord, il serait intéressant d'effectuer le bilan de matière sur le phophate intra et extra cellulaire sur des cellules qui ne sont pas dans la phase exponentielle. L'hypothèse d'un taux de croissance spécifique constant ne sera donc plus valide. Cela complèterait l'étude sur la disponibilité des nutriments durant une culture de cellules de dix jours.

Ensuite, l'étude sur la viabilité des cellules devrait être complétée par un suivi de l'oxygène dissous durant 24 heures d'une culture en bioréacteur. Finalement, pour que la validation de ce système en perfusion soit complète, il faudrait effectuer des études en RMN sur des cellules mammifères, des levures ou d'autres cellules végétales.

Bibliographie

AUBERT, S., BLIGNY, R., DOUCE, R. (1996). NMR Studies of Metabolism in Cell Suspension and Tissues Cultures. Dans: *Nuclear magnetic resonance in plant biology*. Vol. 16. American Society of Plant Physiologists. Shachar-Hill, Y., Pfeffer, P.E. Rockville, Maryland. P. 109 – 154.

BABCOCK Jr, R.W., MALDA, J., RADWAY, J.C. (2002). Hydrodynamics and mass transfer in a tubular airlift photobioreactor. *Journal of applied Phycology*. 14. 169-184.

BALCARCEL, R.R., CLARK, L.M. (2003). Metabolic screening of mammalian cell cultures using well-plates. *Biotechnol. Prog.* 19. 98-108.

BERGER, R.J.; PÉREZ-RAMÍREZ, J., KAPTEIJN, F., MOULIJN, J.A. (2002). Catalyst performance testing radial and axial dispersion related to dilution in fixed-bed laboratory reactors. *Applied Catalysis*. 227. 321-333.

BLANCH, H.W., CLARK, D.S. (1997). *Biochemical Engineering*. New York: Marcel Dekker. 702p.

BLIGNY, R., DOUCE, R. (2002). NMR and plant metabolism. *Current opinion in plant biology*. 4. 191-196.

BRENDA, K., SHANKS, M., SHANKS, J.V. (1996). Influence of aeration on cytoplasmic pH of yeast in an NMR airlift bioreactor. *Biotechnol. Prog.* 12. 257-265.

CANET, D. (1991). *La RMN concepts et méthodes*. Paris : InterEditions. 203p.

CASTRO, C.D., KORETSKY, A.P., DOMACH, M.M. (1999). Performance trade-offs in in situ chemostat NMR. *Biotechnol. Prog.* 15. 185-195.

DANIEL, H., STREATFIELD, S.J., WYCOFF, K. (2001). Medical molecular framing: Production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. *Trends Plant Sci.* 6:5. 219-226.

DORAN, P.M. (1995). In *Bioprocess Engineering Principles*. San Diego: Academic press. 439p.

EPSTEIN, E. (1972). *Mineral Nutrition of plants: Principles and Perspectives*. San Diego: Wiley and Sons. 70p.

FOGLER, H.S. (1999). *Element of chemical reaction engineering*, 3rd ed. New Jersey : Prentice Hall. 937p.

FOX, G.G., RATCLIFFE, R.G., SOUTHON, T.E. (1989). Airlift systems for in vivo NMR spectroscopy of plant tissues. *J. Magn. Reson.* 82. 360-366.

FRIEBOLIN, H. (1993). Basic One- and Two-Dimensional NMR Spectroscopy. 2nd ed. New York : VCH Publishers. 368p.

GAMBORG, O.L., MILLER, R.A., OJIMA, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50. 151-156.

HAAS, C.N., JOFFE, J., HEATH, M.S., JACANGELO, J. (1997). Continuous Flow Residence Time Distribution Function Characterisation. *Journal of environmental engineering*, Feb. 170-114.

HARDIN, M.T. HOWES, T., MITCHELL, D.A., WHITTAKER, A.K. (2002). Axial mixing in rotating drums using magnetic resonance imaging using bran as a model for solid state fermentations. *Biotechnol. Letters.* 24. 521-525.

IMAI, T., OHNO, T. (1995). The Relationship between Viability and Intracellular pH in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61. 3604-3608.

JOHNSON, N. L., KOTZ, S., BALAKRISHNAN, N. (1994). *Continuous univariate distributions*. New York : Wiley Interscience. 784p.

JOLICOEUR, M., BOUCHARD-MARCHAND, E., BÉCARD, G., PERRIER, M. (2002). Regulation of mycorrhizal symbiosis: development of a structured nutritional dual model. *Ecological Modelling*. 158. 121-142.

JOLICOEUR, M., WILLIAMS, R.D., CHAVARIE, C., FORTIN, J.A., ARCHAMBAULT, J. (1999). Production of endomycorrhizae propagules in bioreactors. *Biotechnol. Bioeng.* 64. 224-232.

KOSTOV, Y., HARMS, P., RANDERS-EICHHORN, L., Rao, G. (2001). Low-cost microbioreactor for high-throughput bioprocessing. *Biotechnol. Bioeng.* 72. 346-352.

KRAMER, H. W., BAILY, J.E. (1991). Mass transfert characterization of an airlift probe for oxygenating and mixing cell suspensions in an NMR spectrometer. *Biotechnol. Bioeng.* 37. 205-209.

KREYSZIG, E. (1999). *Advanced engineering mathematics*. 8th ed. New York : John Wiley & Sons Inc. 1156p.

LAMBOURSAIN, L., and JOLICOEUR, M. (2002). In Vitro of Secondary Metabolites by Plant Cells: The Crucial Role of the Cell Nutritional. Proceedings of the 10th International Association for Plant Tissue Culture and Biotechnology Congress, IK Vasil Ed, Kluwer Academic Publ. 491-495.

LAMBOURSAIN, L., st-ONGE, F., JOLICOEUR, M. (2002). A lab built respirometer for plant and animal cell culture. *Biotechnology Prog.* 14. 1377-1386.

LAMPING, S.R., ZHANG, H., ALLEN, B., AYAZI SHAMLOU, P. (2003). Design of a prototype miniature bioreactor for high throughput automated bioprocessing. *Chem. Eng. Sci.* 58. 747-758.

L'ÉCUYER-COELHO, H. (2000). *Développement d'un procédé pour la culture à haute concentration de cellules végétales.* 177p. Mémoire de maîtrise en génie chimique, École Polytechnique de Montréal, Canada.

LEVENSPIEL, O. (1999). *Chemical reaction engineering.* 3rd ed. New York : Wiley. 668p.

MELVIN, B. K., SHANKS, J.V. (1996). Influence of aeration on cytoplasmic pH of yeast in an NMR airlift bioreactor. *Biotechnol. Prog.* 12. 257-265.

NEUMAN, E. B., BUFFHAM, B. A. (1983). Mixing in continuous flow systems. New York : John Wiley & Sons Inc. 271p.

PETERSEN, E.F., FISHBEIN, K.W., MCFARLAND, E.W., Spencer, R.G.S. (2000). ^{31}P NMR spectroscopy of developing cartilage produced from chick chondrocytes in a hollow-fiber bioreactor. *Magnetic Resonance in Medicine*. 44. 367-372.

PLAXTON, W. (1999). Metabolic aspects of phosphate starvation in plants. *Phosphorus in plant biology: Regulatory roles in molecular, Cellular, Organismic, and Ecosystem processes*. Vol. 19. American Society of Plant Physiologists. Rockville, Maryland: Lynch, J.P., Deikman, J. (Eds). p. 229-241.

QUIKER, G.H., SCHUMPE, A., KÖNIG, B., DEKWER, W.D. (1981). Comparison of measures and calculated oxygen solubilities in fermentation media. *Biotechnol. Bioeng.* 23. 635-650.

RIGGS, J. B. (1988). *An Introduction to numerical methode for chemical engineering*. Texas : Texas tech. University Press. 560p.

RIJHWANI, S.K., HO C.H., SHANKS J.V. (1999). In vivo ^{31}P and multilabel ^{13}C NMR measurements for evaluation of plant metabolic pathways. *Metabolic Eng.* 1. 12-25.

RIOUX, F. (1996). *Modélisation de la phase de croissance de Eschscholtzia Californica.* 142p. Mémoire de maîtrise en génie chimique, École Polytechnique de Montréal, Canada.

ROBY, C., MARTIN, J.B., BLIGNY, R. DOUCE, R. (1987). Biochemical changes during sucrose deprivation in higher plant cells. *J. Biol. Chem.* 262. 5000-5007.

ROUESSAC, F., ROUESSAC, A. (1997). *Analyse chimique, méthodes et techniques instrumentales modernes.* 3^{eme} ed. Paris : Masson. 372 p.

SALUSBURY, F. B., ROSS, C. W. (1992). *Plant physiology.* 4th ed. Belmont, California : Wadsworth publishing company. 682p.

SCHACHTMAN, D.P., REID, R.J., AYLING, S.M. (1998). Phosphorus uptake by plants: from soil to cell. *Plant physiol.* 116. 447-453.

SCRAGG, A.H. (1995). The problems associated with High Biomass Levels in Plant Cell Suspensions. *Plant Cell, Tissue and Organic Culture.* 43. 163-170.

SIROIS, J. (1997). *Optimisation de la croissance de cellules d'Eschscholtzia Californica en bioréacteur.* 293p. Mémoire de maîtrise en génie chimique, École Polytechnique de Montréal, Canada.

SMITH, W.S. (1999). *The scientist and engineer's guide to digital signal processing,* 2nd ed. San Diego : California Technical Publishing. 640p.

STEWARD, N., MARTIN, R., ENGASSER, J.M. (1999). A new methodology for plant cell viability assessment using intracellular esterase activity. *Plant cell. Rep.* 19. 171-176.

THEODOROU, M.E., PLAXTON, W.C. (1993). Metabolic adaptations of plant respiration to nutritionnal phosphate deprivation. *Plant physiol.* 101. 339-344.

TIKHOMIROFF, C. (2001). *Étude des métabolismes primaire et secondaire de racines transformées de Catharanthus Roseus en vue du développement d'un modèle cinétique.* 239 p. Mémoire de maîtrise en génie chimique, École Polytechnique de Montréal, Canada.

ULBER, R., FRERICHS, J.G., BEUTEL, S. (2003). Optical sensor systems for bioprocess monitoring. *Anal. Bioanal. Chem.* 376. 342-348.

VERPOORTE , R., VAN DER HEIJDEN,R., SCHRIJFSEMA, J. (1993). Plant cell biotechnology for production of alkaloids: present status and prospects. *Journal of natural products.* 56. 186 – 207.

VILLENEUVE, P. E., WENGER, K. S., THOMPSON, B. G., KEDAR, T., DUNLOP, E. H. (1994). Development of a celss bioreactor : oxygen transfer and micromixing in parabolic flight. *Adv. Space Res.* 14:11. 75-78.

YU, S.M. (1999). Cellular and genetic responses of plant sugar starvation. *Plant Physiol.* 121. 687-693.

