UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

MODÉLISATION ET OPTIMISATION EN CONTINU D'UN PROCÉDÉ DE CULTURE DE CELLULES VÉGÉTALES

JOËL SIROIS

DÉPARTEMENT DE GÉNIE CHIMIQUE

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

THÈSE PRÉSENTÉE EN VUE DE L'OBTENTION

DU DIPLÔME DE PHILOSOPHIAE DOCTOR (Ph.D.)

(GÉNIE CHIMIQUE)

DÉCEMBRE 2000

© Joël Sirois, 2000

National Library
of Canada

Acquisitions and
Bibliographic Services

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque nationale
du Canada

Acquisisitons et
services bibliographiques

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence
ISBN: 0-612-89238-7
Our file Notre référence
ISBN: 0-612-89238-7

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.

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 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.

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 aturement reproduits sans son autorisation.

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

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

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

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

Canada

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Cette thèse intitulée :

MODÉLISATION ET OPTIMISATION EN CONTINU D'UN PROCÉDÉ DE CULTURE DE CELLULES VÉGÉTALES

présenté par : SIROIS Joël

en vue de l'obtention du diplôme de : Philosophiae Doctor (Ph.D.)

a été dûment acceptée par la jury d'examen constitué de :

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

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

M. ARCHAMBAULT Jean, Ph.D., membre et codirecteur de recherche

M. GARNIER Alain, Ph.D., membre externe

M. JOLICOEUR Mario, Ph.D., membre

REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord remercier le Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche (Fonds FCAR) pour leur soutien financier lors de mes études doctorales. J'aimerais aussi remercier le personnel des départements de génie chimique de l'École d'Ingénierie de Trois-Rivières et de l'École Polytechnique de Montréal pour leur soutien à la réalisation de mes travaux.

Je voudrais remercier mes collègues de travail des dernières années (Dany Aubry, Steve Fiset, Martin Gaudette, Laurence Lamboursain, Luc Lavoie et Robert Williams) pour leur aide à différents niveaux, leurs conseils et leurs encouragements. Leur savoir-faire et leur professionnalisme représentent une stimulation personnelle à me dépasser dans mon travail de tous les jours.

J'éprouve beaucoup de respect pour les deux prochaines personnes, mes directeurs de thèse Michel Perrier et Jean Archambault. Je tiens à les remercier pour leur soutien, mais surtout pour leur confiance de même que pour la liberté qu'ils m'ont laissé pour réaliser ce projet de recherche. Je désire aussi les remercier pour leur professionnalisme et leur compétence indéniable. Grâce à eux, j'ai pu vivre intensément ces dernières années en côtoyant des gens réputés et compétents qui ont agrandi mon champ d'intérêt. J'aimerais remercier Michel pour sa rigueur et son sens critique. J'aimerais remercier Jean pour sa ténacité, ses encouragements et pour

m'avoir initié à l'ingénierie des bioprocédés qui est devenue ma passion professionnelle.

Je désire sincèrement remercier chaque membre de ma famille (mon père René, ma mère Alice, ma sœur Isabelle et mon frère Mathieu) pour leurs encouragements, leur soutien sans limite et leur immense compréhension. Je les remercie d'être ce qu'ils sont, de me permettre de prendre du recul par rapport à mon travail et de tout revoir sous un autre jour. Il en va de même pour la famille de ma conjointe (Bertrand, Georgette et Geneviève). Merci à chacun de comprendre mes restrictions, mes absences, et par-dessus tout, mon amour pour Caroline.

Du plus profond de mon cœur, je tiens à remercier ma source d'inspiration, mon épouse Caroline Dubé. Pour réaliser ces travaux, plusieurs sacrifices ont été faits et l'auteur les assume. Toutefois, plusieurs sacrifices ont aussi été faits par ma conjointe et je lui en suis pleinement reconnaissant. Je désire la remercier pour sa patience, son écoute, sa compréhension, son aide, ses encouragements, ses conseils, son soutien, ses attentions, et pour tout le reste. Merci d'avoir été à mes côtés tout au long de ces travaux.

RÉSUMÉ

La croissance des cellules végétales *in vitro* dépend de plusieurs facteurs environnementaux d'importances diverses. Or, seulement quelques-uns sont généralement contrôlés comme l'oxygène dissous et la température. La croissance de cultures opérées sans suivi ni contrôle des principaux facteurs qui l'affectent n'est donc pas maximale. Ceci augmente significativement les temps de culture et affecte l'état physiologique cellulaire. Ces facteurs importants doivent donc être contrôlés individuellement et simultanément pour maximiser la croissance de cellules végétales en bioréacteur.

Plus spécifiquement, cette problématique comporte deux problèmes majeurs: 1) aucun outil mathématique connu n'est présentement utilisé pour maximiser la croissance de cultures alimentées par manipulation individuelle et simultanée de plusieurs variables; 2) il existe peu de variables mesurables en continu pendant les cultures limitant ainsi l'information disponible pour l'élaboration de solutions optimales en temps réel.

Dans ce contexte, ce projet de recherche porte sur deux objectifs principaux. Le premier consiste à développer des outils permettant d'améliorer la compréhension et la description de la phase de croissance des cultures de cellules végétales en suspension. Le second objectif est de développer des outils mathématiques et une stratégie de

culture pour maximiser en temps réel la prolifération cellulaire, i.e. le taux de division cellulaire, à partir d'un minimum d'informations mesurées en continu.

La méthodologie suivie pour rencontrer ces objectifs débute par une étude des interactions nutritionnelles affectant la croissance de la biomasse sèche et la prolifération cellulaire. Cette étude est faite en flacons agités afin de réaliser un nombre élevé d'expériences. Ensuite, différents schèmes réactionnels sont proposés afin de développer des modèles de croissance pour une meilleure compréhension des interactions nutritionnelles avec le métabolisme de croissance. Les paramètres non déterminés expérimentalement sont utilisés afin de minimiser l'erreur d'estimation des cultures effectuées en bioréacteurs à l'aide de simulations. Par la suite, un modèle non ségrégué, où la biomasse est considérée uniforme, a été modifié pour le suivi en temps réel des cultures. Finalement, un contrôleur multivariable sous-optimisant a été élaboré et adapté au système étudié de façon à satisfaire aux contraintes de maximalisation de la prolifération cellulaire. Sa validation a été faite en laboratoire afin de vérifier sa capacité à générer une culture optimale pour des cellules végétales.

L'étude sur les interactions nutritionnelles réalisée en premier lieu, révèle que les nutriments ayant un impact significatif sur les métabolismes de croissance et de prolifération des cellules d'*Eschscholtzia californica* sont les glucides, l'azote (ammonium et nitrate) et le phosphate. Plus spécifiquement, trois de ces quatre nutriments (NH_4, NO_3 et PO_4) limitent directement la prolifération cellulaire alors que les glucides limitent directement la croissance de la biomasse sèche. Les rendements

mesurés sont constants en fonction de la concentration du nutriment pour la source azotée (0.3 x 10^9 cellules $mmol^{-1}$) et le phosphate (6.6 x 10^9 cellules $mmol^{-1}$) alors que le rendement du glucose suit une courbe de Monod avec un rendement maximum de 0.63 g biomasse g^{-1} et une constante d'inhibition de 8.8 g L^{-1}. Par ailleurs, plusieurs auteurs rapportent un effet du rapport de concentration NO_3/NH_4 extracellulaire sur la croissance et la prolifération cellulaire. Or, une étude sur ce rapport révèle que son effet provient plutôt d'un effet de pH provoqué par un déséquilibre protonique lorsque le ratio diffère de sa valeur optimale, qui varie d'une espèce à l'autre. L'utilisation de contre-ions appropriés élimine cet effet.

Suite à la caractérisation des interactions nutritionnelles, trois modèles prédictifs sont développés. Le premier est non ségrégué et le second repose sur la physiologie massique des cellules, soit des cellules à biomasse faible ou élevée. Le troisième modèle repose sur la physiologie cellulaire et place la cellule au centre du système de croissance en décrivant l'évolution de petites et de grosses cellules. Le modèle non ségrégué prédit la phase de croissance exponentielle en biomasse sèche avec une erreur d'estimation relative (la différence entre l'estimation et la valeur mesurée, divisée par la valeur mesurée) de 14% alors qu'elle est de 15% pour les deux modèles physiologiques. Quant à la prolifération cellulaire, les modèles non ségrégués, physiologiques massique et cellulaire prédisent ce phénomène avec des erreurs de 20%, 17% et 18% respectivement. L'originalité des modèles physiologiques repose sur leur structure directement associée au cycle cellulaire. De plus, le modèle

physiologique cellulaire est le premier modèle autonome de cultures de cellules végétales à utiliser la concentration cellulaire comme variable principale. Par leur structure, les deux modèles physiologiques ont la capacité de prédire tous les stades de croissance cellulaire.

Un modèle descriptif est ensuite développé afin d'effectuer un suivi en continu de l'évolution des cultures de cellules végétales. Ce dernier combine la structure du modèle non ségrégué à une estimation en continu de la concentration cellulaire déduite de la mesure du taux de transfert en bioxyde de carbone, CTR. Cette mesure est équivalente au taux de production du bioxyde de carbone en supposant une solubilité constante de ce dernier dans la plage de pH observée. Les profils de suivi obtenus confirment cette dernière hypothèse de même que la capacité du modèle descriptif à suivre l'évolution des variables de croissance en continu.

Finalement, la notion de contrôleur adaptatif sous-optimisant est généralisée aux systèmes multivariables. En combinant cet algorithme au modèle descriptif, un contrôle individuel simultané de plusieurs variables du modèle est réalisé en temps réel. L'exemple utilisé pour valider l'algorithme développé est une culture de cellules végétales en suspension dont quatre concentrations nutritionnelles doivent être contrôlées à partir d'une seule mesure en continu, le CTR. Les profils de croissance et de prolifération cellulaire obtenus confirment la capacité d'un tel contrôleur à maximiser la prolifération cellulaire par la manipulation individuelle des quatre débits d'alimentation en nutriments.

ABSTRACT

The growth of plant cells culture depends on various environmental factors. Few of these factors are usually controlled, mainly the dissolved oxygen concentration and temperature. Consequently, the growth of plant cell cultures without control is not optimized which results in longer culture time and poor cell physiology. These factors need to be individually and simultaneously controlled to maximize the growth.

Two important problems must be addressed: 1) no known mathematical tool is used to maximize the growth of plant cell culture with individual and simultaneous manipulation of several variables; 2) there are few measurable variables that can be used for on-line development of optimal strategies.

In this context, this research project was focused on two objectives. The first objective was to develop tools to improve the understanding and description of the growth phase of plant cell suspension cultures. The second objective was to develop mathematical tools and a culture strategy for the on-line maximization of plant cell proliferation, i.e. cell division rate, from minimal on-line information.

The methodology used during this project was initiated with the study of nutrient interactions on the growth of dry biomass and cell proliferation. This study was performed in shake flasks which yielded a high number of cultures. Different reaction schemes were evaluated to develop growth models for a better understanding of nutrient interactions with the growth metabolism. Unmeasured parameters were used

to minimize the estimation error of simulated experimental cultures performed in bioreactors. Subsequently, a non segregated model, where biomass is assumed uniform, was modified for on-line description of culture variables. A multivariable sub-optimal controller was developed and adapted to the system used in this project. This controller was validated using experimental cultures to verify its potential for on-line optimization of plant cell cultures.

A study on nutrient interactions revealed that carbohydrates, nitrogen (ammonium and nitrate) and phosphate showed highest effect on the dry biomass growth and cell proliferation of *Eschscholtzia californica* cells. More specifically, ammonium, nitrate and phosphate limited cell proliferation while carbohydrates limited biomass growth. Cell proliferation yields were constant with respect to nutrient concentration for nitrogen salts (0.3×10^9 cells $mmol^{-1}$) and phosphate (6.6×10^9 cells $mmol^{-1}$) while carbohydrates yield followed Monod kinetic with maximum yield and inhibition constant of 0.63 g biomass g^{-1} and 8.8 g L^{-1} respectively. Numerous authors reported an effect of the extracellular concentration ratio NO_3/NH_4 on the growth metabolism of cultured plant cells. A study of the effect of this ratio revealed that it could be accounted for a pH effect due to a protonic unbalance when the ratio was changed from its optimal value, which is specific for every plant species cultured. The use of a proper conter-ion cancel out this effect.

Following the nutrient interaction study, three predictive models were developed. The first model is non segregated. The second model is based on cell mass physiology,

with cells of low and high mass. The third model is based on cell physiology focused on small and large cells. The non segregated model predicts the biomass exponential growth phase with an estimation error (difference between the estimated value and the measured value, divided by the measured value) of 14 % while physiological models displayed errors of 15 %. The non segregated model, the physiological mass model and the physiological cell model predict cell proliferation with estimation errors of 20 %, 17% and 18 %, respectively. The originality of the physiological models is their structure based on the plant cell cycle. The physiological cell model is the first autonomous model describing plant cell cultures using cell concentration as the main variable. These physiological models can predict all the growth phases of plant cell cultures.

Subsequently, a descriptive model was developed for on-line description of the growth of suspension cultured plant cells. This model is based on the non segregated model and is linked to cultures by estimating cell concentration using on-line measurement of carbon dioxide transfer rate (CTR) . This measured CTR is equivalent to the carbon dioxide production rate (CPR) of the culture assuming a constant solubility of dissolved carbon dioxide concentration within the observed pH range. The estimated profiles obtained from this model confirm this hypothesis and the capacity of the model to describe on-line the growth of plant cell cultures.

Finally, to close the optimization loop, the concept of sub-optimal adaptive controller was generalized to multivariable systems. The combination of this controller with the

descriptive model allowed an individual and simultaneous control of numerous variables. The example used to test this controller was to control four nutrient concentrations of a plant cells suspension with on-line measurement of one variable, the CTR. The resulting growth profiles confirmed the usefulness of this controller to maximize cell proliferation by individual manipulations of the feed rates of four nutrients.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS iv

RÉSUMÉ vi

ABSTRACT x

TABLE DES MATIÈRES xiv

LISTE DES ANNEXES xxiv

LISTE DES TABLEAUX xxvii

LISTE DES FIGURES xxx

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS lii

NOMENCLATURE liii

1. INTRODUCTION 1

1.1. Problématique 1

1.2. Objectifs de recherche 2

1.3. Méthodologie 3

2. REVUE DE LA LITTÉRATURE 5

2.1. Caractérisation de la croissance de cellules végétales 5

2.2. Composition élémentaire de la cellule 8

2.3. Transport membranaire 10

2.3.1. Diffusion simple 10

2.3.2. Diffusion facilitée/Transport passif 10

2.3.3. Transport actif 15

2.3.4. Transport et nutrition 17

2.4. Limitations nutritionnelles des cultures de cellules végétales 20

2.4.1. Glucides 20

2.4.2. Ions azotés 25

2.4.2.1. Ion ammonium 27

2.4.2.2. Ion nitrate 29

2.4.2.3. Synergie ammonium/nitrate 32

2.4.3. Ion phosphate 37

2.4.4. Synthèse 41

2.5. Modélisation de suspensions de cellules végétales 42

2.5.1. Caractéristiques structurelles d'un modèle 43

2.5.2. Approches de modélisation 46

2.5.3. Modèles prédictifs de la croissance de cellules végétales 48

2.5.4. Modèles descriptifs 87

2.6. Optimisation de cultures en suspension de cellules végétales 93

3. MATÉRIEL ET MÉTHODES 101

3.1. Lignée cellulaire et maintien 101

3.2. Cultures en flacons 102

3.2.1. Procédure générale 102

3.2.2. Étude de rendements 103

3.3. Cultures en bioréacteur 104

3.3.1. Bioréacteur de 6 L 105

3.3.2. Bioréacteur de 2 L 106

3.3.3. Bioréacteur de 3 L 108

3.3.4. Suivi et contrôle 109

3.4. Conditions d'opération 111

3.4.1. Conditions générales 111

3.4.2. Alimentation des cultures en nutriments 112

3.4.2.1. Alimentation manuelle 113

3.4.2.2. Alimentation automatisée 113

3.5. Cultures témoins en flacon 115

3.6. Échantillonnage et suivi 115

3.6.1. Paramètres de culture 115

3.6.2. Estimation des concentrations extracellulaires en nutriments 116

3.6.3. Nutriments intracellulaires 116

3.6.4. Glutamine et glutamate intracellulaires 117

3.7. Analytique 117

3.7.1. Glucides 117

3.7.2. Macronutriments inorganiques 118

3.8. Correction des concentrations extracellulaires 119

3.9. Calcul des taux de croissance de la biomasse et de prolifération cellulaire 120

3.10. Erreurs expérimentales sur les mesures 122

3.10.1. Test statistique intergroupe 122

3.10.2. Test statistique intragroupe 123

3.10.2.1. Glutamine et glutamate 124

3.10.2.2. Dénombrement cellulaire 124

3.10.3. Estimation des concentrations extracellulaires en nutriments 125

3.10.4. Expérimentation en flacons 126

3.10.5. Facteurs affectant le dénombrement cellulaire 127

3.11. Erreurs sur les calculs 130

4. LIMITATIONS NUTRITIONNELLES DES CULTURES DE CELLULES VÉGÉTALES 131

4.1. Glucides 132

4.2. Phosphate 141

4.3. Nitrate 157

4.4. Interactions ammonium, nitrate et pH 166

4.4.1. Source azotée et contre-ions 168

4.4.2. Contrôle du pH extracellulaire 171

4.4.3. Régulation métabolique du pH 175

4.4.4. Source azotée et masse cellulaire 180

4.5. Discussion sur les rendements 186

5. MODÉLISATION 188

5.1. Modèle massique non ségrégué 189

5.1.1. Retour sur le modèle non ségrégué de Sirois (1997) 190

5.1.2. Améliorations du modèle non ségrégué 192

5.1.2.1. Schème réactionnel 192

5.1.2.2. Absorption du nitrate 195

5.1.2.3. Concentrations intracellulaires 197

5.1.2.4. Variations du volume 198

5.1.2.5. Cinétiques de croissance 199

5.1.3. Développement du nouveau modèle non ségrégué 202

5.1.4. Évaluation des valeurs des paramètres du modèle 206

5.2. Modèle physiologique massique 209

5.2.1. Hypothèses de modélisation 209

5.2.1.1. Cycle cellulaire 210

5.2.1.2. Bases de modélisation 212

5.2.1.3. Schème réactionnel 213

5.2.1.4. Cinétiques de croissance 216

5.2.1.5. Cinétiques de mortalité 218

5.2.2. Développement du modèle 219

5.2.3. Évaluation des valeurs des paramètres 225

5.2.4. Simplification de la cinétique associée à la division 228

5.3. Modèle physiologique cellulaire 230

5.3.1. Hypothèses de modélisation 230

5.3.1.1. Cycle cellulaire et bases de modélisation 230

5.3.1.2. Schème réactionnel 231

5.3.1.3. Cinétiques de prolifération et de mortalité cellulaires 233

5.3.2. Développement du modèle 234

5.3.3. Évaluation des valeurs des paramètres 239

5.4. Modélisation descriptive 242

5.4.1. Hypothèses de modélisation 242

5.4.2. Développement du modèle 245

5.4.3. Évaluation des valeurs des paramètres 251

5.5. Amélioration postoptimisation des modèles 252

6. SIMULATIONS ET VALIDATION 253

6.1. Outils de simulation 253

6.1.1. Logiciel et fonctions 253

6.1.2. Calcul des erreurs d'estimation 254

6.1.2.1. Erreur relative moyenne 254

6.1.2.2. Coefficient de détermination multiple empirique 255

6.1.2.3. Carré pondéré des erreurs 256

6.2. Modèle massique non ségrégué 258

6.2.1. Estimation des paramètres et généralisation 258

6.2.2. Analyse de sensibilité des paramètres 262

6.2.3. Validation 266

6.3. Modèle physiologique massique 269

6.3.1. Estimation des paramètres et généralisation 269

6.3.2. Analyse de sensibilité des paramètres 273

6.3.3. Validation 276

6.3.3.1. Généralisation des prédictions 277

6.3.3.2. Ségrégation physiologique 280

6.4. Modèle physiologique cellulaire 282

6.4.1. Estimation des paramètres et généralisation 282

6.4.2. Analyse de sensibilité des paramètres 285

6.4.3. Validation 288

6.4.3.1. Prédiction de cultures postdéveloppement 288

6.4.3.2. Prédiction de cultures mères et de cultures filles 290

6.5. Comparaison des trois modèles 292

6.5.1. Prédiction des profils de croissance et de prolifération 292

6.5.2. Prédiction des concentrations nutritionnelles intracellulaires 294

6.5.3. Indices statistiques de comparaison 296

6.6. Modèle descriptif 302

6.6.1. Filtre de suivi de la concentration cellulaire 302

6.6.2. Suivi en temps réel d'une culture de cellules végétales 304

7. STRATÉGIE D'OPTIMISATION EN TEMPS RÉEL 308

7.1. Définition du problème d'optimisation 308

7.2. Commande optimale 310

7.2.1. Changement de variables 310

7.2.2. Principe Minimum d'optimisation 312

7.2.3. Contrôle extrême : Principe Minimum de Pontryagin 313

7.3. Commande adaptative sous-optimisante multivariable 315

7.3.1. Découplage des taux spécifiques de prolifération cellulaire 316

7.3.2. Conception du contrôleur CASOM 317

7.3.3. Choix des points de consigne 319

7.3.4. Algorithme final du contrôleur CASOM 322

7.4. Optimisation en temps réel de cultures de cellules végétales 325

8. CONCLUSION, RECOMMANDATIONS ET CONTRIBUTIONS 331

8.1. Conclusion 331

8.2. Recommandations 332

8.3. Contributions à l'avancement des connaissances 335

BIBLIOGRAPHIE..... 338

LISTE DES ANNEXES

ANNEXES 391

Annexe A. Composition du milieu de culture B5 modifié 392

Annexe B. Mesure de la concentration cellulaire 394

Annexe C. Mesures des concentrations intracellulaires en glutamine et en glutamate 398

Annexe D. Formules utilisées lors de l'expérience statistique de dénombrement cellulaire 405

Annexe E. Démonstrations mathématiques 409

Annexe F. Démonstration biochimique par bilan protonique de l'effet de la source d'azote et de l'utilisation de citrate sur le pH et le gradient protonique 419

Annexe G. Publication tirée du chapitre 5. Modélisation 426

Annexe H. Estimations de la croissance de cultures végétales développées lors de la détermination des constantes de cinétiques du modèle massique non ségrégué 455

Annexe I. Estimation de la croissance de cultures de cellules végétales post-développement à l'aide du modèle massique non ségrégué 470

Annexe J. Estimations de la croissance de cultures de cellules végétales développées lors de la détermination des constantes de cinétiques du modèle physiologique massique 474

Annexe K. Estimations de la croissance de cultures de cellules végétales post-développement à l'aide du modèle physiologique massique 489

Annexe L. Estimations de la croissance de cultures de cellules végétales en flacon à l'aide du modèle physiologique masique 493

Annexe M. Estimations de la croissance de cultures de cellules végétales développées lors de la détemination des constantes de cinétique du modèle physiologique cellulaire 508

Annexe N. Estimations de la croissance de cultures de cellules végétales post-développement à l'aide du modèle physiologique cellulaire 523

Annnexe O. Estimations de la croissance de cultures de cellules végétales en flacons à l'aide du modèle physiologique cellulaire 527

Annexe P. Comparaison des estimations de la croissance de cultures de cellules végétales par les modèles non ségrégué, physiologique massique et physiologique cellulaire 542

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1 : Rôle des éléments constitutifs de la cellule 9

Tableau 2.2 : Comparaison des trois modes d'absorption nutritionnelle transmembranaire 17

Tableau 3.1 : Erreur intragroupe du dénombrement cellulaire 124

Tableau 3.2 : Facteurs et modalités pour le test statistique de dénombrement cellulaire 127

Tableau 3.3 : Plan statistique expérimental 2^2 pour le dénombrement cellulaire et résultats obtenus 128

Tableau 3.4 : Analyse statistique de l'expérience sur le dénombrement cellulaire 129

Tableau 4.1: Rendements en phosphate pour la croissance de la biomasse sèche 151

Tableau 4.2: Rendements en phosphate pour la prolifération cellulaire 151

Tableau 5.1 : Valeur des paramètres et variables utilisées dans le modèle simplifié 200

Tableau 5.2 : Paramètres du modèle massique non ségrégué 208

Tableau 5.3 : Constantes de réaction et taux spécifiques de consommation du modèle massique ségrégué et leur valeur 227

Tableau 5.4 : Constantes de réaction et taux spécifiques de consommation du modèle cellulaire ségrégué et leur valeur 240

Tableau 5.5: Variables mesurées en continu lors de cultures de cellules végétales en suspension 242

Tableau 5.6: Moyennes des coefficients de régression linéaire (r^2) et écarts types obtenus avec les 14 cultures utilisées pour le développement des modèles 244

Tableau 5.7: Facteurs d'oubli, échantillons et périodes historiques..... 252

Tableau 6.1 : Constantes des cinétiques du modèle massique non ségrégué 259

Tableau 6.2 : Constantes des cinétiques du modèle physiologique massique..... 270

Tableau 6.3 : Constantes des cinétiques du modèle cellulaire ségrégué et leur valeur 282

Tableau 6.4 : Conditions d'opération des 17 cultures utilisées lors des simulations de développement et de validation 297

Tableau 6.5 : Rapport NP/NC pour les trois modèles de croissance 299

Tableau 6.6: Indexe de complexification utile pour les trois modèles de croissance 301

Tableau 7.1 : Valeurs des paramètres de contrôle utilisés lors de l'implantation du CASOM 325

Tableau A.1 : Composition du milieu B5 modifié 393

Tableau C.1 : Courbe standard de concentration en glutamine 401

Tableau C.2 : Préparation des échantillons pour fins d'analyse 402

Tableau C.3 : Solutions finales à analyser 403

LISTE DES FIGURES

Figure 2.1 : Comparaison de la composition élémentaire de certains organismes. 8

Figure 2.2 : Schéma comparatif des trois modes d'absorption nutritionnelle. 11

Figure 2.3 : Schéma comparatif de la vitesse de pénétration cellulaire selon le mode de transport. 13

Figure 2.4 : Concentrations intracellulaires et extracellulaires en sodium et en potassium pour différents types de cellules. 16

Figure 2.5 : Modèle de transport des nutriments dans la cellule végétale..... 19

Figure 2.6 : Voies suggérées pour la fixation de l'ion ammonium..... 27

Figure 2.7 : Cinétique globale de croissance en fonction du glucose et du phosphate. 42

Figure 2.8 : Caractéristiques structurelles d'un modèle d'après Barford et Hall (1978)..... 44

Figure 2.9 : Prolifération cellulaire selon King (1976). 50

Figure 2.10 : Profils de biomasses sèches selon Grm et Mele (1980). 52

Figure 2.11 : Profil de biomasses selon Pazoutová et coll. 54

Figure 2.12 : Profil de biomasse normalisée selon Frazier (1989)..... 58

Figure 2.13 : Profils des biomasses sèche et humide selon Bailey et Nicholson (1989)..... 60

Figure 2.14 : Profils de biomasse sèche selon Bramble et coll. (1991). 63

Figure 2.15 : Profils de biomasse sèche selon Curtis et coll. (1991). 65

Figure 2.16 : Profils de biomasse sèche selon Hooker et Lee (1992). 67

Figure 2.17 : Profil de biomasse sèche selon van Gulik et coll. (1992)..... 69

Figure 2.18 : Profil de biomasse sèche selon van Gulik et coll. (1993). 72

Figure 2.19 : Profils de biomasses sèches selon Guardiola et coll. (1995). 74

Figure 2.20 : Profil de biomasse sèche selon Albiol et coll. (1995). 76

Figure 2.21 : Prolifération cellulaire et profils de biomasse sèche selon Sirois (1997)..... 78

Figure 2.22 Profils de biomasses sèches et humides selon Glicklis et coll. (1998)..... 80

Figure 2.23 : Profils de biomasses sèche et structurale selon Takeda et coll. (1998)..... 83

Figure 2.24 : Profils de biomasses sèche et humide selon Bailey et Nicholson (1989) avec les données de Zhang et coll. (1998) 85

Figure 3.1 : Bioréacteur de 6 L à doubles rubans hélicoïdaux. 106

Figure 3.2 : Bioréacteur de 2 L 108

Figure 3.3 : Comparaison de l'estimation des taux de croissance en biomasse sèche et en prolifération cellulaire par les méthodes du calcul instantané et de la moyenne locale 121

Figure 3.4 : Erreurs expérimentales intergroupes sur les variables de suivi direct, les analyses ioniques et les hydrates de carbone 123

Figure 3.5 : Erreur sur l'approximation de la concentration en ammonium en fonction de la mesure obtenue au moyen du test à bandelettes. 126

Figure 4.1: Dégradation du sucrose et consommation des glucides lors de la culture de cellules végétales. 133

Figure 4.2: Comparaison de l'impact de la source de carbone sur la croissance de la biomasse sèche. 134

Figure 4.3: Comparaison de l'impact de la source de carbone sur la prolifération cellulaire. 135

Figure 4.4: Effet de fortes concentrations initiales en sucrose sur la croissance de la biomasse sèche et sur la prolifération cellulaire..... 136

Figure 4.5: Concentration en biomasse en fonction de la concentration en glucides pour les 14 cultures en bioréacteur utilisées lors du développement des modèles de croissance..... 138

Figure 4.6: Détermination des dérivées locales de la concentration en biomasse sèche en fonction de la concentration en glucides..... 140

Figure 4.7: Rendements locaux en fonction de la concentration en glucides..... 141

Figure 4.8: Croissance de la biomasse sèche à différentes concentrations initiales en phosphate..... 143

Figure 4.9: Prolifération cellulaire à différentes concentrations initiales en phosphate..... 144

Figure 4.10: Rendements de croissance en biomasse sèche et en prolifération cellulaire en fonction de la concentration initiale en phosphate..... 146

Figure 4.11: Rendements corrigés de croissance en biomasse sèche et en prolifération cellulaire en fonction de la concentration initiale en phosphate..... 148

Figure 4.12: Estimation du taux de croissance de la biomasse sèche en fonction de la concentration initiale en phosphate selon trois méthodes. 153

Figure 4.13: Estimation du taux de prolifération cellulaire en fonction de la concentration initiale en phosphate selon trois méthodes..... 155

Figure 4.14: Croissance de la biomasse sèche à différentes concentrations initiales en nitrate..... 158

Figure 4.15: Prolifération cellulaire à différentes concentrations initiales en nitrate. 159

Figure 4.16: Rendements conventionnels et corrigés de croissance en biomasse sèche et de prolifération cellulaire en fonction de la concentration initiale en nitrate. 160

Figure 4.17: Estimation du taux de croissance en biomasse sèche en fonction de la concentration initiale en nitrate selon trois méthodes. 162

Figure 4.18: Estimation du taux de prolifération cellulaire en fonction de la concentration initiale en nitrate selon trois méthodes..... 165

Figure 4.19: Croissance et prolifération cellulaire en fonction de la source d'azote et du contre-ion..... 169

Figure 4.20: Concentrations ioniques en fonction de la source d'azote et du contre-ion. 170

Figure 4.21: Comparaison de la croissance de cultures alimentées en ammonium et dont le pH extracellulaire est contrôlé. 172

Figure 4.22: Comparaison de l'évolution du pH et d'ions de cultures alimentées en ammonium et dont le pH extracellulaire est contrôlé. 174

Figure 4.23: Évolution du pH extracellulaire en fonction du ratio NO3/NH4 et du mode de régulation du pH. 176

Figure 4.24: Consommation de l'azote en fonction du rapport NO3/NH4 à l'inoculation et de l'utilisation ou non du citrate. 178

Figure 4.25: Taux de croissance et de prolifération en fonction du rapport NO3/NH4 à l'inoculation et du mode de régulation du pH. 179

Figure 4.26: Effet du rapport NO3/NH4 et de la régulation du pH sur l'évolution de la masse cellulaire moyenne 182

Figure 4.27: Effet de l'ammonium sur l'évolution de la biomasse sèche et de la concentration cellulaire 184

Figure 4.28: Effet de l'ammonium sur l'évolution de la masse cellulaire moyenne..... 185

Figure 5.1 : Taux de consommation du nitrate en fonction de sa concentration dans le milieu de culture. 197

Figure 5.2 : Taux de croissance et de prolifération moyens simulés en fonction de la concentration initiale en phosphate. 201

Figure 5.3 : Cycle et ségrégation cellulaires 211

Figure 5.4 : Taux de prolifération cellulaire en fonction de la concentration des nutriments principaux..... 229

Figure 5.5: Variation de Λ_c lors d'une culture type de cellules végétales en bioréacteur. 247

Figure 6.1 : ERM et CDME sur la biomasse sèche, obtenus pour chaque culture lors de l'ajustement du modèle massique non ségrégué..... 260

Figure 6.2 : ERM et CDME sur la concentration cellulaire, obtenus pour chaque culture lors de l'ajustement du modèle massique non ségrégué. 261

Figure 6.3 : Effets maximum d'une variation de 50 % des paramètres du modèle massique de croissance non ségrégué sur l'estimation de la biomasse sèche..... 263

Figure 6.4 : Effets maximum d'une variation de 50 % des paramètres du modèle de croissance sur l'estimation de la concentration cellulaire. 265

Figure 6.5 : ERM et CDME sur la biomasse sèche, obtenus pour les cultures postdéveloppement par le modèle massique non ségrégué. 267

Figure 6.6 : ERM et CDME sur la concentration cellulaire obtenus pour les cultures postdéveloppement par le modèle massique non ségrégué. 268

Figure 6.7 : ERM et CDME sur la biomasse sèche, obtenus pour chaque culture lors de l'ajustement du modèle physiologique massique. 271

Figure 6.8 : ERM et CDME sur la concentration cellulaire obtenus pour chaque culture lors de l'ajustement du modèle physiologique massique. 272

Figure 6.9 : Effets maximum d'une variation de 50 % des paramètres du modèle de croissance physiologique massique sur l'estimation de la biomasse sèche..... 274

Figure 6.10 : Effets maximum d'une variation de 50 % des paramètres du modèle de croissance physiologique massique sur l'estimation de la concentration cellulaire. 276

Figure 6.11 : ERM et CDME sur la biomasse sèche, obtenus pour les cultures postdéveloppement par le modèle physiologique massique. 277

Figure 6.12 : Évolution des variables de croissance et du sulfate lors de la culture 2SH35. 278

Figure 6.13 : ERM et CDME sur la concentration cellulaire, obtenus pour les cultures postdéveloppement par le modèle physiologique massique. 279

Figure 6.14 : ERM et CDME sur la biomasse sèche, obtenus pour chaque culture lors de l'ajustement du modèle physiologique cellulaire. 283

Figure 6.15 : ERM et CDME sur la concentration cellulaire, obtenus pour chaque culture lors de l'ajustement du modèle physiologique cellulaire. 284

Figure 6.16 : Effets maximum d'une variation de 50 % des paramètres du modèle de croissance cellulaire sur l'estimation de la biomasse sèche. 286

Figure 6.17 : Effets maximum d'une variation de 50 % des paramètres du modèle physiologique de croissance cellulaire sur l'estimation de la concentration cellulaire. 287

Figure 6.18 : ERM et CDME sur la biomasse sèche, obtenus pour les cultures postdéveloppement par le modèle physiologique cellulaire. 289

Figure 6.19 : ERM et CDME sur la concentration cellulaire, obtenus pour les cultures postdéveloppement par le modèle cellulaire. 290

Figure 6.20 : Comparaison des indices de prédiction ERM et CDME des trois modèles de croissance 293

Figure 6.21 : Mesures expérimentales des variables de croissance et de concentrations nutritionnelles extracellulaires et intracellulaires en flacons. 295

Figure 6.22 : Simulation du régresseur par les moindres carrés sur la correction en continu de la concentration cellulaire 303

Figure 6.23 : Suivi en continu de la culture 5SH57 à l'aide du modèle descriptif de croissance 304

Figure 7.1: Cinétiques de croissance et de prolifération spécifiques à chaque nutriment majeur 319

Figure 7.2 : Suivi et sous-optimisation en temps réel de la croissance d'une culture de cellules végétales en suspension à l'aide du CASOM..... 326

Figure 7.3: Débits d'alimentation des solutions nutritives générés par le CASOM. 327

Figure F.1: Métabolismes des sources azotées et carbonées de l'absorption à la fixation de l'azote sur un squelette carboné..... 420

Figure F.2: Synthèse et comparaison des métabolismes de la source carbonée et de l'azote. 421

Figure H.1: Estimation de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture 2SH8 par le modèle de croissance non ségrégué. 456

Figure H.2: Estimation de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture 5SH9 par le modèle de croissance non ségrégué. 457

Figure H.3: Estimation de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture 2SH10 par le modèle de croissance non ségrégué..... 458

Figure H.4: Estimation de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture 5SH11 par le modèle de croissance non ségrégué..... 459

Figure H.5: Estimation de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture 2SH12 par le modèle de croissance non ségrégué..... 460

Figure H.6: Estimation de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture 5SH13 par le modèle de croissance non ségrégué..... 461

Figure H.7: Estimation de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture 2SH16 par le modèle de croissance non ségrégué..... 462

Figure H.8: Estimation de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture 5SH17 par le modèle de croissance non ségrégué..... 463

Figure H.9: Estimation de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture 2SH20 par le modèle de croissance non ségrégué..... 464

Figure H.10: Estimation de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture 5SH21 par le modèle de croissance non ségrégué..... 465

Figure H.11: Estimation de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture 2SH22 par le modèle de croissance non ségrégué..... 466

Figure H.12: Estimation de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture 5SH23 par le modèle de croissance non ségrégué..... 467

Figure H.13: Estimation de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture 2SH24 par le modèle de croissance non ségrégué..... 468

Figure H.14: Estimation de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture 5SH25 par le modèle de croissance non ségrégué..... 469

Figure I.1: Estimation de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture 2SH35 par le modèle de croissance non ségrégué..... 471

Figure I.2: Estimation de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture 2SH37 par le modèle de croissance non ségrégué..... 472

Figure I.3: Estimation de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture 2SH40 par le modèle de croissance non ségrégué..... 473

Figure J.1: Estimation de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture 2SH8 par le modèle de croissance physiologique massique..... 475

Figure J.2: Estimation de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture 5SH9 par le modèle de croissance physiologique massique..... 476

Figure J.3: Estimation de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture 2SH10 par le modèle de croissance physiologique massique..... 477

Figure J.4: Estimation de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture 5SH11 par le modèle de croissance physiologique massique..... 478

Figure J.5: Estimation de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture 2SH12 par le modèle de croissance physiologique massique. 479

Figure J.6: Estimation de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture 5SH13 par le modèle de croissance physiologique massique. 480

Figure J.7: Estimation de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture 2SH16 par le modèle de croissance physiologique massique. 481

Figure J.8: Estimation de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture 5SH17 par le modèle de croissance physiologique massique. 482

Figure J.9: Estimation de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture 2SH20 par le modèle de croissance physiologique massique. 483

Figure J.10: Estimation de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture 5SH21 par le modèle de croissance physiologique massique. 484

Figure J.11: Estimation de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture 2SH22 par le modèle de croissance physiologique massique. 485

Figure J.12: Estimation de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture 5SH23 par le modèle de croissance physiologique massique. 486

Figure J.13: Estimation de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture 2SH24 par le modèle de croissance physiologique massique. 487

Figure J.14: Estimation de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture 5SH25 par le modèle de croissance physiologique massique. 488

Figure K.1: Estimation de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture 2SH35 par le modèle de croissance physiologique massique. 494

Figure K.2: Estimation de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture 2SH37 par le modèle de croissance physiologique massique. 495

Figure K.3: Estimation de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture 2SH40 par le modèle de croissance physiologique massique. 496

Figure L.1: Estimation de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture-mère (J0) par le modèle de croissance physiologique massique. 494

Figure L.2: Estimation de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture-fille J1 par le modèle de croissance physiologique massique. 495

Figure L.3: Estimation de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture-fille J2 par le modèle de croissance physiologique massique. 496

Figure L.4: Estimation de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture-fille J3 par le modèle de croissance physiologique massique. 497

Figure L.5: Estimation de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture-fille J4 par le modèle de croissance physiologique massique. 498

Figure L.6: Estimation de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture-fille J5 par le modèle de croissance physiologique massique. 499

Figure L.7: Estimation de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture-fille J6 par le modèle de croissance physiologique massique. 500