Annexes

Annexe A. Résultats expérimentaux

A.1 Culture des cellules

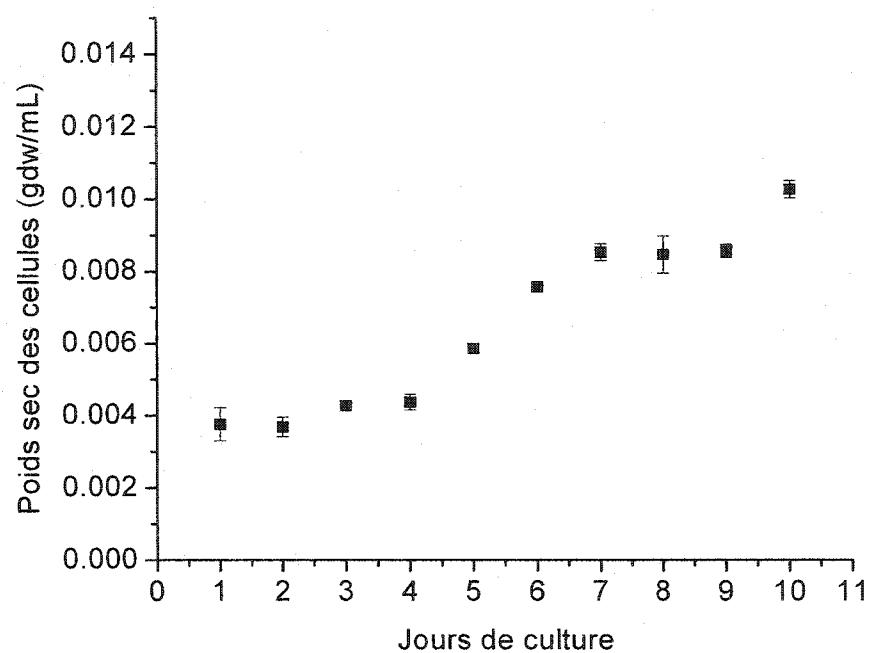


Figure A. 1: Courbe de croissance d'*Eschscholtzia californica*.

Tableau A.1: Composition du milieu B5

Sels Majeurs	mg/L	mM
KNO ₃	2500	25
MgSO _{4.7 H₂O}	250	1.0
(NH ₄) ₂ SO ₄	134	1.0
NaH ₂ PO _{4.2 H₂O}	150	1.1
CaCl _{2.2 H₂O}	150	1.0
Micronutriments		µM
KI	75	4.5
H ₃ BO ₃	3.0	50
MnSO _{4.H₂O}	10	60
ZnSO _{4. H₂O}	2.0	7.0
Na ₂ MoO _{4.2 H₂O}	0.25	1.0
CuSO _{4.5 H₂O}	0.025	0.1
CoCl _{2.6 H₂O}	0.025	0.1
EDTA-ferrique	43.0	100
Vitamines		
Myo-insitol	100	
Acide nicotique	1.0	
Pyridoxine HCl	1.0	
Thiamine HCl	10.0	
Hormones		
Kinétine	0.1	
Acide 2-4 dichlorophénoxyacétique	0.2	
Glucose	30 g/L	
pH	ajusté à 5.6	

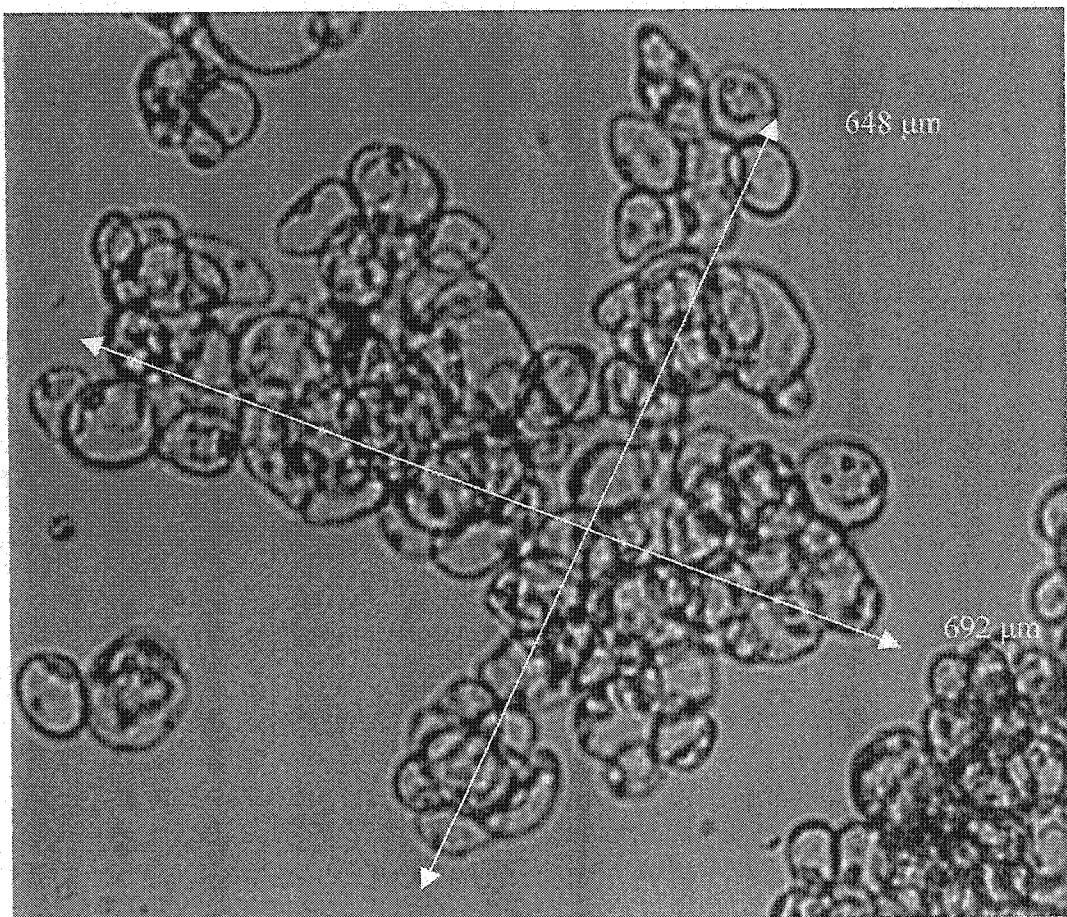


Figure A.2: Photographie des aggrégats de cellules (*E. Californica*) sur une culture âgée de 2 jours. Contraste de phase 1, 40 X.

A.2 Suivi de l'oxygène dissous dans le lit de cellules durant la culture en tube de RMN

Tableau A.2: Débit minimal de perfusion pour chaque jour de culture, les valeurs de qO_2 sont tirés de Lamboursain et al. (2002)

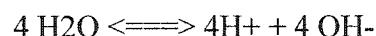
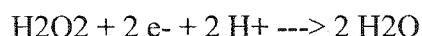
jours	Débit minimal de perfusion mL/min	qO_2 mmol/gdw.h
1	1.34	0.33
2	1.94	0.4
3	2.45	0.51
4	2.40	0.49
5	2.22	0.51
6	1.93	0.34
7	1.67	0.33
8	0.56	0.21
9	0.46	0.18
10	0.76	0.22
Moyenne des débits	1.57	

Tableau A.3: Volume de suspension cellulaire introduit dans la sonde de RMN pour former un lit cellulaire de 2 cm en fonction de l'âge de la suspension cellulaire

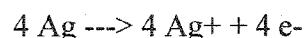
Jours	Volume de suspension (mL)
1	7.5
2	7.5
3	7.5
4	7.5
5	5
6	5
7	4
8	2.5
9	2.5
10	2.5

A.2.1 - Sonde à oxygène dissous:

La sonde utilisée est une sonde polarographique basée sur une méthode électrochimique pour mesurer la concentration en oxygène. Le diagramme obtenu entre l'oxygène dissous et la différence de potentiel obtenu s'appelle un polarogramme. L'électrode est constituée par une cathode en platine et une anode en argent reliée par une solution de KCl conductrice. Cet ensemble est séparé du milieu à étudier par une membrane de téflon. Celle-ci est imperméable à l'eau et aux ions, ce qui garantit la constance de la concentration de la solution de KCl, mais perméable à l'oxygène dissous dans le milieu. Dans ces conditions, l'oxygène est réduit en eau par les électrons délivrés par la cathode en platine :



La solution de KCl entièrement dissociée ($\text{K}^+ + \text{Cl}^-$) permet à l'argent de l'anode de donner 4 électrons :

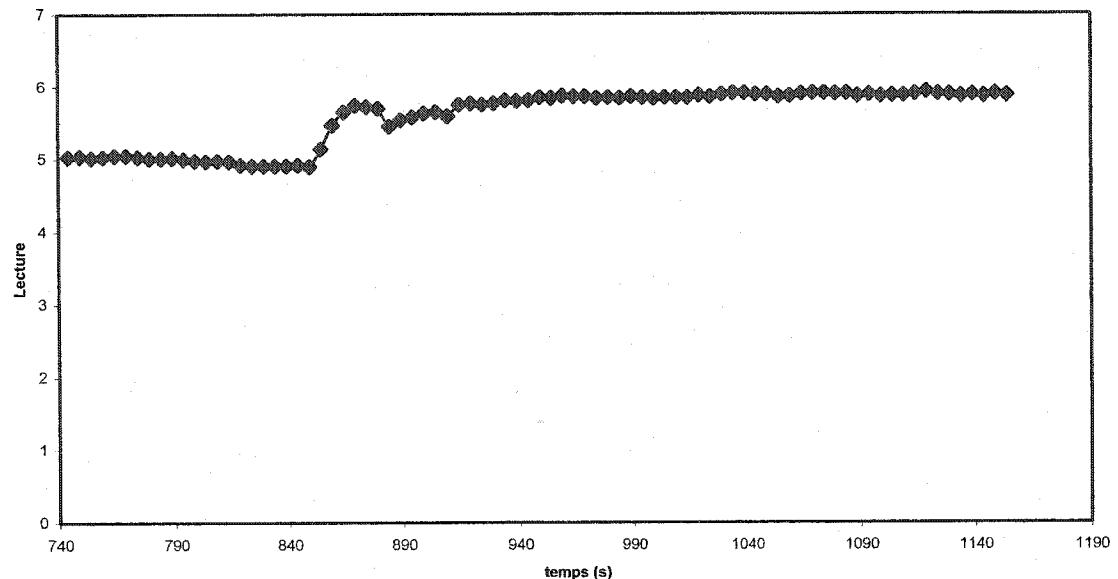


Le courant produit est proportionnel à la concentration en oxygène de la solution de KCl. Par suite de la solubilité de la membrane de téflon à l'oxygène, cette concentration est en équilibre avec la concentration en oxygène dans le milieu et donc le courant est proportionnel, après un certain temps de latence, à la concentration en oxygène du milieu.

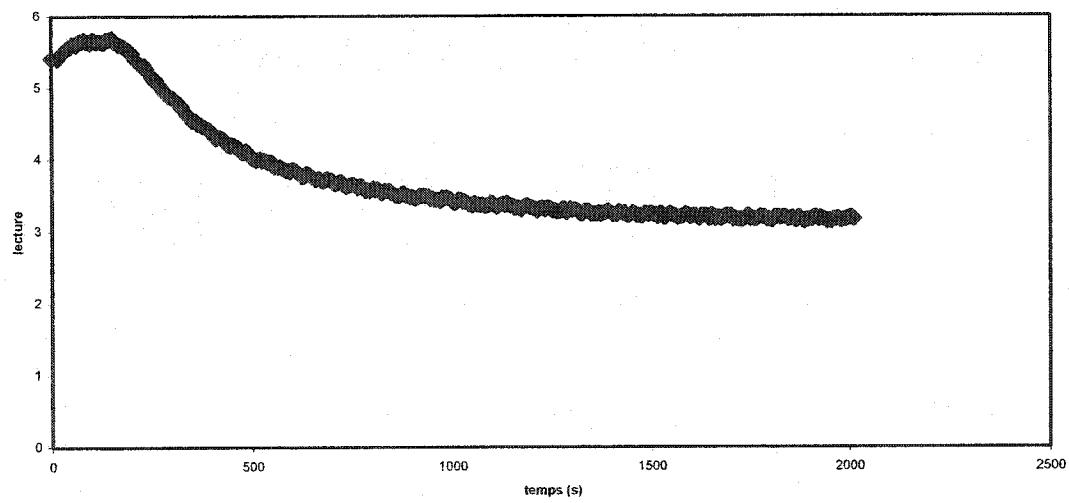
Le contrôle de la température est important puisque le signal est sensible aux variations de température : 3%/°C. Les sources d'erreurs les plus fréquentes sont les suivantes:

- Encrassement de membrane,
- Changement de forme de la membrane,
- La variation de tension ou de la résistance électrique
- Présence de bulles sur la membrane.

La précision de mesure de cet instrument est de $\pm 5\%$ environ. En dessous d'une saturation de 5% en oxygène, l'erreur augmente avec la diminution de la pression partielle en oxygène. La calibration de la sonde a été effectuée avant chaque étude de l'oxygène dissous et plusieurs changements de membrane et d'électrolytes ont été faits.

bullage d'air

(a)

Bullage d'azote

(b)

Figure A.3: Courbes de calibration de la sonde d'oxygène (échelle de 6.5): (a) 100% d'air correspond à une lecture de la sonde de 6.0. (b) 0% d'air (100% azote) correspond à une lecture de la sonde de 3.3.

Respiration des cellules EC6 âgées de 2 jours avec un débit de 1,6 mL/min

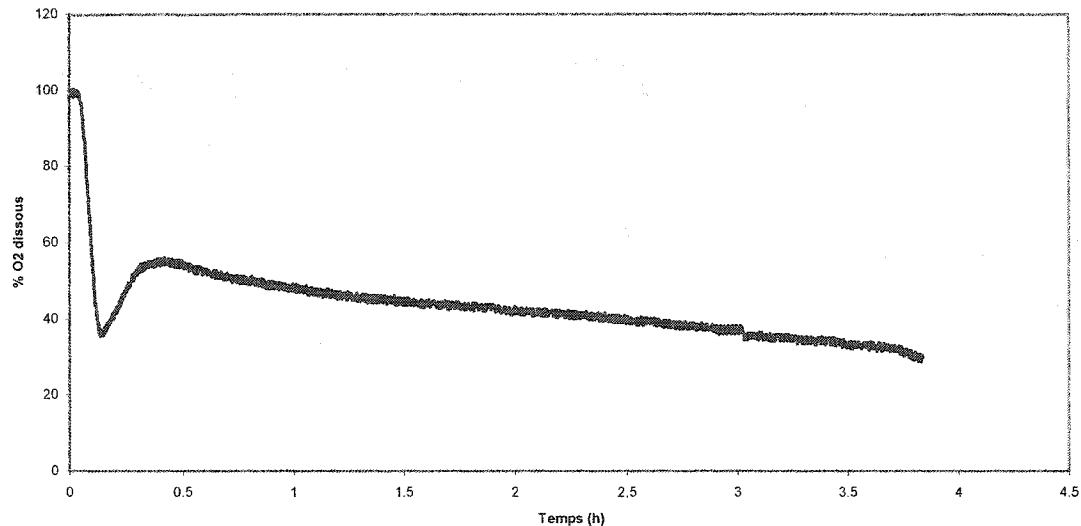


Figure A.4: Suivi de l'oxygène dissous dans le lit cellulaire formé de cellules âgées de 2 jours et un avec un débit de perfusion de 1,6 mL/min.

Respiration des cellules EC6 âgées de 3 jours avec un débit de 2,6 mL/min

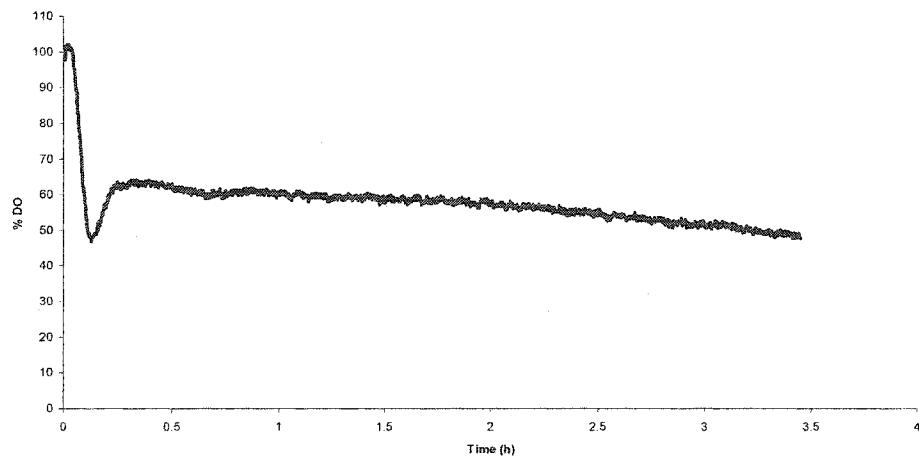


Figure A.5: Suivi de l'oxygène dissous dans le lit cellulaire formé de cellules âgées de 3 jours et un avec un débit de perfusion de 2,6 mL/min.

Respiration des cellules EC6 âgées de 4 jours avec un débit de 2,6 mL/min

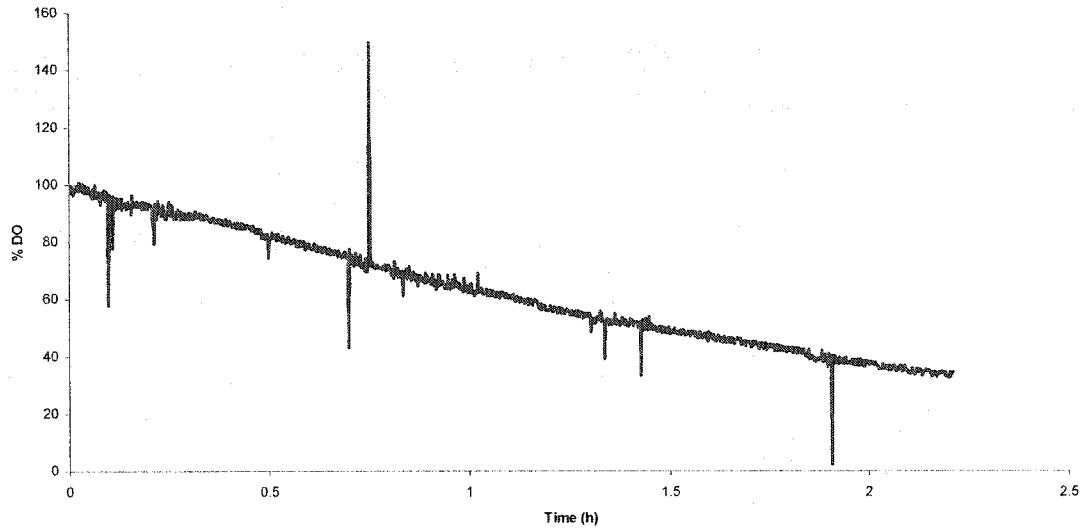


Figure A.6: Suivi de l'oxygène dissous dans le lit cellulaire formé de cellules âgées de 4 jours et un avec un débit de perfusion de 2,6 mL/min.

Respiration des cellules EC6 âgées de 7 jours avec un débit de 1,6 mL/min

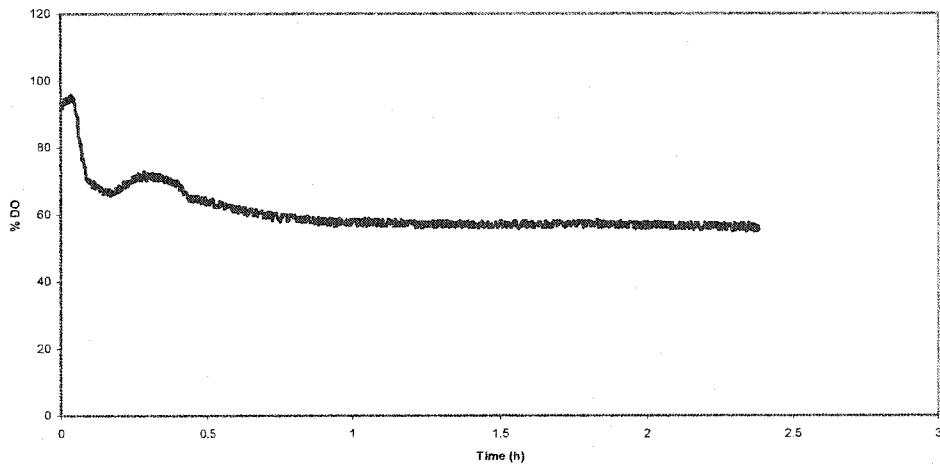


Figure A.7: Suivi de l'oxygène dissous dans le lit cellulaire formé de cellules âgées de 7 jours et un avec un débit de perfusion de 1,6 mL/min.

Respiration des cellules EC6 âgées de 8 jours avec un débit de 0,8 mL/min

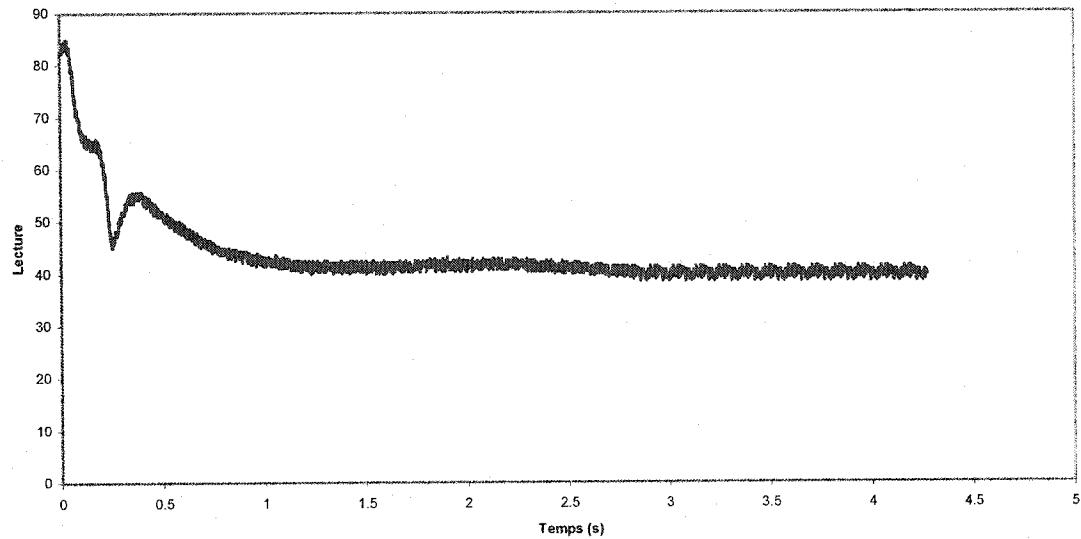


Figure A.8: Suivi de l'oxygène dissous dans le lit cellulaire formé de cellules âgées de 8 jours et avec un débit de perfusion de 0,8 mL/min.