Figure L.8: Estimation de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture-fille J7 par le modèle de croissance physiologique massique. 501

Figure L.9: Estimation de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture-fille J8 par le modèle de croissance physiologique massique. 502

Figure L.10: Estimation de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture-fille J9 par le modèle de croissance physiologique massique. 503

Figure L.11: Estimation de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture-fille J10 par le modèle de croissance physiologique massique. 504

Figure L.12: Estimation de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture-fille J11 par le modèle de croissance physiologique massique. 505

Figure L.13: Estimation de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture-fille J12 par le modèle de croissance physiologique massique. 506

Figure L.14: Estimation de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture-fille J13 par le modèle de croissance physiologique massique. 507

Figure M.1: Estimation de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture 2SH8 par le modèle de croissance cellulaire. 509

Figure M.2: Estimation de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture 5SH9 par le modèle de croissance cellulaire. 510

Figure M.3: Estimation de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture 2SH10 par le modèle de croissance cellulaire. 511

Figure M.4: Estimation de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture 5SH11 par le modèle de croissance cellulaire..... 512

Figure M.5: Estimation de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture 2SH12 par le modèle de croissance cellulaire..... 513

Figure M.6: Estimation de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture 5SH13 par le modèle de croissance cellulaire..... 514

Figure M.7: Estimation de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture 2SH16 par le modèle de croissance cellulaire..... 515

Figure M.8: Estimation de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture 5SH17 par le modèle de croissance cellulaire..... 516

Figure M.9: Estimation de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture 2SH20 par le modèle de croissance cellulaire..... 517

Figure M.10: Estimation de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture 5SH21 par le modèle de croissance cellulaire..... 518

Figure M.11: Estimation de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture 2SH22 par le modèle de croissance cellulaire..... 519

Figure M.12: Estimation de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture 5SH23 par le modèle de croissance cellulaire..... 520

Figure M.13: Estimation de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture 2SH24 par le modèle de croissance cellulaire..... 521

Figure M.14: Estimation de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture 5SH25 par le modèle de croissance cellulaire..... 522

Figure N.1: Estimation de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture 2SH35 par le modèle de croissance cellulaire..... 524

Figure N.2: Estimation de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture 2SH37 par le modèle de croissance cellulaire..... 525

Figure N.3: Estimation de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture 2SH40 par le modèle de croissance cellulaire..... 526

Figure O.1: Estimation de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture-mère (J0) par le modèle de croissance cellulaire..... 528

Figure O.2: Estimation de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture-fille J1 par le modèle de croissance cellulaire..... 529

Figure O.3: Estimation de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture-fille J2 par le modèle de croissance cellulaire..... 530

Figure O.4: Estimation de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture-fille J3 par le modèle de croissance cellulaire..... 531

Figure O.5: Estimation de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture-fille J4 par le modèle de croissance cellulaire..... 532

Figure O.6: Estimation de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture-fille J5 par le modèle de croissance cellulaire..... 533

Figure O.7: Estimation de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture-fille J6 par le modèle de croissance cellulaire..... 534

Figure O.8: Estimation de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture-fille J7 par le modèle de croissance cellulaire..... 535

Figure O.9: Estimation de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture-fille J8 par le modèle de croissance cellulaire..... 536

Figure O.10: Estimation de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture-fille J9 par le modèle de croissance cellulaire..... 537

Figure O.11: Estimation de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture-fille J10 par le modèle de croissance cellulaire..... 538

Figure O.12: Estimation de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture-fille J11 par le modèle de croissance cellulaire..... 539

Figure O.13: Estimation de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture-fille J12 par le modèle de croissance cellulaire..... 540

Figure O.14: Estimation de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture-fille J13 par le modèle de croissance cellulaire..... 541

Figure P.1: Comparaison des estimations des variables de croissance des cultures 2SH8 à 2SH12 par les trois modèles de croissance.. 543

Figure P.2: Comparaison des estimations des variables de croissance des cultures 5SH13 à 2SH21 par les trois modèles de croissance.. 544

Figure P.3: Comparaison des estimations des variables de croissance des cultures 2SH22 à 5SH25 par les trois modèles de croissance.. 545

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

CADm	Contrôleur adaptatif direct basé sur le taux de respiration mesuré
CASOM	Contrôleur adaptatif sous-optimisant multivariable
CDME	Coefficient de détermination multiple empirique
CPR	Taux de production du bioxyde de carbone
CTR	Taux de transfert du bioxyde de carbone
ERM	Erreur relative moyenne
IFAC	*International Federation of Automatic Control*
OUR	Taux de respiration

NOMENCLATURE

c	Concentration cellulaire	10^9 L^{-1}
$\bar{c}$	Concentration cellulaire moyenne	10^9 L^{-1}
ca	Concentration en calcium	mmol L^{-1}
cl	Concentration en chlore	mmol L^{-1}
CM	Carrés moyens	
CPR	Taux de production du bioxyde de carbone (*Carbon-bioxyde Production Rate*)	mmol L^{-1} h^{-1}
CTR	Taux de transfert du bioxyde de carbone (*Carbon-dioxyde Transfer Rate*)	mmol L^{-1} h^{-1}
cv	Coefficient de variation statistique	%
D	Taux de dilution	h^{-1}
DL	Degré de liberté	
Ê	Effet statistique	
e	Erreur d'estimation	
f	Débit d'alimentation nutritionnel	g L^{-1} h^{-1}
		mmol L^{-1} h^{-1}
	Concentration en fructose	g L^{-1}
F	Débit d'alimentaiton	L h^{-1}
F_S	Loi de Fisher-Snedecor	
g	Concentration en glucose	g L^{-1}
hc	Concentration en glucides totaux	g L^{-1}

i	Intermédiaires du cycle de respiration	$g\ L^{-1}$
	Numéro d'échantillon	
I_C	Indice de complexification utile	
j	Nombre d'échantillons	
J	Indice de performance	
k	Concentration en potasium	$mmol\ L^{-1}$
	Numéro de culture	
k_m	Constante de mortalité cellulaire	h^{-1}
k_n	Concentration de rendement	$mmol\ g^{-1}$
		$mmol\ 10^{-9}$
K	Constantes	
	Matrice des constantes de rendement	
	Gain d'estimation des moindres carrés	$mmol\ 10^{-9}\ h^{-1}$
K_m	Constante de Michaelis-Menten	$mmol\ 10^{-9}\ h^{-1}$
L	Nombre de cultures	
mg	Concentration en magnésium	$mmol\ L^{-1}$
m_h	Masse humide	g
n	Concentration en nutriment	$mmol\ L^{-1}$
		$g\ L^{-1}$
n_{cor}	Concentration corrigée en nutriment	$mmol\ L^{-1}$
na	Concentration en sodium	$mmol\ L^{-1}$
nh_4	Concentration en ammonium	$mmol\ L^{-1}$
no_3	Concentration en nitrate	$mmol\ L^{-1}$

N	Quantité totale en nutriment	$g\ L^{-1}$ $mmol\ L^{-1}$
NC	Nombre de constantes déterminées par minimisation des erreurs	
NP	Nombre de points expérimentaux	
OUR	Taux de respiration (*Oxygen Uptake Rate*)	$mmol\ L^{-1}\ h^{-1}$
P	Matrice de covariance des moindres carrés	
PCV	Fraction volumique de cellules centrifugées (Packed Cell Volume)	%
PM	Précision du modèle	
pH	Potentiel hydrogène	$\log([H^+])$
po_4	Concentration en phosphate	$mmol\ L^{-1}$
pp	Composés phosphorylés	$mmol\ g^{-1}$
pr	Concentration du produit	$g\ L^{-1}$ $mmol\ L^{-1}$
q	Débit d'évaporation d'un produit	$g\ L^{-1}\ h^{-1}$ $mmol\ L^{-1}\ h^{-1}$
Q	Débit d'évaporation d'un produit	$g\ h^{-1}$
$Q_{éch}$	Débit d'échantillonnage	$L\ h^{-1}$
$Q_{évap}$	Débit d'évaporation du milieu	$L\ h^{-1}$
q_n	Taux spécifique de consommation du nutriment n	$mmol\ g^{-1}\ h^{-1}$ $mmol\ mmol^{-1}\ h^{-1}$
q_E	Taux spécifique d'échantillonnage	$L\ L^{-1}\ h^{-1}$

q_V	Taux spécifique d'évaporation	$L\ L^{-1}\ h^{-1}$
r_i	Taux de consommation ou de production de i	$mmol\ L^{-1}h^{-1}$ $g\ L^{-1}h^{-1}$
R^2	Coefficient de détermination multiple empirique	
R_Q	Quotient respiratoire	
s	Concentration en sucrose	$mmol\ L^{-1}$
	Écart-type (chapitre 3)	
SC	Somme des carrés	
SCV	Fraction volumique de cellules sédimentées (Settled Cell Volume)	%
so_4	Concentration en sulfate	$mmol\ L^{-1}$
t	temps	h
TA	Taux d'ajustement statistique	
u	Vecteur des variables manipulées	
v	Vitesse de réaction	$mmol\ h^{-1}$
	Variable quelconque	
V_{max}	Vitesse maximale de réaction	$mmol\ h^{-1}$
v_x	Viabilité de la biomasse	$g\ g^{-1}$
w	Gain de pondération	
W	Matrice des gains de pondération	
x, x_s	Concentration en biomasse sèche	$g\ L^{-1}$
x_h	Concentration en biomasse humide	$g\ L^{-1}$
x	Vecteur d'état	

$Y_{c/n}$	Rendement en cellules par rapport au nutriment n	10^9 g^{-1} 10^9 $mmol^{-1}$
$Y_{x/n}$	Rendement en biomasse par rapport au nutriment n	g g^{-1} g $mmol^{-1}$

χ	Rapport de la biomasse humide à la biomasse sèche viable
ϕ	Taux spécifique de réaction
γ	Gain d'estimation
ϑ	Indice de coût
λ	Facteur d'oubli de l'estimateur des moindres carrés
μ	Taux de croissance
ξ	Vecteur des variables d'état relatives
φ	Matrice des taux de réaction
Λ	Coefficient de suivi de la concentration cellulaire
Ξ	Vecteur des variables d'état absolues

Indices et exposants

cor	Corrigé
e	Extracellulaire
	Variable estimée
f	Alimentation
i	Intracellulaire
m	Variable mesurée
maint	Maintenance
nv	Non viable
sing	Singularité
t	Réfère au temps t
t-1	Réfère à l'événement précédent le temps t
v	Viable
0	Conditions initiales
	Référence
∞	Équilibre
*	Maximum
$\overline{\quad}$	Concentration relative à la concentration cellulaire

1. INTRODUCTION

Le monde végétal représente une immense source de molécules utiles dans différents secteurs tels l'agroalimentaire, le cosmétique, mais surtout, en pharmaceutique. La médecine chinoise utilise d'ailleurs à outrance bon nombre de plantes pour guérir plusieurs maux depuis des millénaires. Malgré la présence de molécules d'origine végétale dans plusieurs médicaments en vente aujourd'hui, ce n'est que depuis peu que l'industrie nord-américaine s'est tournée vers le règne végétal pour subvenir à ses besoins en phytomolécules thérapeutiques, difficiles voire impossibles à synthétiser en laboratoire.

1.1. Problématique

Afin d'accélérer la production des phytomolécules et surtout d'en assurer l'approvisionnement en qualité et en quantité, l'industrie préfère les produire en milieux contrôlés. Les suspensions cellulaires en bioréacteurs représentent une excellente technologie pour produire différents types de molécules, dont les métabolites secondaires végétaux (Aubry, 1994).

Dans un procédé global, la phase de bioproduction est toujours précédée d'une phase de croissance cellulaire. Lorsque la phase de production s'effectue à haute concentration en biomasse, il arrive que la phase de croissance soit plus longue que la phase de production elle-même. La productivité du bioprocédé est donc directement affectée par les caractéristiques de la phase de croissance. Au surplus, comme la

production des phytomolécules représente une réaction parallèle ou compétitive au métabolisme de croissance, il est préférable de maîtriser la compréhension de ce dernier afin de maximiser la production. En somme, l'optimisation de tout bioprocédé passe obligatoirement par l'optimisation de la phase de croissance cellulaire.

Selon des études réalisées antérieurement dans l'équipe de recherche (Aubry, 1994; Pépin, 1994; Sirois, 1997; Cohelo, 2000), la croissance des cellules végétales dépend de plusieurs facteurs environnementaux d'importances diverses. Ceux-ci devront être simultanément contrôlés de manière à optimiser la phase de croissance. Deux problèmes majeurs se posent : aucun outil mathématique connu n'est présentement utilisé pour réaliser l'optimisation de la croissance de cultures alimentées par manipulation simultanée de plusieurs variables de cultures; il existe peu de variables mesurées en continu pendant les cultures, limitant ainsi l'information disponible pour l'élaboration de solutions optimales en temps réel.

1.2. Objectifs de recherche

Dans ce contexte, ce projet de recherche porte sur deux objectifs principaux. Le premier consiste à développer des outils permettant d'améliorer la compréhension et la description de la phase de croissance des cultures de cellules végétales en suspension. Le second objectif est de développer des outils mathématiques et une stratégie de culture pour optimiser en temps réel la prolifération cellulaire à partir d'un minimum d'informations obtenues en continu.

Ces objectifs se subdivisent dans les sous-objectifs suivants. Le premier sous-objectif consiste à caractériser les interactions nutritionnelles qui affectent la croissance de la biomasse sèche ou la prolifération cellulaire de culture de cellules végétales afin d'accroître la compréhension du système à l'étude.

Le second sous-objectif est de développer différents modèles prédictifs de croissance et de prolifération de manière à faciliter la synthèse des interactions identifiées et à pouvoir prédire le comportement des cultures suite à diverses perturbations. Le troisième sous-objectif est de développer un modèle descriptif pour établir un lien entre la culture et le modèle de croissance et de prolifération avant de pouvoir optimiser la prolifération cellulaire.

Finalement, le dernier sous-objectif de ce projet de recherche est d'élaborer un contrôleur multivariable basé sur des principes d'optimisation afin d'assurer l'optimisation en temps réel de la phase de croissance. Une stratégie d'optimisation adaptée à chaque culture de cellules végétales sera ainsi obtenue.

1.3. Méthodologie

L'étude des interactions nutritionnelles affectant la croissance de la biomasse sèche et la prolifération cellulaire sera réalisée en flacons agités. Ce choix permettra de réaliser un nombre d'expérimentations élevé pour ainsi favoriser la compréhension du système étudié. Les nutriments identifiés comme ayant un impact significatif sur les

métabolismes de croissance sont les sources de carbone (glucides), d'azote (ammonium et nitrate) et de phosphate.

Afin de développer des modèles de croissance pour une meilleure compréhension des interactions nutritionnelles avec les métabolismes de croissance, différents schèmes réactionnels sont développés. Les systèmes matriciels découlant de ces schèmes sont alors décrits, puis les paramètres les composant sont déterminés théoriquement ou expérimentalement dans la mesure du possible. Les paramètres non déterminés sont alors utilisés afin de minimiser l'erreur d'estimation des cultures effectuées en bioréacteurs à l'aide de simulations.

Par la suite, les variables mesurables en continu sont identifiées, puis un modèle convenant à ce genre de mesure sera adapté pour le suivi en temps réel des cultures. Ceci se fera par l'établissement d'une relation entre les variables mesurées et certaines variables du modèle.

Finalement, en prenant pour bases les principes d'optimisation ainsi que les techniques développées dans des domaines connexes, un contrôleur multivariable sera élaboré et adapté au système étudié. Sa validation sera effectuée en laboratoire de manière à vérifier son potentiel à générer une culture optimale.

2. REVUE DE LA LITTÉRATURE

Le sujet de cette thèse étant d'optimiser la croissance de cellules végétales en suspension en bioréacteur à l'aide d'un modèle de suivi, le choix du ou des paramètre(s) caractérisant la croissance est primordial pour le succès du projet. Ainsi, un bref rappel des paramètres de suivi de la croissance amorce cette revue de littérature. Ensuite, un rappel du rôle des nutriments lors de la croissance de cellules végétales incluant les modes d'absorption de chaque nutriment est présenté. Les différentes sources de limitations rapportées en culture de cellules végétales sont répertoriées dans la section suivante. La cinquième section de la revue de littérature présente les principales approches de modélisation d'intérêt pour les cultures de cellules végétales en suspension. La dernière section de la revue de littérature répertorie différentes techniques de base pouvant être utilisées pour optimiser la croissance de cellules végétales en suspension en bioréacteur.

2.1. Caractérisation de la croissance de cellules végétales

La très grande majorité des auteurs n'utilisent que la concentration en biomasse sèche pour caractériser la croissance des suspensions de cellules végétales. Les quelques exceptions sont Jessup (1976), Wilson (1976), King (1977), Quinlan (1986), Beck et Renner (1989), Do et Cormier (1991), Sakano et coll. (1995), Pépin (1996) et Sirois (1997).

Beck et Renner (1989) ne présentent aucune courbe de croissance. La biomasse et la prolifération cellulaire ne sont utilisées que pour suivre la concentration de nitrate par gramme de matière humide et par million de cellules. Quinlan (1986), Do et Cormier (1991), ainsi que Sakano et coll. (1995) n'effectuent qu'un dénombrement cellulaire sans présenter de courbe d'évolution de la biomasse. Les résultats obtenus par les cinq autres auteurs démontrent que l'utilisation unique de l'un ou l'autre de ces deux paramètres de croissance (concentration cellulaire ou biomasse sèche) pour caractériser la croissance de cellules végétales en suspension n'est pas complète.

Adoptée par la très grande majorité, le suivi de la biomasse sèche est une mesure simple à obtenir et permet de quantifier la croissance de la suspension. Elle permet aussi d'estimer la consommation de certains nutriments comme le rapporte Sirois (1997). En effet, ce dernier ainsi que plusieurs autres chercheurs (e.g. Kato et Nagai (1979), Ducos et Pareilleux (1986), Taticek et coll. (1990), Jolicoeur et coll. (1992)) observent, à titre d'exemple, une relation proportionnelle entre la consommation des glucides et la biomasse sèche.

Par ailleurs, Pépin (1996) et Sirois (1997) distinguent un lien direct entre la prolifération cellulaire et la respiration de la suspension. De façon plus spécifique, Pépin (1996) remarque que le taux maximum de consommation d'oxygène (OUR) plafonne avec l'arrêt de la prolifération cellulaire. De son côté, Sirois (1997) constate un arrêt de cette prolifération cellulaire dès l'apparition d'une limitation du transfert

d'oxygène au milieu de culture alors que la biomasse sèche croît jusqu'à l'épuisement total de l'oxygène dissous.

Sirois (1997) expérimente des ajouts de trois nutriments : le phosphate, le nitrate et l'ammonium lors de cultures en bioréacteur. Il observe des changements marqués, différents tant pour les courbes de prolifération cellulaire que pour celles de biomasse sèche. King (1977) constate que des cultures limitées en glucose ou en nitrate présentent des conséquences similaires sur les courbes de concentrations cellulaires et de biomasse sèche, mais d'une ampleur différente. De leur coté, Jessup et Fowler (1976) observent que des changements de concentrations initiales en nitrate et en glutamate ont des effets distincts sur les deux types de courbes.

Toutes ces études confirment que l'utilisation unique de la biomasse sèche ou de la prolifération cellulaire est insuffisante pour caractériser l'évolution des cultures de cellules végétales en suspension. Rose et Martin (1974) avancent d'ailleurs que l'identification de la latence et de la phase exponentielle en utilisant uniquement des mesures de biomasse sèche peut être fortement trompeuse. La biomasse sèche et la prolifération cellulaire doivent se compléter de manière à obtenir une meilleure vue d'ensemble de l'évolution des cultures de cellules végétales.

Avant d'aborder les limitations nutritionnelles identifiées en suspension, les deux prochaines sections abordent l'aspect microscopique de la nutrition cellulaire.

2.2. Composition élémentaire de la cellule

Les besoins nutritionnels de la cellule sont directement reliés à sa composition élémentaire. La composition relative des organismes vivants diffère peu dans son ensemble comme l'indique la Figure 2.1. Le carbone, l'oxygène, l'azote, l'hydrogène et le phosphore représentent 95 % à 99 % de la composition de la cellule (Bailey et Ollis, 1986). Ces nutriments occupent donc des fonctions clés dans la biochimie cellulaire.

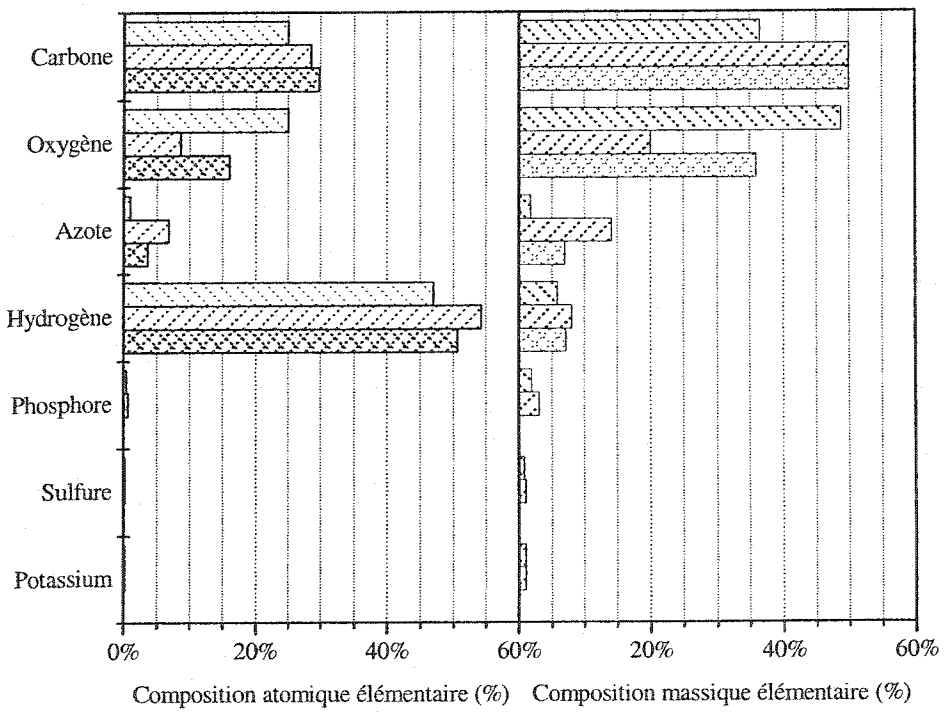


Figure 2.1 : **Comparaison de la composition élémentaire de certains organismes**
Tissus mous des organismes vivants (Alberts et coll., 1992), *Escherichia coli* (Bailey et Ollis, 1986) *Petunia hybrida* (de Gucht et van der Plas, 1995)

La composition relative des éléments d'une cellule est directement reliée à leurs rôles intracellulaires. Le Tableau 2.1 présente les principaux éléments utiles à la vie cellulaire et leur rôle respectif.

Tableau 2.1 : Rôle des éléments constitutifs de la cellule (Adapté de Kleinsmith et Kish, 1988)

Élément	Rôle
Composants des macromolécules	
Carbone	Structure de base de tous les composés organiques
Oxygène	Constituant de l'eau, des composés organiques et de toutes les macromolécules
Azote	Constituant de plusieurs composés organiques, dont les protéines et les acides nucléiques
Hydrogène	Constituant de l'eau et de tous les composés organiques
Phosphore	Constituant des acides nucléiques, des phospholipides ; rôle clé dans le transfert d'énergie
Autres éléments majeurs	
Sulfate	Constituant de la plupart des protéines et de certains composés organiques
Potassium	Principal cation intracellulaire
Sodium	Parmi les principaux cations extracellulaires
Calcium	Requis pour l'activité de certaines enzymes
Magnésium	Requis pour la chlorophylle et pour plusieurs enzymes
Chlore	Parmi les principaux anions cellulaires et extracellulaires
Fer	Essentiel à l'activité de plusieurs enzymes et protéines respiratoires
Manganèse	Requis pour l'activité de plusieurs enzymes
Zinc	Requis pour l'activité de plusieurs enzymes
Cuivre	Essentiel pour certains enzymes d'oxydation et autres genres
Éléments mineurs	
Bore	Essentiel pour certaines plantes
Cobalt	Requis pour l'activité de plusieurs enzymes
Molybdène	Requis pour l'activité de plusieurs enzymes
Vanadium	Essentiel pour les plantes peu évoluées
Nickel	Essentiel pour certaines plantes

En comparant le Tableau 2.1 à la Figure 2.1, il apparaît que les cinq nutriments représentant plus de 95 % de la masse cellulaire remplissent les principales fonctions intracellulaires.

2.3. Transport membranaire

Lorsque la cellule en suspension est mise en présence de nutriments essentiels, elle doit en premier lieu les absorber pour ensuite les utiliser. Ce processus d'absorption peut être réalisé selon trois modes : par diffusion simple, par transport passif (diffusion facilitée) et par transport actif.

2.3.1. Diffusion simple

Le moyen le plus simple pour une molécule de pénétrer la cellule réside dans la diffusion simple. Ce processus repose sur le mouvement naturel des molécules dans la direction inverse du gradient de concentration. À titre d'exemple, les molécules gazeuses comme l'oxygène, l'azote et le gaz carbonique, de même que l'eau, procèdent de la sorte lors des échanges avec la cellule (Alberts et coll., 1992).

2.3.2. Diffusion facilitée/Transport passif

Dans certains cas, la diffusion simple de certaines molécules à travers la membrane cellulaire n'est pas assez rapide pour les besoins de la cellule comme c'est le cas pour les sucres et les acides aminés, relativement insolubles dans les lipides (Kleinsmith et Kish, 1988). Parfois, la diffusion simple est à toute fin pratique impossible. Un des

mécanismes palliant à cette difficulté est la diffusion facilitée, aussi appelée transport passif (Figure 2.2). Ce mode de transport implique aussi un déplacement moléculaire dans la direction du gradient de concentration. Cependant, ces deux mécanismes de diffusion diffèrent selon les quatre points qui suivent (Kleinsmith et Kish, 1988).

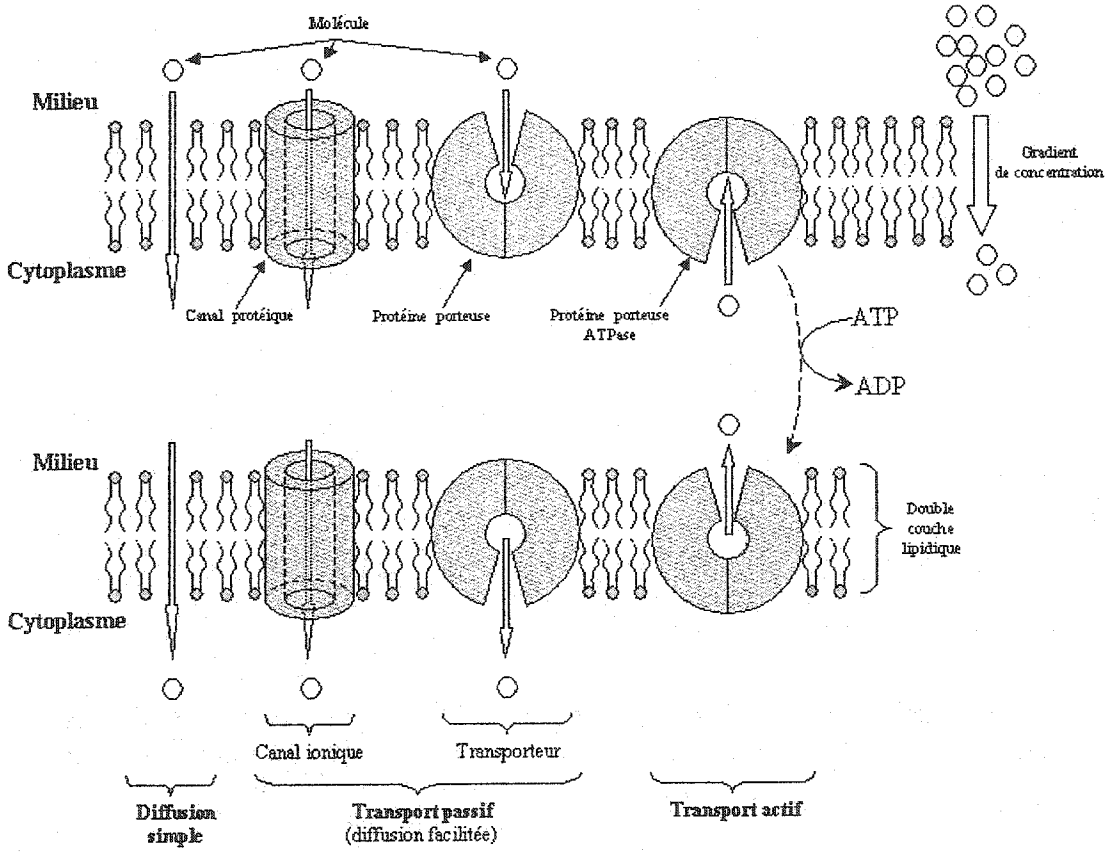


Figure 2.2 : Schéma comparatif des trois modes d'absorption nutritionnelle (adapté de Alberts et coll. (1992) et de Kleinsmith et Kish (1988))

1. Dans la diffusion facilitée, le taux de déplacement moléculaire est habituellement supérieur de quelques ordres de grandeur à la diffusion simple. Ce comportement est analogue à celui des enzymes, si on considère que la vitesse de réaction est accélérée sans toutefois perturber l'équilibre final ;

2. Contrairement à la diffusion simple dont le taux de transfert est directement proportionnel au différentiel de concentration, le taux de transfert de la diffusion facilitée présente une cinétique de saturation, i.e. le taux de transfert tend vers une valeur maximale avec une augmentation du différentiel de concentration. Ce comportement suit la cinétique de Michaelis-Menten, illustrée à la Figure 2.3 et par l'équation 2.1:

$$v_i = V_{max} \frac{\Delta n}{K_m + \Delta n} \qquad 2.1$$

où Δn représente la différence de concentration intermembranaire. Ce comportement suggère que la molécule qui diffuse interagisse avec des transporteurs spécifiques de la membrane cellulaire, disponibles en quantité limitée ;

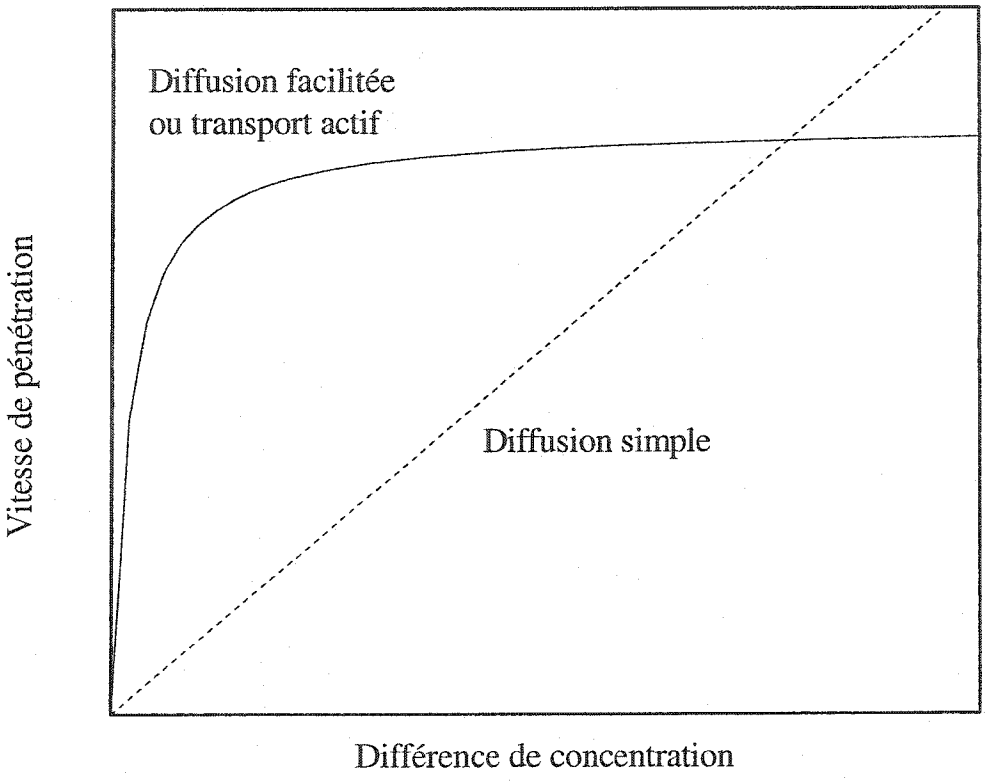


Figure 2.3 : Schéma comparatif de la vitesse de pénétration cellulaire selon le mode de transport (adapté de Alberts et coll., 1992)

3. Alors que les molécules à structure similaire traversent la membrane à des vitesses semblables dans le cas de la diffusion simple, la diffusion facilitée peut différencier des molécules de structure très proche. C'est le cas pour la diffusion facilitée du glucose, qui ne permet pas la diffusion d'autres hexoses tel le fructose (Kleinsmith et Kish, 1988). Ce phénomène suggère que la diffusion facilitée ne s'effectue pas simplement par la présence de pores, mais

que la membrane possède plutôt des sites liant (*binding sites*) comparables aux sites actifs des enzymes ;

4. Tandis que la diffusion simple d'une molécule s'effectue librement, la diffusion facilitée peut être inhibée par une autre molécule qui compétitionne avec la première pour l'utilisation du site de transport. Certains agents reconnus pour dénaturer les enzymes inhibent aussi la diffusion facilitée de certaines molécules, renforçant ainsi l'analogie des transporteurs de diffusion facilitée aux enzymes.

Il existe deux types de diffusion facilitée : les canaux ioniques et les transporteurs passifs. Glass et coll. (1990) de même que Siddiqi et coll. (1990) suggèrent qu'il y aurait deux systèmes de transport du nitrate dans les racines agissant en parallèle, soit un canal ionique à faible affinité et un système facilitateur à haute affinité. Ce genre de canal anionique, aussi perméable au chlore, a été observé par Skerrett et Tyermann (1994) dans les racines de blé. Miller et Smith (1996) suggèrent que l'entrée de nitrate par ce genre de canal serait couplée à l'entrée d'un proton. Schachtman et coll. (1991) de même que par Skerrett et Tyermann (1994) rapportent des canaux cationiques pour le transport du potassium et du sodium. Allen et coll. (1995) observent quant à eux, des canaux cationiques perméables au sodium et inhibés par la présence de calcium dans *T. turgidium* et *T. aestivum*.

2.3.3. Transport actif

Le dernier mode d'échange moléculaire entre la cellule et son environnement réfère au transport actif (Figure 2.2). Contrairement au transport passif (diffusion facilitée), ce système de transport consomme une molécule d'ATP pour chaque molécule transportée. Ce type de transport coûte donc cher à la cellule. Le transport actif ressemble au transport passif, à l'exception de 2 points : outre son besoin énergétique pour fonctionner, le transport actif achemine les molécules dans le sens contraire au gradient électrochimique. Un excellent exemple de ce phénomène est le transport actif du sodium et du potassium qui permet le maintien de concentrations extracellulaires et intracellulaires très différentes chez plusieurs types de cellules tel qu'illustré à la Figure 2.4 (Kleinsmith et Kish, 1988). La pompe à protons constitue un autre excellent exemple de transport actif.

Les systèmes de transport actif sont généralement liés à un gradient ionique. Dans le cas des végétaux, ceux-ci sont couplés au gradient de protons (Alberts et coll., 1992). De manière à maintenir un équilibre des charges, la pénétration transmembranaire des anions est accompagnée d'un proton. Inversement, l'entrée d'un cation dans la cellule provoque l'expulsion d'un proton. Dans ce cas, une pompe à protons, une protéine ATPase, chasse cette charge positive hors de la cellule en consommant une molécule d'ATP.

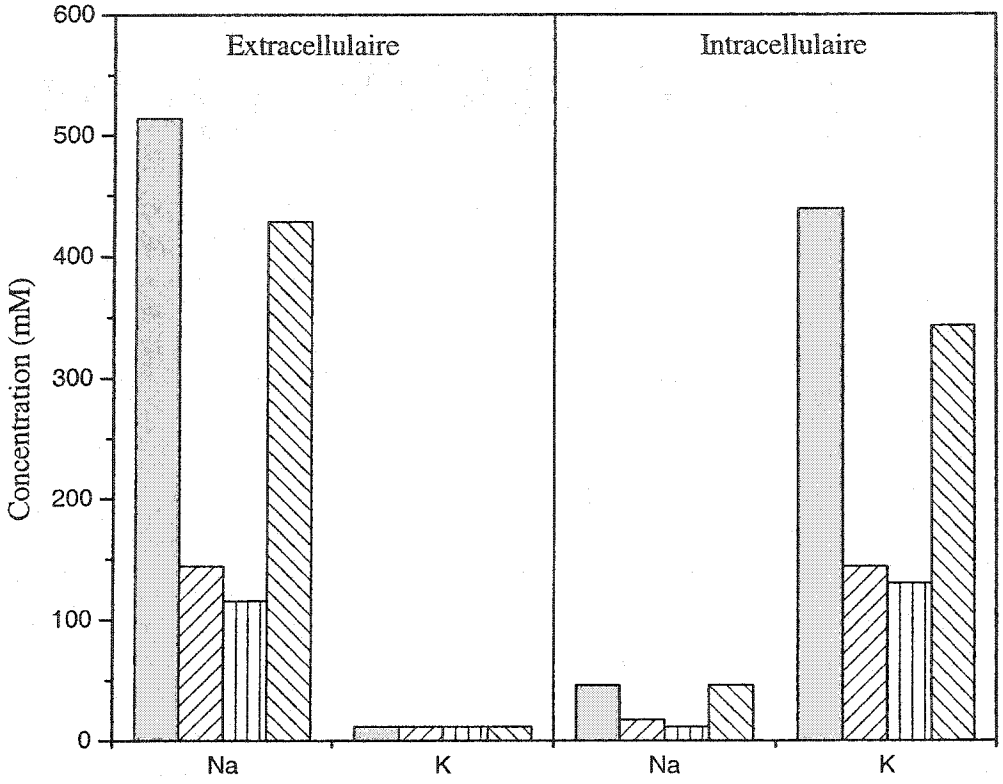


Figure 2.4 : **Concentrations intracellulaires et extracellulaires en sodium et en potassium pour différents types de cellules (adapté de Kleinsmith et Kish, 1988)**

Chaetomorphe (algue marine), Érythrocyte humain, muscle de grenouille, axone de calmar.

2.3.4. Transport et nutrition

Les nutriments utiles à la croissance cellulaire sont absorbés par diffusion simple, par diffusion facilitée et par transport actif. Le Tableau 2.2 résume et compare les propriétés de ces trois types de transports transmembranaires.

Tableau 2.2 : Comparaison des trois modes d'absorption nutritionnelle transmembranaire

	Diffusion simple	Diffusion facilitée	Transport actif
Accélération de la pénétration de la molécule	Non	Oui	Oui
Cinétique de saturation	Non	Oui	Oui
Spécificité à la molécule	Bas	Élevé	Élevé
Sujet à l'inhibition compétitive et non compétitive	Non	Oui	Oui
Direction	Bidirectionnelle	Bidirectionnelle	Sens contraire du gradient de concentration
Nécessité énergétique	Non	Non	Oui
Type de molécules	Neutres	Neutres et ioniques	Neutres et ioniques

De manière générale, les molécules neutres diffusent à travers la membrane cellulaire, alors que les sucres et les ions sont introduits dans la cellule par diffusion facilitée et

transport actifs. Lorsque leur charge doit être balancée au niveau intracellulaire, la pompe à protons réagit en parallèle. Les protons et les ions servent à maintenir un équilibre électrochimique et leur transport se fait par transport actif au coût d'une molécule d'ATP par molécule transportée (Alberts et coll., 1992).

Ce phénomène se produit avec la consommation du lactate et du glucose. Un proton est cotransporté avec le lactate lors de son entrée dans la cellule (Bailey et Ollis, 1986). De même, suite à des essais avec le glucide non métabolisé 2-desoxy-glucose, Cram (1983) affirme que le glucose ne stimule pas la respiration par un effet de concentration. Cette stimulation est plutôt due à une demande énergétique associée à son transport. En effet, l'entrée du glucose dans la cellule est aussi accompagnée d'un proton (van Gulik, 1993). Dans le cas du lactate et du glucose, leur entrée dans la cellule requiert une dépense d'énergie causée par l'entrée simultanée d'un proton, lequel doit par la suite être expulsé par transport actif.

Le mode de transport des nutriments a un impact important sur l'optimisation de la croissance via le modèle développé. En effet, une molécule qui diffuse librement ne provoque pas le même comportement cellulaire dans la suspension et présente donc des termes d'absorption, de croissance en biomasse et de prolifération cellulaire différents dans le modèle de croissance. D'un autre côté, les ions en général (comme le nitrate) qui utilisent la diffusion facilitée ou le transport actif présentent une cinétique d'absorption de saturation (Figure 2.3). La Figure 2.5 présente un modèle global de

transport des nutriments tel que proposé par van Gulik (1993), selon les constatations faites précédemment.

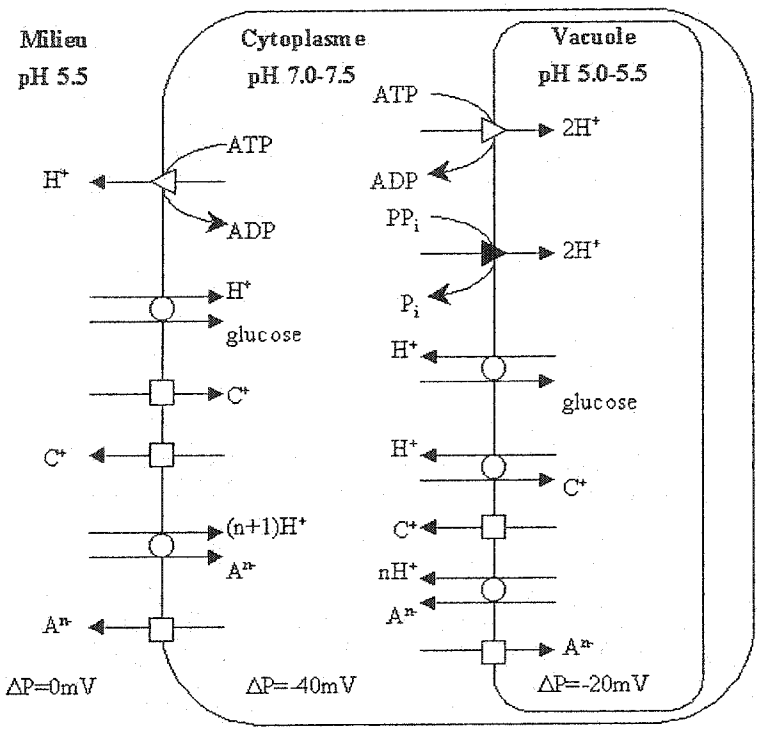


Figure 2.5 : **Modèle de transport des nutriments dans la cellule végétale. (Adapté de van Gulik, 1993).** □ Diffusion facilitée, ○ symport ou antiport protonique, △ transport actif

2.4. Limitations nutritionnelles des cultures de cellules végétales

L'arrêt de croissance des cultures de cellules végétales en suspension est généralement provoqué par diverses limitations externes. Ces limitations proviennent principalement de l'épuisement d'un nutriment essentiel (effet d'épuisement) ou de la présence d'un composé en trop grande ou trop faible quantité (effet de concentration) (Sirois et coll., 1999).

Les nutriments limitants peuvent être classés en deux catégories : les nutriments gazeux à faible solubilité (e.g. l'oxygène (1.26 mM à 25 °C) et le bioxyde de carbone (10^{-2} mM à pH 5.5 et 25 °C)) (Bailey et Ollis, 1986) et les nutriments ioniques et organiques (sels, glucides) à solubilité beaucoup plus élevée (e.g. supérieur à 1 M pour l'ion ammonium à 25 °C). Ce projet de recherche cible les nutriments ioniques et organiques alors que l'alimentation continue de l'oxygène assure sa disponibilité à une concentration constante non limitante à l'aide d'un contrôleur adaptatif à plage variable (Sirois, 1997). La concentration en bioxyde de carbone dans les gaz de sortie du bioréacteur est maintenue dans une plage de croissance acceptable (Archambault, 1991) par dilution des gaz d'entrée.

2.4.1. Glucides

Les nutriments limitants les plus souvent rapportés sont sans aucun doute les glucides. Ceux-ci sont absorbés par la cellule et utilisés via la glycolyse pour remplir différentes fonctions structurales (e.g. paroi cellulaire), énergétiques ou d'intermédiaire

métabolique (e.g. l'acide α-cétoglutarate issu de l'oxydation du glucose capte un premier ion ammonium pour former le glutamate, puis un second pour former la glutamine). Ils sont à la base de toute matière vivante et de toute structure organique. Seule une portion (environ 30 % à 40%) des sucres absorbés par la cellule y est utilisée efficacement alors que le reste est perdu sous forme de bioxyde de carbone résiduel (de Gucht et van der Plas, 1995). Les sucres sont indispensables à la croissance cellulaire puisque le carbone représente environ 50 % de la composition chimique de la cellule (Bailey et Ollis, 1986).

Certaines espèces végétales peuvent accumuler les glucides sous forme d'amidon intracellulaire (*Catharanthus roseus* (van Gulik et coll., 1992 ; van Gulik et coll., 1993), *Datura stramonium* (Hilton et Rhodes, 1994), maïs (Ball et coll., 1996)) et utiliser cette réserve sur une plus longue période. D'autres espèces en sont incapables (ou le font en faibles quantités) et l'utilisent dès son entrée dans la cellule (*Eschscholtzia californica* (Taticek et coll., 1990 ; Aubry, 1995 ; Sirois, 1997), *Taxus cuspidata* (Fett-Neto et coll., 1994)). De plus, la nature préférentielle des sucres accumulés change d'une espèce à l'autre. Ainsi, van Gulik et coll. (1992) constatent que les cellules de *Catharanthus roseus* accumulent les sucres sous forme d'amidon et de sucrose alors que *Nicotiana tabacum* entrepose préférablement le glucose et le fructose. De plus, la concentration de sucre entreposé est directement reliée à la concentration extracellulaire de ce nutriment (King, 1977).

Selon certaines études recensées, un arrêt de la croissance en biomasse est observé dès qu'une pénurie extracellulaire des hydrates de carbone survient (e.g. Jessup et Fowler, 1976 ; van Gulik et coll., 1993 ; Aubry, 1995 ; Sirois, 1997). Dans le cas de la transformation intracellulaire des sucres en amidon, ceux-ci semblent davantage utilisés pour la maintenance cellulaire que pour la croissance en biomasse (van Gulik et coll., 1993).

Comme plusieurs autres, Taticek et coll. (1990) et Aubry (1995) et Sirois (1997) avec *Eschscholtzia californica*, de même que Rho et André (1991) avec *Catharanthus roseus*, constatent une consommation des sucres directement proportionnelle à la croissance en biomasse sèche, suivie d'un arrêt de croissance en biomasse sèche lors de l'épuisement des glucides extracellulaires. Sirois (1997) a constaté le même phénomène au niveau de la prolifération cellulaire. Tous les cas cités présentent des cultures en cuvée. Oksman-Caldentey et coll. (1994) constatent aussi un accroissement de la concentration finale en biomasse sèche lorsque la concentration initiale en sucrose est augmentée avec des cellules d'*Hyoscyamus muticus*. Il s'agit d'une limitation par épuisement provoqué par un arrêt d'approvisionnement de la principale source de carbone.

En plus d'affecter les cinétiques de croissance et de prolifération cellulaire, les glucides peuvent avoir un impact sur les rendements et la composition élémentaire des cellules végétales. Soumises à une limitation en glucose, des cultures de *Petunia hybrida* opérées en continu présentent une diminution de 20 % du rendement en

biomasse par rapport au glucose (de Gucht et van der Plas, 1996). Curtis et coll. (1991) constatent aussi ce phénomène avec *Papaver somniferum*. Deux phénomènes peuvent expliquer ceci. La première explication est une demande soutenue en glucides pour des réactions métaboliques endogènes de transformation (e.g. la réduction du nitrate en ammonium ou la formation du glutamate et de la glutamine nécessitant un squelette carboné).

Une seconde explication de cette chute de rendement est le coût respiratoire : la demande cellulaire en ATP (et donc en glucides) est directement reliée à la composition élémentaire de la biomasse (Penning de Vries et coll., 1974). Or, la composition obtenue pour la limitation en glucose par de Guch et van der Plas (1996) est $CH_{1.70}O_{0.68}N_{0.16}$ alors qu'elle est $CH_{1.76}O_{0.83}N_{0.04}$ pour la limitation en nitrate. Ce même phénomène a également été observé par Balagué et Wilson (1982) avec *Catharanthus roseus*. Confirmant les propos de Penning de Vries et coll. (1974), la respiration cellulaire des cultures limitées en glucose est 30 % supérieure à celle observée dans les cultures limitées en nitrate. Aussi, la respiration cellulaire de *Petunia hybrida* avec une limitation en glucose serait restreinte par une disponibilité limitée en adénosine diphosphate (ADP) selon van Gulik (1993). Finalement, de Guch et van der Plas (1996) en déduisent une plus grande flexibilité des cultures limitées en glucose que celles limitées en nitrate face aux changements des conditions environnementales.

van Gulik et coll. (1989) ainsi que van Gulik et coll. (1992) observent eux aussi une diminution du rendement en glucose avec *Catharanthus roseus* et *Nicotiana tabacum* lorsque le taux de dilution est abaissé, diminution accompagnée de changements dans la composition moléculaire de la biomasse. Ces auteurs supposent qu'une plus grande fraction du glucose alimenté sert à la maintenance et aux besoins énergétiques à des taux de croissance plus faibles. Une limitation en glucose chez *Daucus carota* L. active une série d'enzymes du catabolisme des phospholipides, ce qui serait une stratégie utilisée par les cellules pour survivre à un manque en glucides (Lee et coll., 1998).

En résumé, les glucides peuvent être limitants à la fois pour la croissance massique et pour la prolifération cellulaire. En outre, ils peuvent présenter des cinétiques de saturation sur la croissance. En effet, Zhong et coll. (1994) observent un effet de concentration négatif du sucrose sur la croissance de la biomasse humide (effet de pression osmotique) et positif sur le contenu cellulaire en anthocyanines avec *Perilla frutescens*. Ces résultats sont confirmés par Sato et coll. (1996) avec des cellules de fraise. Cet effet négatif est aussi observé par Mori et Sakurai (1994) lorsque la concentration en sucrose est élevée (>50 g L^{-1}). Par ailleurs, van Gulik et coll. (1993) constatent un effet de concentration positif sur la croissance de la biomasse sèche avec de plus faibles concentrations en glucose (< 30 g L^{-1}) et décrivent cet effet par une cinétique de Monod.

2.4.2. Ions azotés

Selon Schachtman et coll. (1998) et Wink (1997), l'azote représente la source nutritionnelle la plus souvent limitante pour la croissance des végétaux puisqu'il est essentiel à la biosynthèse des protéines, ce qui représente jusqu'à 90 % de son utilisation par la cellule (van Gulik, 1993). L'azote entre dans la composition de l'ADN, de l'ARN, des cofacteurs et des hormones de croissance. Dans le cas des cellules végétales, il est approvisionné sous formes complexes (urée, glutamine, etc.) ou plus généralement sous forme de sels de nitrate et d'ammonium.

Le nitrate est un macronutriment important dans le monde végétal puisqu'il sert à la fois de source nutritionnelle et de signal dans le processus de croissance. En effet, suite à son apparition dans l'environnement, le métabolisme cellulaire végétal est altéré par l'induction de certains gènes dans son processus d'assimilation (Crawford et Glass, 1998). Il est transporté dans la cellule par symport protonique (Ullrich et Novacky, 1981 ; van Gulik, 1993) où il est réduit en nitrite puis en ammonium grâce à la nitrate réductase et à la nitrite réductase (Payne et coll., 1991).

L'ammonium est obtenu par réduction du nitrate ou directement absorbé du milieu de culture par diffusion facilitée (van Gulik, 1993). Il faut noter que le pKa d'équilibre de l'ion ammonium (NH_4^+) et de l'ammoniac (NH_3) étant de 9.25 (Pilbeam et Kirkby, 1992), l'azote réduit se retrouve principalement sous forme d'ammonium dans le milieu de culture et dans l'environnement cellulaire. Barak et coll. (1996) de même

que Taylor et Bloom (1998) constatent une corrélation entre la consommation d'ammonium et le rejet de protons, ce qui est confirmé par une légère augmentation du pH cytoplasmique mesurée par Kanazawa et coll. (1983). Aussi, l'ammonium est un produit secondaire de différentes réactions métaboliques telles la photorespiration, l'asparaginase, l'arginase, le catabolisme des uréides, la synthèse de la lignine et possiblement le catabolisme de la glutaminase et de la glutamate déshydrogénase (Lea et coll., 1992).

L'ion ammonium est lié à l'α-cétoglutarate (un intermédiaire du cycle du citrate) via la glutamate déshydrogénase, formant ainsi le glutamate. Cette réaction exige toutefois une concentration élevée de l'ion dans l'entourage de l'enzyme (Rawn, 1990). Rhodes et coll. (1980) proposent une autre voie : une molécule de glutamine réagirait avec une molécule d'α-cétoglutarate pour former deux molécules de glutamate. Ces auteurs estiment que plus de 95 % des ions ammonium intégrés le seraient à l'aide de ce cycle de synthèse du glutamate. Dans les deux cas, un ion ammonium est ensuite fixé au glutamate au coût d'un ATP pour former la glutamine. Les deux voies proposées sont illustrées à la Figure 2.6. Ces deux nouvelles molécules, le glutamate et la glutamine, forment le réservoir d'azote où puisent de nombreuses voies biosynthétiques (Rawn, 1990).

D'un point de vue métabolique, l'ammonium est plus intéressant à consommer que le nitrate pour la cellule. Raven (1985) estime que l'entrée dans la cellule du nitrate (qu'elle doit réduire par la suite) coûte 305 photons par mole alors que 296 sont

nécessaires pour l'ammonium. D'un autre côté, von Wirén et coll. (1997) mentionnent que la forme d'azote consommé est sujette au maintien d'un équilibre endogène anion-cation.

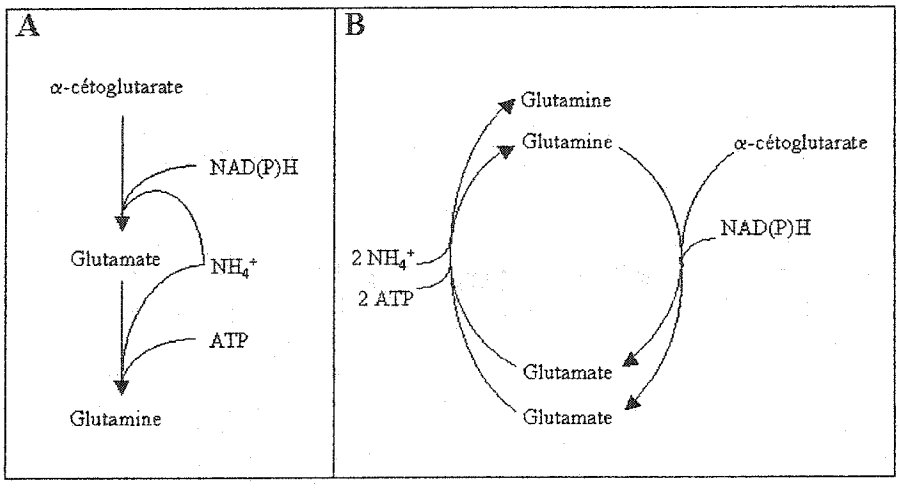


Figure 2.6 : **Voies suggérées pour la fixation de l'ion ammonium.** A. Adapté de Rawn (1990). B. Adapté de Lea et coll. (1992)

2.4.2.1. Ion ammonium

Comme bien d'autres ions, l'ammonium est absorbé du milieu de culture et une partie de cet ion retourne au milieu de culture via des courants de fuite. Il faut donc distinguer l'entrée des ions (influx) de la perte vers le milieu (efflux) et de la somme relative des deux phénomènes dont le résultat sera l'absorption (ou assimilation) nette.

Les échanges en ammonium entre la cellule et le milieu sont fonction de la concentration de cet ion dans le milieu (Barak et coll., 1996). L'influx d'ammonium ne

présente pas de dynamique de saturation, contrairement à l'absorption nette qui suit une dynamique de Michaelis-Menten tel qu'observée chez *Enteromorpha* et *Osmundaria colensoi* (Taylor et Rees, 1999). Selon ces observations, l'efflux d'ammonium présenterait donc une dynamique de saturation comme il fût observé dans le cas du nitrate (Grouzis et coll., 1997).

Selon Steiner et Dougall (1995), l'état d'agrégation cellulaire aurait aussi un impact significatif sur le taux d'absorption de l'ammonium. Une des raisons concerne le lien direct entre l'agrégation cellulaire et la surface d'échange (de membrane) disponible, celle-ci étant moindre lorsqu'il y a agrégation.

Certains facteurs comme la croissance, le contenu protéique, en azote et en enzyme d'assimilation de l'ammonium sont favorisés par la présence de ce dernier dans le milieu (Sengar et Srivastava, 1995). Par exemple, Goodchild et Givan (1990) remarquent que la concentration en ammonium a un effet négatif marqué sur la taille des réserves endogènes en acides aminés et que cet effet est fonction du pH du milieu de culture. Sachant que l'ion ammonium consommé provoque un relargage de protons (van Gulik, 1993), celui-ci est donc utilisé par San et Stephanopoulos (1984) pour contrôler le pH d'une culture de levure empêchant ainsi sa basification par des ajouts sporadiques d'ammonium. Cependant, il est généralement impossible de soutenir une croissance avec l'ammonium comme seule source azotée (*Daucus carota* (Veliky et Rose, 1973) ; *Fragaria ananassa* (Mori et Sakurai, 1994) ; *Hyoscyamus muticus*

(Oksman-Caldentey et coll., 1994)). Dans ce cas, le milieu de croissance s'acidifie jusqu'à inhiber complètement la croissance des cellules végétales.

Sargent et King (1974) constatent un effet bénéfique de l'ammonium à basse concentration cellulaire sur la croissance en biomasse sèche. Celui-ci est suivi d'un plateau, puis d'un effet négatif suite à l'augmentation de la concentration en ammonium. À des concentrations inférieures à 0.4 mM, une forte augmentation du taux de croissance est observée. Entre 0.4 mM et 2 mM, cette augmentation est ralentie alors qu'à des concentrations supérieures à 2 mM, la croissance diminue rapidement. Cependant, ces auteurs remarquent que les mêmes quantités d'ammonium (> 2 mM) alimentées de manière sporadique à quelques reprises (ex. : 5 ajouts de 0.4 mM ou 10 ajouts de 0.2 mM) n'inhibent pas la croissance. Il est donc possible de limiter les effets toxiques de l'ion ammonium en adaptant sa stratégie d'alimentation.

2.4.2.2. Ion nitrate

Tout comme l'ammonium, le nitrate traverse la membrane cellulaire dans les deux sens. Des mesures empiriques, appuyées par des calculs thermodynamiques, démontrent que l'influx de nitrate est énergivore, cette énergie étant fournie par le gradient protonique (Crawford et Glass, 1998). Santi et coll. (1995) remarquent d'ailleurs que l'activité des pompes à protons de la membrane plasmique peut directement influencer l'absorption de nitrate.

D'un autre côté, l'efflux de cet ion est sélectif, saturable à basses concentrations (K_M ~ 5 mM) et passif à plus hautes concentrations (Grouzis et coll., 1997) en plus d'être induit par sa présence (Aslam et coll., 1996). Schmidt et Schroeder (1994) rapportent d'ailleurs une très grande perméabilité des canaux anioniques lents au nitrate, appuyant ainsi la thèse d'efflux passif.

L'absorption du nitrate s'effectuerait via trois systèmes distincts : un système constitutif et un système induit, tous deux à hautes affinités (fonctionnant à très basses concentrations : < ~0.2 mM), en plus d'un système à basse affinité (opérant à plus hautes concentrations : > ~0.2 mM). Alors que les deux premiers présentent des cinétiques de saturation de type Michaelis-Menten à basses concentrations (K_m de 6-20 μM et 20-100 μM respectivement) en nitrate (*Arabidopsis thaliana* (Doddema et Otten, 1979) ; *Vicia faba* L. (Sánchez-Guerrero et coll., 1998)), le dernier serait constitutif avec une cinétique linéaire (Crawford, 1995) en plus de contribuer de façon significative à l'absorption du nitrate au-delà de 250 μM (Crawford et Glass, 1998). Par conséquent, la concentration intracellulaire en nitrate peut atteindre 100 mM lorsque le milieu est soumis à une alimentation continue de cet ion.

Alors que la majeure partie du nitrate consommé se retrouve dans la vacuole (Beck et Renner, 1989 ; Miller et Smith, 1996), la concentration cytoplasmique en nitrate demeure relativement constante à 3 mM dans le maïs et entre 4 et 5 mM dans l'orge (Miller et Smith, 1996). Cette accumulation intracellulaire de même que celle du

chlore affecteraient l'absorption du nitrate chez les racines de carottes (Cram, 1973) et d'orge (Cram, 1973 ; Smith, 1973).

D'autre part, les acides aminés diminuent l'activité de la nitrate réductase chez *Spirodela oligorrhiza* (Vijayaraghavan et coll., 1982) et inhibent la consommation de nitrate chez *Arabidopsis thaliana* (Doddema et Otten, 1979 ; Muller et Touraine, 1992). La présence du nitrate lui-même accroît l'activité de la nitrate réductase (provoquée par l'influx de nitrate plutôt que par ses réserves vacuolaires (Lea, 1993)) et de la nitrite réductase, cette dernière étant davantage susceptible à une diminution d'activité (Gupta et Beevers, 1983). Cresswell et Syrett (1982) indiquent que l'absorption du nitrite est inhibée par le nitrate, mais non de manière compétitive.

Dans certains cas, les cellules ne peuvent croître lorsque le nitrate constitue la seule source d'azote disponible dans le milieu de culture (*Daucus carota* (Veliky et Rose, 1973) ; *Fragaria ananassa* (Mori et Sakurai, 1994)). Selon Marigo et coll. (1985), le nitrate (anion inorganique) accumulé par les cellules provoque une perturbation métabolique favorisant ainsi la dégradation du malate (principal anion métabolique de *Catharanthus roseus*). Sachant que les acides organiques sont nécessaires au métabolisme énergétique et à la synthèse des acides aminés, la croissance s'en trouve donc directement affectée.

Le nitrate a donc un impact important sur la croissance des cellules végétales. La croissance en biomasse de *Parthenocissus tricuspidata* est ainsi accrue par l'ajout de

nitrate (Henshaw et coll., 1977). Il en est de même pour les cellules d'*Acer pseudoplatanus* de Jessup et Fowler (1976) dont la prolifération cellulaire est aussi limitée en azote. Simpkins et coll. (1970) constatent que le rendement en sucrose des cultures peut être accru par l'ajout de nitrate, ce qui confirme une limitation nutritionnelle de cet ion.

Par ailleurs, le taux de croissance ne semble pas affecté par le nitrate chez *Catharanthus roseus*, tant que ce dernier est présent dans le milieu de culture (Rho et André, 1991). Le même phénomène est observée chez *Lolium perenne* à basses concentrations en nitrate (0-14 mM), mais une diminution marquée apparaît néanmoins à plus hautes concentrations (~ 70-140 mM) (Clement et coll., 1978).

En revanche, King (1977) remarque une augmentation du taux de prolifération cellulaire avec une augmentation de la disponibilité en nitrate. L'inverse est aussi observé. De manière similaire, Burns et coll. (1997) rapportent un taux de croissance en biomasse suivant une cinétique de Monod à des concentrations en nitrate inférieures à 5 % g/g (soit environ < 5 mM) avec de la laitue et du chou. La stratégie d'alimentation en nitrate peut donc avoir un effet significatif sur la croissance en biomasse sèche et en prolifération cellulaire.

2.4.2.3. Synergie ammonium/nitrate

Le cycle cellulaire de l'azote est autorégulé. En effet, Aslam et coll. (1997) rapportent que l'ammonium extracellulaire régule l'induction de la nitrate réductase dans les

racines de *Hordeum vulgare* en limitant la disponibilité du nitrate. Ils ajoutent que dans le cas de la nitrite réductase, l'inhibition serait indépendante de la concentration en nitrate. Cette dernière inhibition a déjà été rapportée par Rose et Martin (1975) chez *Pomoea.*

Cet effet peut expliquer la diminution de la consommation du nitrate en présence d'ammonium telle que constatée par Beck et Renner (1989) avec *Chenopodium rubrum*, par Pépin (1996) avec *Vitis vinifera*, par Taylor et Bloom (1998) avec *Zea mays* cv. Dekalb, par Kronzucker et coll. (1999) avec *Hordeum vulgare* L et rapportée par Crawford et Glass (1998). Dans le cas de Beck et Renner (1989), il semblerait que l'ammonium soit consommé pendant la période de latence initiale alors que le nitrate disparaît du milieu lors de la phase exponentielle. Au surplus, l'ammonium inhiberait directement l'absorption du nitrite, selon Cresswell et Syrett (1982).

De surcroît, les flux intermembranaires en ammonium, la concentration cytosolique en ammonium et le métabolisme de l'ammonium sont tous favorisés par la présence de nitrate. En revanche, la présence d'ammonium restreint les flux, l'accumulation de même que le métabolisme du nitrate dans son ensemble (Kronzucker et coll., 1999).

Toujours selon Kronzucker et coll. (1999), l'ammonium aurait un effet direct sur la membrane plasmique. Il inhiberait l'influx de nitrate en agissant sur le système de transport induit plutôt que sur le système constitutif à haute affinité ou sur le système à

basse affinité. Cette diminution de l'influx de nitrate représenterait la cause majeure d'une diminution de l'absorption du nitrate.

Ces effets d'inhibitions mutuelles de l'ammonium et du nitrate sont sans aucun doute le résultat de signaux métaboliques émis autant par l'un que par l'autre. Ces signaux doivent être de nature moléculaire, dont les concentrations et les distributions cellulaires sont affectées par le besoin en azote de la cellule (Imsande et Touraine, 1994). Par exemple, des produits résultants de l'assimilation de l'ammonium doivent être impliqués dans la régulation de l'assimilation du nitrate car des inhibiteurs de la glutamate synthétase préviennent l'effet inhibiteur de l'ammonium sur la consommation du nitrate (Breteler et Siegerist, 1984).

Plusieurs auteurs constatent que le ratio NH_4/NO_3 est plus important que la concentration totale en azote elle même (e.g. *Fragaria ananassa* (Sato et coll., 1996) ; *Hyoscyamus muticus* (Oksman-Caldentey et coll., 1994 ; *Solanum* (Nigra et coll., 1990)). Alors que le premier semble directement relié au métabolisme primaire, le second limite la croissance par épuisement (Sato et coll., 1996).

Dans le même ordre d'idées, Sargent et King (1974) ont effectué une étude sur l'impact de la présence d'ammonium dans le milieu de culture de plusieurs espèces de plantes. Ils ont constaté que les cultures de fèves de soya (*Glycine max* L. cv. Mandarin), de fèves (*Phaseolus vulgaris*, *P. angularis* et *P. aureus*) et de riz (*Oriza sativa*) présentaient une augmentation significative de la croissance avec l'ajout d'ammonium.

Quant aux cultures de tabac (*Nicotiana tabacum*), de blé (*Triticum monococcum* L. var Thatcher), d'*Ammi visnaga* et de *Vicia vvillosa*, aucune amélioration n'est décelée. Seule la culture d'*Haplopappus gracilis* présente une inhibition de la croissance avec la présence d'ammonium.

En passant d'un ratio NH_4/NO_3 de 1/3.1 à 1.3/1 et même 2.6/1, Do et Cormier (1991) augmentent la prolifération cellulaire de *Vitis vinifera* de 70 % alors que celle-ci est plutôt inhibée de 20 % lorsque le ratio passe à 3.8/1. Le rapport optimal diffère d'une espèce à l'autre, passant de 1/12.5 selon Gamborg (1970) à 1/5 pour *Fragaria ananassa* (Sato et coll., 1996), 1/4 pour *Daucus carota* (Veliky et Rose, 1973), 1/2 pour *Colchicum autumnale* (Hayashi et coll., 1988), *Dioscorea deltoida* (Tal et coll., 1982) et *Solanum eleagnifolium* Cav. (Nigra et coll., 1990), 1/1 pour *Dioscorea deltoida* (Tal et coll., 1982), *Lolium perenne* L. (Bailey, 1998), *Oryza sativa* L. (Kronzucker et coll., 1999), *Pinus sylvestris* (Laukkanen et coll., 1997) et *Rauwolfia serpentina* Benth. (Yamamoto et Yamada, 1986), jusqu'à 3/1 pour la tomate (Bloom et coll., 1993). Dans le cas de *Brassica napus* L. (Ali et coll., 1998), ce ratio ne semble avoir aucun impact sur la croissance. Hormis ce dernier exemple, la production de biomasse obtenue dans tous les autres cas est inférieure ou supérieure à d'autres rapports NH_4/NO_3.

Dans le cas des conifères, de meilleures croissances sont possibles lorsque l'ammonium, sans nitrate, sert de source d'azote. De tels résultats sont obtenus avec *Picea abies* (L.) Karst. (Marschner et coll., 1991), *Pinus sylvestris* L. (Boxman et

Roelofs, 1988), *Pseudotsuga menziesii* (Gijsman, 1990; Kamminga-van Wijk et Prins, 1993; Bedell et coll., 1999) et par Kronzucker et coll. (1997). Du reste, certains roseaux arctiques préfèrent plutôt les acides aminés (Chapin et coll., 1993).

En augmentant le ratio NH_4/NO_3, le relargage d'anions carboxiliques (dont le citrate) diminue (Imas et coll., 1997). De plus, alors qu'une absence d'ammonium (ratio de 0/1) augmente le pH jusqu'à 8 et que celui-ci passe de 5.2 à 3 avec une absence de nitrate (ratio de 1/0), des ratios de 1/2 et de 2/1 entraînent respectivement le pH minimum à moins de 4.8 et 3.8 chez la tomate (Imas et coll., 1997). De manière similaire, en présence d'ammonium uniquement (16 mM), le pH d'une suspension de cellules de *Daucus carota* passe de 4.5 à environ 3.8 alors qu'il atteint un peu plus de 7 lorsque le ratio est de 1/3.3, pour une concentration totale en azote de 24 mM (Veliky et Rose, 1973). Cet effet amène Pilbeam et Kirkby (1992) à suggérer que les piètres croissances obtenues avec l'ammonium sont probablement dues aux variations de pH engendrées plutôt qu'à l'ion ammonium lui-même.

Il importe de mentionner un autre impact important de l'azote sur les cellules végétales. Lorsque soumises à un épuisement en azote, les cellules accumulent les glucides intracellulaires (*Catharanthus roseus* (Rho et André, 1991) ; *Petunia hybrida* (de Gucht et van der Plas, 1996) ; *Saccharum sp.* (Veith et Komor, 1993)). Ceci a donc pour effet de changer la composition générale de la biomasse. Un taux de respiration cellulaire moindre est aussi observé.

Les sources d'azote régulent donc la croissance en biomasse sèche de plusieurs façons. En plus d'avoir des effets propres à chacune (ammonium ou nitrate), leur synergie est très grande et les effets se font sentir sur la croissance via des changements dans leur consommation et particulièrement dans l'effet pH qui découle de la consommation des deux formes d'azote, oxydée (nitrate) et réduite (ammonium), utilisées.

2.4.3. Ion phosphate

Après l'azote, le phosphate est l'anion le plus souvent limitant lors de la croissance de cultures de cellules végétales (Schachtman et coll., 1998). Ce dernier a comme principale utilité l'accroissement de la disponibilité en adénosine triphosphate (ATP), en acides ribonucléiques (ARN) et désoxyribonucléiques (ADN) de même qu'en phospholipides. Il entraîne une augmentation du taux de production de protéines amenant une réduction des réserves d'acides aminés. Il conduit aussi à une diminution de protéases (Payne et coll., 1991) causant alors une augmentation de la consommation en oxygène (Pépin, 1996).

Selon la section 2.3.4, il est possible de constater que le phosphate pénètre la cellule par diffusion facilitée. À cette voie s'ajoute une voie de transport actif lorsque le gradient de phosphate intermembranaire devient trop important (Reid et coll., 1998). L'entrée du phosphate dans la cellule serait réalisée par symport avec deux protons (van Gulik, 1993), ce qui alcalinise le milieu de culture (Sakano, 1990). Toutefois, cet auteur observe que le ratio $H^+/H_2PO_4^-$ varie plutôt entre 1 et 4, tendant de préférence

vers 4. Fait intéressant à souligner, Schmidt et coll. (1992) identifient deux systèmes distincts d'absorption du phosphate chez *Catharanthus roseus* : un système à haute affinité et un à basse affinité. Alors que l'activité du premier peut être accrue ou réactivée par une limitation en phosphate (K_m de 50 à 330 μM), l'activité du second (K_m de 3 à 7 μM) est constitutive (Schachtman et coll., 1998).

Le phosphate est ensuite accumulé dans le cytoplasme en proportions relativement faibles (1 à 5 %) mais accessible, de même que dans la vacuole. Alors que la concentration cytoplasmique demeure quasi constante, celle vacuolaire peut varier de 0 à 25 mM (Schachtman et coll., 1998). Le phosphate intracellulaire est ensuite utilisé par la cellule sur une plus longue période de croissance (*Catharanthus roseus* (van Gulik et coll., 1993), laitue (Burns et coll., 1997), *Nicotiana tabacum* (Kato et coll., 1977)).

Le taux d'absorption du phosphate serait autorégulé. En effet, Lefebvre et Glass (1982) constatent que ce taux d'assimilation est inhibé par la présence d'orthophosphate, forme d'accumulation du phosphate inorganique intracellulaire. Ce phénomène est confirmé par Clarkson et Scattergood (1982) lorsque des plants d'orge et de tomate sont transférés d'une solution contenant du phosphate à une solution sans phosphate. Outre un ralentissement de croissance, ceux-ci observent une diminution de la concentration intracellulaire des réserves de phosphate inorganique accompagnée d'un accroissement du taux d'absorption du phosphate. Ce phénomène est alors facilement inversé par le transfert des plantes dans la solution d'origine avec phosphate.

Topa et Sisak (1997) relient aussi des taux élevés d'assimilation de phosphate à de faibles concentrations intracellulaires de ce nutriment dans des racines de différentes espèces de pin. Par l'étude du mouvement d'ions ^{32}P, ils discernent un mouvement de va-et-vient entre l'environnement et la cellule. Ils affirment même que le taux d'absorption net du phosphate est autant, sinon plus, contrôlé par le flux de fuite que par l'influx du phosphate. À ce sujet, Bieleski et Ferguson (1983) mentionnent que l'efflux de phosphate peut représenter de 8 à 70 % de l'influx. Le phosphate aurait aussi un effet de régulation sur l'assimilation de l'ion nitrate. Gniazdowska et coll. (1998) rapportent une diminution rapide des taux d'absorption du nitrate suite à un épuisement prolongé en ion phosphate.

Malgré l'accumulation intracellulaire du phosphate, plusieurs travaux rapportent des limitations de croissance causées par cet anion. Sato et coll. (1996) remarquent une relation directe entre la masse humide maximale de cellules de fraises obtenue et la concentration initiale en phosphate, ce qui suggère une limitation de la croissance en biomasse par épuisement de ce nutriment. Alors que Bramble et Graves (1991) relient la concentration en biomasse sèche finale à la concentration initiale en phosphate avec *Coffea arabica* de façon linéaire, Dougall et Weyrauch (1980) observent que le rendement en biomasse sèche varie aussi de façon linéaire avec le taux spécifique de croissance pour des cellules de carottes. De même, Sakano et coll. (1995) rapportent un arrêt de prolifération cellulaire de *Catharanthus roseus* qui serait provoqué par

l'épuisement du phosphate intracellulaire ainsi que Wilson (1976) avec *Acer pseudoplatanus* L.

Sakano et coll. (1995) mesurent des concentrations intracellulaires en phosphate au-delà de 100 μmol par gramme de matière humide, ce qui est de loin supérieur aux concentrations toxiques apparentes des plantes de 16 μmol par gramme de matière humide rapportées par Bieleski et Laüchli (1992). En faisant référence aux travaux de Ulrich (1941) sur la balance ionique, Sakano et coll. (1995) proposent, à titre d'explication métabolique de cette toxicité apparente, qu'une accumulation de phosphate (anion inorganique) en excès, tout comme dans le cas du nitrate, pourrait promouvoir une dégradation des acides organiques endogènes (anions métaboliques) tout en inhibant l'expansion de leurs réserves intracellulaires.

Au surplus, la synthèse et la dégradation de l'amidon intracellulaire sont régulées par le phosphate endogène (Preiss et Levi, 1980). Il s'ensuit que de fortes concentrations intracellulaires en phosphate induisent la disparition des réserves d'amidon du cytoplasme, provoquant alors un gonflement cellulaire (Sakano et coll., 1995). Il apparaît qu'une lyse phosphorylée incontrôlée de l'amidon est induite par des concentrations intracellulaires élevées en phosphate, ce qui provoque une augmentation de l'osmolarité cellulaire menant à la rupture membranaire. De tels effets de toxicité du phosphate intracellulaire sont aussi rapportés par Nieman et Clark (1976) chez des racines de maïs, par Robins et Ratcliffe (1984) chez *Humulus lupulus* et par Hunt et Helgeson (1989) avec des cultures de *Solanum*.

Des limitations provenant d'un effet de concentration sont aussi répertoriées. Curtis et coll. (1991) observent des taux de croissance en biomasse sèche qui augmentent avec la concentration initiale en phosphate, chez *Papaver somniferum.* Le même phénomène se produit avec des plants de blé (Barrett-Lennard, et coll., 1982) et des cellules de canne à sucre (Veith et Komor, 1991). Selon Burns et coll. (1991), cette cinétique de croissance en fonction de la concentration intracellulaire en phosphate suit une loi de Monod, ce qui est aussi observé par Kato et coll. (1977). Balagué et Wilson (1982) constatent que des concentrations supérieures en masses sèche et humide sont atteintes à l'équilibre en perfusion lorsque la concentration en phosphate dans l'alimentation est réduite. Le phosphate limite donc la croissance à la fois par épuisement et par effet de concentration.

2.4.4. Synthèse

Il apparaît donc clairement que les nutriments interagissent grandement entre eux lors de la croissance de cellules végétales. Leur présence et leurs concentrations influencent les taux d'absorption. De plus, les cinétiques de croissance en biomasse sèche en fonction des concentrations des quatre nutriments étudiés (glucose, ammonium, nitrate et phosphate) présentent toutes une forme de Monod à basse concentration, suivie d'une inhibition à plus haute concentration. Ces travaux suggèrent une cinétique globale de croissance des cellules végétales en fonction des nutriments ayant une forme de cloche légèrement déformée (Figure 2.7).

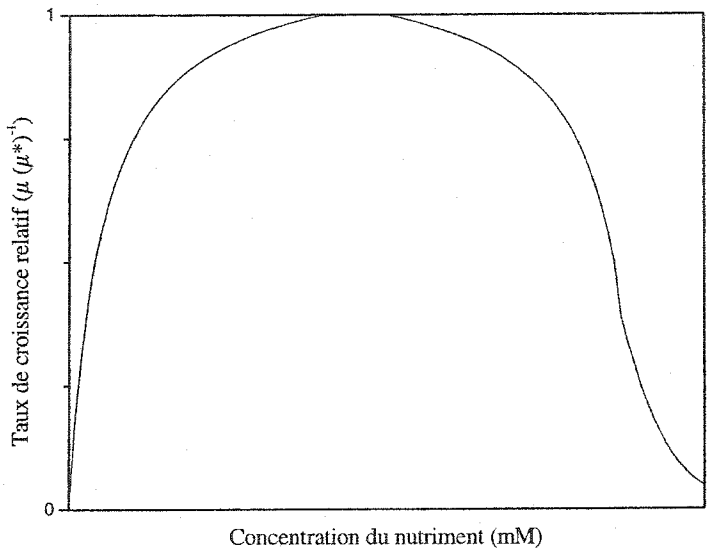


Figure 2.7 : Cinétique globale de croissance en fonction du glucose et du phosphate

2.5. Modélisation de suspensions de cellules végétales

La modélisation de cultures permet de caractériser l'impact de certains facteurs environnementaux sur le métabolisme cellulaire. Le modèle obtenu révèle la réaction de la suspension cellulaire aux conditions de culture imposées. De manière générale, un modèle peut être prédictif ou descriptif.