Respiration des cellules EC6 âgées de 9 jours avec un débit de 0,8 mL/min

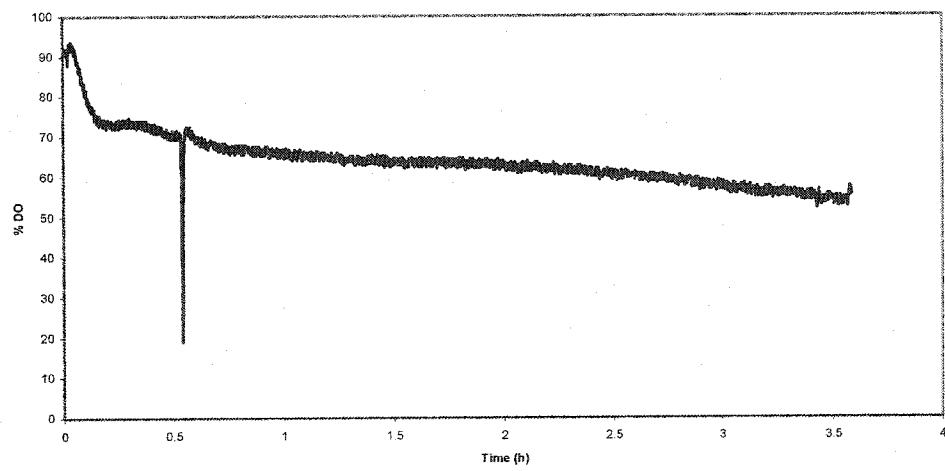


Figure A.9: Suivi de l'oxygène dissous dans le lit cellulaire formé de cellules âgées de 9 jours et avec un débit de perfusion de 0,8 mL/min.

A.3 Résultats de la modélisation hydrodynamique: Dispersion axiale

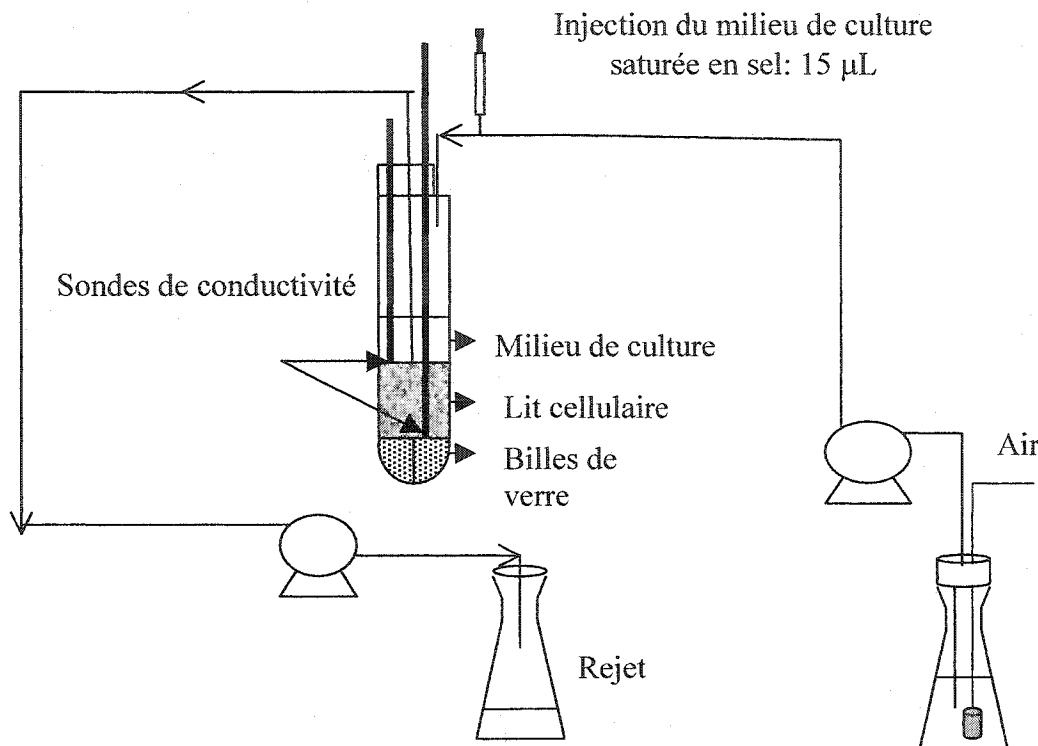
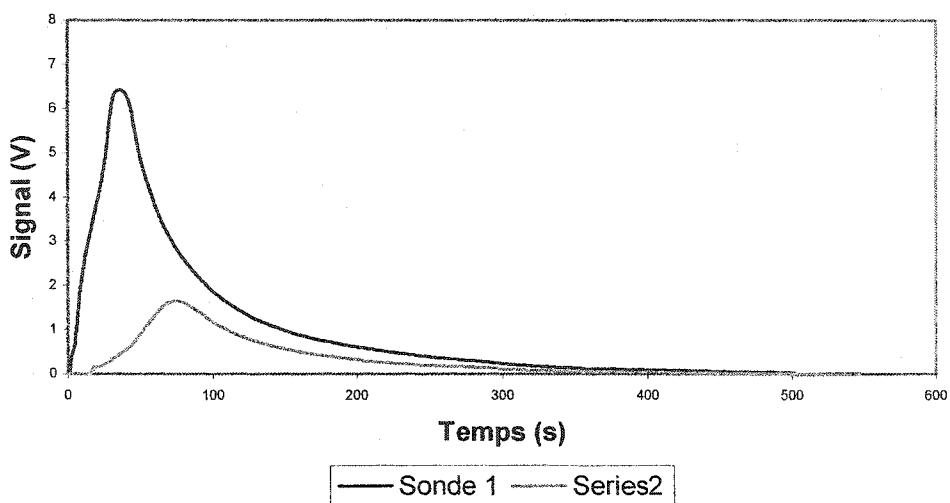


Figure A.10: Schémas du montage expérimental du test d'injection saline.

Impulsion saline dans un lit cellulaire de 6jours, avec un débit de perfusion de 1.6 ml/min



Impulsion saline dans un lit cellulaire de 10jours, avec un débit de perfusion de 0.8 ml/min

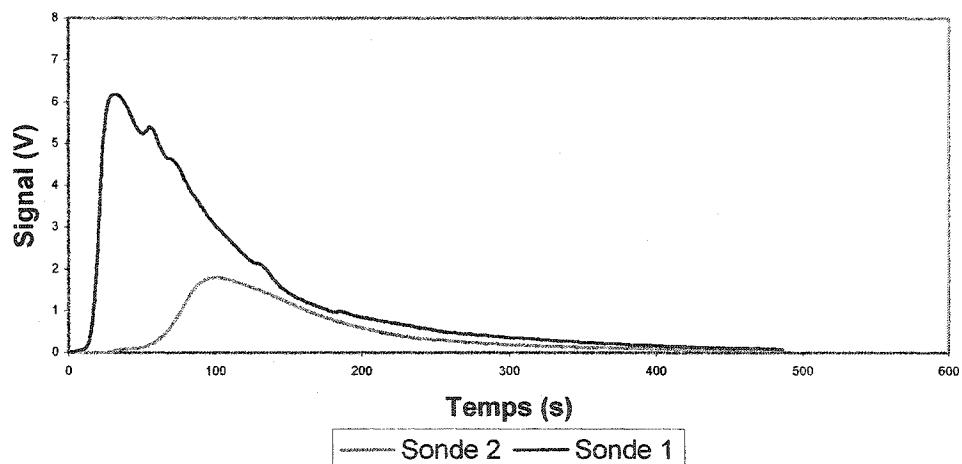


Figure A.11: Exemples des signaux obtenus suite à une impulsion saline dans le lit cellulaire.

Tableau A 4: Tableaux des coefficients de dispersion axiale

		Dispersion (m ² /s)					
Durée de perfusion (h)	Débit(m ^l /min)	jours	(âge des cellules)	mesure1	mesure2	mesure3	moyenne
							erreur
1	0.85	4	1.63969	1.4218	0.91626	1.325916667	0.273104
2	0.85	4	1.6	1.3	0.54609	1.148696667	0.401738
3	0.85	4	1.2	1.35347		1.276735	0.076735
4	0.85	4	1.53083	1.77677	1.70198	1.66986	0.092687
5	0.85	4	1.12055			1.12055	0
6	0.85	4					0.211066
1	1.6	5	1.26	1.19609	1.3872	1.281096667	0.070736
2	1.6	5	1.1983		1.25034	1.22432	0.02602
3	1.6	5	1.15		1.42525	1.287625	0.137625
4	1.6	5	0.965		1.28867	1.126835	0.161835
5	1.6	5	1		1.19108	1.09554	0.09554
1	2.6	5	0.2				0.098351
2	2.6	5	0.12				
3	2.6	5	0.5				
4	2.6	5	0.3				
5	2.6	5	0.2				

		Dispersion (m ² /s)					
Durée de perfusion (h)	Débit (ml/min)	Jours (ages des cellules)	mesure1	mesure2	mesure3	moyenne	erreur
1	0.85	1	0.29	0.25275	0.29831	0.280353	0.002278
2	0.85	1	0.295	0.2652	0.31644	0.292213	0.025562
3	0.85	1	0.48	0.32	0.47771	0.425903	0.078855
4	0.85	1	0.354	0.5	0.40088	0.418293	0.04956
5	0.85	1	0.29632	0.3521	0.19397	0.280797	0.079065
1	2.6	1	0.352	0.31082	0.33141	0.02059	
2	2.6	1	0.4	0.3	0.35	0.05	
3	2.6	1	0.511	0.35	0.4305	0.0805	
4	2.6	1	0.462	0.2	0.331	0.131	
5	2.6	1		0.13378	0.13378	0	
1	1.6	1			0.34079		
2	1.6	1			0.3		
3	1.6	1			0.29913		
4	1.6	1			0.2		
5	1.6	1			0.215		

		Dispersion (m ² s)					
Durée de perfusion (h)	Débit(ml/min)	Jours (âges des cellules)	mesure1	mesure2	mesure3	moyenne	erreur
1	0.85	8	1.1	1.0184	1.0592	1.0408	
	0.85	8	1.5	1.2	1.35	0.15	
	0.85	8	1.22	1	1.11	0.11	
	0.85	8	1.19	0.8	0.995	0.195	
	0.85	8	1.2	1.3	1.25	0.05	
2	1.6	10	1.233	1.6	1.16733	1.333443	0.177704
	1.6	10	1.09	1.798	0.8	1.229333	0.379111
	1.6	10	1.5	1.532	1	1.344	0.229333
	1.6	10	0.9		1.50833	1.204165	0.304165
	1.6	10					
3	2.6	10	0.5621		0.82	0.69105	0.12895
	2.6	10	0.86		0.6	0.73	0.13
	2.6	10	0		0.5	0.25	0.25
	2.6	10	0.6854		0.5235	0.60445	0.08095
	2.6	10			0.5562	0.5562	0
4	2.6	10					
	2.6	10					
	2.6	10					
	2.6	10					
	2.6	10					
5	2.6	10					
	2.6	10					
	2.6	10					
	2.6	10					
	2.6	10					