Un modèle prédictif se doit d'être mathématiquement autonome, c'est-à-dire que l'évolution de chaque facteur compris dans l'une des équations du modèle est elle-même décrite par une équation du modèle. Ainsi, par exemple, si le taux de croissance est affecté par la concentration du phosphate dans le milieu de culture, l'évolution de celui-ci en fonction de l'alimentation et de l'absorption doit aussi être décrite dans le

modèle. Ce genre de modèle est utilisé pour améliorer la compréhension du comportement d'une culture en fonction des facteurs environnementaux et en faire une synthèse. Il est aussi utilisé pour prédire l'évolution des différentes variables décrites suite à une ou plusieurs perturbations sur une ou plusieurs variables du modèle. Les principaux avantages d'un tel modèle sont donc de faire la synthèse de l'information existante, d'apporter de nouvelles informations, de prédire le comportement des cultures dans le but de développer des stratégies maximisantes et donc, de réduire l'expérimentation par la simulation.

Un modèle descriptif correspond en fait à un modèle prédictif auquel est ajouté une ou plusieurs relations avec une ou plusieurs variables dont les vraies valeurs sont connues en temps réel. Cette variable réelle peut être directement mesurée ou obtenue indirectement à l'aide d'un estimateur ou d'un observateur (Bastin et Dochain, 1990). Un modèle descriptif permet donc de suivre, en temps réel, l'évolution de plusieurs variables de culture non mesurées. Les principaux avantages d'un tel outil sont donc de suivre la progression de plusieurs variables en temps réel et de servir de base pour une optimisation en continu.

2.5.1. Caractéristiques structurelles d'un modèle

La structure des modèles mathématiques leur confère certaines propriétés qui leur sont propres. La Figure 2.8 présente les principales caractéristiques des modèles mathématiques de suspensions cellulaires selon Barford et Hall (1978).

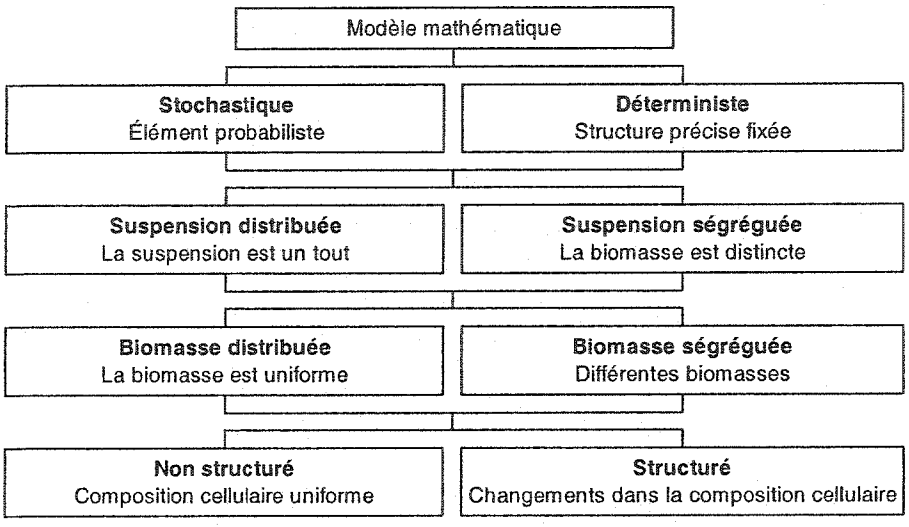


Figure 2.8 : Caractéristiques structurelles d'un modèle d'après Barford et Hall (1978)

Quelques interprétations douteuses de ces caractéristiques peuvent être relevées dans la littérature. Ainsi, Bailey et Nicholson (1989) disent d'un modèle ne contenant qu'un seul type de biomasse qu'il est non structuré, ce qui définit plutôt la composition de la biomasse. Les modèles à une ou plusieurs biomasses sont ségrégués ou non quant à la biomasse. Il faut donc détailler chacune des six caractéristiques, exclusives deux à deux, dans le cadre de ce projet de recherche.

Un modèle de culture de suspension cellulaire peut donc être caractérisé selon trois principales propriétés. La première caractéristique se rapporte à la structure même du modèle. S'il y a présence d'un élément probabiliste (variable, paramètre, etc.), le modèle est d'ordre stochastique (par exemple les modèles à logique floue). En

revanche, si la structure du modèle est fixe et que ses paramètres sont déterminés selon un critère arbitraire (mesure, erreur minimale, etc.), le modèle est déterministe. Seuls les modèles déterministes sont présentés à la section 2.5.3.

La seconde caractéristique d'un modèle se présente à deux niveaux. Il s'agit de sa ségrégation. La ségrégation du modèle peut être faite au niveau de la suspension dans l'ensemble. En ce sens, le modèle peut être distribué ou ségrégué. Dans le premier cas, la suspension est considérée comme un tout uniforme ramené au volume total de la suspension (ex. : les concentrations de toutes les variables sont en unité L^{-1}). Lorsque la suspension est ségréguée, la masse cellulaire est réputée distincte (i.e. une entité en elle-même). Dans ce dernier cas, certains composés peuvent être exprimés en unité $(g\ biomasse)^{-1}$. Le modèle peut aussi être ségrégué au niveau de la biomasse (ou de toute autre variable de croissance). Lorsque celle-ci est considérée uniforme et que la moyenne représente adéquatement l'ensemble de la population, le modèle est alors distribué par rapport à la biomasse. En revanche, lorsque des populations distinctes forment la population globale, le modèle est plutôt ségrégué par rapport à la biomasse.

Finalement, le niveau de définition de la variable de croissance confère sa troisième caractéristique au modèle. Lorsque des différences dans la composition même de la cellule sont décrites (ex. : phosphate intracellulaire vs phosphate structural), le modèle est réputé structuré.

2.5.2. Approches de modélisation

Avant d'obtenir un modèle de suivi en continu, la première étape de modélisation d'un procédé consiste à développer un modèle prédictif. Il existe trois approches différentes basées sur la connaissance *a priori* du procédé afin d'obtenir un modèle de culture soit celle de la boîte blanche, celle de la boîte noire et finalement, celle de la boîte grise (Varner et Ramkrishna, 1999).

La première méthode de modélisation, la plus conventionnelle, est basée sur les principes premiers de bilans massiques et de relations de cause à effet. La phénoménologie du procédé est directement encodée sous forme d'équations mathématiques et les variables de moindre importance sont négligées. Des bilans massiques sont réalisés sur les variables de suivi qui intéressent l'usager et sur les variables qui semblent les affecter de façon significative (ex. : biomasse sèche et glucose). Par la suite, les cinétiques appropriées et les paramètres manquants sont déterminés et incorporés aux bilans (ex. : vitesse de croissance, taux de consommation, impact du glucose sur la croissance, etc.).

La force de cette approche réside dans sa rigueur. En effet, le modèle est basé sur les lois inviolables de la conservation de la matière et l'évaluation de ses paramètres se doit d'être expérimentale ou basée sur des théories établies (ex. : principes thermodynamiques). Il représente un excellent outil d'apprentissage sur les actions et les interactions des variables du système. Toutefois, le talon d'Achille de cette

méthode est la structure du modèle qui est basée sur la connaissance et l'instinct de celui qui le développe. Si l'utilisateur cible bien les variables à décrire, le modèle sera performant. Sinon, des différences importantes sont à prévoir entre les prédictions du modèle et les données expérimentales. De plus, il arrive que certains paramètres du modèle obtenus des bilans soient difficilement mesurables, voire impossible à déterminer avec les connaissances actuelles. Dans ce cas, ceux-ci sont utilisés pour minimiser l'erreur de description du modèle (e.g. Sirois, 1997). La valeur de chaque paramètre et son impact ne peuvent que suggérer certains comportements et phénomènes sans toutefois être adoptés tels quels.

Une autre école de pensée préconise une modélisation qui repose sur le principe de la boîte noire. Cette façon de procéder, bien connue en ingénierie, consiste à considérer le procédé (la suspension cellulaire) comme une boîte dans laquelle entrent certains réactifs (nutriments, conditions environnementales, etc.) et de laquelle sortent des produits (taux de croissance, de production, types de molécules, etc.), sans tenir compte de la nature de la réaction (consommations nutritionnelles, synthèse des composés, etc.). Les exemples les plus courants sont les techniques de modélisation selon les méthodes de Volterra de même que les réseaux neuronaux.

Varner et Ramkrishna (1999) mentionnent que la structure mathématique est forcée d'obéir aux observations expérimentales. De manière plus vulgarisée, il s'agit en fait de lisser un polynôme aux données expérimentales sans que celui-ci, ni même les coefficients qu'il comporte, ne signifient nécessairement quoi que ce soit de physique.

D'ailleurs, Varner et Ramkrishna (1999) rapportent que cette approche assure une description du comportement du procédé, du moins localement. Cette approche a déjà obtenu un certain succès là où l'approche conventionnelle (boîte blanche) éprouvait des difficultés (Doyles et coll., 1995 ; Pearson et coll., 1996).

Finalement, l'approche de la boîte grise prône l'union des deux approches précédentes. Il s'agit en fait d'utiliser des principes de chacune des deux approches pour éliminer certains éléments problématiques de l'une, sans diverger nécessairement vers l'autre. Dans le domaine des bioprocédés, l'utilisation des systèmes neuronaux pour déterminer simultanément la forme des différents taux de croissance dans un modèle conventionnel (Bernard et coll., 1999) constitue un excellent exemple.

2.5.3. Modèles prédictifs de la croissance de cellules végétales

Un peu moins d'une vingtaine de modèles décrivant l'évolution de variables de suspensions cellulaires végétales sont répertoriés jusqu'à maintenant. Cette section présente les principales équations et discute de leur forme. Ces équations sont réécrites pour uniformiser la nomenclature et éviter ainsi une accumulation de constantes inutiles à leur compréhension. Les modèles sont accompagnés d'une figure présentant la description des variables caractérisant la croissance afin d'en apprécier la qualité. Ces modèles de suspension de cellules végétales sont présentés en ordre chronologique.

King (1977) présente un premier modèle simple décrivant adéquatement les résultats d'une perturbation du profil d'alimentation du nutriment limitant, de n_1 à n_2, sur la concentration cellulaire (c) de cellules de sycomore d'une culture alimentée en continu:

$$c = Y_{c/n} n_1 \left[\frac{n_2}{n_1} - \left(\frac{n_2}{n_1} - 1 \right) e^{-Dt} \right] \qquad 2.2$$

Ce modèle est distribué, autant au niveau de la suspension cellulaire que de la biomasse, et non structuré. La Figure 2.9 présente le profil d'évolution de la concentration cellulaire obtenu avec l'équation 2.2 (seule équation du modèle) suite à un changement de la concentration en nitrate dans l'alimentation de 7 mM à 10 mM. De composition très simple, ce modèle (un des deux seuls décrivant la prolifération cellulaire) est limité aux cultures alimentées dont un seul nutriment est limitant et dont sa concentration est maintenue constante par une alimentation soutenue. Il s'agit d'un premier pas dans la description mathématique de la prolifération cellulaire mais n'est d'aucune utilité pour une quelconque optimisation.

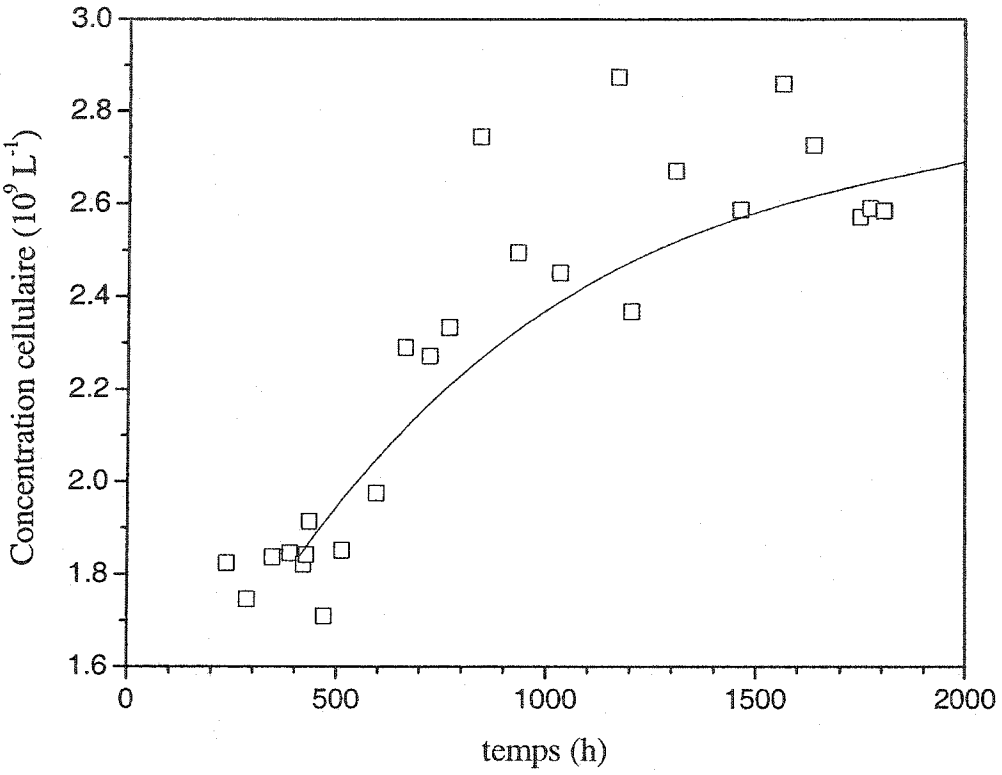


Figure 2.9 : Prolifération cellulaire selon King (1976). □ Données expérimentales. — prédiction du modèle

Quelques années plus tard, Grm et Mele (1980) publient un modèle décrivant les phases de croissance et de production de cellules de *Claviceps purpurea*. Beaucoup plus complexe que le précédent, ce modèle représente une avancée significative dans la description des cultures de cellules végétales en suspension. Les auteurs supposent que la biomasse (x) est répartie en quatre groupes selon leur fonction : absorption du substrat et synthèse de nouveaux constituants cellulaires (A), croissance (B),

production des lipides et des alcaloïdes sans croissance (C) et inerte (D). Ce modèle non structuré est distribué quant à la suspension avec une biomasse sèche ségréguée. La Figure 2.10 présente l'évolution de ces quatre biomasses et de la biomasse totale obtenue à partir des équations 2.3 à 2.10.

$$\frac{dx_A}{dt} = -\mu_B x_A + \mu_A x_B \qquad 2.3$$

$$\frac{dx_B}{dt} = 2\mu_B x_A - (\mu_A + \mu_C) x_B \qquad 2.4$$

$$\frac{dx_C}{dt} = \mu_C x_B - (\mu_D + k_m) x_C \qquad 2.5$$

$$\frac{dx_D}{dt} = \left(1 - \frac{1}{Y_{x_C/pr}}\right)\mu_D x_D - k_m x_D \qquad 2.6$$

$$\frac{ds}{dt} = -\frac{\mu_B}{Y_{x_A/s}} x_A \qquad 2.7$$

$$\frac{dpr}{dt} = -\frac{\mu_D}{Y_{x_C/pr}} x_C \qquad 2.8$$

$$\mu_B = \begin{cases} \mu_B^0 & t < 48h \\ \mu_B^0 e^{-b_1(t-48)} & t \geq 48h \end{cases} \qquad 2.9$$

$$\mu_A = \begin{cases} \mu_A^0 & t < 48h \\ \mu_A^0 e^{-b_2(t-48)} & t \geq 48h \end{cases} \qquad 2.10$$

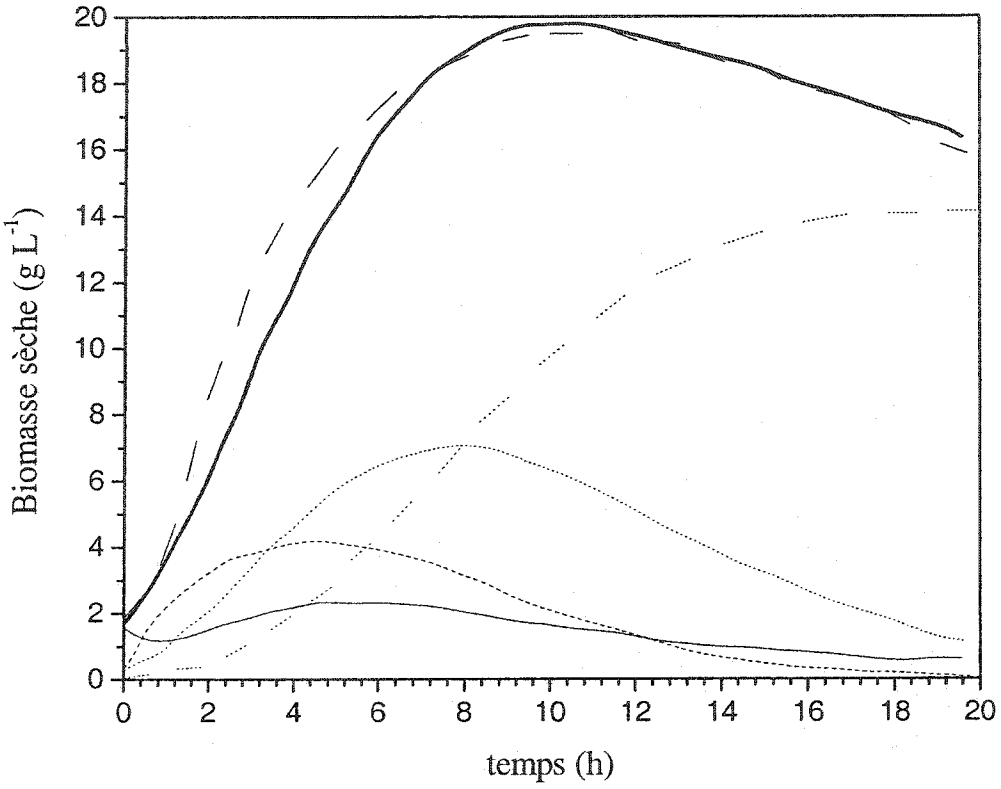


Figure 2.10 : **Profils de biomasses sèches selon Grm et Mele (1980). — biomasse A, ---- biomasse B, ····· biomasse C, ··· ··· biomasse D, ▬▬ biomasse totale, — — profil expérimental.**

Cette approche est très intéressante, mais évidemment plus complexe à réaliser. Le modèle démontré présente quelques lacunes dont une relation temporelle (48 h) tout à fait arbitraire pour définir l'influence du phosphate sur la conversion de la biomasse absorbante (A) en biomasse divisante (B) dû à l'incapacité des auteurs à modéliser cet impact (Grm et Mele, 1980). De plus, les paramètres déterminés pour obtenir le profil

d'une culture lui sont spécifiques. Ce modèle est donc spécifique à chaque culture, ce qui fait que son utilité est réduite.

En 1981, Pazoutová et coll. présentent un modèle accentuant l'effet du phosphate sur la croissance de la biomasse de *Claviceps purpurea* (équations 2.11 à 2.14).

$$\frac{dx}{dt} = \mu_1\left(1 - e^{-K_1 po_{4i}}\right)x - K_2 x^2 \qquad 2.11$$

$$\frac{dpo_{4e}}{dt} = -q_p \frac{po_{4e}}{po_{4e} + K_p} x + \left(\frac{1}{Y_{x/p}} + po_{4i}\right) K_2 x^2 \qquad 2.12$$

$$\frac{dpo_{4i}}{dt} = \frac{1}{x}\frac{dpo_{4e}}{dt} - \left(\frac{1}{Y_{x/p}} + po_{4i}\right)\frac{1}{x}\frac{dx}{dt} \qquad 2.13$$

$$\frac{dpr}{dt} = q^*_{pr} \frac{K_{pr}}{K_{pr} + po_{4i}^2} \qquad 2.14$$

K_1, K_2, K_P et K_{Pr} sont des constantes de saturation alors que q_P et q_{Pr} sont des taux de consommation du phosphate et de synthèse du produit respectivement. Ce modèle non structuré est ségrégué quant à la suspension (le phosphate intracellulaire est exprimé en g (g de biomasse)$^{-1}$), mais ne l'est pas quant à la biomasse. La forme de sa cinétique de croissance, qui est uniquement fonction du phosphate, est propre aux auteurs. La concentration intracellulaire en phosphate est estimée par la différence entre la consommation spécifique du phosphate extracellulaire (2.13, 1er terme) et la somme des pertes causées par lyse cellulaire ou par transformation en phosphate lié (2.13, 2^{ième} et 3^{ième} terme). L'impact du phosphate sur la croissance et sur la production est bien défini étant donné la capacité du modèle à décrire l'évolution de plus d'une culture à différentes conditions initiales en phosphate. D'ailleurs, les auteurs se servent

de ce modèle pour optimiser l'alimentation en phosphate par simulation. Un exemple de description de culture au moyen de ce modèle est présenté par la Figure 2.11.

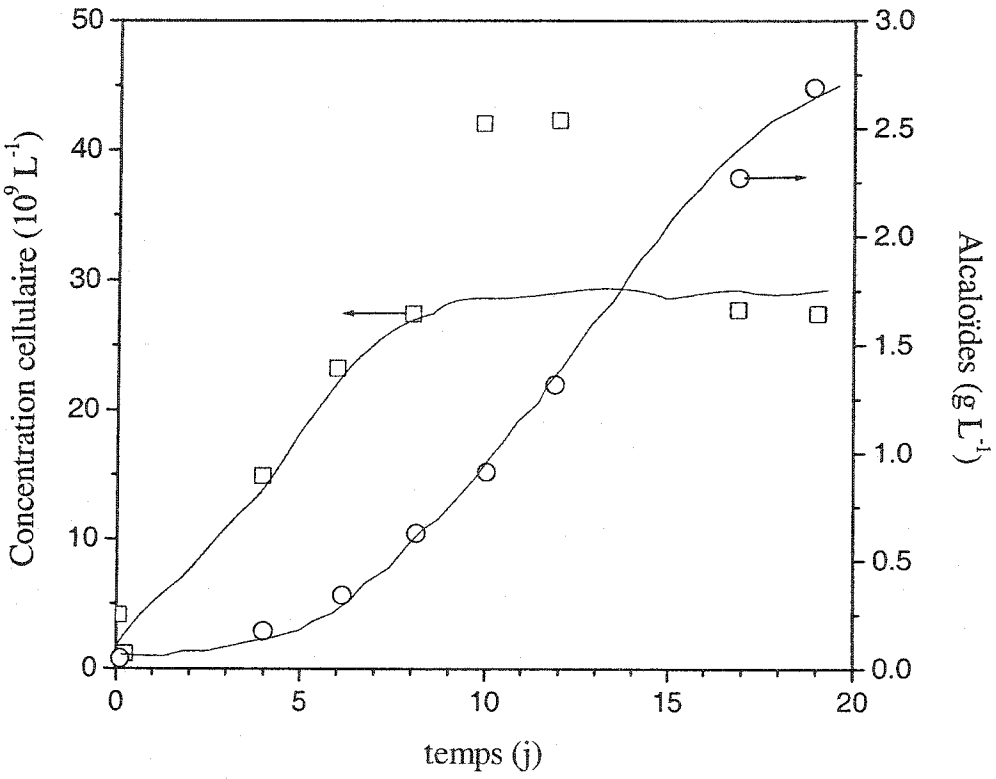


Figure 2.11 : Profil de biomasses selon Pazoutová et coll. (1981). □ biomasse seche, ○ alcaloïde, — Prédictions du modèle.

En 1986, Quinlan publie une amélioration du modèle logistique microbien de Fencl (1966) appliqué à la prolifération de cellules végétales. Le modèle logistique est modifié de manière à ce que la concentration cellulaire finale atteinte soit fonction de

la disponibilité d'un nutriment limitant. Ce modèle est représenté par les équations 2.15 à 2.17 suivantes:

$$c_{k_t} = c_\infty \left[1 + (c_\infty - c_0) c_0^{-1} e^{-\mu k_t \Delta t}\right]^{-1} \qquad 2.15$$

$$c_\infty = \frac{\mu}{K} Y_{c/n} \qquad 2.16$$

$$\mu = K n_0 + \frac{\ln\left(1 - {}^{V_{éch}}/_{V}\right)}{\Delta t} \qquad 2.17$$

où, spécifiquement dans ce modèle, k_t, c_{kt} et c_∞ représentent respectivement le numéro d'échantillon, la concentration cellulaire pour l'échantillon k_t et la concentration cellulaire finale. Ce modèle est distribué en tous points et non structuré. L'auteur mentionne que son modèle décrit adéquatement la croissance en cuvée alimentée de plusieurs types de cellules : *Asterionella formosa* et *Cyclotella meneghiniana* (diatomées), cellules de souris (cellules animales) et *Daucus carota* (cellules végétales). Cependant, aucune courbe n'est présentée dans ce dernier cas ce qui ne permet pas d'apprécier les capacités du modèle avec des suspensions de cellules de plantes. Par ailleurs, l'utilisation d'un modèle logistique est piégée : la cinétique de croissance est prédéfinie et fixe. L'utilisation d'une telle forme ne génère aucune information utile et ne tient pas compte de quoi que ce soit dans la culture, hormis l'épuisement d'un nutriment dans ce cas particulier.

Frazier (1989) présente un modèle original pour décrire la croissance de *Dioscorea deltoidea*. Sa principale hypothèse porte sur un métabolite essentiel à la croissance qui fuit des cellules vers le milieu de culture. Cette hypothèse sert à expliquer la phase de latence en début de culture, laquelle serait attribuable à la perte de ce métabolite. Dans le cas d'une culture de *Dioscorea deltoidea*, cet auteur propose que le sucrose est rapidement transformé en glucose et en fructose à l'intérieur même de la cellule ou sur sa paroi, et que l'excès de ces nutriments diffuse vers le milieu. Sa représentation mathématique est illustrée par les équations 2.18 à 2.21:

$$\frac{dx^*}{dt^*} = \frac{n_i^*}{1+n_i^*} x^* \qquad 2.18$$

$$\frac{ds^*}{dt^*} = -K_1 \frac{(1-K_2 s^*)^2}{1-K_3 x^*}\left(\frac{s^*}{1+s^*}\right)x^* + K_3 \frac{1-K_2 s^*}{1-K_3 x^*}\left(\frac{n_i^*}{1+n_i^*}\right)s^* x^* \qquad 2.19$$

$$\frac{dn_e^*}{dt^*} = \frac{1-K_2 s^*}{1-K_3 x^*}\left[K_4 x^{*1/3}\left(K_5 n_i^* - n_e^*\right) + K_6\left(\frac{s^*}{1-s^*}\right)n_e^* x^* + K_3\left(\frac{n_i^*}{1+n_i^*}\right)n_e^* x^*\right] \qquad 2.20$$

$$\frac{dn_i^*}{dt^*} = K_7\left(\frac{s^*}{1-s^*}\right) - K_8 x^{*-2/3}\left(K_5 n_i^* - n_e^*\right) - \left(n_i^* + K_9\right)\left(\frac{n_i^*}{1+n_i^*}\right) \qquad 2.21$$

Spécifiquement pour ce modèle, n_e et n_i représentent les concentrations extracellulaire et intracellulaire du glucose et du fructose combinées, alors que le signe * signifie que la variable est normalisée. Le modèle est entièrement distribué et non structuré.

L'étude des résultats présentés (Figure 2.12) indique qu'aucune augmentation rapide de la biomasse sèche en début de culture n'est observée, ce qui devrait se produire s'il y avait réellement assimilation rapide des nutriments extracellulaires. Ceci invalide donc l'hypothèse de départ, soit que le sucrose est pompé et hydrolysé rapidement à l'intérieur de la cellule, d'où fuient le glucose et le fructose vers l'extérieur de la cellule. L'auteur en vient à la conclusion que pour ces cellules, la principale cause de latence est une fuite des monosaccharides vers le milieu de culture.

De tels résultats n'ont jamais été rapportés dans la littérature. Il est peu probable que la phase de latence soit provoquée par un tel phénomène. Lors d'expériences effectuées avec du sucrose ou du glucose comme source de carbone, les profils de croissance similaires obtenus démontraient que la phase de latence n'était ni due à la nature du glucide utilisé, ni fonction de sa concentration initiale (résultats non publiés). Ceci va donc à l'encontre de la seconde partie de l'hypothèse sur laquelle repose le développement du modèle. La modélisation, selon l'approche des principes premiers (boîte blanche), repose complètement sur la connaissance *a priori* du procédé. Les hypothèses instigatrices doivent être conformes aux observations expérimentales, les données publiées et la théorie qui s'applique au domaine. Si tel n'est pas le cas, le comportement final du modèle mène à de fausses conclusions, biaisées par les hypothèses et la forme mathématique initialement privilégiées.

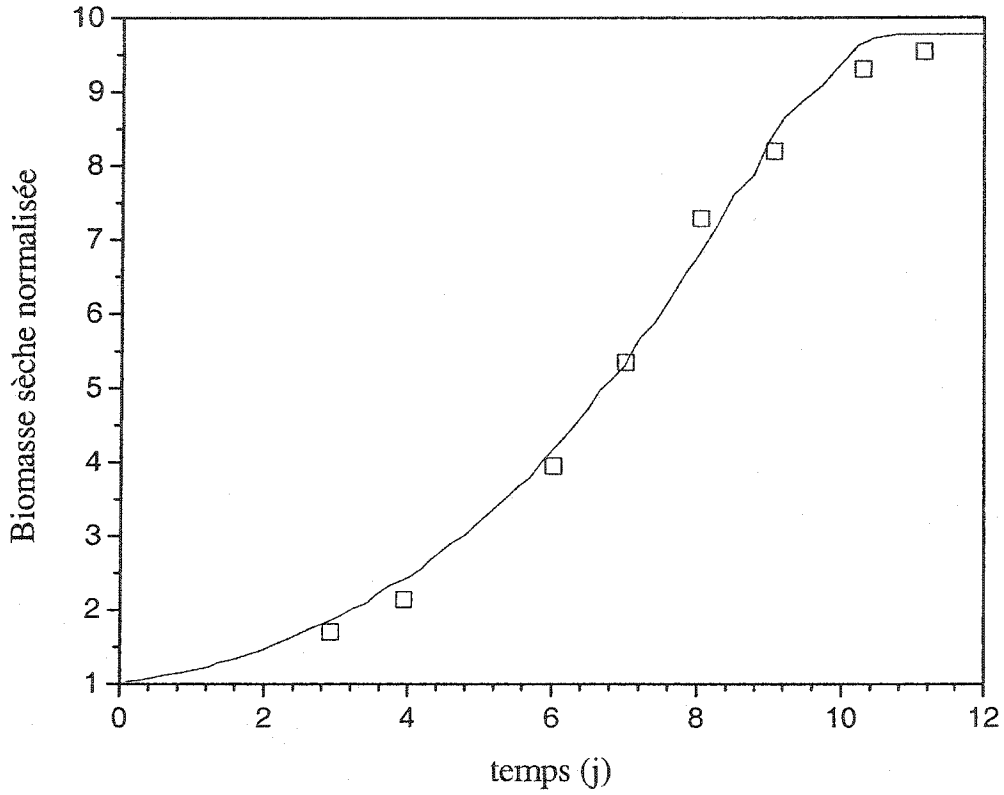


Figure 2.12 : Profil de biomasse normalisée selon Frazier (1989).□ données expérimentales — prédiction du modèle

En 1989, Bailey et Nicholson présentent un nouveau modèle qu'ils disent structuré, bien qu'il soit ségrégué par rapport à la biomasse. Celui-ci décrit l'évolution des biomasses sèches (viable, non viable et totale), de la biomasse humide, de la synthèse d'un produit et de la consommation du nutriment. Ce modèle non structuré à biomasse ségréguée est donc distribué quant à la suspension. De manière à être autonome, la description du rapport biomasse humide/biomasse sèche fait partie intégrante du

modèle, permettant ainsi de calculer la viabilité. Cette dernière relation est basée sur l'hypothèse d'une fragilité supérieure au stress mécanique des plus grosses cellules. Les équations 2.22 à 2.27 représentent ce modèle:

$$\frac{dx_s}{dt} = (\mu_n v_x n - k_m)x_s \qquad 2.22$$

$$\frac{dn}{dt} = -\frac{\mu_n n}{Y_{x/s}} x_s \qquad 2.23$$

$$\frac{dv_x}{dt} = v_x\left[\mu_n n(1 - v_x) - K_1\chi^2\right] \qquad 2.24$$

$$\frac{dx_h}{dt} = \frac{x_h}{v_x}\frac{dv_x}{dt} + K_2 v_x x_s \qquad 2.25$$

$$\frac{dpr}{dt} = K_3 v_x \frac{dx_s}{dt} + K_4 v_x x_s + \frac{pr}{v_x}\frac{dv_x}{dt} \qquad 2.26$$

$$\chi = \frac{x_h}{vx_s} \qquad 2.27$$

Particulièrement dans ce cas, μ_n (L g^{-1} h^{-1}) représente le taux de croissance associé au nutriment limitant n alors que v_x représente la viabilité de la biomasse, K_1, K_2, K_3 et K_4 représentent des taux de réaction. Aucune cinétique de croissance n'étant spécifiée, une constante lui est assignée. La forme proposée par ce modèle est intéressante du fait que la biomasse est séparée en différentes composantes selon leurs propriétés avec une plus grande simplicité que Grm et Mele (1980). L'information fournie par ces deux modèles n'est toutefois pas la même. Le modèle de Bailey et Nicholson (1989) démontre quelques faiblesses, dont l'absence totale de résultats sur l'évolution de la concentration du nutriment limitant. Les auteurs fixent arbitrairement la concentration

initiale à 1.0 g L^{-1}, obtenant ainsi une courbe standardisée. De fait, aucun rendement ne peut être calculé. La valeur fixée étant faible, il s'avère impossible d'apprécier le type de cinétique de croissance présente avec de telles cultures. Cette situation explique la relation linéaire obtenue avec le nutriment limitant dans leur publication. La Figure 2.13 présente leur prédictions des biomasses sèche et humide.

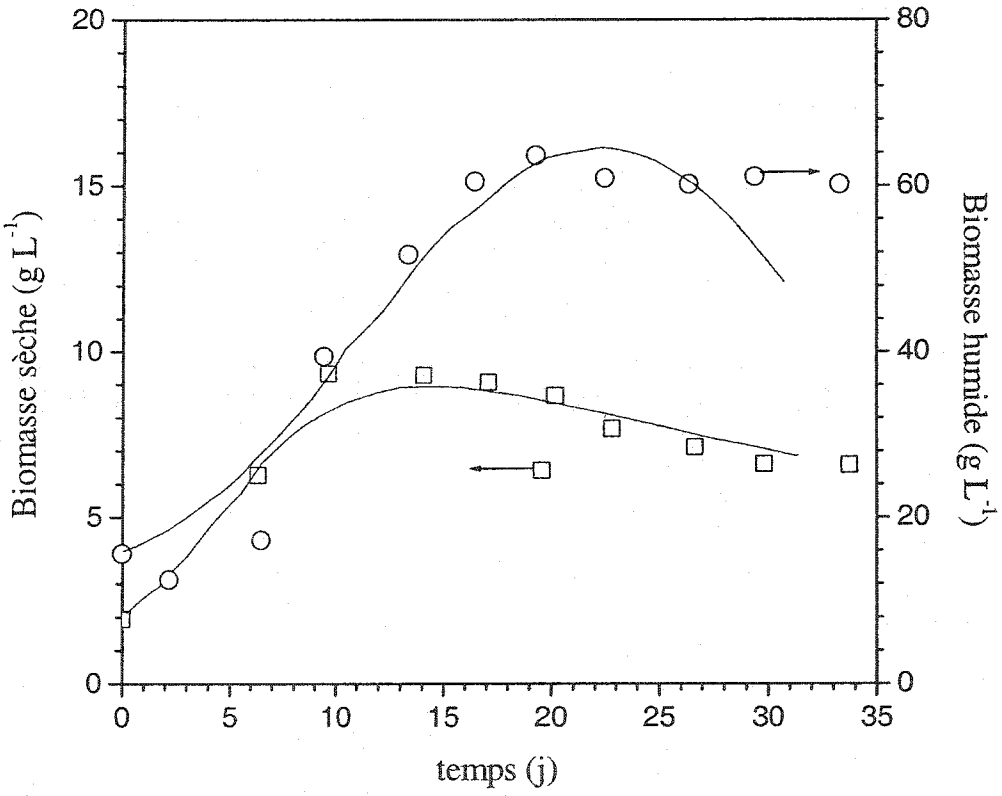


Figure 2.13 : Profils des biomasses sèche et humide selon Bailey et Nicholson (1989).

□ biomasse sèche, ○ biomasse humide, — prédiction du modèle.

En 1990, Taticek propose un modèle de croissance pour la biomasse des cellules d'*Eschscholtzia californica*. Il décrit la consommation des sucres par l'utilisation d'une équation logistique où le taux spécifique de croissance est obtenu en lissant l'équation 2.29 aux données expérimentales.

$$\frac{dg}{dt} = \left(\frac{\mu}{Y_{x/g}} + m_g \right) x_s \qquad 2.28$$

$$x_s = \frac{x_0 e^{\mu(t-t_0)}}{1 - \frac{x_0}{x_\infty}\left[1 - e^{\mu(t-t_0)}\right]} \qquad 2.29$$

La forme du modèle le classe comme distribué et non structuré. Comme pour le modèle de Quinlan (1986, équations 2.15 à 2.17), un modèle logistique n'est pas d'un grand recours pour la compréhension des phénomènes de croissance ni pour l'optimisation du procédé. De plus, la détermination du taux spécifique par un lissage des données expérimentales implique que le modèle est spécifique à une culture et n'est donc d'aucune utilité subséquente.

Bramble et coll. (1991) proposent un modèle décrivant l'évolution des concentrations en biomasse sèche (x_s), en glucose (g), en phosphate intracellulaire (po_{4i})et extracellulaire (po_{4e}) de même qu'en alcaloïdes selon les équations 2.30 à 2.34.

$$\frac{dx_s}{dt} = \mu_{max} \frac{g}{K_1 + g}\left[1 + K_2\left[\frac{1}{ca} + \frac{ca^2}{K_2 K_3^2}\right]\left[\frac{K_3}{K_3 + ca}\right]\right]^{-1} x_s - k_m x_s \qquad 2.30$$

$$\frac{dg}{dt} = -\mu_{max} \frac{g}{K_1 + g}\left[1 + K_2\left[\frac{1}{ca} + \frac{ca^2}{K_2 K_3^2}\right]\left[\frac{K_3}{K_3 + ca}\right]\right]^{-1} \frac{x_s}{Y_{x/g}} \qquad 2.31$$

$$\frac{dpo_{4e}}{dt} = -q_{po_4}\frac{po_{4e}}{K_4 + po_{4e}}x_s + \left(\frac{1}{Y_{x/po_4}} + po_{4i}\right)k_m x_s \qquad 2.32$$

$$\frac{dpo_{4i}}{dt} = q_{po_{4i}}\frac{po_{4e}}{K_4 + po_{4e}} - \left(\frac{1}{Y_{x/po_4}} + po_{4i}\right)\frac{g}{K_1 + g}\left[1 + K_2\left[\frac{1}{ca} + \frac{ca^2}{K_2 K_3^2}\right]\left[\frac{K_3}{K_3 + ca}\right]\right]^{-1} \qquad 2.33$$

$$\frac{dpr}{dt} = q_{pr}\frac{pr}{K_5 + pr^2}x_s \qquad 2.34$$

La suspension est donc ségréguée puisque le phosphate intracellulaire est exprimé par rapport à la biomasse. Celle-ci est distribuée et le modèle est non structuré. Ce modèle est basé sur une série d'expériences traitant de l'impact du calcium (ca) et du phosphate sur la croissance et sur la production de même que sur la théorie publiée traitant des inhibitions nutritionnelles. Sa structure est ainsi représentative de la réalité. Ceci se reflète effectivement dans les résultats obtenus (Figure 2.14).

Ce modèle est relativement simple et ses constantes sont déterminées expérimentalement, à l'exception de quatre d'entre elles qui sont utilisées pour minimiser l'erreur d'estimation du modèle. Cependant, comme l'indiquent les équations 2.30, 2.31 et 2.33, l'évolution de la biomasse, du glucose et du phosphate intracellulaire est fonction de la concentration du nutriment limitant, dans ce cas-ci le calcium (ca). Puisque aucune équation du modèle ne décrit l'évolution de cette variable, un profil prédéterminé doit être établi. La valeur instantanée de la concentration en calcium nécessaire à chaque pas d'intégration pourra donc y être

puisée. Ceci représente un grand désavantage puisque ce modèle n'est pas autonome : son évolution dépend d'une variable extérieure.