Tableau A.5: Nombre de Peclét et vitesse superficielle U

Durée de perfusion (h)	Débit (ml/min)	jours (âges des cellules)	U (m/s)	P_e	jours	U (m/s)	P_e	jours	U (m/s)	P_e
1	0.85	4	0.000944	0.001779	1	0.000938	0.008368	8	0.000772	0.001823
2	0.85	4	0.000944	0.002054	1	0.000938	0.008029	8	0.000772	0.00143
3	0.85	4	0.000944	0.001848	1	0.000938	0.005509	8	0.000772	0.00174
4	0.85	4	0.000944	0.001413	1	0.000938	0.005609	8	0.000772	0.001941
5	0.85	4	0.000944	0.002106	1	0.000938	0.008355	8	0.000772	0.001545
6	0.85	4								
1	1.6	5	0.001383	0.002699	1	0.002877	0.021706	10	0.000858	0.001609
2	1.6	5	0.001383	0.002824	1	0.002877	0.020553	10	0.000858	0.001745
3	1.6	5	0.001383	0.002685	1	0.002877	0.01671	10	0.000858	0.001596
4	1.6	5	0.001383	0.003068	1	0.002877	0.021733	10	0.000858	0.001782
5	1.6	5	0.001383	0.003156	1	0.002877	0.053772			
1	2.6	5	0.002444	0.033648	1	0.002515	0.018451	10	0.001395	0.005045
2	2.6	5	0.002444	0.029707	1	0.002515	0.02096	10	0.001395	0.004776
3	2.6	5	0.002444	0.017457	1	0.002515	0.021021	10	0.001395	0.013946
4	2.6	5	0.002444	0.018562	1	0.002515	0.03144	10	0.001395	0.005768
5	2.6	5	0.002444	0.026604	1	0.002515	0.029246	10	0.001395	0.006268

Annexe B. Résolution du bilan de matière sur le phosphate extra- et intra-cellulaire par la méthode des éléments finis

B.1 Exposition du problème

Comme le comportement des cellules a été caractérisé par un modèle nutritionnel structuré (Jolicoeur et al., 2002) et qu'un modèle hydrodynamique caractérisant le lit cellulaire (dispersion axiale) a été jumelé au modèle nutritionnel, on peut maintenant vérifier les conditions auxquelles les cellules sont soumises, et ce sur toute la longueur du lit. En faisant un bilan de matière sur un nutriment, tel que le phosphate, sur le lit cellulaire, on pourrait savoir si les cellules sont dans un milieu homogène tout au long du réacteur dans un premier temps et si les cellules sont dans le même état nutritionnel, c'est à dire, que les concentrations intracellulaires sont similaires pour toutes les cellules, dans un deuxième temps.

Les objectifs de cette étude sont:

- De résoudre par la méthode des éléments finis l'équation du bilan de matière sur le phosphate dans le lit cellulaire pour les cellules de Pavot de Californie.

- De vérifier si le profil de la concentration du phosphate extracellulaire selon l'axe des z est constant, ce qui indiquerait un milieu homogène
- De vérifier si pendant la durée de la lecture de l'échantillon dans le RMN, (2 heures) les concentrations intracellulaires des nutriments ne sont pas nulles.

Certaines hypothèses ont été effectuées pour résoudre ce problème:

- Puisque les paramètres hydrodynamiques changent selon l'âge des cellules et selon le débit de perfusion, les simulations pour cette étude seront faites pour un seul débit celui de 1,6 mL/min (qui est la moyenne des débits) et pour un seul âge de cellules à 5 jours (phase exponentielle de croissance).
- Le taux de croissance μ est supposé constant pour les cellules prises à 5 jours. Cette hypothèse est justifiée par le fait que le cycle de croissance cellulaire passe par une phase de croissance exponentielle durant laquelle le taux de croissance est constant. Pour les cellules à l'étude cette phase dure de 3 à 6 jours.
- Un seul nutriment sera à l'étude, soit le phosphate. Ce choix est basé sur le fait que le phosphate est le nutriment le plus rapidement accumulé par la cellule et que c'est aussi le nutriment qui est le plus consommé par celle ci. Donc si les objectifs sont atteints pour le phosphate, ils le seront pour les autres nutriments.

- Les conditions aux frontières prises sont pour un réacteur fermé-fermé.

Bilan de matière sur la concentration extracellulaire du phosphate

Les équations suivantes se retrouvent dans le chapitre 3.

$$[\text{Flux entrée}] - [\text{Flux sortie}] - [\text{flux consommation}] = \text{accumulation}$$

$$S * F_z - S * F_{z+\Delta z} = \text{consommation}$$

$$\text{Ce qui donne } -\frac{dF}{dz} - \text{consommation} = \frac{dF}{dt}$$

où

$$F = -D \frac{dPi_{extra}(z,t)}{dz} + UPi_{extra}(z,t)$$

$$D \times \frac{d^2 Pi_{extra}(z,t)}{dz^2} - U \times \frac{dPi_{extra}(z,t)}{dz} - X * v_{inPI} = \frac{dPi_{extra}(z,t)}{dt} \quad (\text{éq B.1})$$

où:

$$v_{inPI} = v_{max_HA_Pi} \frac{Pi_{extra}(z,t)}{Pi_{extra}(z,t) + K_{Pi_HA}} + v_{max_LA_Pi} \frac{Pi_{extra}(z,t)}{Pi_{extra}(z,t) + K_{Pi_LA}} \quad (\text{éq B.2})$$

Bilan de matière sur la concentration intracellulaire du phosphate

$$\frac{dP_i(z,t)}{dt} = v_{inPI} - \mu \left(\frac{1}{Y_{x/P}} + P_i(z,t) \right) \quad (\text{éq B.3})$$

Bilan de matière sur la biomasse

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (\text{éq B.4})$$

B.2 Résolution du problème par la méthode des éléments finis

La méthode des éléments finis est une méthode de résidus pondérés qui utilise les approximations sur chacune des portions du maillage.

B.2.1 Discrétisation du domaine

On estime que le bioréacteur est un segment de droite de longueur L. En posant cette hypothèse, on assume que la diffusion se fait dans la direction de l'écoulement du fluide : l'axe des z. On se trouve donc avec un problème 1D dans l'espace avec un terme stationnaire. La partition du domaine se fait sur la section du bioréacteur où se trouve le lit cellulaire, dans l'intervalle [0,1]. Ce choix des frontières est dû au fait que c'est dans cet intervalle qu'il y aura consommation des nutriments.

Les éléments choisis ont une taille identique, c'est un maillage uniforme. La figure qui suit illustre la disposition des éléments:

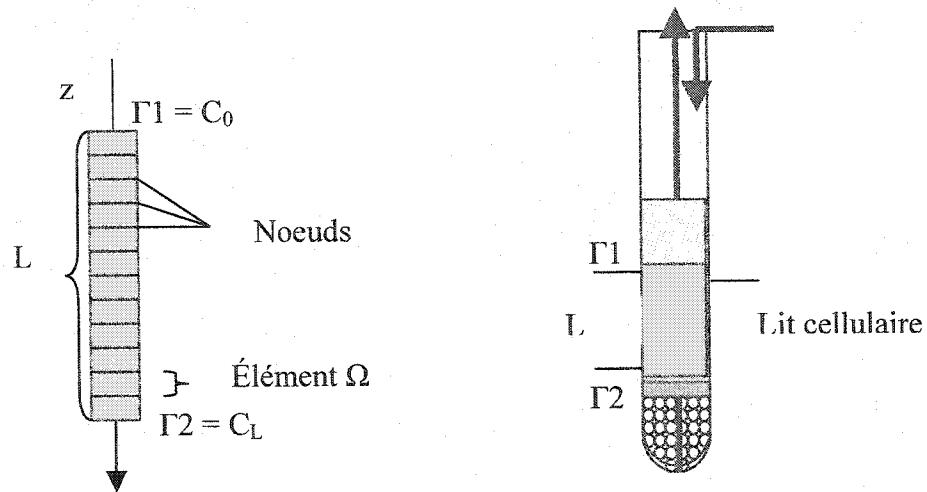


Figure B.12: Discréétisation du domaine

Pour un maillage uniforme constitué de E éléments de taille h défini comme suit :

$$h = \frac{L}{E} \quad (\text{éq B.5})$$

Les éléments sont reliés entre eux par des bornes appelées nœuds géométriques locaux. Dans cette étude, le nombre de nœuds par élément, appelés nœuds d'interpolation N_c , est de deux. L'interpolation est donc linéaire. Le nombre de nœuds globaux N_G est donné par

$$N_G = (N_c - 1)E + 1 \quad (\text{éq B.6})$$

B.2.2 Estimation du terme stationnaire

On applique la méthode de Crank-Nicholson pour estimer le terme stationnaire des équations différentielles (B.1), (B.3) et (B.4).

Choix de la méthode:

Cette méthode est inconditionnellement stable, ce qui signifie qu'on peut choisir le pas de temps, la stabilité de la méthode n'en dépend pas. Ce qui est avantageux, car on peut choisir le pas de temps. Le choix de cette méthode se base en fait sur la facilité avec laquelle on peut l'implanter pour ce problème et aussi sur le fait qu'elle stable.

On pose :

$$\left. \frac{\partial P_{ext}}{\partial t} \right|_{t=t_n} = \frac{P_{ext}^{n+1} - P_{ext}^n}{\Delta t} + e(\Delta t) \quad \text{où } t_n = n * \Delta t \quad (\text{éq B.7})$$

Les équations (B.1), (B.3) et (B.4) deviennent alors :

$$X^n + X^n \mu \Delta t = X^{n+1} \quad (\text{éq B.8})$$

$$(\alpha) D \frac{d^2 P_{ext}^{n+1}}{dz^2} - (\alpha) U \frac{d P_{ext}^{n+1}}{dz} + (1-\alpha) D \frac{d^2 P_{ext}^n}{dz^2} - (1-\alpha) U \frac{d P_{ext}^n}{dz} - X^n v_{inP}^n = \frac{P_{next}^{n+1} - P_{ext}^n}{\Delta t} \quad (\text{éq B.9})$$

$$v_{inP}^{n+1} - \mu \left(\frac{1}{Y_{X/P_i}} + P_i^n \right) = \frac{P_i^{n+1} - P_i^n}{\Delta t} \quad (\text{éq B.10})$$

B.2.3 Formulation variationnelle

La méthode des éléments finis utilise une formulation variationnelle de système de l'EDP. Cette formulation est obtenue en multipliant les équations par une fonction test puis en intégrant le tout sur la longueur du réacteur.