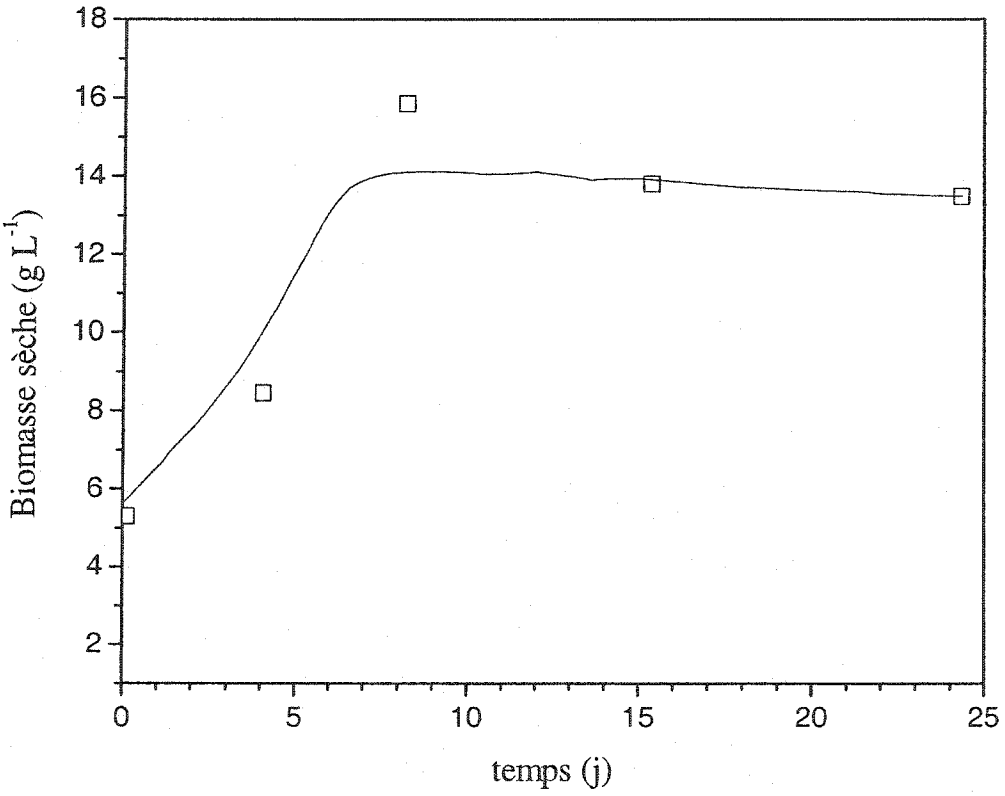


Figure 2.14 : Profils de biomasse sèche selon Bramble et coll. (1991).□ données expérimentales,— prédiction du modèle.

Curtis et coll. (1991) présentent un modèle décrivant la croissance de la biomasse de cellules de *Papaver somniferum* en fonction du phosphate (équations 2.35 à 2.37).

$$x_{s,t} = x_{s,0}\left(1+\mu_t \frac{po_{4,0}}{po_{4,t}} t\right) \quad 2.35$$

$$po_{4,t} = \frac{x_{s,0}}{x_{s,t}} po_{4,0} - \frac{1}{Y_{x/p}} \quad 2.36$$

$$\mu_t = K_1 po_{4,t} \quad 2.37$$

Ce modèle définit une suspension ségréguée puisque le phosphate est exprimé par gramme de matière sèche. La biomasse y est distribuée et ce modèle est non structuré. La croissance linéaire qu'ils observent est associée à une limitation nutritionnelle en phosphate intracellulaire libre. Ce modèle est convenable pour les conditions de culture utilisées par cette équipe, mais les profils linéaires (Figure 2.15) dépendent de la présence continue d'une concentration globale en phosphate significativement supérieure au phosphate structural. Ceci implique donc que le modèle n'est pas valide en limitation en phosphate et à de faibles concentrations. Ce modèle n'est pas facilement transférable à d'autres espèces ou même simplement à d'autres systèmes de culture avec la même espèce puisque la cinétique est directement proportionnelle à la concentration en phosphate.

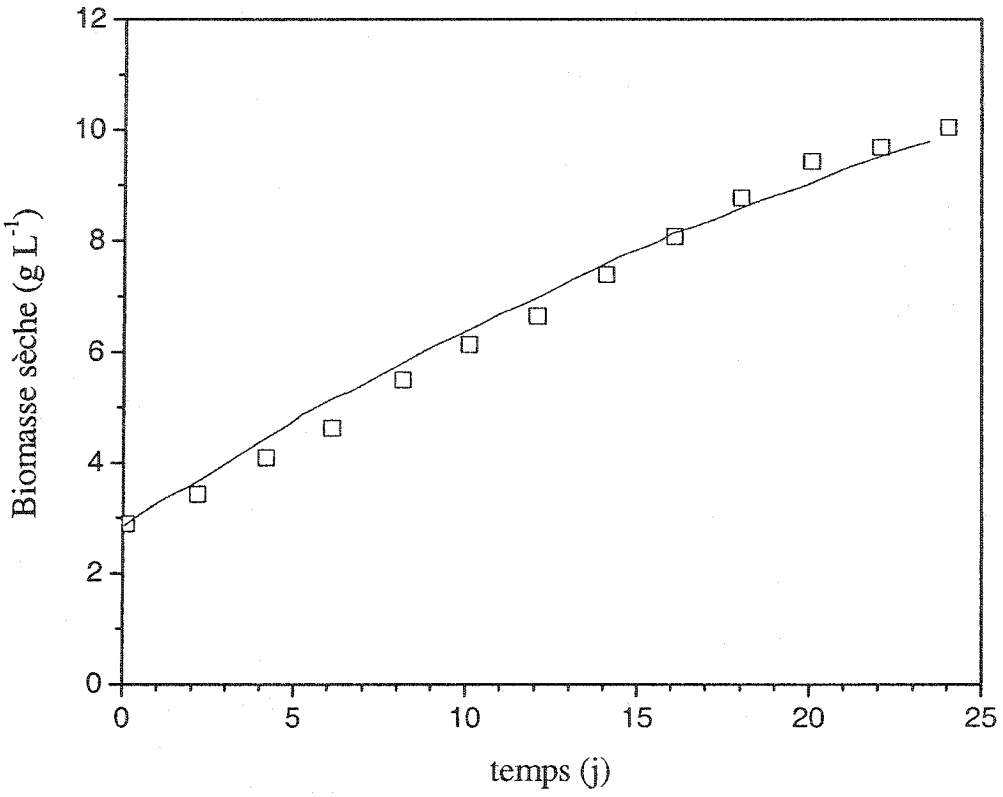


Figure 2.15 : Profils de biomasse sèche selon Curtis et coll. (1991. □ données expérimentales, — prédiction du modèle.

Hooker et Lee (1992) présentent un modèle reproduisant la croissance de cultures de *Nicotiana tabacum*. Des cinétiques de Monod (1942) décrivent la transformation du sucrose extracellulaire en glucose extracellulaire, la consommation des nutriments extracellulaires, les variations en concentration des nutriments intracellulaires totaux ainsi que les pertes en biomasse dues à la respiration. De plus, l'évolution des

composantes intracellulaires intermédiaires, des composantes structurales et de la concentration en métabolites y est présentée, le tout selon les équations 2.38 à 2.46.

$$\frac{ds}{dt} = -q_s\left(\frac{K_1}{V}\right)\left(\frac{s}{K_2/V + s}\right) \qquad 2.38$$

$$\frac{dhc_s}{dt} = q_s\left(\frac{K_1}{V}\right)\left(\frac{s}{K_2/V + s}\right) - q_{n_t}\left(\frac{K_1}{V}\right)\left(\frac{hc_s}{K_3/V + (hc_s + n)}\right) \qquad 2.39$$

$$\frac{dn}{dt} = -q_{n_t}\left(\frac{K_1}{V}\right)\left(\frac{n}{K_3/V + (hc_s + n)}\right) \qquad 2.40$$

$$\frac{dn_{t,i}}{dt} = q_{n_t}\left(\frac{K_1}{V}\right)\left(\frac{(hc_s + n)}{K_3/V + (hc_s + n)}\right) - \left(\frac{K_4 + K_5}{K_1}\right)Vn_{t,i}x_{int} - \frac{K_1K_6}{V}\left(\frac{g}{K_7/V + g}\right) \qquad 2.41$$

$$\frac{dx_{int}}{dt} = K_4\left(\frac{V}{K_1}\right)n_{t,i}x_{int} - (K_8 + K_9)x_{int} \qquad 2.42$$

$$\frac{dx_{struct}}{dt} = K_8x_{int} - k_m x_{struct} \qquad 2.43$$

$$\frac{dpr}{dt} = K_5\left(\frac{V}{K_1}\right)n_{t,i}x_{int} + K_9x_{int} \qquad 2.44$$

$$\frac{dx_{resp}}{dt} = K_6\left(\frac{K_1}{V}\right)\left(\frac{g}{K_7/V + g}\right) + k_m x_{struct} \qquad 2.45$$

$$x_s = n_{t,i} + x_{int} + x_{struct} \qquad 2.46$$

Dans ce modèle, hc_s représente le glucose et le fructose, n, l'ensemble des nutriments exception faite des glucides, $n_{t,i}$, tous les nutriments intracellulaires, x_{int}, les intermédiaires métaboliques de la biomasse structurale, x_{struct}, la biomasse structurale et x_{resp}, la biomasse perdue lors de la respiration (glucose et métabolisme endogène). Ce modèle représente une suspension cellulaire distribuée et une biomasse ségréguée et structurée. La Figure 2.16 illustre les résultats expérimentaux de la biomasse sèche.

Ce modèle est assez complexe, obligeant ainsi les auteurs à déterminer arbitrairement certains paramètres. C'est d'ailleurs la plus grande faiblesse de ce modèle, soit sa surspécialisation. À trop complexifier un modèle, l'objectif premier risque d'être perdu de vue et l'essentiel du modèle est obscurci par un surplus d'informations souvent inutiles (van Impe, 1993).

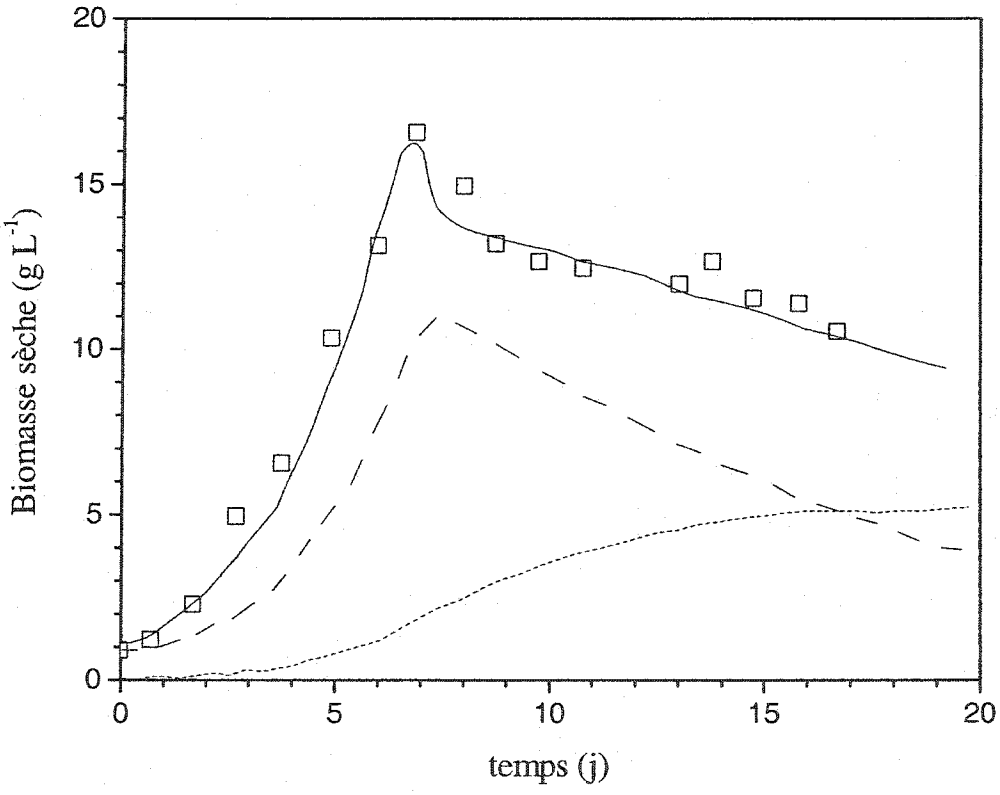


Figure 2.16 : Profils de biomasse sèche selon Hooker et Lee (1992). □ données expérimentales, — biomasse totale, — — composantes intermédiaires, ----- composantes structurales.

van Gulik et coll. (1992) présentent un modèle des cinétiques de croissance de *Catharanthus roseus* et *Nicotiana tabacum* pour des cultures en cuvée et en cuvée alimentée selon les équations 2.47 à 2.49.

$$\frac{dx_s}{dt} = \mu^* \frac{s}{K_1 + s} x_s - \left(Y_{x/s} m_s + q_p\right)\left(1 - \frac{s}{K_1 + s}\right) \qquad 2.47$$

$$\frac{ds}{dt} = -\frac{s}{K_1 + s} x_s \left(\frac{\mu^* + q_p}{Y_{x/s}} + m_s\right) \qquad 2.48$$

$$\frac{dpr}{dt} = x_s q_p \qquad 2.49$$

Ces chercheurs proposent d'estimer la consommation d'oxygène et la production de bioxyde de carbone par un bilan des degrés de réduction suivi d'un bilan sur le carbone. Ce modèle est distribué, dans l'ensemble, et non structuré. Les courbes obtenues par ces chercheurs sont très satisfaisantes quant au substrat et à la biomasse (Figure 2.17). Toutefois, l'estimation des profils de respiration pour les deux espèces n'est pas aussi précise qu'ils le souhaitaient. Alors que le taux spécifique de respiration de *Catharanthus roseus* est surestimé par un facteur d'environ 60%, celui de *Nicotiana tabacum* est sous-estimé d'environ 20% pendant la croissance exponentielle et surestimée (environ 150%) pendant la phase de mortalité.

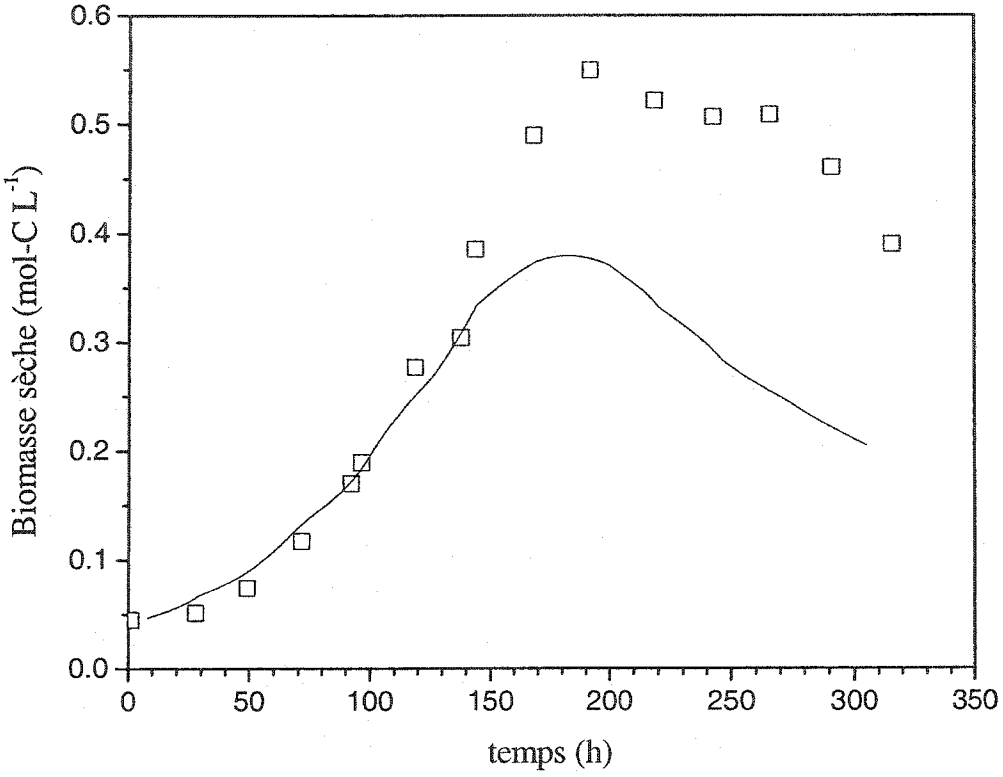


Figure 2.17 : Profil de biomasse sèche selon van Gulik et coll. (1992). □ données expérimentales, —prédiction du modèle.

En 1993, van Gulik et coll. reformulent le modèle précédent sous une forme structurée. Ce modèle décrit l'évolution de la biomasse selon quatre composés : le phosphate libre (po_{4i}), les composés phosphorylés (pp_i), les sucres intracellulaires (hc_i) et la biomasse structurale (x_{struct}) selon les équations 2.50 à 2.54.

$$\frac{dpo_{4,i}}{dt} = \frac{1}{x_s}\left[r_p - \frac{r_{pp}}{Y_{po_4/pp}} - \left(\frac{dx_s}{dt} - Dx_s\right)\frac{po_{4,i}}{x_s}\right] \qquad 2.50$$

$$\frac{dpp_i}{dt} = \frac{1}{x_s}\left[r_{pp} - \frac{r_{x_{struct}}}{Y_{pp/x_{struct}}} - \left(\frac{dx_s}{dt} - Dx_s\right)\frac{pp_i}{x_s}\right] \qquad 2.51$$

$$\frac{dhc_i}{dt} = \frac{1}{x_s}\left[r_{hc,i} - r_{hc,i_{maint}} - \left(\frac{dx_s}{dt} - Dx_s\right)\frac{hc_i}{x_s}\right] \quad 2.52$$

$$\frac{dx_{struct}}{dt} = \frac{1}{x_s}\left[r_{x_{struct}} - \frac{r_{x_{struct}}}{Y_{pp/x_{struct}}} - r_l - \left(\frac{dx_s}{dt} - Dx_s\right)\frac{x_{struct}}{x_s}\right] \quad 2.53$$

$$x_s = x_{struct} + pp_i + hc_i \quad 2.54$$

À celles-ci s'ajoutent les concentrations extracellulaires en glucose (g) et en phosphate (po_4) ainsi que les produits de la lyse cellulaire (l) (équations 2.55 à 2.57).

$$\frac{dg}{dt} = -r_g + D_g x_s \quad 2.55$$

$$\frac{dpo_4}{dt} = -r_{po_4} + D_{po_4} x_s \quad 2.56$$

$$\frac{dl}{dt} = -r_l + D_l x_s \quad 2.57$$

Les taux de réaction (r) sont exprimés par les équations 2.58 à 2.63.

$$r_g = r_{pp} + \frac{r_{x_{struct}}}{Y_{hc/x_{struct}}} + r_{hc,i} - r_{g,maint} \quad 2.58$$

$$r_{pp} = q_{pp} * x_{struct} \frac{po_{4,i}/x_s}{K_1 + po_{4,i}/x_s} \frac{g}{K_2 + g} \quad 2.59$$

$$r_{x_{struct}} = q_{x_{struct}} * x_{struct} \frac{pp_i/x_s}{K_3 + pp_i/x_s} \frac{g}{K_2 + g} \quad 2.60$$

$$r_{hc_i} = q_{hc_i} * x_{struct} \frac{g}{K_2 + g\left(1 + \frac{po_{4,i}/x_s}{K_4}\right)} \quad 2.61$$

$$r_{g,maint} = q_{g_{maint}} * x_{struct} \frac{g}{g + K_5\left(hc_i/x_s\right)} \quad 2.62$$

$$r_{hc,i_{ma\,int}} = q_{g_{ma\,int}} * x_{struct} \frac{K_5\left(hc_i / x_s\right)}{g + K_5\left(hc_i / x_s\right)} \qquad 2.63$$

Le terme *maint* désigne l'utilisation du composé pour la maintenance. La production de bioxyde de carbone et la consommation d'oxygène sont modélisées par un bilan sur le carbone et un bilan sur le degré de réduction des composés

$$r_{CO_2} = r_g - r_{pp} - r_{x_{struct}} - r_{hc,i} + r_{hc,i_{ma\,int}} \qquad 2.64$$

$$r_{O_2} = \frac{1}{4}\left[\gamma_g\left(r_g - r_{hc,i} + r_{hc,i_{ma\,int}}\right) - \gamma_{x_s}\left(r_{pp} + r_{x_{struct}}\right)\right] \qquad 2.65$$

où g représente le degré de réduction du glucose (g) et de la biomasse (x_s). Ce modèle décrit une suspension ségréguée comprenant une biomasse distribuée mais structurée. Les estimations produites décrivent les profils expérimentaux avec moins d'erreurs que précédemment comme le montre la Figure 2.18.

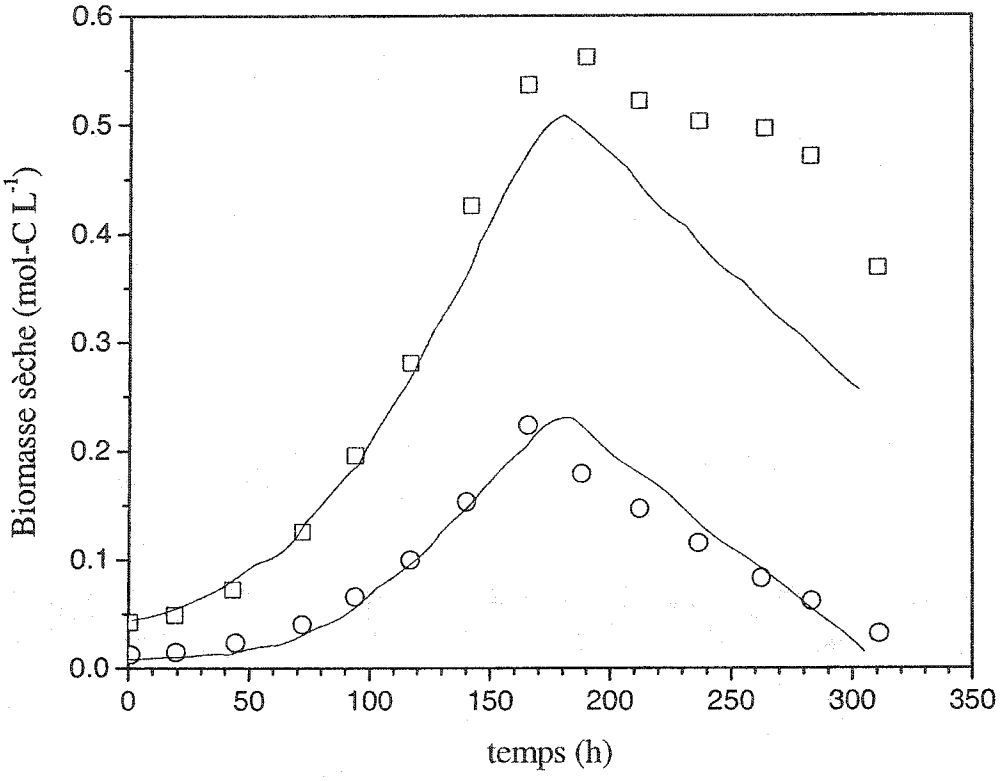


Figure 2.18 : Profil de biomasse sèche selon van Gulik et coll. (1993). □ biomasse sèche totale, ○ composés intracellulaires, — prédictions du modèle.

Ce modèle contient beaucoup plus d'équations que la moyenne, mais celles-ci sont claires et simples, ce qui ne complique pas outre mesure la compréhension du fonctionnement du système. Puisqu'il représente des phénomènes réels, ce modèle fournit de l'information concernant le déroulement des différentes étapes métaboliques observées (la plupart des paramètres sont calculés ou déduits de la littérature), de même que pour les cinétiques de réaction. Seulement trois paramètres

sont utilisés pour minimiser l'erreur d'estimation du modèle. Un tel réalisme mathématique permet d'utiliser ce modèle comme outil pour une phase d'optimisation de la croissance de la biomasse. Cependant, il importe d'éviter une surspécialisation et un surplus d'informations.

Guardiola et coll. (1995) présentent un modèle reliant la production de métabolites secondaires à la progression de la biomasse de cultures de cellules végétales en suspension pour *Vitis vinifera*. L'évolution de la biomasse, du sucrose et du produit (anthocyanes) y est présentée selon des relations de Monod (1942) aux équations 2.66 à 2.69.

$$\frac{dx}{dt} = \left[\mu_x^* \frac{s}{K_2 + s} - \mu_m^* \left(1 - \frac{s}{K_1 + s} \right) \right] x \qquad 2.66$$

$$\frac{ds}{dt} = \left[-\frac{\mu_x^*}{Y_{x/s}} \frac{s}{K_2 + s} - m_s \frac{s}{K_1 + s} - \frac{\mu_m^*}{Y_{p/s}} \frac{s}{K_3 + s} \right] x \qquad 2.67$$

$$\frac{dp}{dt} = \left(\mu_x^* \frac{s}{K_3 + s} \right) x - K_v p \qquad 2.68$$

$$K_v = \begin{cases} K_4 v & \text{cuvées} \\ K_5 & \text{cuvées alimentées} \end{cases} \qquad 2.69$$

Ce modèle, entièrement distribué et non structuré, décrit adéquatement les conditions expérimentales (Figure 2.19).

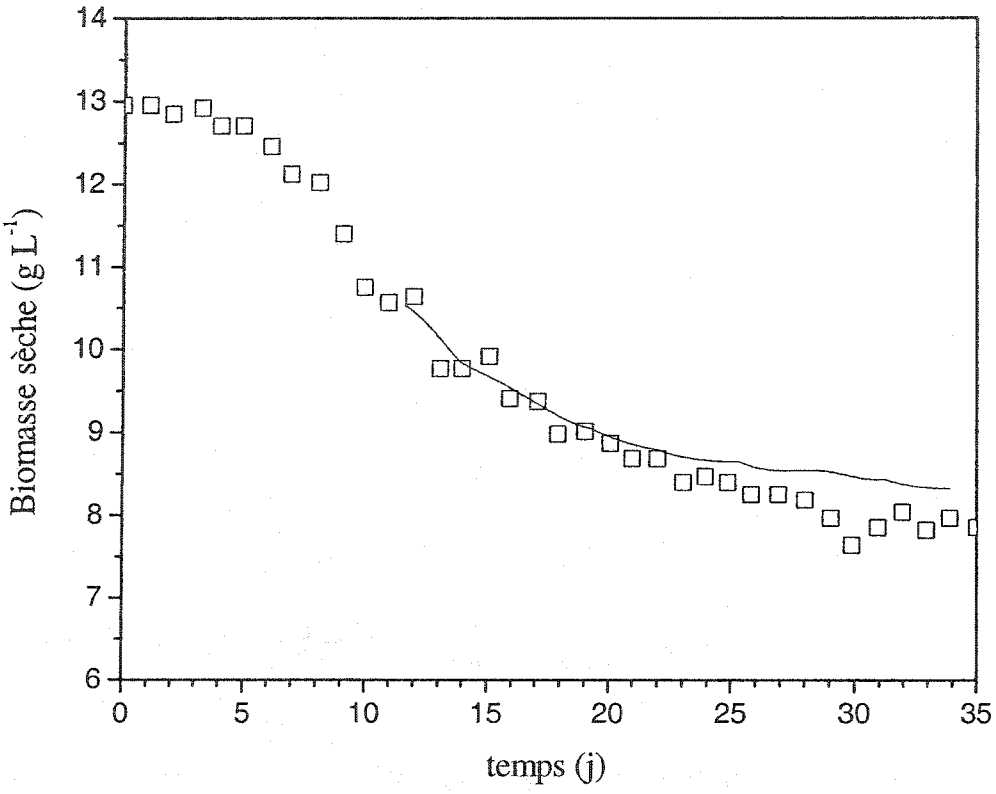


Figure 2.19 : Profils de biomasses sèches selon Guardiola et coll. (1995). □ biomasse sèche totale, — prédictions du modèle.

À la fois par la simplicité du modèle et malgré elles, deux faiblesses majeures ressortent. Comme le montre l'équation 2.69, le paramètre K_v est fonction de la viabilité (v) de la biomasse. Or, un profil expérimental de la viabilité, obtenu par lissage des résultats, est incorporé au modèle puisque cette variable n'y est pas incluse. En outre, les courbes du modèle sont tronquées (Figure 2.19) puisque le modèle est

incapable d'estimer le début de la croissance en cuvée alimentée et ce, pendant un peu plus de 10 heures.

Tous les modèles prédictifs de suspensions de cellules végétales discutés dans cette section sont le résultat d'une approche par les principes premiers. D'autre part, Albiol et coll. (1995) utilisent des estimateurs neuronaux (approche de la boîte noire) afin de développer un modèle de croissance de la biomasse de *Daucus carota* en fonction des concentrations en sucrose, en glucose et en fructose. Le modèle est distribué dans son ensemble et non structuré. Cette approche leur permet, après seulement deux essais, d'obtenir des courbes suivant les résultats expérimentaux (Figure 2.20).

Les estimateurs neuronaux sont en fait de grands polynômes où les gains sont ajustés jusqu'à ce que l'estimateur soit représentatif des résultats expérimentaux. Ce type d'estimateur ne fournit aucune information pertinente quant au comportement des cellules par rapport aux nutriments ni à titre informatif ni pour une éventuelle optimisation. Cependant, il serait intéressant d'utiliser des estimateurs de ce type pour déterminer un seul ou un ensemble de paramètres compris dans un modèle traditionnel dont les valeurs ne peuvent être déterminées expérimentalement. Sirois (1997) proposait d'utiliser ces estimateurs pour reconstruire le profil d'un paramètre ou d'une variable difficile à modéliser. Dans cette veine, Bernard et coll. (1999) utilisent de tels estimateurs pour évaluer simultanément des taux de croissance dont l'obtention de profils dans le temps permet de tirer de l'information sur les phénomènes qui les affectent.

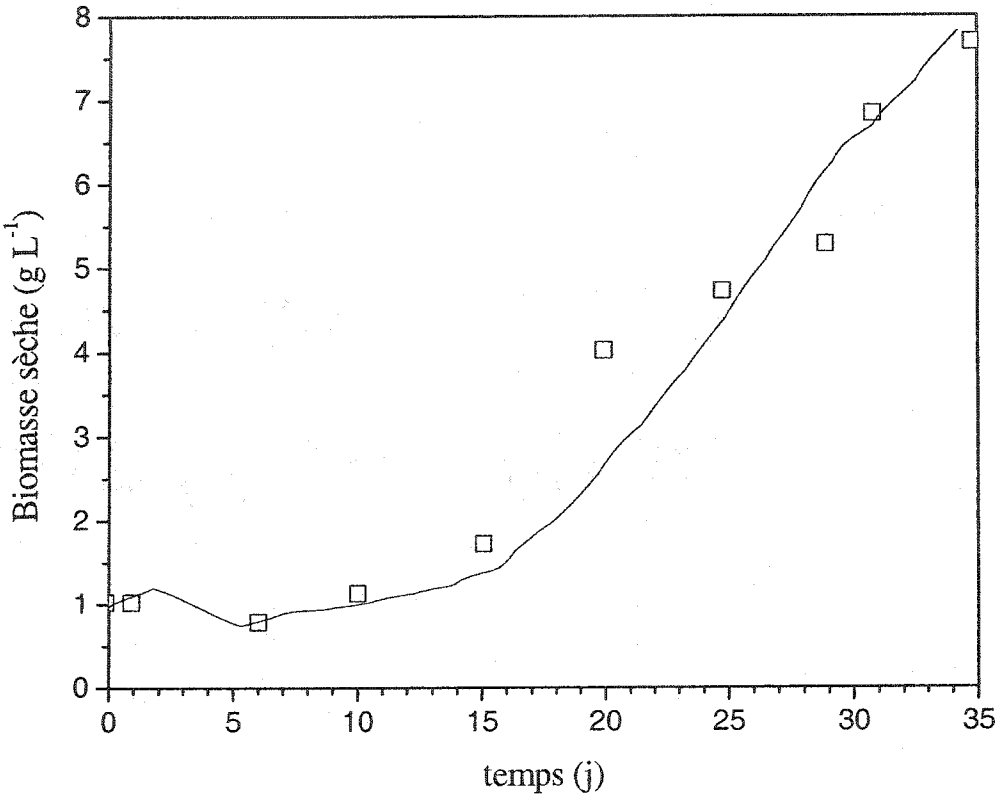


Figure 2.20 : Profil de biomasse sèche selon Albiol et coll. (1995). □ biomasse sèche — prédictions du modèle.

Sirois (1997) présente un modèle de croissance des cellules d'*Eschscholtzia californica* en cuvée, alimentée ou non, en bioréacteur. Celui-ci décrit la prolifération cellulaire et l'évolution de la biomasse sèche en plus de celles de nutriments extracellulaires (phosphate, ammonium, nitrate et glucides) et intracellulaires (phosphate et ammonium) selon les équations 2.70 à 2.80.

$$\frac{dc}{dt} = (\mu_c + q_V)c \qquad 2.70$$

$$\frac{dx}{dt} = (\mu_x + q_V)x \qquad 2.71$$

$$\frac{dhc}{dt} = -\frac{\mu_x}{Y_{x/hc}}x + D_{hc}hc_f + q_V hc \qquad 2.72$$

$$\frac{dno_3}{dt} = -\frac{\mu_x}{Y_{x/no_3}}x + D_{no_3}no_{3,f} + q_V no_3 \qquad 2.73$$

$$\frac{dpo_{4,e}}{dt} = -q_{po_4}x + D_{po_4}po_{4,f} + q_V po_{4,e} \qquad 2.74$$

$$\frac{dnh_{4,e}}{dt} = -q_{nh_4}x + D_{nh_4}nh_{4,f} + q_V nh_{4,e} \qquad 2.75$$

$$\frac{dpo_{4,i}}{dt} = \left(q_{po_4} - \frac{\mu_x}{Y_{x/po_4}}\right)x + q_V po_{4,e} \qquad 2.76$$

$$\frac{dnh_{4,i}}{dt} = \left(q_{nh_4} - \frac{\mu_x}{Y_{x/nh_4}}\right)x + q_V nh_{4,i} \qquad 2.77$$

$$\frac{dV}{dt} = (D - q_E - q_V)V \qquad 2.78$$

$$\mu_x = \mu_x^*\left(\frac{hc}{K_1 + hc}\right)\left(\frac{n_t}{K_2 + n_t}\right)\prod_{n=no_3,po_{4,e},nh_{4,i}}\left(\frac{K_{x,n,1}}{K_{x,n,1} + n^{K_{x,n,2}}}\right) \qquad 2.79$$

$$\mu_c = \mu_c^*\left(\frac{hc}{K_3 + hc}\right)\prod_{n=no_3,po_{4,e},nh_{4,i}}\left(\frac{K_{c,n,1}}{K_{c,n,1} + n^{K_{c,n,2}}}\right) \qquad 2.80$$

Ce modèle est distribué et non structuré. La nouvelle forme de cinétique de croissance développée, fonction de la concentration des nutriments intracellulaires et extracellulaires, permet d'estimer adéquatement la prolifération cellulaire et l'évolution de la biomasse sèche (Figure 2.21), de même que la consommation des nutriments.

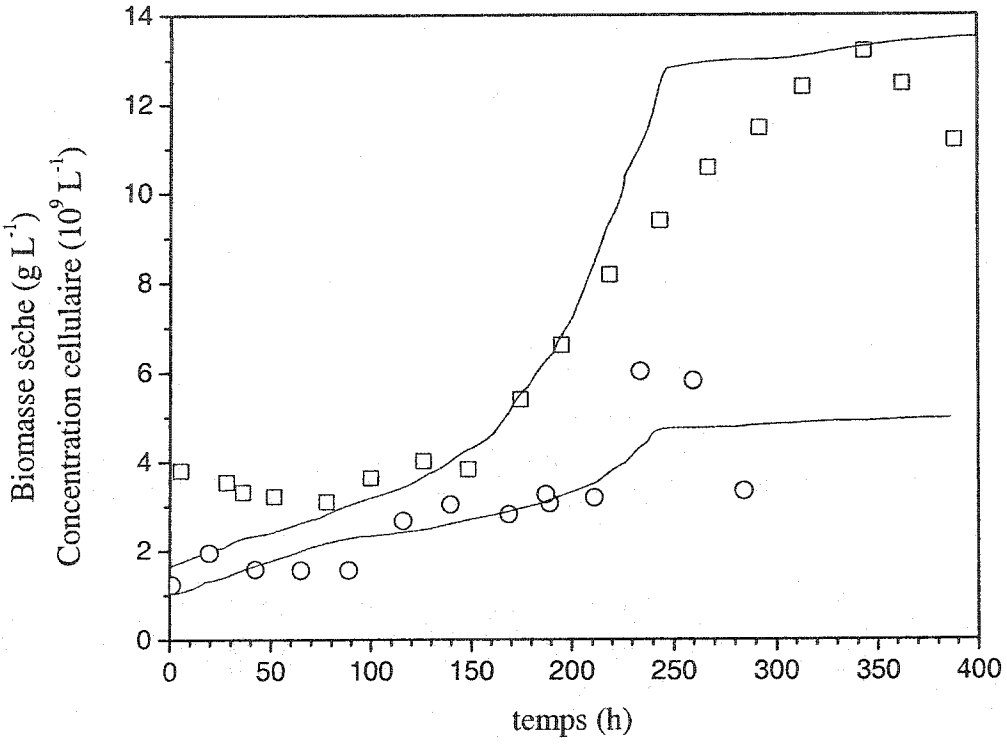


Figure 2.21 : Prolifération cellulaire et profils de biomasse sèche selon Sirois (1997).

□ biomasse sèche, ○ concentration cellulaire, — prédictions du modèle.

Comme pour le modèle de van Gulik et coll. (1993), ce modèle contient bon nombre d'équations, mais celles-ci sont simples et ne compliquent pas inutilement la compréhension du système. Tous les paramètres des bilans de matière (2.72 à 2.78) sont mesurés expérimentalement. Là où le modèle présente une faiblesse, c'est dans les cinétiques de croissance. En effet, les constantes des cinétiques spécifiques du phosphate, du nitrate et de l'ammonium, autant pour la prolifération cellulaire que pour la croissance de la biomasse, ne sont pas mesurées mais plutôt utilisées pour

minimiser l'erreur globale d'estimation des deux variables de croissance. Cette procédure est valide en soi, mais l'information en découlant doit être validée expérimentalement ou par la littérature. L'originalité du modèle de Sirois (1997) est sans contredit le fait qu'il génère simultanément, pour une première fois, une estimation (prédiction) de la croissance en biomasse et de la prolifération cellulaire de cultures de cellules végétales en suspension.

Glicklis et coll. (1998) développent un modèle décrivant l'évolution des biomasses humide et sèche, viables ou non dans ce dernier cas. Ils estiment aussi la concentration du nutriment carboné de même que les concentrations de polysaccharide produit dans la cellule et dans le milieu de croissance selon les équations 2.81 à 2.86.

$$\frac{dx_{s,v}}{dt} = \left[\left(\frac{\mu^*}{K_1}s\right) - K_2\left(\frac{x_h}{x_{s,v}}\right)^2 - k_m\right]x_{s,v} \qquad 2.81$$

$$\frac{dx_{s,nv}}{dt} = K_2\left(\frac{x_h}{x_{s,v}}\right)^2 x_{s,v} \qquad 2.82$$

$$\frac{dx_h}{dt} = K_5 x_{s,v} + \left[\left(\frac{\mu^*}{K_1}sx_{s,v} - K_2\left(\frac{x_h}{x_{s,v}}\right)^2 x_{s,v} - k_m x_{s,v}\right)x_{s,nv} - \left(K_2\left(\frac{x_h}{x_{s,v}}\right)^2 x_{s,v} - k_m^{nv} x_{s,nv}\right)x_{s,v}\right]\frac{x_h}{x_s}x_{s,v} \qquad 2.83$$

$$\frac{ds}{dt} = \left[K_3 p_2 - \left(\frac{\mu^*}{K_1}\frac{1}{Y_{x/s}}\right)\right]x_{s,v} \qquad 2.84$$

$$\frac{dp_1}{dt} = \left[\left(\frac{\mu^*}{K_1}\frac{Y_{p/s}}{Y_{x/s}}s\right) - K_4\left(1 - \frac{p_2}{p_1}\right)\right]x_{s,v} \qquad 2.85$$

$$\frac{dp_2}{dt} = \left[K_4\left(1 - \frac{p_2}{p_1}\right) - K_3 p_2\right]x_{s,v} \qquad 2.86$$

Ce modèle non structuré est distribué par rapport à la suspension, mais ségrégué quant à la biomasse. Les paramètres (K) sont ajustés de manière à minimiser la somme des erreurs d'estimation (Figure 2.22).

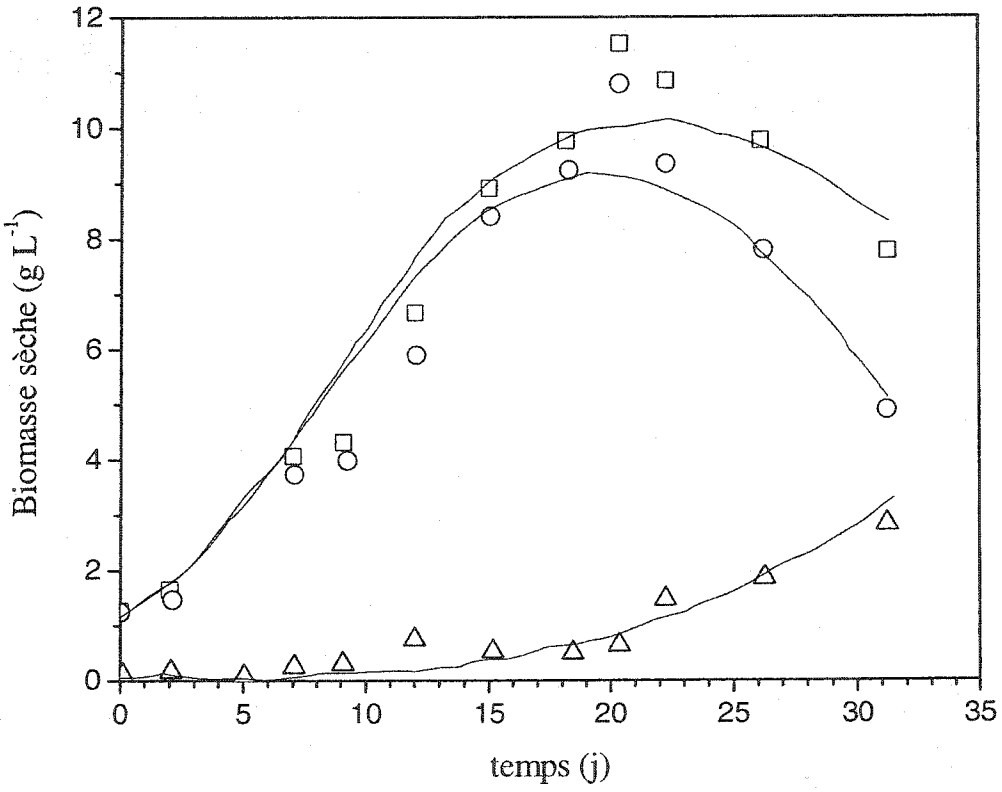


Figure 2.22 **Profils de biomasses sèches et humides selon Glicklis et coll. (1998). □ biomasse sèche totale, ○ biomasse sèche viable, △ biomasse sèche non viable, — prédictions du modèle.**

Ce modèle est élaboré dans les règles de l'art, c'est-à-dire qu'il est complètement autonome. Il n'est pas fonction du temps et n'est pas complexe outre mesure. La

minimisation des erreurs d'estimation est appliquée pour des cultures à quatre différentes températures. Ceci représente un bon exemple d'utilisation du modèle comme outil de compréhension. En effet, en observant la variation des divers paramètres en fonction de la température, il est possible d'observer des corrélations pour plusieurs d'entre eux. Ces auteurs n'ont toutefois pas réalisé ces travaux. Cependant, les cinétiques ne sont aucunement fonction des autres conditions environnementales telles les concentrations en nutriments. Une optimisation nutritionnelle du bioprocédé de culture n'est donc pas possible à partir des résultats obtenus.

Le modèle présenté par Takeda et coll. (1998) estime l'évolution des concentrations de sucre et de phosphate extracellulaires, des intermédiaires de la respiration (i_r), des sucres intracellulaires et des biomasses structurales (x_{struct}), sèche (x_s) et humide (x_h) selon les équations 2.87 à 2.94.

$$\frac{dg}{dt} = -K_1 \frac{g}{K_2 + g} x_{struct} \qquad 2.87$$

$$\frac{dpo_4}{dt} = -K_3 \frac{po_4}{K_4 + po_4} x_{struct} \qquad 2.88$$

$$\frac{d\left(i_{r,i} + i_{r,e}\right)}{dt} = K_1 \frac{g}{K_2 + g} x_{struct} - K_5 i_{r,i} - \frac{1}{K_6}\left(K_5 i_{r,i} - K_7 x_{struct}\right) - K_8 \frac{\left(i_{r,i}/x_s\right)}{\left(g_i/x_s\right)\left(po_{4,i}/x_s\right)} x_{struct} + K_9 \frac{\left(g_i/x_s\right)\left(po_{4,i}/x_s\right)}{\left(i_{r,i}/x_s\right)} x_{struct} \qquad 2.89$$

$$\frac{dhc_i}{dt} = K_8 \frac{\left(i_{r,i}/x_s\right)}{\left(g_i/x_s\right)\left(po_{4,i}/x_s\right)} x_{struct} - K_9 \frac{\left(g_i/x_s\right)\left(po_{4,i}/x_s\right)}{\left(i_{r,i}/x_s\right)} x_{struct} \qquad 2.90$$

$$\frac{dx_{struct}}{dt} = \frac{1}{K_6}\left(K_5 i_{r,i} - K_7 x_{struct}\right) \quad 2.91$$

$$i_{r,e} = K_{10}\frac{i_{r,i}}{x_s} \quad 2.92$$

$$x_s = x_{struct} i_{r,i} + g_i \quad 2.93$$

$$K_{11}\rho_m \frac{x_s}{x_h} = g + K_{12} \quad 2.94$$

À ces équations s'ajoutent les prédictions de production de précurseurs extracellulaires ($p_{1,e}$), intracellulaires ($p_{1,i}$) et du produit principal (p) (équations 2.95 à 2.97).

$$\frac{dp_1}{dt} = -K_{13} i_{r,i} \quad 2.95$$

$$\frac{dp_2}{dt} = \left(K_{14} - K_{15}\frac{p_2}{x_h}\right) i_{r,i} \quad 2.96$$

$$\frac{dp}{dt} = K_{16}K_{15}\frac{p_2}{x_h} i_{r,i} - K_{17} p \quad 2.97$$

Des dix-sept constantes présentes dans le modèle, K_1, K_5, K_8, K_9, K_1, et le rapport x_s/x_{struct} sont utilisés pour minimiser l'erreur d'estimation du modèle, les autres constantes étant mesurées ou rapportées. Aucun profil de biomasse humide n'est présenté. La Figure 2.23 montre uniquement l'estimation de la biomasse sèche.

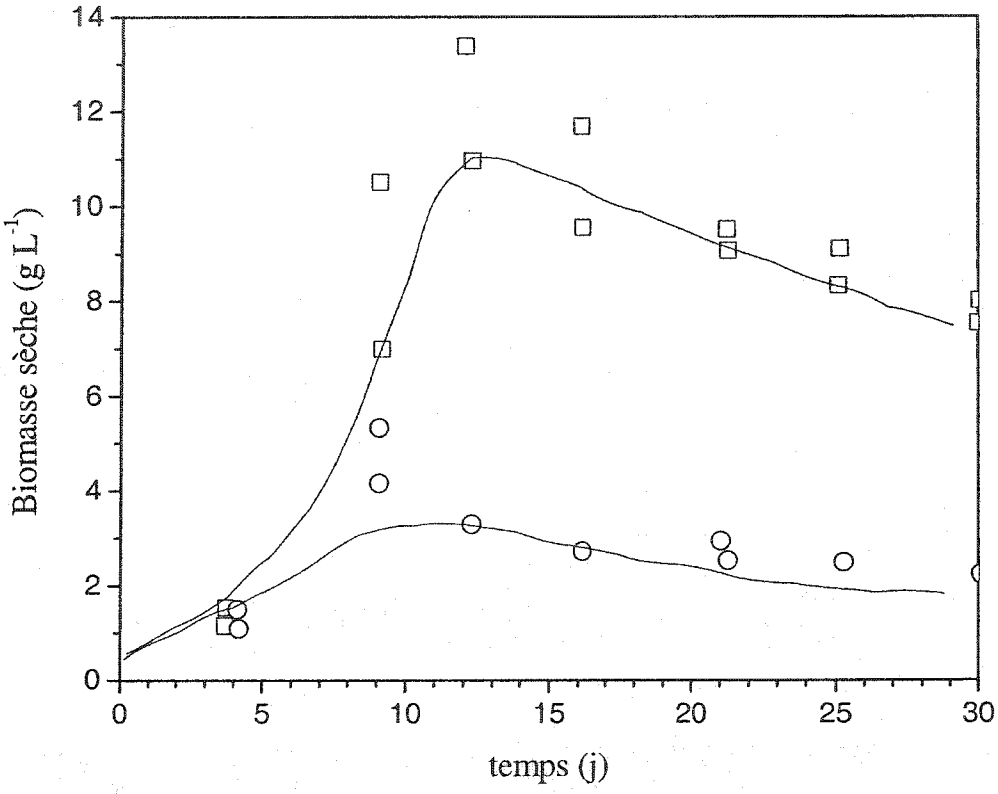


Figure 2.23 : Profils de biomasses sèche et structurale selon Takeda et coll. (1998). □ biomasse sèche totale, ○ biomasse sèche structurale, — prédictions du modèle.

Les bilans et cinétiques présentés sont assez simples et faciles à estimer. Cependant, 35% des constantes de ce modèle sont utilisées pour minimiser l'erreur d'estimation, ce qui est assez élevé. Peu de profils sont présentés par les auteurs. Il est donc difficile d'apprécier la qualité d'estimation des variables de ce modèle. Il est aussi difficile

d'apprécier l'utilité et la contribution de chaque paramètre aux fins de prédiction des biomasses et du produit.

En 1999, Zhang et ses collaborateurs reprennent le modèle de Bailey et Nicholson (1989) pour estimer la croissance de *Fragaria ananassa* (cv. Shikinari) et sa production d'anthocyanes. Alors que les premières équations sont reprises intégralement (équations 2.22 à 2.25).

$$\frac{dx_s}{dt} = (\mu_n v_x n - k_m)x_s \qquad 2.22$$

$$\frac{dn}{dt} = -\frac{\mu_n n}{Y_{x/s}} x_s \qquad 2.23$$

$$\frac{dv}{dt} = v\left[\mu_n n(1-v) - K_1\chi^2\right] \qquad 2.24$$

$$\frac{dx_h}{dt} = \frac{x_h}{v}\frac{dv}{dt} + K_2 v x_s \qquad 2.25$$

une nouvelle variable, le ratio de biomasse viable pigmentée sur la biomasse viable totale (R), est ajoutée

$$\frac{dR}{dt} = K_5\mu_n sv(1-R) \qquad 2.98$$

ce qui modifie l'équation de production de Bailey et Nicholson (1989)

$$\frac{dpr}{dt} = K_3\frac{d(vRx_s)}{dt} + K_4 vRx_s + \frac{pr}{v}\frac{dv}{dt} \qquad 2.99$$

avec

$$\chi = \frac{x_h}{vx_s} \qquad 2.27$$

Il est clair que les modifications apportées par Zhang et coll. (1999) n'affectent que l'estimation de la production et ne changent en rien les courbes de croissance. La Figure 2.24 présente les estimations de biomasses sèche et humide obtenues pour les résultats de ces auteurs avec le modèle de Bailey et Nicholson (1989).

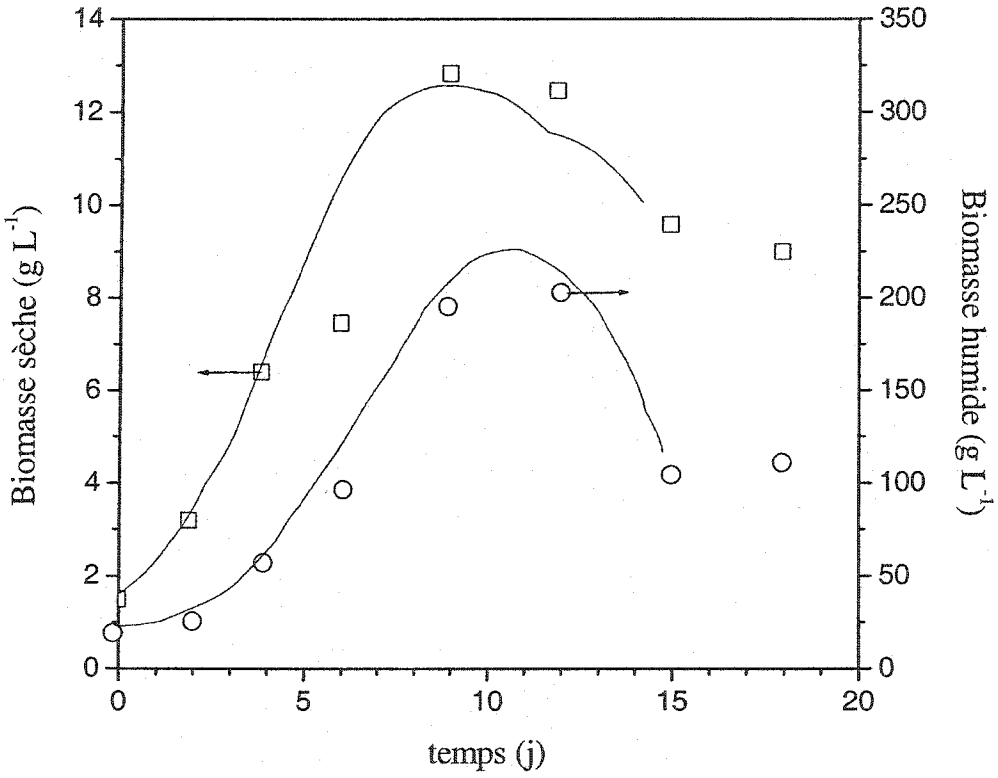


Figure 2.24 : Profils de biomasses sèche et humide selon Bailey et Nicholson (1989) avec les données de Zhang et coll. (1998)

Pour arriver à des estimations convenables, Zhang et coll. (1998) ne conservent que la forme du modèle de Bailey et Nicholson (1989). En effet, les valeurs des paramètres

sont ajustées afin de minimiser l'erreur d'estimation par rapport à leurs résultats. Le modèle convient très bien pour les 15 premières journées, mais il décroche à partir de ce moment. Comme le montre la Figure 2.24, les estimations de biomasses sèche et humide sont en décroissance à ce moment, alors que les résultats expérimentaux au 18^{e} jour de croissance suggèrent l'atteinte d'un plateau. Un phénomène important qui affecte significativement la culture n'est donc pas modélisé et il induit même une erreur importante dans les estimations.

En résumé, les modèles de croissance de suspensions de cellules végétales développés depuis plus de vingt ans utilisent généralement la biomasse sèche (parfois complétée par la biomasse humide) pour caractériser les cultures. Il n'y a que King (1976) qui caractérise et prédit la croissance en utilisant la concentration cellulaire. De tous les modèles publiés, seul Sirois (1997) utilise à la fois la biomasse sèche et la concentration cellulaire pour caractériser la croissance de suspensions végétales. Cette façon de faire permet de définir et de suivre l'état physiologique des cellules selon une multitude de paramètres et ouvre la porte à une avancée significative en modélisation physiologique des suspensions de cellules végétales. Toutefois, cette approche structurée n'a pas été pleinement exploitée par ce dernier dans les travaux présentés.

Selon la tendance de modélisation des dernières années, une partie de la rigueur mathématique est sacrifiée au bénéfice d'une qualité d'estimation ponctuelle accrue. En effet, les modèles (par principes premiers) contiennent de plus en plus d'équations et de variables, multipliant ainsi les paramètres à déterminer. Ceux-ci sont parfois liés

d'un point de vue biologique ou mathématique, rendant leur détermination extrêmement difficile, voire impossible. Au lieu de mesurer ces paramètres, les utiliser pour minimiser l'erreur d'estimation du modèle améliore la description des cultures à l'étude (réalisées dans des conditions précises), mais amenuise la généralisation du modèle. Celui-ci devient fortement spécifique aux cultures avec lesquelles il a été développé. En fait seul Sirois (1997) s'assure d'une généralisation du modèle de croissance développé en l'appliquant sur plus de 14 cultures effectuées dans des conditions différentes.

2.5.4. Modèles descriptifs

Un modèle descriptif est un modèle prédictif dont au moins une variable est mesurée ou estimée en continu, ou auquel est ajouté un lien entre l'une de ses variables et une variable mesurée. Malgré les recherches effectuées, il semble qu'aucune publication traitant spécifiquement du suivi en continu des cultures de cellules végétales à l'aide d'un modèle n'a été publiée à ce jour. Toutefois, cette procédure est utilisée dans des domaines connexes comme la production d'hybridomes (de Tremblay, 1991). Dans les pages qui suivent, différentes approches et techniques, desquelles ce projet pourrait tirer profit, sont exposées.

Dans la transformation d'un modèle prédictif en modèle descriptif, deux éléments sont particulièrement importants : la relation entre la variable du modèle et la variable mesurée de même que l'équation supplémentaire minimisant l'erreur d'estimation en

continu. Bastin et Dochain (1990), présentent des outils performants (estimateurs et observateurs) permettant de minimiser l'erreur d'estimation de variables en bioréacteur en continu. La présente revue se consacre aux relations directes pouvant être établies entre une variable du modèle et une variable mesurée.

Les variables mesurées en continu dans des suspensions de cellules végétales sont assez limitées. Les nouvelles sondes particulières comme les mesures optique (Junker et coll., 1994) et de capacitance (Austin et coll., 1994) développées pour des cultures de bactéries et de levures sont très difficilement applicables aux cultures de cellules végétales puisque ces dernières croissent en amas de plusieurs dizaines, voire plusieurs centaines de cellules. Le suivi en continu doit donc reposer sur des mesures applicables dans de pareilles conditions. Les plus répandues sont la température, le pH, la conductivité, l'oxygène dissous, le taux de respiration (OUR, *Oxygen Uptake Rate*) et le taux de production (transfert) de dioxide de carbone (CTR, *Carbon-dioxide Transfer Rate*).

Alors que la température ne présente qu'un infime potentiel pour le suivi de cultures par bilan énergétique (Grosz et coll., 1984), le pH et la conductivité sont reliés à la consommation nutritionnelle et donc, à la croissance. Cependant, le pH est relié à une multitude de phénomènes d'équilibre des charges présentant plusieurs interactions. Malgré le fait que pH puisse être fortement relié à certains nutriments (voir section 2.4.2), il est peu utile lorsque plus d'un nutriment est présent dans le milieu de culture

(Sirois, 1997 ; présents travaux). De même, la conductivité du milieu de culture est étroitement reliée aux nutriments principaux (Sirois, 1997).

En ce qui a trait à l'oxygène dissous, cette variable est généralement contrôlée et ne peut donc être utilisée directement pour un suivi. Toutefois, Wilson (1987) démontre que la biomasse peut être estimée par l'intégration d'un bilan sur l'oxygène lorsque sa concentration est maintenue constante.

Restent donc le OUR, le CTR et le quotient respiratoire (R_Q, *Respiratory quotient*) qui est le ratio des deux premiers. Grosz et coll. (1984) suggèrent l'utilisation du quotient respiratoire jumelé à un bilan stœchiométrique pour effectuer le suivi des cultures. Toutefois, cette technique n'est pas souhaitée lorsque le potentiel oxydo-réductif de la biomasse (~ 4.0 à 5.0 selon Atkinson et Mavituna, 1983) s'approche de celui de la source carbonée utilisé (~ 4.0, glucose). Dans ce cas, la technique est mathématiquement inutilisable.

Théoriquement, le taux de respiration et le taux de production de dioxide de carbone sont exprimés en fonction des taux spécifiques suivants :

$$OUR = q_{O_2} x \qquad 2.100$$

$$CTR = q_{CO_2} x \qquad 2.101$$

et en fonction du taux de croissance :

$$OUR = \left(\frac{\mu}{Y_{x/O_2}} + m_{O_2} \right) x \qquad 2.102$$

$$CTR = \left(\frac{\mu}{Y_{x/CO_2}} + m_{CO_2} \right) x \qquad 2.103$$

Ces deux équations, à deux degré de liberté, peuvent être utilisées conjointement. Cela revient à employer le quotient respiratoire, mais à partir de relations semi-empiriques (coefficients de rendements et de maintenance) plutôt que théoriques comme le proposent Grosz et coll. (1984) avec les problèmes qui en découlaient. Selon cette approche semi-empirique, le taux de croissance peut être déterminé selon

$$\mu = Y_{x/O_2} Y_{x/CO_2} \frac{\left(R_Q m_{O2} - m_{CO_2} \right)}{\left(Y_{x/O_2} - R_Q Y_{x/CO2} \right)} \qquad 2.104$$

Cette approche est toutefois restreinte aux cas où le coefficient de maintenance est significatif. Dans le cas inverse, le taux de croissance n'est plus fonction du quotient respiratoire, lequel devient uniquement un rapport des coefficients de rendements et est donc inutilisable :

$$R_Q = \frac{Y_{x/O_2}}{Y_{x/CO_2}} \qquad 2.105$$

Cette démonstration soulève toutefois un point intéressant. En supposant des coefficients de rendement constants, elle permet d'apprécier en continu la déviation du système respiratoire d'un système exclusif de croissance en biomasse sans maintenance. Cependant, il est impossible de différencier la contribution de la

production de bioxyde de carbone de celle de l'utilisation de l'oxygène, car les deux coefficients de maintenance sont linéairement dépendants en tant qu'inconnues dans l'équation 2.104.

À des fins de suivi, les équations 2.102 et 2.103 peuvent être utilisées indépendamment. Dans ce cas, un degré de liberté de chaque équation peut être comblé par l'emploi de la valeur initiale de la biomasse, soit à l'inoculation. En supposant un pseudo-équilibre sur une courte période d'échantillonnage mathématique, le taux de croissance peut être approximé par l'une ou l'autre des équations suivantes :

$$\mu = Y_{x/O_2}\left(\frac{OUR}{x} - m_{O_2}\right) \qquad 2.106$$

$$\mu = Y_{x/CO_2}\left(\frac{CTR}{x} - m_{CO_2}\right) \qquad 2.107$$

et la concentration en biomasse nécessaire au calcul du prochain échantillonnage est alors calculée par le modèle en supposant un taux de croissance pseudo-constant sur un intervalle d'échantillonnage.

Cette relation implique que les taux de respiration et de production de bioxyde de carbone sont directement fonctions du taux de croissance. Cette corrélation est observée pour la respiration de *Petunia hybrida* par de Gucht et van der Plas (1995). En revanche, ces auteurs affirment dans une publication subséquente (de Gucht et van der Plas, 1996) que le taux de respiration est relié à la consommation des ions. Or, les

ions sont généralement consommés indépendamment du taux de croissance (Sirois, 1997 ; voir aussi section 2.4). Une déviation à la règle définie par les équations 2.106 et 2.107 peut être anticipée.

Il en est de même pour l'estimation du taux de croissance à partir des équations 2.108 et 2.109, obtenues à partir des équations 2.100, 2.101 et d'un bilan simple sur la croissance de la biomasse (équation 2.110) :

$$\mu = \frac{1}{OUR}\frac{dOUR}{dt} \qquad 2.108$$

$$\mu = \frac{1}{CTR}\frac{dCTR}{dt} \qquad 2.109$$

$$\frac{dx}{dt} = \mu x \qquad 2.110$$

De plus, cette technique nécessite une mesure non bruitée du OUR ou du CTR, ce qui est difficile à obtenir expérimentalement.

Par ailleurs, van Gulik et coll. (1992 ; 1993) utilisent plutôt un bilan du potentiel oxydo-réductif pour estimer la consommation d'oxygène. En ce qui concerne le taux de production de bioxyde de carbone, ceux-ci l'estiment par bilan sur le carbone, ce qui suppose, pour une estimation en continue, une connaissance de la quantité de la source carboné consommé, ce qui est difficilement accessible avec précision en continu.

Il faut finalement remarquer que toutes ces techniques appliquées aux cultures de cellules végétales ne servent qu'à estimer la biomasse sèche en continu. Aucune autre variable de caractérisation de la croissance, telle la prolifération cellulaire, ne peut être suivie en continu selon la littérature recensée.

2.6. Optimisation de cultures en suspension de cellules végétales

Une méthode de quasi-optimisation de la croissance de cellules végétales est présentée par Sirois (1997). Celui-ci propose une stratégie d'optimisation de la concentration cellulaire de cellules végétales en suspension par ajouts ponctuels de nutriments. Il a établi que des limitations nutritionnelles par épuisement et par concentrations en sucre, en ammonium, en nitrate et en phosphate affectaient la croissance en biomasse sèche et la prolifération cellulaire. Il effectue donc des ajouts périodiques de concentrés de chacun de ces nutriments de manière à ce que la concentration de chacun de ces nutriments soit minimale sans toutefois dépasser un seuil de limite inférieure. Ces ajouts sont calculés à partir d'un modèle de croissance qui prédit les concentrations actuelles en biomasse sèche, en cellules et de chacun des quatre nutriments, de même que l'évolution de chaque variable pour les 24 heures à venir.

En procédant de la sorte, l'auteur réalise une culture où il observe une augmentation de la croissance d'environ 100 à 200 % pour la biomasse sèche finale, et d'environ 500 à 1000 % pour la concentration cellulaire finale. L'objectif de ces travaux était de maximiser la concentration cellulaire finale tout en minimisant la concentration finale

en biomasse. Il obtient un facteur d'optimisation de 5 par cette approche. Malgré ces résultats intéressants, l'optimisation n'est pas complète. En effet, pour ne pas avoir à ajouter de nutriments avant le jour suivant, l'auteur en ajoute suffisamment pour compenser une consommation soutenue de 24 heures. La concentration de chacun des nutriments dans les heures qui suivent les ajouts est donc largement supérieure à la limite inférieure. Il s'agit donc d'une grande amélioration par rapport aux cultures en cuvée, mais les profils d'alimentation ne sont pas optimaux.

Selon la recension des écrits effectuée, l'optimisation de la croissance de cultures de cellules végétales par la manipulation des débits d'alimentation est à toute fin pratique inexistante. Dans ce contexte, il s'est avéré intéressant d'étudier les approches utilisées dans des domaines connexes.

De toutes les méthodes d'optimisation disponibles, la principale technique pour résoudre les problèmes de commande optimale est celle du principe du maximum de Pontryagin (Pontryagin et coll., 1962). Ce principe spécifie que la loi de commande qui maximise le Hamiltonien maximise aussi l'indice de performance correspondant. Cependant, comme le démontrent de Tremblay (1991) et van Impe (1993), le principe de Pontryagin ne parvient pas à générer la solution optimale dans le cas d'alimentation nutritionnelle des bioréacteurs.

Pour un système d'état d'une suspension cellulaire en bioréacteur généralement représenté par :

$$\frac{d\mathbf{x}(t)}{dt} = \mathbf{f}[\mathbf{x}(t), \mathbf{u}(t), t] \qquad 2.111$$

le Hamiltonien correspondant est

$$H[\mathbf{x}(t), \mathbf{u}(t)] = L[\mathbf{x}(t), \mathbf{u}(t), t] + \lambda^T \mathbf{f}[\mathbf{x}(t), \mathbf{u}(t), t] \qquad 2.112$$

où $\mathbf{x}(t)$ est le vecteur d'état, $\mathbf{u}(t)$, le vecteur des variables manipulées, L, est l'intégrant de l'index de performance et λ, le vecteur des variables adjointes du Hamiltonien. Celles-ci sont définies par

$$\frac{d\lambda}{dt} = -\frac{dH[\mathbf{x}(t), \mathbf{u}(t)]}{dt} \qquad 2.113$$

L'incapacité du principe de Pontryagin à générer la solution optimale dans le cas d'alimentation nutritionnelle des bioréacteurs est due au fait que la variable manipulée ($\mathbf{u}$) apparaît linéairement dans l'équation d'état et de ce fait, dans le Hamiltonien. Une singularité est ainsi obtenue lors de la différentiation du Hamiltonien et ce genre de problème génère une loi de commande Bang-Singularité-Bang. En d'autres mots, si le coefficient de la variable manipulée dans le Hamiltonien est négatif, l'alimentation est à son minimum. Dans le cas contraire, l'alimentation est à son maximum. Lorsqu'il est nul, aucune valeur d'alimentation ne satisfait le problème : c'est la singularité.

Modak et coll. (1986) proposent une procédure pour trouver systématiquement la valeur singulière du débit d'alimentation optimisant l'indice de performance. Cependant, cette approche requiert la solution d'un problème à deux frontières. Pour y arriver, les valeurs initiales des variables adjointes du Hamiltonien sont posées, puis les équations d'état du modèle et les variables adjointes du Hamiltonien sont intégrées jusqu'au temps final. Pendant ce processus, les valeurs minimale, maximale ou singulière de l'alimentation sont utilisées selon les exigences des résultats d'intégration. Lorsque l'intégration est complétée, les valeurs finales des variables adjointes du Hamiltonien sont comparées avec celle initialement posée. La procédure est répétée jusqu'à convergence. Le profil obtenu est alors implanté lors de la culture.

De son côté, de Tremblay (1991) suggère l'utilisation de la programmation dynamique pour résoudre ce problème dans le cas de cellules d'hybridômes. Cette technique, utilisée avec succès par de Tremblay et coll. (1993), est basée sur le principe d'optimalité de Bellman (1962). Elle demande d'effectuer un maillage dans le temps entre le temps initial (l'inoculation) et un temps final (fixé) et d'effectuer une optimisation de l'indice de performance à rebours, c'est-à-dire en partant de la dernière maille jusqu'à la première, au temps initial.

Les deux solutions présentées par Modak et coll. (1986) et de Tremblay (1991) exigent donc que le modèle décrive parfaitement le système modélisé, puisque le profil d'alimentation est déterminé en entier avant que la première manipulation ne soit faite, sans être modifié par la suite. Lorsqu'il y a une erreur de modélisation, si

faible soit-elle, celle-ci s'accumule pendant l'évolution de la culture et, puisque le temps de culture peut varier d'une à deux semaines (parfois même trois) dans le cas des cellules végétales, le profil optimum d'alimentation peut rapidement décrocher de la réalité et générer une culture non optimale. Au surplus, ce genre de technique ne tient absolument pas compte des perturbations du procédé.

Il est possible d'éviter l'accumulation d'erreurs en recommençant la procédure à chaque pas dans le temps, soit en effectuant la procédure de convergence des variables adjointes après un certain temps pour Modak et coll. (1986) ou soit en calculant le profil optimum du temps final au temps présent comme le propose de Tremblay (1991). Dans les deux cas, les calculs sont faits avec les valeurs actuelles comme valeur au temps 0 à chaque fois. Cependant, cette procédure demande une quantité impressionnante de calculs à chaque pas dans le temps, ce qui la rend difficilement utilisable pour les systèmes de cultures actuels. De plus, en ce qui concerne la programmation dynamique, le temps final doit être fixé *a priori*, ce qui représente une restriction majeure. Lorsque, par exemple, une concentration ou une quantité maximale d'un produit doit être obtenue jusqu'à épuisement total de l'alimentation ou jusqu'à un ralentissement significatif des cultures (peu importe le temps), cet algorithme n'est d'aucune utilité. Dans les deux cas, la sensibilité du procédé aux perturbations est importante puisque la technique repose sur des profils de croissance théoriques.

D'autres techniques permettent d'obtenir des profils quasi optimaux (Hilary et coll., 1994). La première, proposée par Hookes et Jeeves (1962) effectue une recherche directe de l'optimum en changeant les débits d'alimentation. L'algorithme consiste à poser de façon arbitraire un premier débit et à calculer la croissance qui en résulte. Un deuxième débit est imposé et son impact est calculé. Si le second débit augmente la croissance plus que le premier, il devient la nouvelle référence, sinon le premier point demeure le repère. Ce processus est effectué de part et d'autre du débit de référence jusqu'à l'obtention du débit optimum. Cette procédure est répétée à chaque pas dans le temps. De nature peu rigoureuse, cette technique consiste ni plus ni moins en une procédure itérative centrée. Comme démontré par Hilary et coll. (1994), le profil obtenu est similaire au profil optimum. Cette méthode exige aussi que le modèle décrive parfaitement le système modélisé puisque le choix du débit optimisant est calculé avec la fonction objectif, à partir du modèle et non du procédé.

Agrawal et coll. (1989) suggèrent que l'optimisation du taux de croissance en fonction de la concentration d'un nutriment puisse être simplement réalisée par un contrôle proportionnel à rétroaction de l'alimentation de ce nutriment :

$$F(k+1) = F(k) + K \cdot \varepsilon(k) \qquad 2.114$$

$$\varepsilon(k) = \mu_{opt} - \mu(k) \qquad 2.115$$

où k représente l'incrément dans le temps et μ_{opt} est le taux de croissance optimal. Hilary et coll. (1994) démontrent effectivement que ce type de contrôleur mime la

performance d'un contrôleur optimisant obtenu par le principe du maximum de Pontryagin. Cette performance s'explique par le simple fait que le contrôleur force le taux de croissance et la concentration du nutriment à demeurer à l'optimum. Agrawal et coll. (1989) suggèrent que le procédé soit opéré périodiquement en boucle ouverte avec une alimentation maximale de manière à déterminer le taux de croissance optimal en fonction de ce nutriment. Pour parvenir à ses fins, cet algorithme requiert une estimation en continu du taux de croissance. Ce contrôle optimal par rétroaction apparaît toutefois difficilement applicable à la régulation du débit d'alimentation de plus d'un nutriment. En effet, l'erreur de commande entre le taux de croissance réel et l'optimum (équation 2.114) est supposé être causée par un mauvais débit d'alimentation et celui-ci est alors corrigé (équation 2.115). Dans le cas de plusieurs variables, il est impossible de déterminer quel débit ou quel nutriment est la cause de l'erreur et de le corriger sans perturber les autres.

van Impe (1993) propose une technique fort intéressante de contrôle sous-optimal. Considérée comme une extension des contrôleurs adaptatifs présentés par Bastin et Dochain (1990), cette technique permet de développer un contrôleur optimisant le profil d'alimentation d'un nutriment lorsque les cinétiques de croissance et de production sont découplées par rapport à ce nutriment. Ce contrôleur combine une performance quasi optimale avec une grande robustesse aux incertitudes du modèle et aux perturbations du procédé. Hilary et coll. (1994) observent d'ailleurs qu'un

contrôleur adaptatif optimisant génère à toute fin pratique le même profil d'alimentation qu'un contrôleur optimal.

Repris par van Impe et Bastin (1993), ce contrôleur adaptatif optimisant est utilisé pour maximiser la quantité finale d'un produit, l'acide poly-β-hydroxybutyrique (PHB) produit par *Alcaligenes eutrophus* en l'occurrence, lorsque limité par deux nutriments, les sources de carbone et d'azote. Ces auteurs démontrent que cette technique est une excellente approximation du contrôle optimal dans le cas d'une limitation à deux nutriments dont les cinétiques sont découplées.

L'optimisation proprement dite de bioprocédés multivariables n'est donc pas facile à réaliser de prime abord. Des méthodes parallèles à la commande optimale doivent être développées pour parvenir à une optimisation du procédé, au prix d'une légère perte de performance et/ou de l'obligation de mesurer en continu l'évolution des variables du système. En plus du peu de littérature sur le sujet en culture de cellules végétales, aucune optimisation de la concentration ni de la prolifération cellulaire n'a été recensée pour les cultures de cellules végétales.

3. MATÉRIEL ET MÉTHODES

3.1. Lignée cellulaire et maintien

Les cellules végétales de l'espèce *Eschscholtzia californica* ont été utilisées comme espèce modèle dans le cadre de ce projet. La lignée utilisée (EC6) a été développée par le Dr Robert Williams du Centre de recherche en ingénierie des bioprocédés (BIOPRO) de l'École Polytechnique de Montréal. L'utilisation de cette lignée qui date de plus de 15 ans permet de faciliter la reproductibilité des résultats (Curtis et coll., 1991), ce qui est primordial au succès de la modélisation généralisée de cette lignée.

Les suspensions cellulaires sont cultivées dans des flacons de culture de 500 ml de type erlenmeyer contenant 200 ml de suspension, au moyen d'un milieu nutritionnel B5 standard (Gamborg et coll., 1968) dont la composition est présentée à l'annexe A et auquel sont ajoutés 0.2 mg L^{-1} d'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D), 0.1 mg L^{-1} de kinétine et 30 g L^{-1} de sucrose. De plus, il importe de mentionner que le sulfate d'ammonium est remplacé par du citrate d'ammonium. Le pH est ajusté à 5.5 à l'aide d'une solution aqueuse de KOH (1 N) avant stérilisation à l'autoclave (20 minutes, 121 °C et 1 bar).

Les sous-cultures sont réalisées périodiquement (tous les 5 à 10 jours) lorsque le volume de cellules sédimentées est de 60% à 70%. La proportion de l'inoculum par rapport au volume total des sous-cultures varie de 20% à 35% selon la croissance des cultures. Les flacons sont agités à 120 rpm à l'aide d'un agitateur orbital (G10

gyratory shaker, New-Brunswick) sous illumination continue et à température contrôlée (26 ± 1°C).

3.2. Cultures en flacons

Une partie de l'expérimentation réalisée dans le cadre de ce projet a été exécutée en flacons de culture de 500 ml de type erlenmeyer. Toutes ces expériences sont effectuées en duplicata de manière à apprécier l'erreur expérimentale.

3.2.1. Procédure générale

Le milieu de culture B5 est préparé selon l'objectif de l'expérimentation qui est d'utiliser différentes concentrations nutritionnelles à l'inoculation. Pour chaque expérience, un concentré de 120% à 150% est préparé de manière à obtenir les concentrations désirées après l'ajout de l'inoculum (40 à 60 ml selon l'expérience). Le pH est ajusté à 5.5 à l'aide d'une solution aqueuse de KOH (1 N) avant stérilisation à l'autoclave (20 minutes, 121 °C et 1 bar). Après refroidissement du milieu à la température ambiante, la quantité adéquate d'inoculum est transférée dans le flacon de culture et le suivi est effectué tel que décrit à la section 3.6.

3.2.2. Étude de rendements

La détermination des rendements nutritionnels est très sensible aux concentrations résiduelles des nutriments du milieu de l'inoculum, de même que dans les cellules de cet inoculum. Afin de pallier cette difficulté, la procédure d'inoculation est modifiée. Les cellules sont tout d'abord transférées dans un milieu de croissance où le nutriment à l'étude est abscent afin de purger les réserves de ce nutriment dans la cellule. Les cellules sont transférées dans un milieu de croissance contenant une quantité connue du nutriment étudié dès qu'une limitation de croissance est identifiée. Ceci évite un effet néfaste sur le métabolisme cellulaire provoqué par une pénurie nutritionnelle prolongée. En procédant de la sorte, il est possible d'associer la croissance observée à la disponibilité du nutriment limitant se trouvant dans le milieu de culture sans biais provoqué par des réserves intracellulaires.

De manière plus spécifique, l'inoculum est tout d'abord transféré à 50% v/v dans des flacons contenant 120 ml de milieu B5 dilué à 50% dans lequel le nutriment étudié est absent. Les suspensions obtenues sont suivies (biomasse humide, biomasse sèche, volume sédimenté) de manière à identifier une limitation de croissance en biomasse sèche, celle-ci survenant toujours après ou au même moment qu'une limitation en prolifération cellulaire (Sirois, 1997). La limitation observée est associée à une limitation nutritionnelle de la croissance par le nutriment étudié puisque tous les autres nutriments sont présents. Cette étape de transition dure habituellement de 1 à 4 jours.

Lorsque la limitation en croissance est identifiée, la suspension cellulaire est filtrée à l'aide de filtres (Glass fiber filter, Gelman Science) et de capsules de filtration (Micro Culture Capsule 0.2 μm, Gelman Sciences) préalablement stérilisés (20 min, 121 °C, 1 bar). À l'aide de la tendance des rapports biomasse humide/biomasse sèche des journées précédentes (x_h/x_d), de la mesure de la concentration en biomasse humide (x_h) de la journée d'inoculation, du volume de suspension (V) et de la concentration en biomasse sèche désirée (x_d), une quantité calculée de biomasse humide (m_h) est pesée de manière à obtenir précisément la concentration de biomasse sèche désirée dans la suspension finale selon l'équation 3.1 qui suit :

$$m_h = V(x_d)_{désiré}\left(\frac{x_h}{x_d}\right)_{extrapolé} \qquad 3.1$$

Cette biomasse humide est alors ajoutée à du milieu B5 non concentré qui contient le nutriment à l'étude à la concentration désirée. Le suivi est effectué normalement, tel que décrit à la section 3.6.