Comme mentionné dans la section précédente, les conditions limites au niveau de l'entrée au réacteur sont de type Dirichlet non homogène. On procède donc à un changement de variable :

$$\theta^{n+1} = P_{ext}^{n+1} - \theta_0^{n+1} \quad \in H_0(\Omega) \quad \text{et } \theta_0^{n+1} = C_L^n = C_0^{n+1} = \theta_L^n \text{ sur } \Gamma_1$$

0 ailleurs

$$\alpha D \frac{d^2 \theta^{n+1}}{dz^2} - \alpha U \frac{d\theta^{n+1}}{dz} - X^n v_{mp}^n + \alpha D \frac{d^2 \theta_0^{n+1}}{dz^2} - \alpha U \frac{d\theta_0^{n+1}}{dz} = \frac{(\theta_0^{n+1} - \theta_0^n)}{\Delta t} + \frac{\theta^{n+1} - \theta^n}{\Delta t}$$

$$-(1-\alpha)D \frac{d^2 \theta^n}{dz^2} + (1-\alpha)U \frac{d\theta^n}{dz} - (1-\alpha)D \frac{d^2 \theta_0^n}{dz^2} + (1-\alpha)U \frac{d\theta_0^n}{dz}$$

(éq B.11)

et

$$v_{mp}^{n+1} = v_{\max_{HA_Pi}} \frac{\theta^{n+1} + \theta_0^{n+1}}{\theta^{n+1} + \theta_0^{n+1} + K_{Pi_HA}} + v_{\max_{LA_Pi}} \frac{\theta^{n+1} + \theta_0^{n+1}}{\theta^{n+1} + \theta_0^{n+1} + K_{Pi_LA}} \quad (\text{éq B.12})$$

On applique maintenant la formule de Green et on multiplie par une fonction test $\psi \in H_0'$ comme suit :

$$-D \frac{d^2\theta}{dz^2} = D \int_{\Omega} \text{grad}\theta \text{grad}\psi \, d\Omega - \left. \frac{d\theta}{dn} \psi \right|_{\Gamma_1}^{\Gamma_2} \quad (\text{éq B.13})$$

où n est le vecteur normale, donc c'est le vecteur unitaire selon l'axe z . Or, à Γ_2 , $d\theta/dz$ est nul (Condition naturelle) et $\psi = 0$ à Γ_1 (Conditions essentielles). L'équation (B.11) devient :

$$\begin{aligned} \Delta t \left[-\alpha D \int_{\Omega} \frac{d\theta^{n+1}}{dz} \frac{d\psi}{dz} \, d\Omega - \alpha U \int_{\Omega} \frac{d\theta^{n+1}}{dz} \psi \, d\Omega - \int_{\Omega} X^n v_{imp}^n \psi \, d\Omega \right] - \int_{\Omega} \theta^{n+1} \psi \, d\Omega = \\ + \Delta t \left[\alpha D \int_{\Omega} \frac{d\theta_0}{dz} \frac{d\psi}{dz} \, d\Omega + \alpha U \int_{\Omega} \frac{d\theta_0}{dz} \psi \, d\Omega \right] \\ + \int_{\Omega} (\theta_0^{n+1} - \theta_0^n) \psi \, d\Omega + \Delta t \left[-D(1-\alpha) \int_{\Omega} \frac{d\theta_0}{dz} \frac{d\psi}{dz} \, d\Omega - U(1-\alpha) \int_{\Omega} \frac{d\theta_0}{dz} \psi \, d\Omega \right] \end{aligned}$$

(éq B.14)

Il faut cependant noter que la dérivée $d\theta_0^n/dz$ existe si $z = \Gamma_1$, ailleurs $\theta_0 = 0$ et donc la dérivée aussi. Ceci signifie que pour les trois dernières intégrales de l'équation (B.14), l'intégrale est évaluée sur l'élément 1 uniquement.

Considérons un élément Ω_k . On représente θ sur cet élément à l'aide d'un polynôme de Lagrange de degré 1 :

$$\theta|_{\Omega_k} = \sum_{j=1}^2 \theta_j^k \varphi_j \quad (\text{éq B.15})$$

où φ_j sont les fonctions de base et $\varphi_1 = (z-z_2)/(z_1-z_2)$

$$\varphi_2 = (z-z_1)/(z_2-z_1)$$

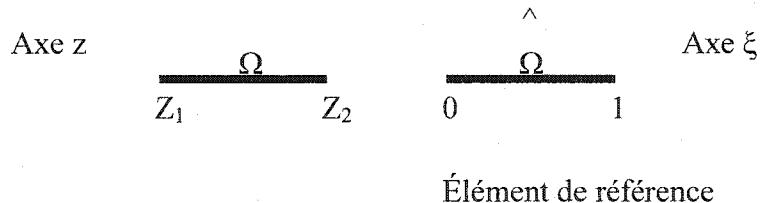
La méthode de Galerkin sera utilisée ici, et selon cette méthode les fonctions test sont les mêmes que les fonctions de base, donc $\psi_i = \phi_j$.

Passage à l'élément de référence

Comme $\Omega = \bigcup_{k=1}^N \Omega_k$ et $\Omega_l \cap_{l \neq m} \Omega_m = 0$

On obtient que $\int_{\Omega} F(x) = \sum_{k=1}^N \int_{\Omega_k} F(x)$

On va effectuer un changement de variables qui nous permet de passer de réel à l'élément de référence. Ainsi, on peut évaluer les intégrales élémentaires facilement. Il faut cependant



et $\phi_1 = 1 - \xi$ $\phi_2 = \xi$

$$\theta|_{\Omega_k} = \theta_1^k \phi_1 + \theta_2^k \phi_2$$

$$= \theta_1^k \hat{\phi}_1 + \theta_2^k \hat{\phi}_2$$

$$= \hat{\theta}|_{\Omega}$$

Ce qui donne les dérivées suivantes : $\frac{d\xi}{dz} = \frac{1}{h}$ et $\frac{dz}{d\xi} = h$

On aura pour 1 élément de référence différent de Ω_1 ,

$$\begin{aligned}
& \Delta t \left[(\alpha) \left[-\frac{D}{h} \int_{\Omega} \left(\theta_1^{n+1} \frac{d\hat{\varphi}_1}{d\xi} + \theta_2^{n+1} \frac{d\hat{\varphi}_2}{d\xi} \right) \frac{d\hat{\varphi}_i}{d\xi} d\Omega \right] - (\alpha) U \left[\int_{\Omega} \left(\theta_1^{n+1} \frac{d\hat{\varphi}_1}{d\xi} + \theta_2^{n+1} \frac{d\hat{\varphi}_2}{d\xi} \right) \hat{\varphi}_i d\Omega \right] \right] \\
& - \Delta t \left[\int_{\Omega} X^n v_{imp}^n \psi d\Omega \right] - \int_{\Omega} \left(\theta_1^{n+1} \hat{\varphi}_1 + \theta_2^{n+1} \hat{\varphi}_2 \right) \hat{\varphi}_i d\Omega = - \int_{\Omega} \left(\theta_1^n \hat{\varphi}_1 + \theta_2^n \hat{\varphi}_2 \right) \hat{\varphi}_i d\Omega \\
& + \Delta t \left[(1-\alpha) \left[\frac{D}{h} \int_{\Omega} \left(\theta_1^n \frac{d\hat{\varphi}_1}{d\xi} + \theta_2^n \frac{d\hat{\varphi}_2}{d\xi} \right) \frac{d\hat{\varphi}_i}{d\xi} d\Omega \right] + (1-\alpha) U \left[\int_{\Omega} \left(\theta_1^n \frac{d\hat{\varphi}_1}{d\xi} + \theta_2^n \frac{d\hat{\varphi}_2}{d\xi} \right) \hat{\varphi}_i d\Omega \right] \right]
\end{aligned}$$

pour $i = 1, 2.$ (éq B-16)

Toutes les intégrales sont évaluées sur l'élément de référence $\hat{\Omega}$. Pour $\Omega = \Omega_1^*$, on a l'équation suivante :

$$\begin{aligned}
& \Delta t \left[-\alpha D \int_{\Omega} \frac{d\theta^{n+1}}{dz} \frac{d\psi}{dz} d\Omega - \alpha U \int_{\Omega} \frac{d\theta^{n+1}}{dz} \psi d\Omega \right] - \int_{\Omega} \left(\theta_1^{n+1} \hat{\varphi}_1 + \theta_2^{n+1} \hat{\varphi}_2 \right) \hat{\varphi}_i d\Omega = \\
& - \int_{\Omega} \left(\theta_1^n \hat{\varphi}_1 + \theta_2^n \hat{\varphi}_2 \right) \hat{\varphi}_i d\Omega + \int_{\Omega} X^n v_{imp}^n \psi d\Omega \\
& + \Delta t \left[(1-\alpha) \left[\frac{D}{h} \int_{\Omega} \left(\theta_1^n \frac{d\hat{\varphi}_1}{d\xi} + \theta_2^n \frac{d\hat{\varphi}_2}{d\xi} \right) \frac{d\hat{\varphi}_i}{d\xi} d\Omega \right] + (1-\alpha) U \left[\int_{\Omega} \left(\theta_1^n \frac{d\hat{\varphi}_1}{d\xi} + \theta_2^n \frac{d\hat{\varphi}_2}{d\xi} \right) \hat{\varphi}_i d\Omega \right] \right] \\
& + \Delta t \left[\alpha D \int_{\Omega} \frac{d\theta_0^{n+1}}{dz} \frac{d\psi}{dz} d\Omega + \alpha U \int_{\Omega} \frac{d\theta_0^{n+1}}{dz} \psi d\Omega \right] + \int_{\Omega} (\theta_0^{n+1} - \theta_0^n) \psi d\Omega \\
& + \Delta t \left[D(1-\alpha) \int_{\Omega} \frac{d\theta_0^n}{dz} \frac{d\psi}{dz} d\Omega + U(1-\alpha) \int_{\Omega} \frac{d\theta_0^n}{dz} \psi d\Omega \right]
\end{aligned}$$

pour $i = 1, 2.$ (éq B.17)

On pourrait écrire les équations (B.16) et (B.17) sous forme matricielle avec comme membre de gauche les termes en θ^{n+1} et en membre de droite les termes en θ^n ,

$A_{ji}^k * \theta_K^{N+1} + D_{ji}^k * \theta_K^{N+1} + e_i = B_{ji}^k * \theta_k^N + F_{ji}^k * \theta_K^N + r_i^k + E_i$. Le terme E intervient si

Ω_1 est l'élément de référence obtenu après un changement de variables sur Ω_1 réel.

Ailleurs que sur le premier élément, ce terme est nul.

$$A_{ji}^k = \int_{\Omega} \hat{\phi}_j \hat{\phi}_i d\Omega \quad (\text{éq B.18})$$

$$B_{ji}^k = \int_{\Omega} \hat{\phi}_j \hat{\phi}_i d\Omega \quad (\text{éq B.19})$$

$$\theta_K^{N+1} = (\theta_1^{n+1}, \theta_2^{n+1})^T \quad (\text{éq B.20})$$

$$\theta_K^N = (\theta_1^n, \theta_2^n)^T$$

$$F_{ji}^k = \Delta t \left[(1-\alpha) \frac{D}{h} \int_{\Omega} \frac{d\hat{\phi}_j}{d\xi} \frac{d\hat{\phi}_i}{d\xi} d\Omega \right] + \Delta t \left[(1-\alpha) U \int_{\Omega} \frac{d\hat{\phi}_j}{d\xi} \hat{\phi}_i d\Omega \right] \quad (\text{éq B.21})$$

$$D_{ji}^k = \Delta t \left[-(\alpha) \frac{D}{h} \int_{\Omega} \frac{d\hat{\phi}_j}{d\xi} \frac{d\hat{\phi}_i}{d\xi} d\Omega \right] + \Delta t \left[-(\alpha) U \int_{\Omega} \frac{d\hat{\phi}_j}{d\xi} \hat{\phi}_i d\Omega \right] \quad (\text{éq B.22})$$

$$r_i^k = -\Delta t \int_{\Omega} X^n v_{inP}^n \hat{\phi}_i d\Omega \quad (\text{éq B.23})$$

$$E_i = \Delta t \left[(1-\alpha) \frac{D}{h} \int_{\Omega} \frac{d\theta_0^n}{d\xi} \frac{d\hat{\phi}_i}{d\xi} d\Omega + (1-\alpha) U \int_{\Omega} \frac{d\theta_0^n}{d\xi} \hat{\phi}_i d\Omega \right] - \int_{\Omega} (\theta_0^{n+1} - \theta_0^n) \hat{\phi}_i d\Omega \quad (\text{éq B.24})$$

$$e_i = \Delta t \left[-(\alpha) \frac{D}{h} \int_{\Omega} \frac{d\theta_0^{n+1}}{d\xi} \frac{d\hat{\phi}_i}{d\xi} d\Omega - (\alpha) U \int_{\Omega} \frac{d\theta_0^{n+1}}{d\xi} \hat{\phi}_i d\Omega \right] \quad (\text{éq B.25})$$

Pour un élément de références k et i, j = 1, 2.

B.2.4 Intégration des termes élémentaires

Les intégrales élémentaires développées ci-dessus peuvent être évaluées facilement en utilisant une formule de quadrature.

B.2.5 Assemblage

Cette étape consiste à regrouper les termes et les matrices élémentaires. On a i nœuds allant de 1 à $N+1$, où $\theta_1 = 0$ à cause de la condition limite essentielle. On a un système de N équations à $N+1$ inconnues. Afin d'obtenir un système d'équations régulier, on doit éliminer la première équation.

En utilisant la définition des fonctions de base et en réécrivant ces équations en système de vecteurs et de matrices, on obtient un système matriciel composé de matrices élémentaires qu'on a déjà résolut. Le système matriciel ainsi obtenu est résolut par la méthode LU. Le programme MATLAB élaboré pour résoudre ce système se trouve en Annexe. *Confère Annexe D.*

Annexe C. Modélisation hydrodynamique du lit cellulaire

Les modèles sont un bon outil pour représenter l'écoulement dans un réacteur non idéal et pour détecter si le mélange y est insuffisant. Le modèle étudié dans cet article pour modéliser le lit cellulaire est le modèle de dispersion axiale. Le choix de ce modèle est basé sur la similarité de l'écoulement dans le lit cellulaire avec l'écoulement dans un réacteur piston. Le modèle de réacteurs en série est aussi utilisé pour représenter le lit cellulaire comme une combinaison de N réacteurs parfaitement mélangés (CSTRs) de volumes égales en série.

Le modèle de dispersion axiale dans un réacteur représente le transport qui a lieu dans la direction axiale, ce modèle considère un écoulement de type piston avec certain degré de rétro mélange. La dispersion radiale représente aussi l'écoulement dans un réacteur mais elle est généralement plus petite que la dispersion axiale (Berger et al, 2002). Par analogie à la loi de Fick pour la diffusion (Levenspiel 1999), le coefficient de dispersion axiale D, caractérise le degré du rétro-mélange durant l'écoulement. Le transport par convection est représenté par la vitesse superficielle U,

$$U = \frac{Q}{S * \rho} \quad (\text{éq C.1})$$

L'équation représentant le modèle de dispersion axiale est la suivante :

$$\frac{\partial C_T}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C_T}{\partial z^2} - U \frac{\partial(C_T)}{\partial z} \quad (\text{éq C.2})$$

Plus le coefficient de dispersion axiale est plus important que le transport par convection plus le mélange dans le lit cellulaire est important. Le nombre de Peclet est un nombre adimensionnel qui représente le rapport entre le taux de transport par convection divisé par le taux de transport par diffusion ou par dispersion. C'est ce nombre qui sera utilisé pour discuter du mélange dans le lit cellulaire.

$$Pe = \frac{Ul}{D} \quad (\text{éq C.3})$$

Quand le nombre de Peclet est nul, l'écoulement est parfaitement mélangé. Modéliser l'écoulement dans le lit cellulaire peut se faire en déterminant le temps de séjour des molécules individuellement dans le lit de cellules. Ou plutôt, la distribution du temps de séjour (DTS). La fonction DTS est une caractéristique du mélange dans le réacteur, d'où l'intérêt d'obtenir cette information (Haas and al. 1997). La fonction de distribution du temps de séjour E, est la fonction qui décrit les différents temps que les éléments de fluide ont passé dans le réacteur. La courbe E est obtenue par les données du test de traçage en divisant la concentration du traceur c_i au temps de lecture t_i par l'aire sous la courbe de concentration-temps.

$$E_i = \frac{c_i}{\sum_{i=0}^{t_{total}} (c_i \Delta t_i)} \quad (\text{éq C.4})$$

Pour qu'un modèle d'équations aux dérivées partielles soit complet, il faut déterminer ses conditions aux frontières. Dans le cas d'un réacteur représenté par des équations

paraboliques, deux conditions aux frontières doivent être posées. Dans ce cas ci, la dispersion à l'entrée et à la sortie du lit cellulaire est la même que la dispersion dans le lit cellulaire, les conditions ouvert-ouvert s'appliquent. En utilisant ces conditions aux frontières, la fonction RTD normalisée, E, pour une dispersion axiale est donnée par :

$$E_\theta = \frac{1}{2\sqrt{\pi\theta / Pe}} \exp\left[\frac{-(1-\theta)^2}{4\theta / Pe} \right] \quad (\text{éq C.5})$$

Les réacteurs non idéaux peuvent être conceptualiser en utilisant le modèle de réacteurs en séries. Pour connaître la valeurs de N, on utilise le temps de résidence moyen et la variance qui sont deux moment de la fonction E.

$$N = \frac{t_{mean}^2}{\sigma^2} \quad (\text{éq C.6})$$

Dans les conditions de frontières ouvert-ouvert, le temps de résidence moyen est défini par:

$$t_{mean} = (\sum t_i E_i \Delta t_i) \quad (\text{éq C.7})$$

et la variance par :

$$\frac{\sigma^2}{t_{mean}^2} = \frac{2}{Pe} - \frac{2}{Pe^2} (1 - e^{-Pe}) \quad (\text{éq C.8})$$

L'introduction soudaine d'un traceur dans le réacteur donne deux signaux de sortie. Le premier est à l'entrée du lit cellulaire et le deuxième est à la sortie du lit cellulaire. Ces signaux, une fois normalisés, représentent les fonctions de distribution du temps de séjour à l'entrée et à la sortie du lit cellulaire. La fonction RTD à la sortie du lit

cellulaire est en réalité le résultat d'une combinaison des fonctions RTD à l'entrée du lit cellulaire et du lit cellulaire lui-même. Par la méthode de convolution (Levenspiel, 1999), il est facile de découpler le signal d'entrée du signal de sortie et d'obtenir ainsi ce qui nous intéresse: la fonction de distribution du temps de séjour du lit cellulaire.

Pour obtenir la fonction RTD du lit cellulaire, il faut procéder par étapes (Folgler, 1999):

1. Les conditions aux frontières ouvert-ouvert s'appliquent. La dispersion en amont et en aval du lit cellulaire est la même que dans le lit cellulaire.
2. Il faut poser une valeur de Peclet et ensuite calculer la fonction E pour le lit cellulaire à partir de l'équation (C.5). Les fonctions E à l'entrée et à la sortie du lit cellulaire sont obtenues à partir des données expérimentales selon l'équation (C.4).
3. La méthode FFT, Fast Fourier Transform, est une technique qui coupe le signal en petits segments pour ensuite les transformer du domaine du temps au domaine fréquentiel (Smith, 1999). L'intérêt de cette méthode est que dans le domaine fréquentiel, la convolution est tout simplement une multiplication de signaux. La fonction E calculée à la sortie du réacteur par convolution est obtenue par la convolution de la fonction E à l'entrée du lit cellulaire avec la fonction E dans le lit cellulaire.
4. Par un algorithme basé sur les moindres carrés, il est facile de minimiser l'erreur entre la fonction E calculée à la sortie du lit cellulaire par convolution et la fonction E obtenue expérimentalement à la sortie du lit cellulaire. Tant que

l'erreur est grande, le nombre de Peclet est modifié jusqu'à l'obtention d'un Peclet optimum.

Le nombre de réacteurs en série que représente le lit cellulaire est calculé avec les équations (C.6), (C.7) et (C.8) en utilisant le Peclet optimum déjà calculé.

Annexe D. Programmes informatiques

D.1 Programme pour la résolution du modèle hydrodynamique

Fonction main2

%Cette fonction est la fonction principale du programme

```

clear all
close all

choix=input('Choix de donnees (1..12) : ');

%Données expérimentales
% Différents fichier de données expérimentales les signaux des sondes de conductivité lors des tests de traçages
% T et x sont le temps et la signal de la deuxième sonde respectivement
% T et x sont le temps et la signal de la première sonde respectivement (a l'entrée du lit cellulaire)

if choix==1,
    [T,x,Tv,xv] = donne1(1);

end
if choix==2,
    [T,x,Tv,xv] = donne2(1);

end
if choix==3,
    [T,x,Tv,xv]= donne3(1);

end
if choix==4,
    [T,x,Tv,xv] = donne4(1);

end
if choix==5,
    [T,x,Tv,xv]= donne5(1);

end
if choix==6,
    [T,x,Tv,xv] = donne6(1);

end
if choix==7,
    [T,x,Tv,xv] = donne7(1);

end
if choix==8,
    [T, X] = donne8(1);
    [Tv, Xv] = donne8(1);
end

```

```

if choix==9,
    [T, X] = donne9(1);
    [Tv, Xv] = donnev9(1);
end
if choix==10,
    [T, X] = donne10(1);
    [Tv, Xv] = donnev10(1);
end
if choix==11,
    [T, X] = donne11(1);
    [Tv, Xv] = donnev11(1);
end
if choix==12,
    [T, X] = donne12(1);
    [Tv, Xv] = donnev12(1);
end
[Petau]=minimum(T,x,Tv,xv);

[y]=cellule(T,x,Tv,xv,Petau);