3.3. Cultures en bioréacteur

Trois types de bioréacteurs opérés de manière similaire ont été utilisés dans le cadre de ce projet. Ceux-ci possèdent des volumes de culture maximum de 6 L, 3 L et de 2 L correspondant à des volumes effectifs moyens de 5 L, 2.5 L et 1.5 L respectivement.

3.3.1. Bioréacteur de 6 L

Le bioréacteur de 6 L possède une hélice à doubles rubans hélicoïdaux afin d'assurer une agitation efficace à faible taux de cisaillement pour les cellules végétales. Sa configuration à été déterminée selon les dimensions du réacteur de 11 L, originellement conçu par Jolicoeur et coll. (1992). Ce bioréacteur (Figure 3.1) est équipé de sondes de mesure de température, de pH et d'oxygène dissous. La sortie des gaz est reliée à un moniteur infrarouge pour la mesure de la concentration de bioxyde de carbone (Modèle 870, Rosemount Analytical). L'agitation de la suspension est réalisée à l'aide d'un moteur de 0.5 hp à vitesse variable. Un tachymètre relié à l'arbre de transmission permet le contrôle de cette vitesse d'agitation.

Le bioréacteur possède des ports d'échantillonnage, d'inoculation ainsi qu'un système d'alimentation en nutriments et en milieu. Les gaz d'alimentation sont stérilisés par pénétration à l'aide de lits denses de laine de verre, alors qu'un possible retour par les gaz de sortie est stérilisé par interception à l'aide de filtres stériles de 0.45 μm (Bacterial air vent, Gelman Sciences).

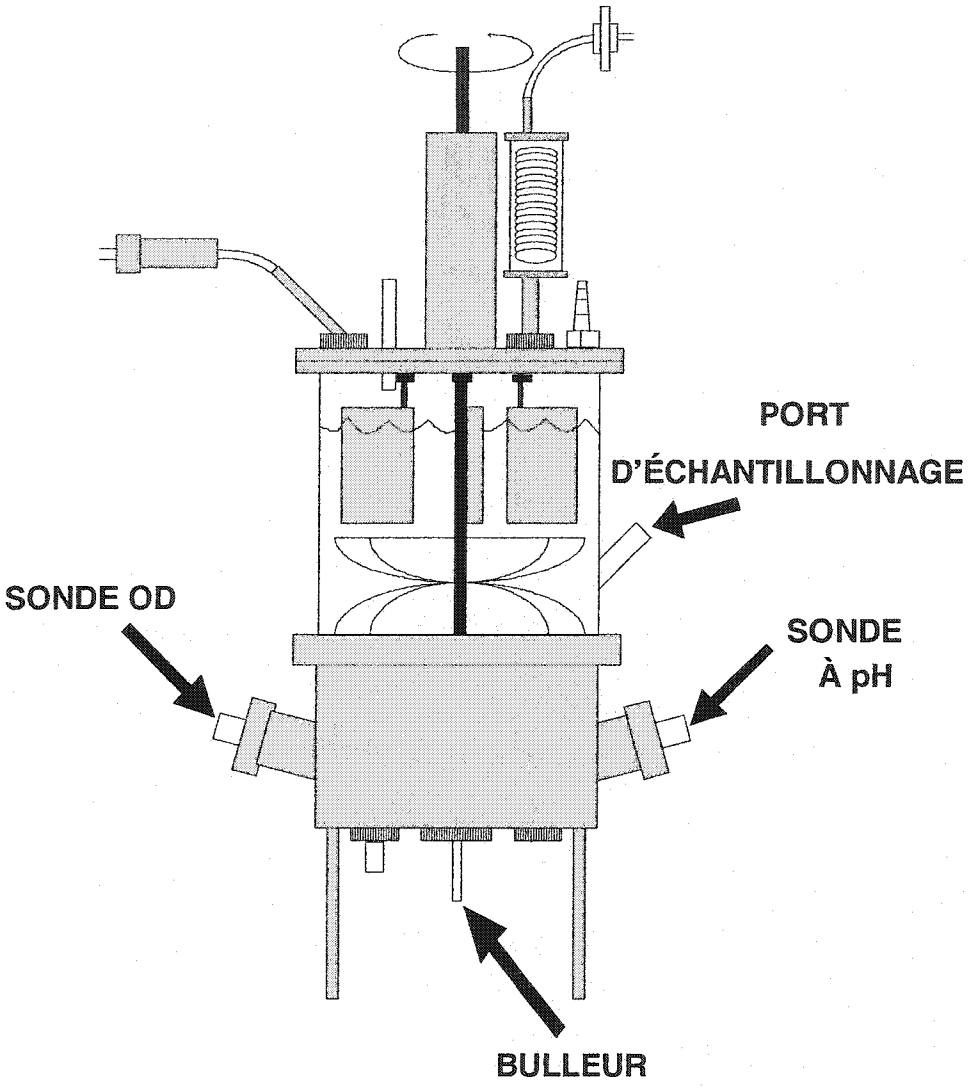


Figure 3.1 : Bioréacteur de 6 L à doubles rubans hélicoïdaux. Adapté de Aubry (1995)

3.3.2. Bioréacteur de 2 L

Le bioréacteur de 2 L possède une configuration similaire à celles du 6 L et du 11 L (Jolicoeur et coll., 1992). Il est composé d'un réservoir en verre sur lequel repose un couvercle en acier inoxydable (SS-316) usiné et fixé par des brides et un joint

caoutchouté. L'agitation est réalisée par une hélice à doubles ou simple rubans hélicoïdaux ainsi que par des chicanes de surface.

Ce bioréacteur (Figure 3.2) est équipé de sondes permettant un suivi en continu de la température, de la conductivité, du pH et de l'oxygène dissous. La sortie des gaz est reliée au même moniteur à infrarouge que celui mentionné précédemment, par l'utilisation de vannes 3 voies qui permettent un cycle d'analyse de 15 minutes par bioréacteur. L'agitation de la suspension est assurée par un moteur (Stir-pak©, modèle 4554-10, Cole Parmer) dont la vitesse est ajustée manuellement et mesurée périodiquement à l'aide d'un tachymètre portable (modèle 20904-010, VWR). L'ensemble de l'instrumentation est relié au système de commande de Bioexpert (Québec, Canada).

Ce bioréacteur possède aussi des ports d'échantillonnage, d'inoculation, d'alimentation en milieu et en nutriments, en plus d'être relié à des réservoirs de milieu et de nutriments de même qu'à un flacon d'inoculation. Les même conditions de stérilité sont utilisées pour ce bioréacteur, à l'exception des gaz d'alimentation qui sont aussi stérilisés par pénétration d'un lit compact de laine de verre.

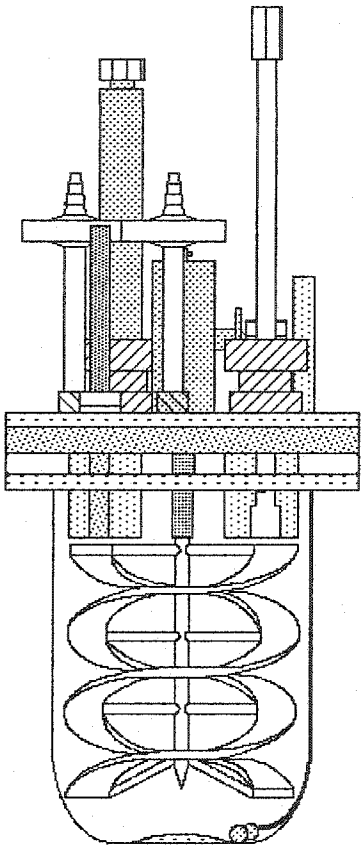


Figure 3.2 : Bioréacteur de 2 L. Adapté de Sirois (1994)

3.3.3. Bioréacteur de 3 L

Le bioréacteur de 3 L nominal est une variante du bioréacteur de 2 L. Il s'agit du même système de culture, à l'exception du récipient de verre d'un volume nominal de 3 L. De manière à assurer une agitation uniforme, l'arbre de l'hélice est allongé pour que cette dernière descende dans la partie inférieure du bioréacteur. La partie supérieure de la suspension cellulaire est agitée par entraînement des courants d'agitation. L'utilisation

d'une sonde à oxygène dissous en tête de réacteur sert de chicane, empêchant ainsi la création d'un vortex lors de l'opération.

3.3.4. Suivi et contrôle

La température est suivie en continu à l'aide d'une sonde à résistance électrothermique (RTD) collée à la paroi extérieure du bioréacteur. Le maintien de la température est assuré par un contrôle de la température de la pièce entière où se trouve la culture de cellules végétales à 26 ± 1 °C.

Le pH de la culture est aussi suivi en ligne grâce à une sonde stérilisable prépressurisée (Ingold, Combined pH electrode). Elle est calibrée à l'aide de solutions étalons à pH de 4.00 et de 7.00 (Fischer Scientific) avant la stérilisation. La dérive de calibration est d'environ 1 x $10^{0.01}$ H^+ j^{-1} avec un temps de réponse approximatif de 2 min (Aubry, 1995).

La concentration en oxygène dissous des cultures est mesurée à l'aide d'une sonde polarographique stérilisable (Ingold). Suite à une période de polarisation de 24 heures, la calibration de cette sonde est réalisée après stérilisation dans le milieu de culture saturé à l'azote (0% d'oxygène dissous) et à l'air (100% d'oxygène dissous). La dérive maximum de la calibration est inférieure à 0.1% j^{-1}.

La concentration en bioxyde de carbone dans les gaz de sortie est analysée grâce à un moniteur à infrarouge de haute précision (Modèle 870, Rosemount Analytical) d'une

capacité de 0% à 10%. L'étalonnage est réalisé à l'aide d'azote (0%) et de gaz certifiés à 1.21%, 3.50% et 8.00% en CO_2 (Air-Liquid). L'utilisation de vannes solénoïdes trois voies permet une lecture des gaz de sortie de chaque bioréacteur pendant 15 minutes. Une période de 3 minutes sans acquisition de données est nécessaire au début de l'analyse de 15 minutes afin de purger les conduites des gaz du réacteur précédemment analysé. Cet intervalle est largement suffisant puisque le temps de purge mesuré est inférieur à 1 minute.

Afin de fournir l'oxygène dissous nécessaire à la croissance des cellules végétales, un système de contrôle des gaz est associé à chaque bioréacteur. Ce système mélange l'air et l'oxygène de manière à faire varier la pression partielle d'oxygène dans les gaz d'alimentation. Le contrôle de la pression partielle d'oxygène est réalisé par la manipulation d'un débitmètre contrôleur (FC-260, Tylan General) placé sur le conduit d'oxygène à un débit total constant des gaz assuré par un second débitmètre contrôleur (FC-260, Tylan General). Le débit d'air s'ajuste de manière à combler la différence entre le débit total et le débit d'oxygène. L'alimentation totale en gaz est ensuite séparée en deux : aération de bullage et de surface par le contrôle du débit de bullage au moyen d'un troisième débitmètre contrôleur (FC-260, Tylan General).

L'ensemble de l'instrumentation servant à l'acquisition de données et au contrôle de la culture est relié à un système d'acquisition de données et de contrôle Bioexpert. La période d'échantillonnage digitale imposée au système est de 10 s de manière à accroître les performances de contrôle et d'estimation des différents algorithmes.

Puisque les temps caractéristiques du procédé sont élevés (>5 h en consommation des nutriments et >100 h en croissance), ceci permet au système digital de s'approcher d'un système de contrôle et d'estimation analogique.

3.4. Conditions d'opération

3.4.1. Conditions générales

L'inoculum des cultures est préparé de façon identique à la procédure décrite pour les sous-cultures lors du maintien de la lignée cellulaire. Au moment de l'inoculation, 3 à 7 flacons contenant environ 200 ml de suspension cellulaire sont mélangés afin d'obtenir le volume total nécessaire d'inoculum à la culture en bioréacteur (environ 25% du volume total de culture).

Des volumes de 2.1 L à 6.4 L de milieu sont préparés pour les cultures effectuées dans les bioréacteurs de 2 L et 6 L. Le sucrose est stérilisé (20 min, 121 °C, 1 bar) dans une partie de l'eau requise pour le milieu (300 g L^{-1}, 400 ml par flacon d'un litre), alors que les régulateurs de croissance (0.2 g L^{-1} 2,4-D, 0.1 g L^{-1} kinétine) et les sels dissous sont stérilisés dans l'autre partie de l'eau suite à l'ajustement du pH à 5.5. Les deux solutions stériles sont mélangées à l'inoculum dans le bioréacteur.

La vitesse d'agitation est de 60 rpm, ce qui correspond à un temps de mélange d'environ 20 s et un taux de cisaillement de 30 s^{-1} (Aubry, 1995) dans le bioréacteur de 6 L. L'aération de la culture est assurée par une alimentation des gaz en surface qui

peut être redirigée à l'aérateur de fond, au centre. Cette façon d'alimenter la suspension en oxygène permet de meilleures conditions de transfert ce qui se refléte par une augmentation du coefficient de transfert d'oxygène (k_La) par un facteur de 6. Dans le bioréacteur de 2 L (60 rpm), le k_La passe de 0.8 à 5 h^{-1} avec de l'eau (Sirois, 1994), alors qu'il passe de 2.7 à 16 h^{-1} dans le bioréacteur de 5 L (Aubry, 1995). Le débit d'aération disponible varie entre 50 à 1000 ml min^{-1} (bioréacteur de 2 L) et atteint 2000 ml min^{-1} dans le réacteur de 5 L selon la demande du contrôleur de la fenêtre de plage permise qui permet un incrément automatique des débits d'aération au besoin (Sirois, 1997).

3.4.2. Alimentation des cultures en nutriments

Différentes expériences sont réalisées de manière à vérifier l'impact d'ajouts soutenus de différents nutriments sur la croissance des cultures. Ces ajouts ont été effectués de deux façons : manuellement ou automatiquement à l'aide de pompes. Les 4 principaux nutriments étudiés et contrôlés sont le glucose, le phosphate, le nitrate et l'ammonium. Ils sont ainsi préparés indépendamment en solutions aqueuses concentrées. Un concentré (1.5 X) de milieu B5, sans les 4 nutriments étudiés, est ajouté aux solutions de glucose et de nitrate afin d'éviter une limitation nutritionnelle des autres nutriments et hormones. Les solutions de phosphate et d'ammonium ne reçoivent pas de concentré de milieu B5 afin d'éviter des problèmes de précipitation et de réactions indésirables.

3.4.2.1. Alimentation manuelle

Dans le premier cas, les concentrations initiales des nutriments ciblés ont une valeur prédéterminée légèrement supérieure à la consigne limite inférieure. Ces concentrations à l'inoculation sont calculées de manière à satisfaire à la demande nutritionnelle des cultures pour les premières 24 heures sans descendre sous la consigne. Par la suite, des ajouts de nutriments concentrés sont réalisés à chaque jour. Les ajouts sont effectués par gravité et le volume de solution est mesuré à l'aide d'une seringue graduée incorporée au système. La quantité ajoutée pour chaque nutriment est calculée à l'aide du modèle de croissance (généralement SIREC1, Sirois (1997)) de manière à ce que la concentration de chaque nutriment dans la suspension soit près de sa consigne limite 24 heures plus tard avant l'ajout suivant. Un profil de concentration en dents de scie est ainsi obtenu et permet de maintenir la concentration des nutriments près d'une consigne sans toutefois la dépasser.

3.4.2.2. Alimentation automatisée

Lors des travaux de suivi et d'optimisation en continu des cultures, les pompes reliées à chaque solution concentrée de nutriment sont activées automatiquement par un algorithme d'ajout. Ceci permet de générer un débit préétabli, soit par l'utilisateur, soit par l'algorithme d'optimisation. Deux types de pompes ont été utilisées : à débit constant (action directe) et à débits variables (action avec retard). Les pompes utilisées fournissant des débits (30 à 900 ml h^{-1}) largement supérieurs aux débits d'alimentation

requis (<10 ml h^{-1}), l'algorithme d'ajout active les pompes de façon cyclique pour ainsi obtenir les débits désirés. Les pompes à débit constant ne présentent pas de retard lors de leur mise en marche et génèrent un débit nominal dès leur activation. Dans le cas des pompes à débits variables, elles présentent un retard avant de fournir un débit nominal préfixé par l'utilisateur, ce retard étant parfois variable (± 10%). Même si celui-ci est mesuré et incorporé à l'algorithme d'ajout, une telle variation du retard peut entraîner une erreur de 2% à 5% sur le débit d'ajout.

Considérant les faibles débits requis, des pompes à débit constant sont utilisées pour les ajouts des solutions de phosphate (Masterflex 7543-02, 2 rpm, 30 ml h^{-1} max. pour les bioréacteurs de 3 L et de 6 L) et de nitrate (Watson-Marlow 96694, 200 ml h^{-1} max. pour le bioréacteur de 3 L et Masterflex 7543-06, 6 rpm, 90 ml h^{-1} max. pour celui de 6 L) ainsi que pour l'ammonium dans le cas du réacteur de 6 L (Masterflex 7548-60, 60 rpm, 900 ml h^{-1} max.). En revanche, des pompes à débits variables préfixés sont utilisées pour les solutions de glucose (Masterflex 7520-25, préfixé à 90 ml h^{-1} max. pour le bioréacteur de 3 L et Masterflex 7520-35, préfixé à 60 ml h^{-1} max. pour celui de 6 L) et d'ammonium dans le cas du bioréacteur de 3 L (Masterflex 7523-10, préfixé à 30 ml h^{-1} max.).

3.5. Cultures témoins en flacon

Lors des cultures en bioréacteur, des cultures en flacon sont aussi réalisées afin de comparer les résultats avec ceux obtenus en bioréacteur. En procédant de cette façon, il est donc possible de déceler toute anomalie liée aux cellules. Les flacons utilisés sont de 500 ml et contiennent 240 ml de suspension cellulaire. Les mêmes conditions d'inoculation sont respectées et du milieu B5 normal est utilisé.

La culture en flacon permet aussi de comparer l'état cellulaire de l'inoculum d'une culture à l'autre. De cette manière, si un résultat aberrant se présente, il est possible de l'associer directement à l'expérience en cours ou à un état cellulaire différent de l'inoculum.

3.6. Échantillonnage et suivi

La durée des cultures varie de 8 à 20 jours. Afin du suivre la croissance cellulaire et la consommation des nutriments, des échantillons sont prélevés à des fréquences de 1 par 2 jours en flacons et de 1 à 2 par jour en bioréacteur.

3.6.1. Paramètres de culture

Le pH (pHmeter, 805 MP, Fischer Scientific)et le volume de biomasse sédimentée pendant 30 min (SCV, Settled Cells Volume) des échantillons sont immédiatement mesurés. L'échantillon est ensuite filtré (Glass fiber filter, Gelman Science) et le milieu de culture recueilli est analysé pour son contenu résiduel en ions et glucides. La

biomasse humide récoltée est pesée, séchée (80°C, 24 h), puis pesée de nouveau. Ces opérations permettent de mesurer les concentrations en biomasses humide et sèche ainsi que le rapport poids humide/poids sec des échantillons.

Un volume de 2 ml de suspension cellulaire est prélevé immédiatement après la prise d'échantillon et utilisé pour mesurer la concentration cellulaire selon l'annexe B. La masse cellulaire moyenne est calculée par le rapport biomasse sèche/concentration cellulaire.

3.6.2. Estimation des concentrations extracellulaires en nutriments

Lors des cultures en bioréacteur, une partie du surnageant est utilisée pour mesurer la concentration extracellulaire de glucose par glycométrie (Accutrend Instant, Boehringer Mannheim), de même que les concentrations de nitrate (420 nm ; NitraVer, Permachem Reagent (Hach)) et phosphate (605 nm ; PhosVer, Permachem Reagent (Hach)) par colorimétrie (Colorimètre Smart, Lamotte). La concentration en ammonium est estimée à l'aide d'un test semi-quantitatif à bandelettes (Em Quant Ammonium (NH_4^+) Test, Em Science).

3.6.3. Nutriments intracellulaires

Une quantité précise (environ 0.1 g) de biomasse sèche réduite en poudre est mise en suspension dans 4 ml d'eau distillée et agitée à 60 rpm pendant 24 h à température ambiante. Le surnageant est récupéré et l'extraction est reprise avec un même volume

d'eau distillée (60 rpm, 24 h, température ambiante). Les deux solutions sont mélangées et filtrées (Glass fiber filter, Gelman Science). Une partie de cette solution est analysée par HPLC (voir section 3.7) pour déterminer ses concentrations ioniques et en glucide. La seconde partie de cette solution est utilisée pour l'analyse des concentrations de glutamine et de glutamate intracellulaires selon la section 3.6.4.

3.6.4. Glutamine et glutamate intracellulaires

L'analyse des concentrations intracellulaires en glutamine et en glutamate est effectuée lors de l'expérience sur les nutriments intracellulaires de manière à vérifier le stockage des réserves d'azote, particulièrement de l'ammonium, par les cellules à l'étude. Le protocole utilisé (annexe C) permet de déterminer indépendamment les concentrations en glutamine et en glutamate dans les échantillons.

3.7. Analytique

Afin de déterminer les concentrations en glucides et en ions, le milieu de culture recueilli est analysé par chromatographie en phase liquide.

3.7.1. Glucides

Les concentrations en sucrose, glucose et fructose du milieu de culture sont mesurées par chromatographie en phase liquide à haute pression (HPLC) comportant une pompe volumétrique (501, Waters), un injecteur automatique (AS3500, Spectra System), un réfractomètre (7515-A, ERC inc.), un élément chauffant (7980, Man-Tech) et un

logiciel d'acquisition de données (PeakNet 5.1, Dionex). La séparation des glucides est réalisée par une colonne analytique (HPX87C, Biorad©) maintenue à température constante (80 ± 3 °C). Le volume de milieu injecté est de 1.5 μl et la phase mobile (eau déionisée filtrée) est alimentée à un débit de 0.9 ml min^{-1}.

3.7.2. Macronutriments inorganiques

Le contenu en ions du milieu de culture est mesuré par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) au moyen d'un détecteur électrochimique opéré en mode conductivité (Dionex). L'appareil comprend une pompe et un injecteur automatique (Dionex). Le logiciel Dionex A1-450 sert au contrôle du HPLC ainsi qu'à l'acquisition des données pour l'analyse des cations, alors que le logiciel PeakNet 5.1 est utilisé dans le cas des anions.

Les cations sont séparés par une colonne 4 x 250 mm (IONPAC CS-12A, Dionex) et par un suppresseur cationique (CSRS Ultra, Dionex). La phase mobile est une solution aqueuse d'acide méthanosulfonique (20 mM) alimentée à 0.9 ml min^{-1}. Les anions sont séparés par une colonne 4 x 250 mm (IONPAC AS14, Dionex) et par un suppresseur anionique (ASRS Ultra, Dionex). La phase mobile est une solution aqueuse de bicarbonate (3.5 mM Na_2CO_3 et 1.0 mM $NaHCO_3$) alimentée à 1.0 ml min^{-1}.

3.8. Correction des concentrations extracellulaires

Les concentrations en glucides et en ions mesurés par HPLC correspondent à la phase liquide de l'échantillon. Elles doivent donc être corrigées de manière à représenter la concentration en nutriments rapportée au volume de culture global. van Gulik (1992) suggère une correction des concentrations obtenues en fonction du volume de cellules centrifugées (PCV, Packed Cells Volume) selon :

$$n_{cor} = n(1 - 0.5PCV) \qquad 3.2$$

Cette correction suppose que les cellules occupent 50% du PCV. La relation entre le volume de cellules sédimentées (SCV) et le volume de cellules centrifugées (PCV) (Sirois, 1997) est :

$$PCV = 0.76SCV \qquad 3.3$$

L'équation 3.4 est obtenue en comparant les équations 3.2 et 3.3 :

$$n_{cor} = n(1 - 0.38SCV) \qquad 3.4$$

Cette relation sert à corriger les concentrations en nutriments extracellulaires obtenues des analyses avant leur utilisation pour interprétation et modélisation.

3.9. Calcul des taux de croissance de la biomasse et de prolifération cellulaire

Les mesures des variables de croissance, et plus particulièrement l'évolution de la concentration cellulaire, présentent parfois des variations locales importantes provenant d'erreurs d'échantillonnage, de mesure ou d'analyse. Le calcul des taux de croissance à partir de ces variables est mathématiquement très sensible à ces erreurs diverses. Suite à une discrétisation explicite de l'équation de croissance :

$$x_{t+1} = x_t e^{\mu_t \Delta t} \tag{3.5}$$

le taux de croissance instantané est alors calculé selon :

$$\mu_t = \frac{\ln\left(x_{t+1}/x_t\right)}{\Delta t} \tag{3.6}$$

La méthode de moyenne locale suggère plutôt de calculer le taux de croissance actuel à l'aide des échantillons précédent et du suivant selon :

$$\mu_t = \frac{\ln\left(x_{t+1}/x_{t-1}\right)}{2\Delta t} \tag{3.7}$$

La valeur obtenue est attribuée aux échantillons précédent, actuel et suivant, ce qui fait que le taux de croissance moyen local est obtenu par la moyenne des trois taux calculés pour chaque échantillon.

$$\overline{\mu}_t = \frac{\mu_{t-1} + \mu_t + \mu_{t+1}}{3} \tag{3.8}$$

Le même processus est effectué pour la prolifération cellulaire. La Figure 3.3 démontre la validité de cette approche qui permet d'identifier des profils de croissance même en présence de mesures très bruitées.

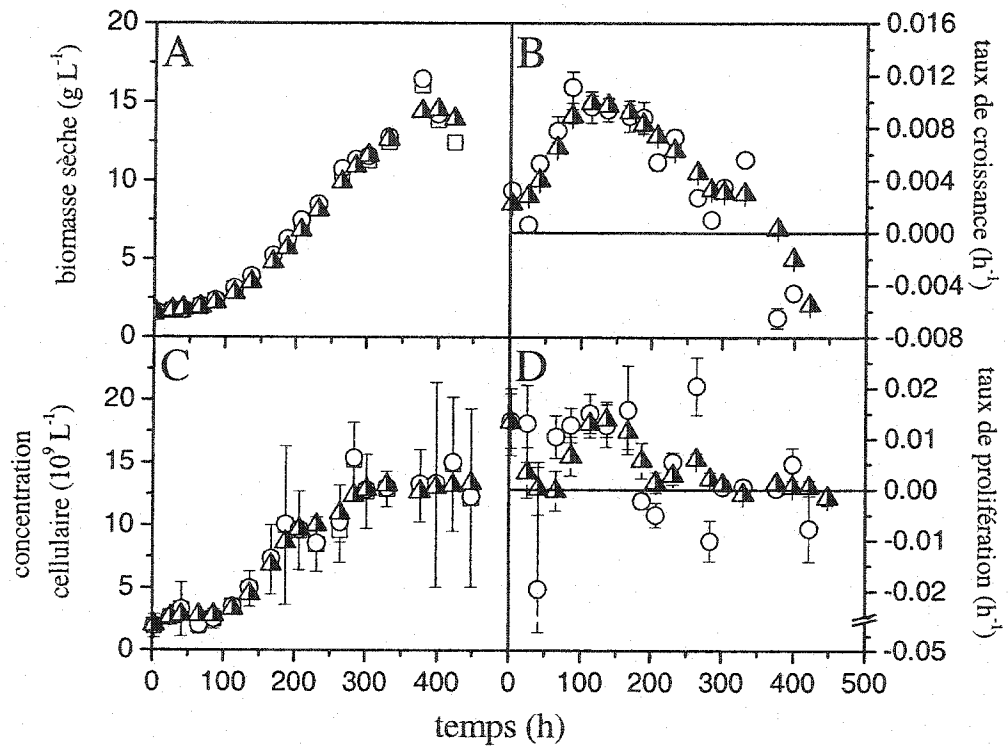


Figure 3.3 : **Comparaison de l'estimation des taux de croissance en biomasse sèche et en prolifération cellulaire par les méthodes du calcul instantané (○) et de la moyenne locale (△). □ Données originales. A. Biomasse sèche expérimentale et reconstruite. B. Taux de croissance en biomasse sèche. C. Concentration cellulaire expérimentale et reconstruite. D. Taux de prolifération.**

3.10.Erreurs expérimentales sur les mesures

Une étude des erreurs expérimentales sur les mesures a été effectuée afin d'identifier correctement les tendances obtenues des expérimentations et à ne pas les confondre avec une fausse tendance provenant de l'erreur expérimentale. Celle-ci permettra donc d'apprécier le rapport signal/bruit des mesures en plus de faciliter la modélisation du système et ce, tout en améliorant sa compréhension.

3.10.1. Test statistique intergroupe

Dix échantillons d'une même culture sont pris l'un après l'autre dans une courte période de temps (< 5 min) et sont analysés indépendamment par la suite. Les résultats d'analyse sont ensuite regroupés pour en calculer la valeur moyenne, l'écart-type et le coefficient de variation (cv = écart-type/valeur moyenne). Les résultats obtenus sont présentés à la Figure 3.4. Ce test statistique permet d'apprécier l'erreur sur chaque mesure ce qui est nécessaire pour une étude adéquate des interactions nutritionnelles et une modélisation représentative des phénomènes réels et non des erreurs expérimentales.

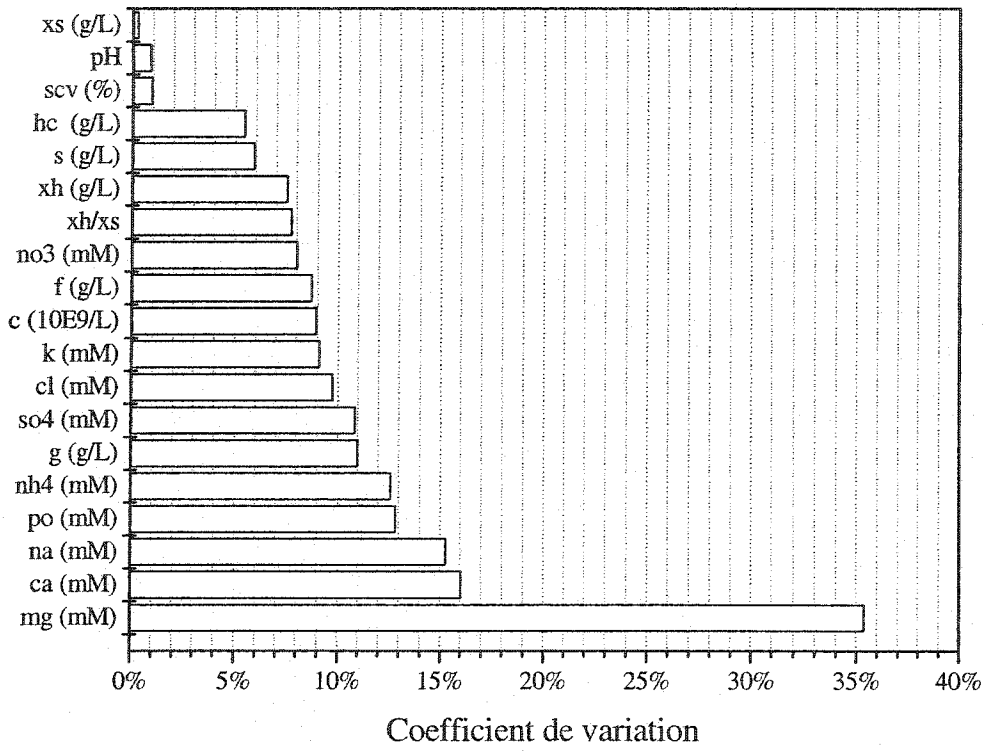


Figure 3.4 : Erreurs expérimentales intergroupes sur les variables de suivi direct, les analyses ioniques et les hydrates de carbone.

3.10.2. Test statistique intragroupe

Lorsque la mesure est obtenue par des lectures répétées d'un même échantillon, une estimation intragroupe de l'erreur expérimentale est obtenue, celle-ci représentant une meilleure approximation de l'erreur expérimentale réelle (Clément, 1999).

3.10.2.1.Glutamine et glutamate

Lors des mesures de concentration en glutamine et en glutamate au spectromètre, deux lectures successives du même échantillon sont réalisées. De cette manière, l'erreur due à l'appareil est évaluée et utilisée avec les erreurs de manipulation pour estimer l'erreur globale de la mesure.

3.10.2.2.Dénombrement cellulaire

Le dénombrement cellulaire est obtenu en faisant une moyenne de plusieurs comptes cellulaires. En calculant l'écart-type de cette moyenne, une approximation intragroupe de l'erreur expérimentale réelle est obtenue. Cette erreur se situe généralement autour de 10%, mais peut être plus élevée comme le démontrent les résultats du test statistique présentés au Tableau 3.1.

Tableau 3.1 : Erreur intragroupe du dénombrement cellulaire

Essai	c_1	c_2	c_3	$\bar{c}$	s	cv (%)
1	7.7	7.0	6.9	7.2	0.4	5.6
2	6.5	9.2	10.5	8.7	2.1	24
3	10.2	8.3	12.5	10.3	2.1	20
4	9.6	9.0	10.8	9.8	0.9	9.2

3.10.3. Estimation des concentrations extracellulaires en nutriments

L'erreur des 4 tests d'estimation rapide de la concentration extracellulaire du glucose, du phosphate, du nitrate et de l'ammonium est beaucoup plus élevée que celle obtenue par le test intergroupe suite à une analyse par chromatographie. Il s'agit toutefois du seul moyen disponible pour obtenir rapidement une estimation des concentrations résiduelles de ces nutriments et ainsi être en mesure de prendre promptement certaines décisions lors des cultures.

La précision sur le test du glucose est d'environ 0.5 mM (résultats non présentés), soit une erreur approximative de 1 g L^{-1} en tenant compte de la dilution (1/10) effectuée avant analyse. Dans le cas du phosphate et du nitrate, l'erreur de mesure se situe près de 0.2 mM en tenant compte des dilutions réalisées dans les deux cas soient 1/100 et 1/20, respectivement. En ce qui a trait à la concentration en ammonium, le test semi-quantitatif utilisé induit une très grande erreur. La bandelette change de couleur en fonction de la concentration de l'ion ammonium. Il faut donc comparer ces couleurs à celles de référence retrouvées sur l'emballage, lesquelles correspondent à des concentration de 0 mg L^{-1} (0 mM), 10 mg L^{-1} (0.6 mM), 30 mg L^{-1} (1.7 mM), 60 mg L^{-1} (3.3 mM), 100 mg L^{-1} (5.6 mM), 200 mg L^{-1} (11.1 mM) et 400 mg L^{-1} (22.2 mM). Le seul moyen d'obtenir une mesure est de juger si la couleur obtenue sur la bandelette se rapproche d'une couleur étalon ou si elle se situe entre les deux. Le graphique présenté à la Figure 3.5 illustre l'erreur expérimentale obtenue en fonction de la mesure.

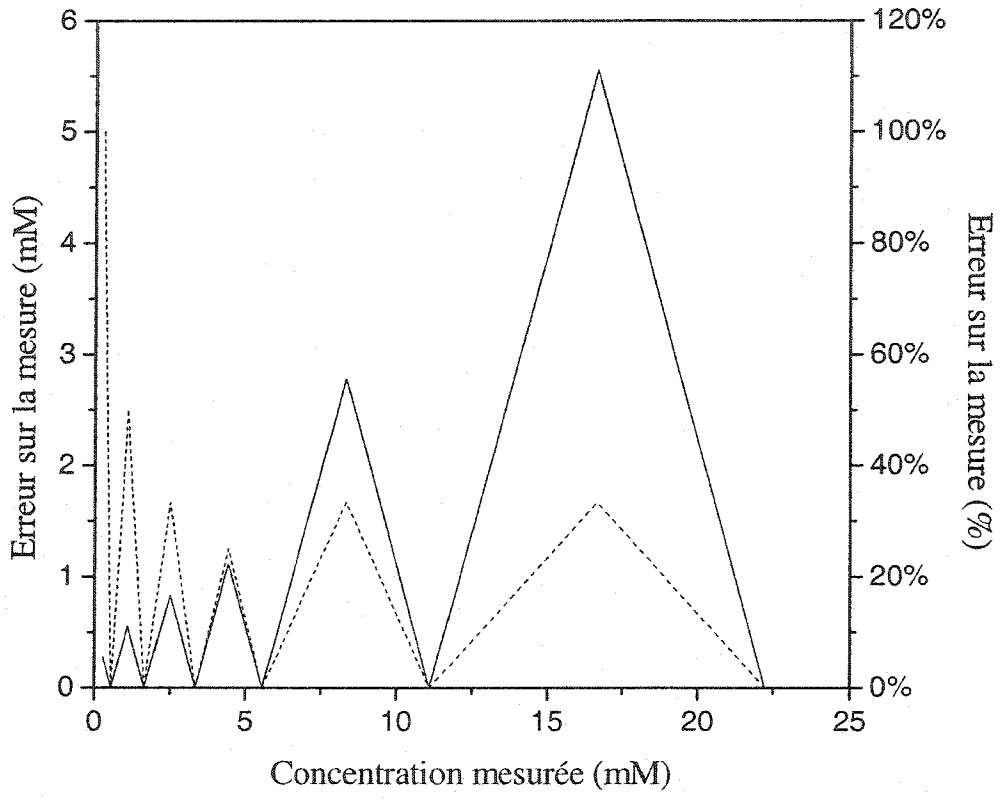


Figure 3.5 : **Erreur sur l'approximation de la concentration en ammonium en fonction de la mesure obtenue au moyen du test à bandelettes. — erreur en mM, ---- erreur en %.**

3.10.4. Expérimentation en flacons

Toutes les expérimentations en flacons ont été réalisées en duplicata. En procédant ainsi, des divergences anormales peuvent être décelées et leur absence assure une variation expérimentale égale ou inférieure à l'erreur de mesure intergroupe sur la variable.

3.10.5. Facteurs affectant le dénombrement cellulaire

Le dénombrement cellulaire peut être fait sur différents types de plaques dont les deux modèles testés sont l'hémacytomètre de Bright-Lite et celui de Fushs-Rosenthal ultraplane, tous les deux conçus par Hausser Scientific. L'utilisateur peut affecter la mesure puisque certains objets apparaissant sur la plaque lors du dénombrement peuvent être difficiles à classifier. En effet, il n'est pas évident de confirmer être bel et bien en présence d'une cellule ou d'un simple artefact. Un test statistique complet à 2 facteurs (plaquette, utilisateur) et 2 modalités (2 utilisateurs et 2 plaquettes différentes), soit 2^2 essais, a été réalisé pour démystifier l'influence de ces deux facteurs. Le Tableau 3.2 présente les modalités et les facteurs de l'expérience statistique.

Tableau 3.2 : Facteurs et modalités pour le test statistique de dénombrement cellulaire

Facteur	Identification	Modalité
Plaque	P1	-
	P2	+
Utilisateur	U1	-
	U2	+

Le Tableau 3.3 démontre le plan statistique complet 2^2 utilisé, de même que les résultats obtenus où P, U et PU représentent respectivement la plaque, l'utilisateur et la combinaison des deux. Les variables $\bar{c}$, s et R désignent la moyenne, l'écart-type et

l'étendue des trois dénombrements cellulaires c_1, c_2 et c_3 effectués lors de chaque essai. Toutes les formules utilisées pour l'expérience statistique se trouvent à l'annexe D.

Tableau 3.3 : Plan statistique expérimental 2^2 pour le dénombrement cellulaire et résultats obtenus

Essai	P	U	PU	c_1	c_2	c_3	$\bar{c}$	s	R
1	-	-	+	7.7	7.0	6.9	7.2	0.4	0.8
2	-	+	-	6.5	9.2	10.5	8.7	2.1	4.1
3	+	-	-	10.2	8.3	12.5	10.3	2.1	4.2
4	+	+	+	9.6	9.0	10.8	9.8	0.9	1.8

L'usager U1(-) effectue habituellement un dénombrement sur la plaque P1(-) et l'usager U2(+) le fait généralement sur la plaque P2(+). L'habitude de ceux-ci se reflète dans les valeurs de l'étendue R qui est moindre (<2) lors des essais représentant cette situation, alors qu'elle est supérieure (>4) lorsque les usagers comptent les cellules sur une autre plaque que celle qu'ils utilisent régulièrement. Une analyse statistique est nécessaire pour vérifier si ce phénomène génère une erreur statistiquement significative sur le dénombrement cellulaire.