```

Fonction calcul

% cette fonction calcule la fonction de distribution de temps de séjour E du signal de sortie du lit cellulaire avec un Peclet posé et donné par la fonction minimum. Elle renvoie l'erreur entre la fonction E du signal de sortie et la fonction E calculée.

```

function [erreur]=calcul(Petau,T,x,Tv,xv)
Pe=Petau;

%U=0.8/(S*por);
U=12.33/1000/60; %m/s
L=0.025; %m

T=T+1;
for i=1:size(T)
    teta(i) = T(i)*U/L;
end
for i=1:size(T,1)
    En(i)=1/(2*(pi*teta(i)/Pe)^0.5)*exp((-1-teta(i))^2/(4*teta(i)/Pe));
end
for i=2:size(T,1)
    dv(i) = xv(i);
end

ffet=fft(En);
ffl=fft(dv);
ffty=(ffl.*ffet);
y=abs(ifft(ffty));

for i=2:size(T,1)
    dx(i) = x(i);
end

erreur=sum((y-dx).^2)*1e6;

```

Fonction minimum

% cette fonction pose un nombre de Pe et minimise l'erreur calculée par la fonction calcul. Elle utilise la fonction fmins de MATLAB qui est basée sur la méthode du simplex.

```
function [Petau]=minimum(T,x,Tv,xv)
[Petau]=fminsearch(@calcul,[0.5],[],T,x,Tv,xv);
```

Fonction cellule

% Avec le Peclet optimum, cette fonction calcule le coefficient de dispersion axiale pour le lit cellulaire et calcule le deuxième moment de la fonction de distribution du temps de séjour pour calculer le nombre de CSTR en série que représente le réacteur : le lit cellulaire.

```
function [y]=cellule(T,x,Tv,xv,Petau)
```

```
Pe= Petau
```

```
U= 12.33/60/1000; %m/s;
L=0.025; %m
for i=1:size(T)
    teta(i) = T(i)*U/L;
end

for i=1:size(T,1)
    En(i)=1/(2*(pi*teta(i)/Pe)^0.5)*exp((-1-teta(i))^2)/(4*teta(i)/Pe));
end
for i=2:size(T)
    dv(i) = xv(i);
end
for i=1:size(x)
    Ts(i)=En(i)*T(i);
end

t=trapz(T,Ts)
```

%calcul des moments pour la fonction de transfert du lit cellulaire

```
for j=1:size(x,1)
    sig(j)=(T(j)-t)^2*En(j);
end

sigma=sqrt(trapz(T,sig));

D = U*L/Pe
```

D.2 Programme pour la résolution du bilan sur le phosphate

```
%%%%%%%%%%%%%% résolution du Bilan de phosphate par éléments finis %%%%%%%%
clear all

%%%%%%%%%%%%%% entrée des paramètres du système %%%%%%%%
n=3600*6; %nombre d'itération pour le temps
a=10; %nombre d'éléments
alpha = 1/2; %Parametre de discréétisation du temps par la méthode de Crank Nicholson

D=1.2; %coefficent de dispersion axiale m2/s
U=0.001383; %Vitesse superficielle d'écoulement m/s
X0 = 0.15; %Quantité biomasse gdw

Q = 1.6; %débit d'écoulement ml/min
vmaxLA = 0.8/24/3600 ; %taux de transport basse affinité mmolPi/gdw-s
vmaxHA = 0.001/24/3600; %taux de transport haute affinité mmolPi/gdw-s
KHA = 0.005/X0; %Constante de haute affinité du phosphate en mmol
KLA = 0.47 /X0 ; %Constante de haute affinité du phosphate en mmol

mu = 0.14/24/3600 ; %taux de croissance cellulaire (sec-1)
Yxp = 12 ; %rendement gdw/mmol

P0 = 1.1 ; %concentration initiale du phosphate extracellulaire en mM
%P0 est aussi Co
Pi0 = 0; %Concentration initiale du phosphate intracellulaire

L = 0.025; % taille du domaine de calcul en m
h = L/a; % taille de la maille

%%%%%%%%%%%%%%Déclaration des matrices et vecteurs du système%%%%%%%%%%%%%%
X = zeros(a,1); %concentration de la biomasse au temps t
x = zeros(a,1); %concentration de la biomasse au temps t-1
P = zeros(a,1); %concentration du phosphate extracellulaire au temps t
p = zeros(a,1); %concentration du phosphate extracellulaire au temps t-1
Pi = zeros(a,1); %concentration du phosphate intracellulaire au temps t
pi = zeros(a,1); %concentration du phosphate intracellulaire au temps t-1
C = zeros(a,1); %variable pour le changement de variable teta, P-teta0 = teta au temps t
c = zeros(a,1); %variable pour le changement de variable teta, P-teta0 = teta au temps t-1
V = zeros(a,1); %débit d'entrée du phosphate dans la cellule au temps t
v = zeros(a,1); %dit d'entrée du phosphate dans la cellule au temps t-1
teta0 =zeros(a,1); % Changement de variable tetao = Co pour le premier élément et zéro ailleurs.

for i = 1:a,
    P(i,1)=P0;
    p(i,1)=P0;
end

for i = 1:a,
    Pi(i,1)=Pi0;
    pi(i,1)=Pi0;
end
for i = 1:a,
    X(i,1)=X0;
    x(i,1)=X0;
end
```

```

Co = 1.1;
C1 = 1.1;
C2 = 1.1;
teta0(1,1) = Co;

for i = 1:a,
    C(i,1)=P(i,1)-Co;
    c(i,1)=p(i,1)-Co;
end

for i = 1:a,
    V(i,1)= vmaxHA * (C(i,1) + Co)/((C(i,1) + Co)+ KHA) + vmaxLA * (C(i,1) + Co)/((C(i,1) + Co)+ KLA) ;
    v(i,1)= vmaxHA * (c(i,1) + Co)/((c(i,1) + Co)+ KHA) + vmaxLA * (c(i,1) + Co)/((c(i,1) + Co)+ KLA) ;
end

%%%%%%%construction des matrices contenant les valeurs à t+1 sur toute la durée de l'incrémentation n

xx=zeros(a,n);
vv=zeros(a,n);
pp = zeros(a,n);
cc=zeros(a,n);
ppi=zeros(a,n);

%initialisation des matrices globales contenant tous les vecteurs sur toute la durée de la simulation et sur tout l'axe z

for i =1:a,
    xx(i,1)= X(i,1);
    vv(i,1)=V(i,1);
    pp(i,1)=P(i,1);
    cc(i,1)=C(i,1);
    ppi(i,1)=Pi(i,1);
end

%%%%%Boucle pour itérer le temps%%%%%
delta=0.5; %pas de temps

for t=2:n,
    %Définition des matrices et vecteurs du système

    Co = (1.1*172 - (pi(a,1)*2))/172;      % 172 étant le volume totale du liquide qui circule dans le lit cellulaire.(mmol/ml)

    teta0(1,1) = Co;
    P(1,1) = Co;

    % Construction de la matrice Aji

    m = a-1;
    A = zeros (m,m);
    A(1,1)= 2/3*h;
    A(m,m)= 1/3*h;
    A(1,2)=1/6*h;
    A(m,(m-1))=1/6*h;
    for i=2:(m-1),
        A(i,i)= 2/3*h;
        A(i,i+1)= 1/6*h;
        A(i,i-1)=1/6*h;
    end

```

%Construction de la matrice Fji

%Construction de la première partie de la matrice Fji : fji

```
f = zeros (m,m);
f(1,1)= -2*(D*delta)/h;
f(m,m)= -(D*delta)/h;
f(1,2)=(D*delta)/h;
f(m,(m-1))=(D*delta)/h;
for i=2:(m-1),
    f(i,i)=-2*(D*delta)/h;
    f(i,i+1)=(D*delta)/h;
    f(i,i-1)=(D*delta)/h;
end
```

%Construction de la deuxième partie de la matrice Fji: uji

```
u = zeros (m,m);
%u(1,1)= u11 + u22 = 0;
u(m,m)=-U*delta/2;
u(1,2)=U*delta/2;
u(m,(m-1))=-U/delta/2;
for i=2:(m-1),
    u(i,i+1)= U*delta/2;
    u(i,i-1)=-U*delta/2;
end
F=f+u;
```

%Construction du vecteur ri

```
r = zeros(m,1);
S = zeros(m,1);
for i=1:m,
    S(i,1) = x(i,1)*V(i,1);
end
for i=1:m,
    r(i,1)=-S(i,1)*delta*h/2;
end
```

%Construction du vecteur Ei et ei

```
E = zeros(m,1);
E(1,1) = (-D*delta/h * C1 + U*delta* C1/2)*(1-alpha) - 1/3*h*(C1 - C2);
e = zeros(m,1);
e(1,1) = (-D*delta/h * Co + U*delta* Co/2)*alpha;
```

%Construction de toute l'équation matricielle

```
K = zeros(m,1);
k = zeros(m,1);
K = inv(A+(F*(alpha)))*((( -F*(1-alpha))+A)*k+r+E-e);
```

%Construction des matrices a t=t+1 pour la biomasse, le phosphate intracellulaire et le taux de transport du phosphate v

```

C(1,1)=teta0(1,1);
P(1,1) = C(1,1);
for i = 1:m,
    C((i+1),1)= K(i,1);
end
for i = 1:m,
    P((i+1),1)=teta0(1,1)-K(i,1);
    k(i,1) = K(i,1);
end

for i = 1:a,
    V(i,1)= vmaxHA * (C(i,1) + Co)/((C(i,1) + Co)+ KHA) + vmaxLA * (C(i,1) + Co)/((C(i,1) + Co)+ KLA) ;
end
for i=1:a,
    X(i,1)= x(i,1)+ delta*mu*x(i,1);
    Pi(i,1) = pi(i,1)+ delta*(V(i,1) - mu*((1/Yxp)+pi(i,1))) ; %cellule/gdw = 0.25
end

for i = 1:a,
    x(i,1)= X(i,1);
    v(i,1)=V(i,1);
    p(i,1)=P(i,1);
    c(i,1)=C(i,1);
    pi(i,1)=Pi(i,1);
end

%construction des matrices contenant les valeurs a t+1 sur toute la durée de l'incrémentation n

C2 = C1;
C1 = Co;
for i =1:a,
    for j =t,
        xx(i,j)= X(i,1);
        vv(i,j)=V(i,1);
        pp(i,j)=P(i,1);
        cc(i,j)=C(i,1);
        ppi(i,j)=Pi(i,1)*X(i,1);
    end
end

end

```

%Affichage et graphes

%Graphique du phosphate extracellulaire :pp

```

taille=size(pp);
taille1=zeros(taille(1),1);
taille2=zeros(taille(2),1);

for i=1:1:taille(2)
    taille2(i)=(i-1)*delta;
end

```

```
for i=1:1:taille(1)
    taille1(i)=(i-1)*h;
end
save GraphPi taille2 taille1 pp -ASCII;
figure(1)
[X,Y]=meshgrid(taille2,taille1);
mesh(X,Y,pp)
xlabel('Time (sec)'); ylabel('Cell bed Length (cm)'); zlabel('Pi extracellular (mmol/L)');
%Graphique du phosphate intracellulaire : ppi
figure(3)
taillei=size(ppi);
taillei1=zeros(taillei(1),1);
taillei2=zeros(taillei(2),1);
for i=1:1:taillei(2)
    taillei2(i)=(i-1)*delta;
end
for i=1:1:taillei(1)
    taillei1(i)=(i-1)*h;
end
[X,Y]=meshgrid(taillei2,taillei1);
mesh(X,Y,ppi)
xlabel('Time (h)'); ylabel('Cell bed Length (cm)'); zlabel('Pi intracellular (mmol/L)');
```