Le Tableau 3.4 présente une analyse statistique détaillée des résultats obtenus précédemment. La colonne C contient les contrastes de chaque facteur calculés à partir des résultats précédents, alors les autres colonnes regroupent le taux d'ajustement

(TA), la somme des carrés (SC), le degré de liberté (DL), les carrés moyens (CM), l'effet (Ê) et le paramètre de signification statistique de la loi de Fisher-Snedecor (F_S).

Tableau 3.4 : Analyse statistique de l'expérience sur le dénombrement cellulaire

Source	C	TA	SC	DL	CM	Ê	F_S
P	2.1	4	1.1	1	1.1	1.1	0.5
U	0.5	4	0.1	1	0.1	0.2	0.0
PU	-1.0	4	0.3	1	0.3	-0.5	0.1
intra			19.2	8	2.4		
totale			1.4	11			

n = 3

Un facteur a un impact significatif, c'est-à-dire supérieur au bruit, sur le signal qui correspond à la mesure si le paramètre F_S lui étant associé est supérieur au paramètre théorique (F_{th}). Or, dans ce cas-ci, le paramètre statistique théorique ayant une précision de 99% est de 7.6, alors que les paramètres statistiques des facteurs (P, U et PU) sont d'au plus 0.5. Cette étude permet donc de conclure que ni le type de plaque vérifié, ni l'utilisateur n'ont d'impact significatif sur les résultats du dénombrement cellulaire. En d'autres mots, l'erreur de ces deux sources est inférieure à l'erreur provenant de la mesure elle-même.

3.11.Erreurs sur les calculs

De manière générale, l'erreur sur les calculs effectués dans le cadre de ce projet de recherche est déduite selon le principe de propagation de l'erreur des variables aléatoires ou indépendantes présenté par Williams (1987). Cette technique est fortement suggérée lors de calculs complexes faisant intervenir plusieurs variables ayant chacune une incertitude expérimentale ou provenant de calculs antérieurs. Contrairement au calcul traditionnel des erreurs qui a pour fondement la sommation des incertitudes maximales de chaque variables intervenant dans le calcul, le principe de propagation de l'erreur de variables aléatoires ou indépendantes repose sur la sommation du carré des incertitudes individuelles, le résultat étant la racine quadratique. L'incertitude résultante est donc plus réaliste, évitant ainsi une accumulation rapide des erreurs dépassant le résultat du calcul après quelques étapes seulement.

4. LIMITATIONS NUTRITIONNELLES DES CULTURES DE CELLULES VÉGÉTALES

Les nutriments sont souvent limitants à la croissance, soit par un effet d'épuisement, soit par un effet de concentration. Dans ce dernier cas, la concentration du nutriment dans le milieu de culture affecte, positivement ou négativement, les échanges ioniques transmembranaires et du même coup, le métabolisme cellulaire. Selon l'ensemble de la littérature, les nutriments qui affectent le plus souvent la croissance cellulaire végétale et ayant le plus d'importance sont ceux constituant les sources de carbone, d'azote et de phosphate.

Dans la plupart des milieux de culture, la source de carbone est le sucrose ou le glucose. Dans le cas de l'azote, son apport provient du nitrate et de l'ammonium dans diverses proportions alors que le phosphate provient du phosphate de sodium. Finalement, le pH étant réputé réguler plusieurs activités métaboliques (section 2.4.2), la source et l'impact de ses variations lors des cultures, de même que la possibilité de les amoindrir sont aussi explorés.

4.1. Glucides

La source nutritionnelle carbonée est absorbée par la cellule et utilisée à la fois comme source d'énergie et squelette carboné pour la formation de composés complexes. Dans la composition de la plupart des milieux de croissance de cellules végétales, des formes simples de glucides tels le sucrose et le glucose sont utilisées (e.g. Furner et coll., 1978 ; Gamborg et coll., 1968 ; Murashige et Skoog, 1962). Suite à l'hydrolyse du sucrose, les pentes d'absorption du glucose et du fructose sont similaires (Figure 4.1) réfutant ainsi l'idée d'une préférence des cellules pour l'un ou l'autre de ces deux nutriments carbonés.

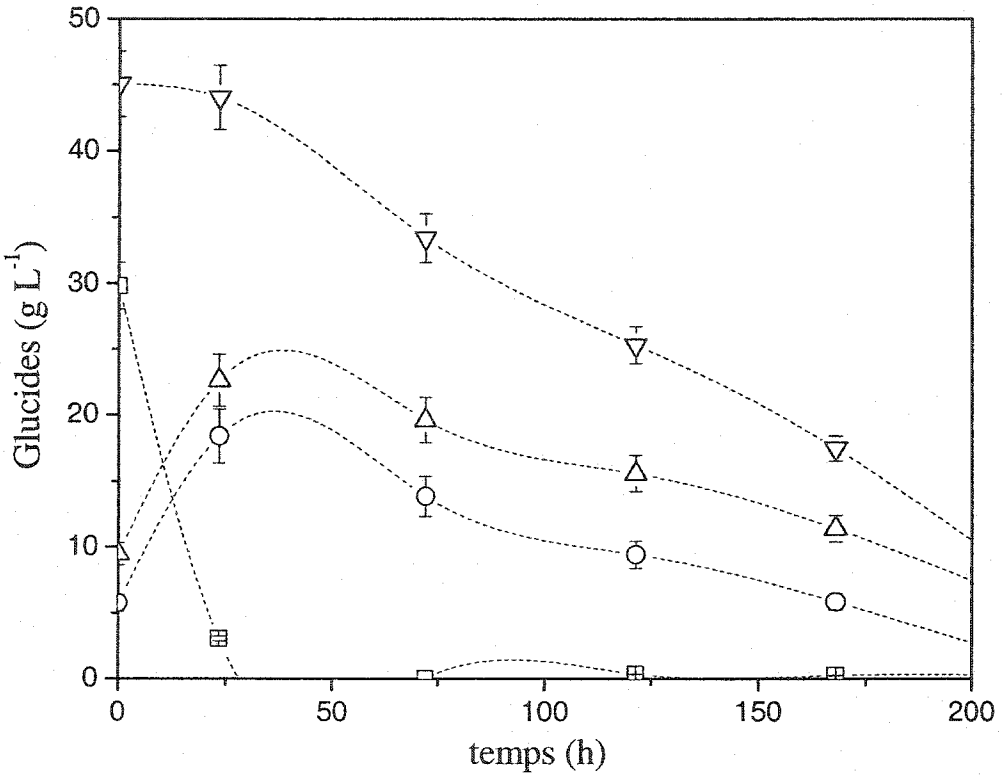


Figure 4.1: **Dégradation du sucrose et consommation des glucides lors de la culture de cellules végétales. □ sucrose, ○ glucose, △ fructose, ▽ glucides totaux.**

Afin de confirmer que la nature de la source carbonée n'affecte pas significativement la croissance cellulaire, deux expériences parallèles sont effectuées : l'une alimentée au sucrose et l'autre au glucose. Les résultats obtenus confirment que les paramètres de croissance des cellules d'*Eschscholtzia californica* utilisées, autant en biomasse sèche (Figure 4.2) qu'en prolifération cellulaire (Figure 4.3), ne sont pas affectés de manière significative par l'utilisation de l'une ou l'autre des deux sources carbonées.

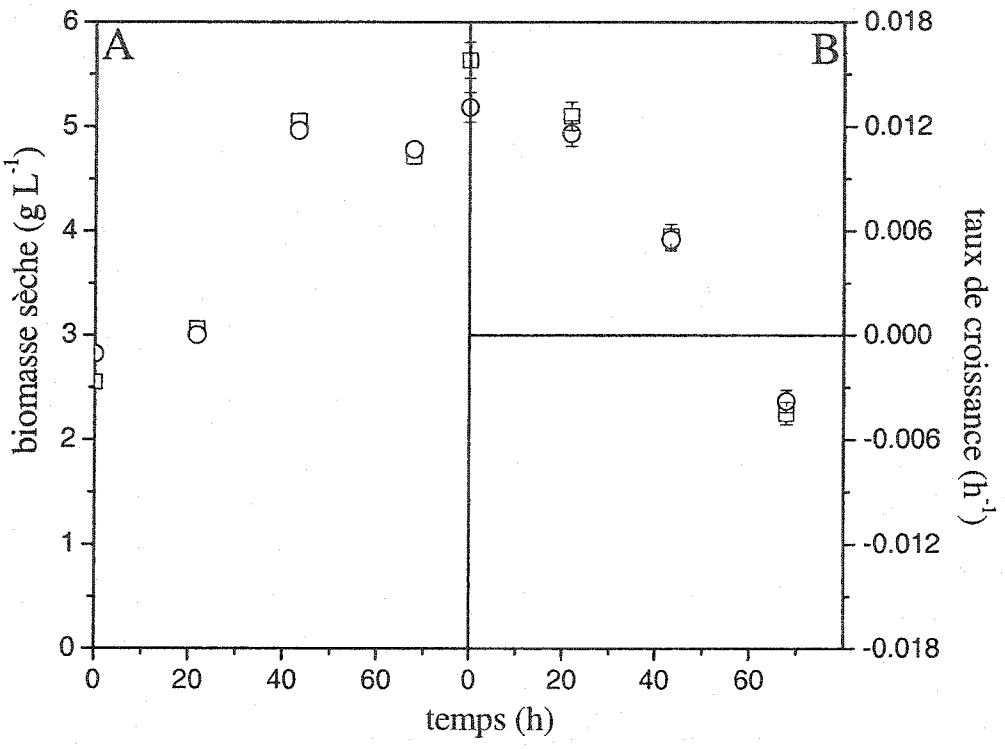


Figure 4.2: **Comparaison de l'impact de la source de carbone sur la croissance de la biomasse sèche. A. Concentrations en biomasse sèche. B. Taux de croissance. Source de carbone : □ sucrose, ○ glucose.**

Ceci se distingue par le suivi des concentrations (partie A des figures), mais aussi par la comparaison des taux de croissance de biomasse et de prolifération cellulaire (partie B des figures), lesquels sont mathématiquement plus sensibles aux variations de croissance.

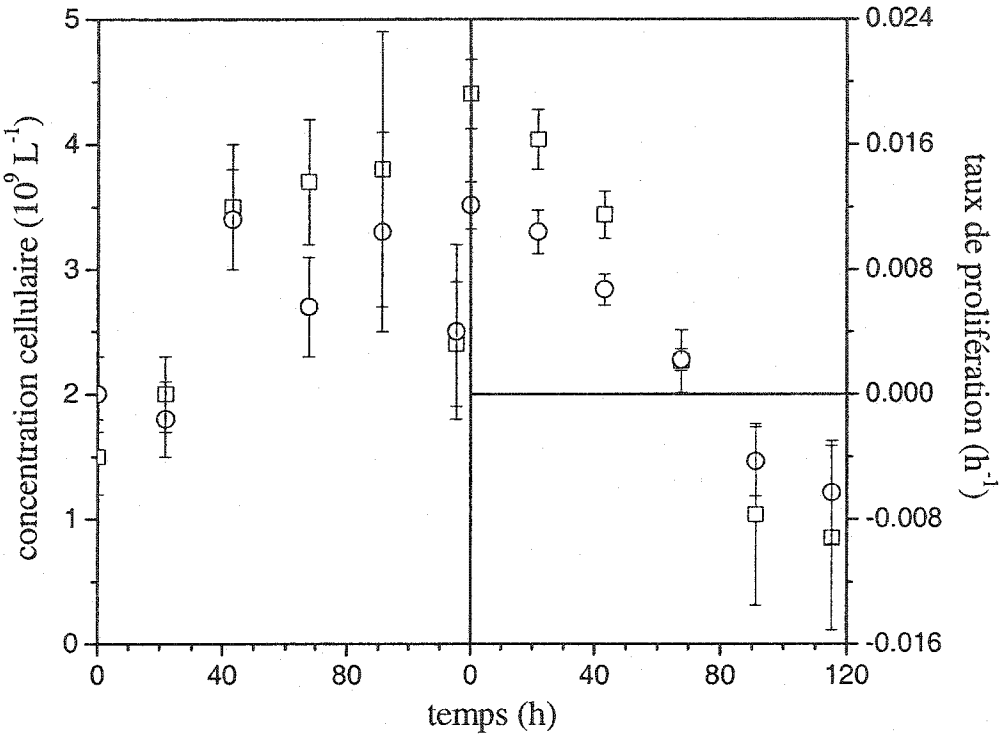


Figure 4.3: **Comparaison de l'impact de la source de carbone sur la prolifération cellulaire. A. Concentrations en biomasse sèche. B. Taux de croissance. Source de carbone : □ sucrose, ○ glucose.**

Selon la littérature (chapitre 2), la forme générale d'inhibition par concentration des nutriments semble suivre une cinétique de cloche déformée (section 2.4.4). La concentration habituelle en glucides se situe entre 20 et 30 g L^{-1}. Des cultures parallèles sont donc réalisées avec des concentrations initiales de 45 g L^{-1} dans un premier cas et de 150 g L^{-1} dans un second. Comme le montre la Figure 4.4, une

inhibition complète, autant en croissance de la biomasse sèche (A) qu'en prolifération cellulaire (B), est observée à très forte concentration initiale en sucrose.

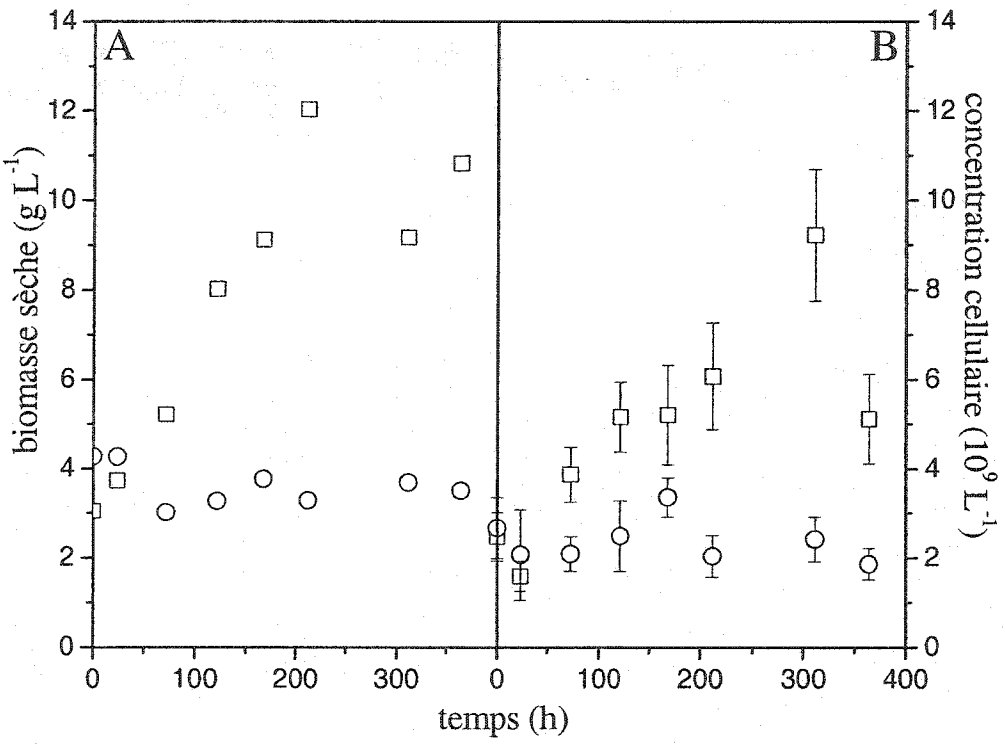


Figure 4.4: **Effet de fortes concentrations initiales en sucrose sur la croissance de la biomasse sèche et sur la prolifération cellulaire. A. Concentrations en biomasse sèche. B. Concentration cellulaire. Concentration initiale en sucre : □ 45 g sucrose L^{-1}, ○ 150 g sucrose L^{-1}.**

Ceci peut s'expliquer par une très forte pression osmotique dans le milieu de culture perturbant les échanges ioniques. De fait, alors que la biomasse humide de l'expérience à concentration initiale de 45 g L^{-1} en sucrose a atteint les 350 g L^{-1}, celle

des cellules mises en contact avec la plus forte concentration est passée de 80 à 55 g L^{-1} en un peu plus de 100 heures et y est demeurée stable jusqu'à la fin de l'expérience. Le rapport massique biomasse humide/biomasse sèche de l'expérience à 150 g L^{-1} est descendu sous les 20 immédiatement après l'inoculation et a diminué jusqu'à moins de 15. Pour sa part, le rapport massique pour l'expérience à 45 g L^{-1} en sucrose a diminué de 30 à 20 sur 150 heures pour remonter jusqu'à 30 autour de 350 heures de culture.

Cette expérience confirme donc, pour *Eschscholtzia californica,* l'inhibition de la croissance à fortes concentrations en glucide tout comme l'ont constaté Zhong et coll. (1994), Zhong et Yoshida (1995) et Sato et coll. (1996). Aussi, Mori et Sakurai (1994) sont arrivés au même constat pour des concentrations supérieures à 50 g L^{-1}. Ceci indique donc que lors de cultures en bioréacteur où de grandes quantités de carbone sont nécessaires, une alimentation maximale soutenue en un cours laps de temps n'est pas souhaitable. Celle-ci doit plutôt être contrôlée de manière à éviter une pénurie, tout en se protégeant d'une inhibition par concentration.

En ce qui a trait aux rendements de croissance, Sirois (1997) propose un rendement constant de 0.31 ± 0.05 g g^{-1} obtenu par la moyenne des pentes de régression linéaire de la concentration en biomasse sèche en fonction de la concentration en glucides. Ceci laisse croire à une absorption des glucides directement proportionnelle à l'accroissement en biomasse sèche. Cette absorption représente aussi la consommation des glucides par les cellules d'*Eschscholtzia californica* puisque ces dernières ne peuvent accumuler significativement les glucides intracellulaires (Taticek et coll.,

1990 ; Aubry, 1995 ; Sirois, 1997). Toutefois, en observant la Figure 4.5, une tendance exponentielle décroissante semble se dessiner entre la concentration en biomasse et la concentration en glucides. Cette tendance suggère que le rendement en croissance par rapport aux glucides est fonction de la concentration de ces derniers.

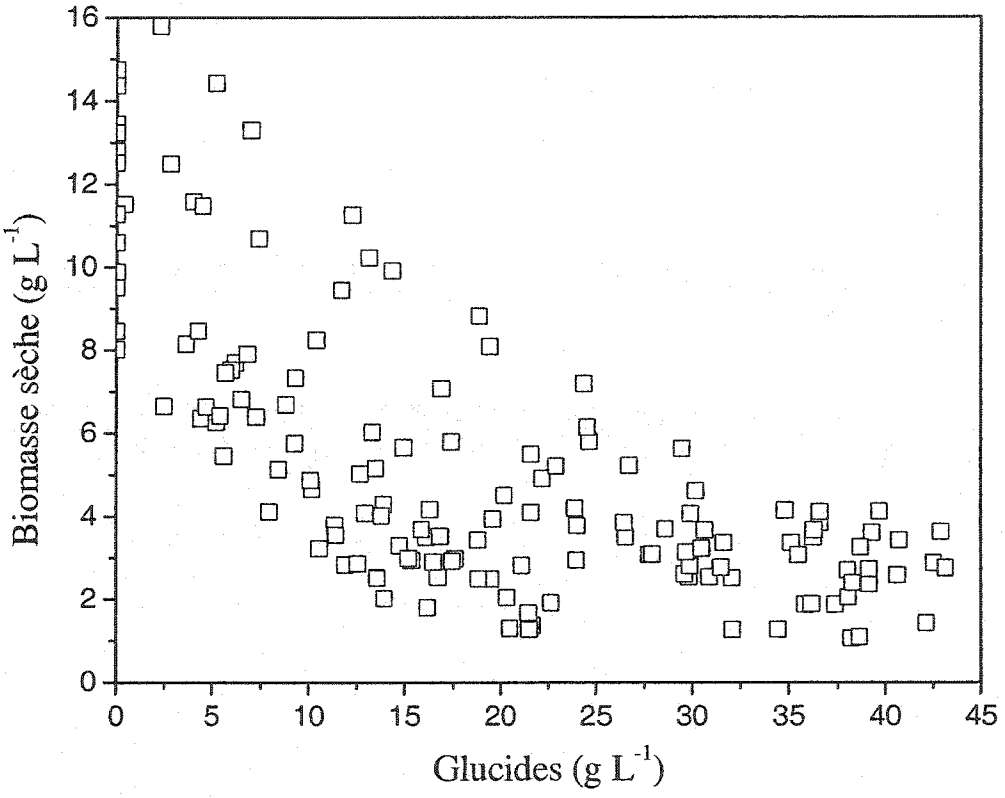


Figure 4.5: **Concentration en biomasse en fonction de la concentration en glucides pour les 14 cultures en bioréacteur utilisées lors du développement des modèles de croissance.**

La forme de cinétique de Jerusaliwski et Engambervediev (1969) est adaptée au présent cas et utilisée pour décrire ce genre de comportement pour une variation du rendement:

$$Y_{x/g} = Y^{*}_{x/g} \frac{K^{J}_{g}}{K^{J}_{g} + g} \qquad 4.1$$

Afin de déterminer les valeurs du rendement maximum ($Y^{*}_{x/g}$) et de la constante d'inhibition (K^{J}_{g}), des valeurs du rendement en fonction de la concentration en glucides doivent être calculés. L'approche choisie consiste a effecter une dérivée locale (par régression linéaire) le long de la courbe expérimentale de la concentration de biomasse sèche en fonction de la concentration en glucides (Figure 4.5).

Les points présentés sur cette figure sont issus de deux groupes d'expériences. Un premier groupe comprend les expériences où la concentration initiale en glucides est de 20 g L^{-1} alors que le second groupe contient les expériences où la concentration initiale en glucides est de 40 g L^{-1}. La technique de la dérivée locale est appliquée indépendemment sur chacun de ces deux groupes pour éviter des calculs de pente erronés (Figure 4.6). Le pas de différentiation (en concentration en glucides) a été varié jusqu'à l'obtention d'une valeur minimisant le bruit des résultats finaux. Les valeurs retenues pour ce pas de différentiation sont de 20% et 25% de la concentration maximale pour les groupes à 20 g L^{-1} et 40 g L^{-1} respectivement, soit des pas de 5 g L^{-1}et 10 g L^{-1}.

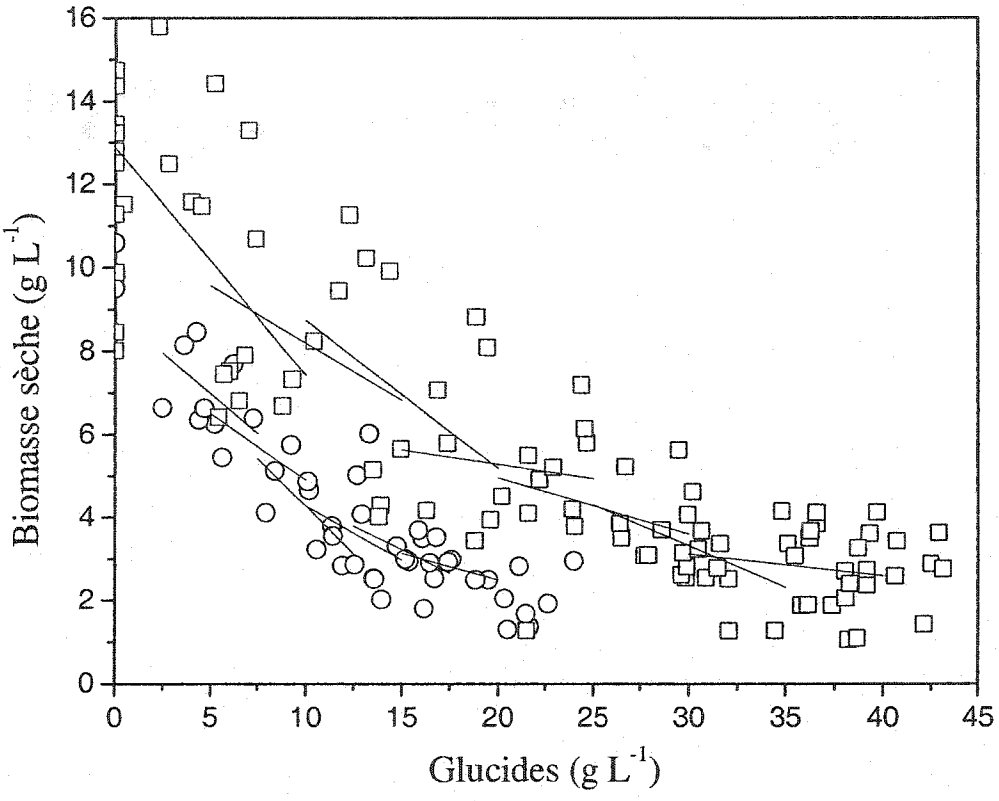


Figure 4.6: **Détermination des dérivées locales de la concentration en biomasse sèche en fonction de la concentration en glucides. □ concentration initiale de 40g L^{-1} en glucides, ◯ concentration initiale de 20 g L-1 en glucides.**

Les valeurs du rendement maximum et de la constante d'inhibition sont obtenues par régression linéaire sur un graphique de l'inverse du rendement local en fonction de la concentration en glucides (démonstration E3 de l'annexe E) tel que présenté à la Figure 4.7.

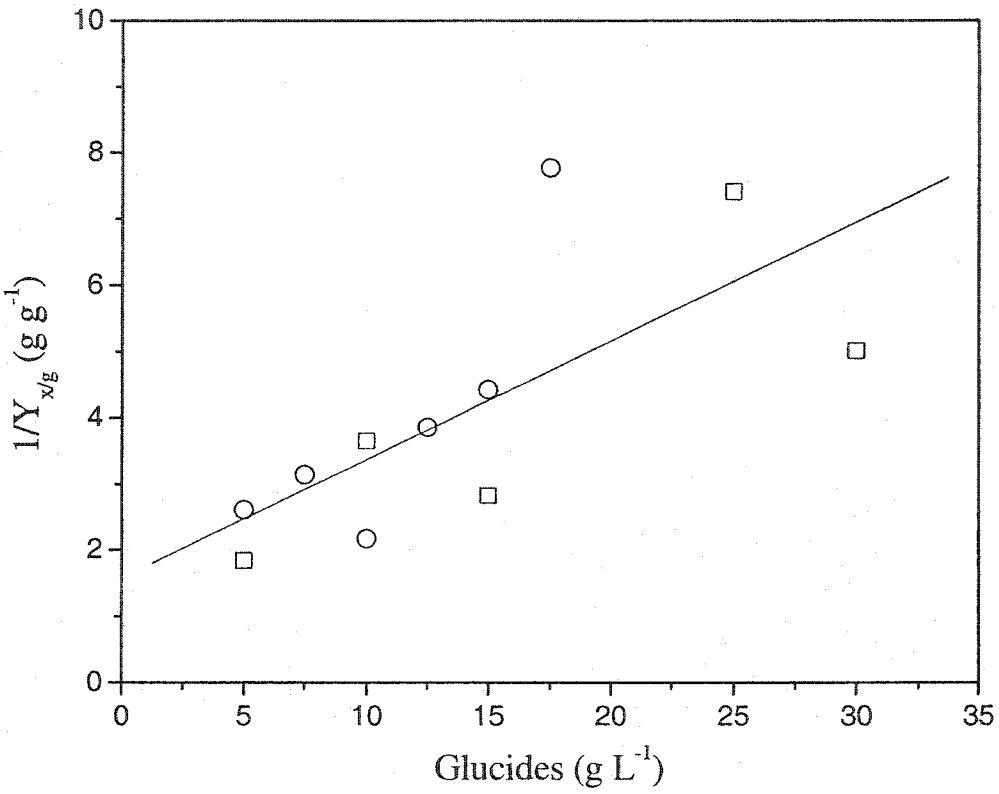


Figure 4.7: **Rendements locaux en fonction de la concentration en glucides. □ concentration initiale de 40g L^{-1} en glucides, ○ concentration initiale de 20 g L-1 en glucides.**

Le rendement maximum décrivant une telle forme est donc de 0.634 g g^{-1} alors que la constante d'inhibition a une valeur de 8.8 g L^{-1}.

4.2. Phosphate

Les travaux de Sirois (1997) traitent en partie d'une limitation possible de la croissance par le phosphate. Reposant sur cette hypothèse, des rendements de croissance en biomasse sèche et en prolifération cellulaire ont été estimés. Or, en

observant plus en profondeur l'ensemble des résultats exposés dans cette thèse, il apparaît que les cultures réalisées en cuvées sont plutôt limitées en azote.

Afin de déterminer des rendements de croissance en biomasse et de prolifération cellulaire représentatifs en phosphate, trois expériences ont été effectuées. Des cultures en flacons agités sont inoculées à différentes concentrations initiales en phosphate. L'inoculum est purgé du nutriment étudié (section 3.2.2), puis filtré pour éviter tout transfert nutritionnel. La Figure 4.8 et la Figure 4.9 présentent les profils de croissance obtenus en fonction de la concentration initiale en phosphate.

La partie A de chaque figure montre une limitation nutritionnelle par épuisement en phosphate puisque les courbes de biomasse sèche et de concentration cellulaire plafonnent à des niveaux différents. Dans le cas de la biomasse sèche, il apparaît qu'une certaine croissance a lieu dans la culture sans phosphate, même après une purge de l'inoculum. Ceci ne semble toutefois pas le cas pour la prolifération cellulaire. Ce phénomène peut être associé à une croissance en biomasse indirectement (et non directement) fonction du phosphate (e.g. accumulation nutritionnelle), à une réorganisation des réserves endogènes en phosphate ou simplement à une accumulation intracellulaire des autres nutriments (e.g. azote), ce qui semble le plus probable.

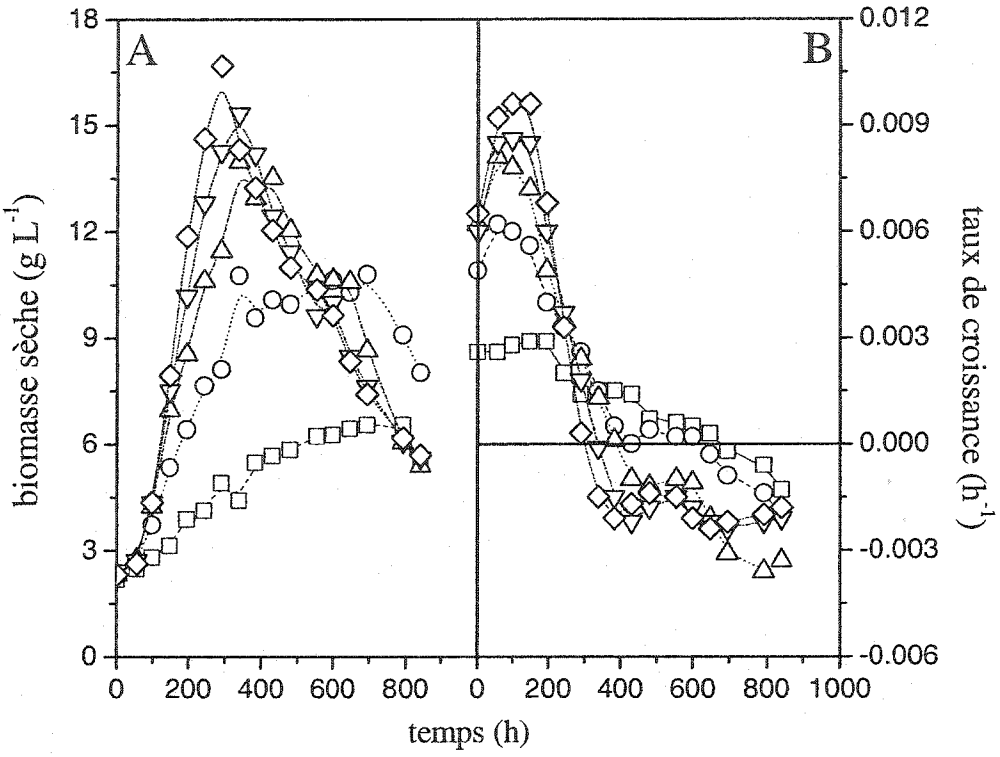


Figure 4.8: **Croissance de la biomasse sèche à différentes concentrations initiales en phosphate. A. Concentrations en biomasse sèche. B. Taux de croissance. Concentration initiale en phosphate : □ 0.00 mM, ○ 0.25 mM, △ 0.50 mM, ▽ 0.75 mM, ◇ 1.00 mM.**

La limitation par épuisement à différents plateaux en fonction de la quantité initiale en phosphate suggère que des rendements de croissance puissent être calculés. Le phosphate est rapidement absorbé par les cellules d'*Eschscholtzia californica* (Sirois, 1997). Les rendements sont calculés à partir des croissances maximales obtenues et de la quantité de phosphate présente à l'inoculation.

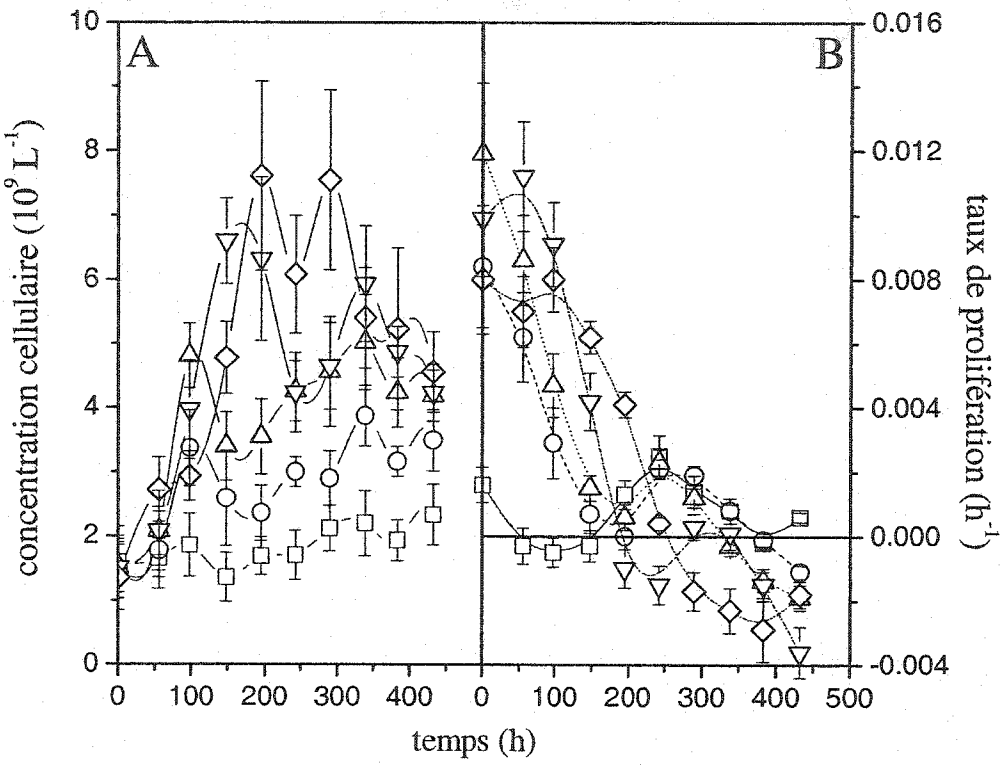


Figure 4.9: **Prolifération cellulaire à différentes concentrations initiales en phosphate. A. Concentrations cellulaires. B. Taux de prolifération. Concentration initiale en phosphate :□ 0.00 mM,○ 0.25 mM,△ 0.50 mM, ▽ 0.75 mM, ◇ 1.00 mM.**

Selon cette méthode, les rendements en biomasse sèche et en prolifération cellulaire sont calculés comme suit :

$$Y_{x_s/po_4} = \frac{x_{s,max} - x_{s,0}}{po_{4,0}} \qquad 4.2$$

$$Y_{c/po_4} = \frac{c_{max} - c_0}{po_{4,0}} \qquad 4.3$$

Les rendements ainsi obtenus sont présentés à la Figure 4.10. Dans les deux cas, une tendance exponentielle décroissante du rendement en fonction de la concentration initiale en phosphate est perceptible. En ce qui concerne la prolifération cellulaire, l'erreur expérimentale suggère un rendement constant, ce qui n'est pas le cas pour la biomasse sèche.

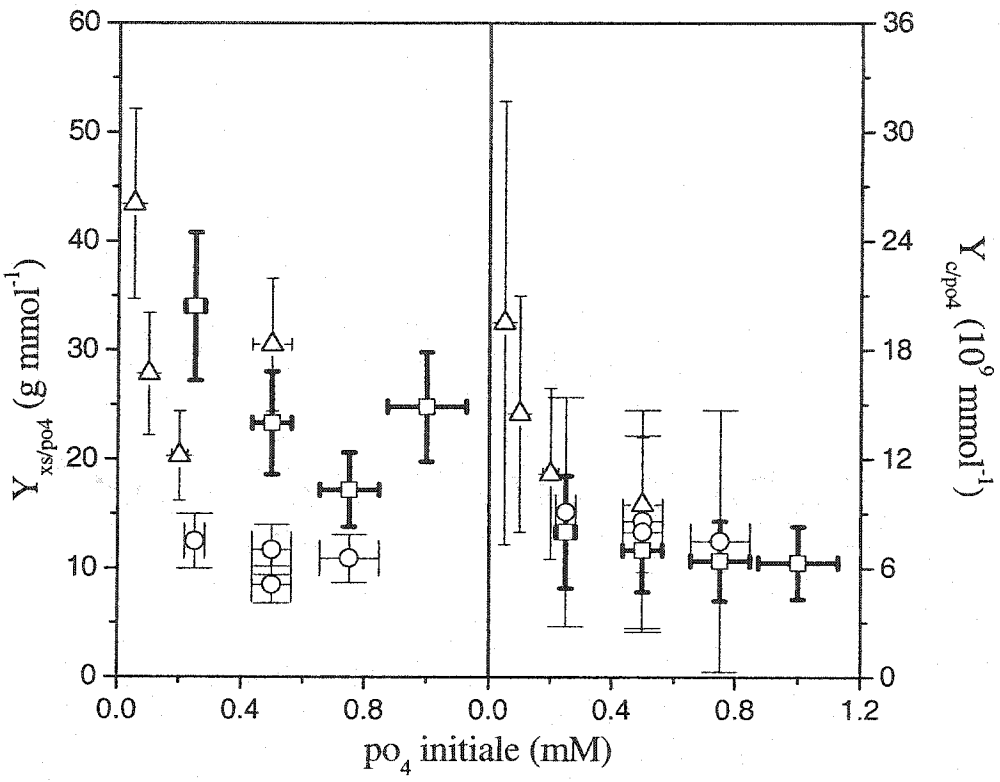


Figure 4.10: **Rendements de croissance en biomasse sèche et en prolifération cellulaire en fonction de la concentration initiale en phosphate. □ Première expérience (barres d'erreur foncées), ○ seconde expérience (barres d'erreur minces à larges extrémités), △ troisième expérience (barres d'erreur minces à petites extrémités).**

Dans ce cas, les rendements à faible concentration initiale sont significativement plus élevés que ceux à haute concentration initiale en phosphate. Au surplus, les résultats de croissance de la seconde expérience génèrent des rendements en prolifération

cellulaire statistiquement identiques aux autres expériences, alors que la différence est marquée dans le cas de la biomasse sèche.

Comme le phosphate intracellulaire influe sur les réserves nutritionnelles et que celles-ci agissent à leur tour sur d'autres métabolismes (section 2.4), ces deux biais pourraient être le fruit d'un réarrangement intracellulaire ou d'un métabolisme endogène. Si tel est le cas ici, ce réarrangement survient lors d'une pénurie de sources extracellulaires de phosphate, ce qui est non désiré dans le cas d'une optimisation de la croissance. Afin de corriger le calcul des rendements, la croissance due à ces réarangements doit être soustraite de la croissance effective obtenue du phosphate ajouté à l'inoculation. Le calcul des rendements effectifs est corrigé pour tenir compte de la croissance obtenue dans les flacons sans ajout de phosphate à l'inoculation. Ces rendements effectifs s'obtiennent donc selon :

$$Y'_{x_s/po_4} = \frac{x_{s,max} - x_{s,0} - \left(x_{s,max} - x_{s,0}\right)_{po_{4,0}=0}}{po_{4,0}} \qquad 4.4$$

$$Y'_{c/po_4} = \frac{c_{max} - c_0 - \left(c_{max} - c_0\right)_{po_{4,0}=0}}{po_{4,0}} \qquad 4.5$$

Les rendements effectifs obtenus avec cette correction sont présentés à la Figure 4.11.

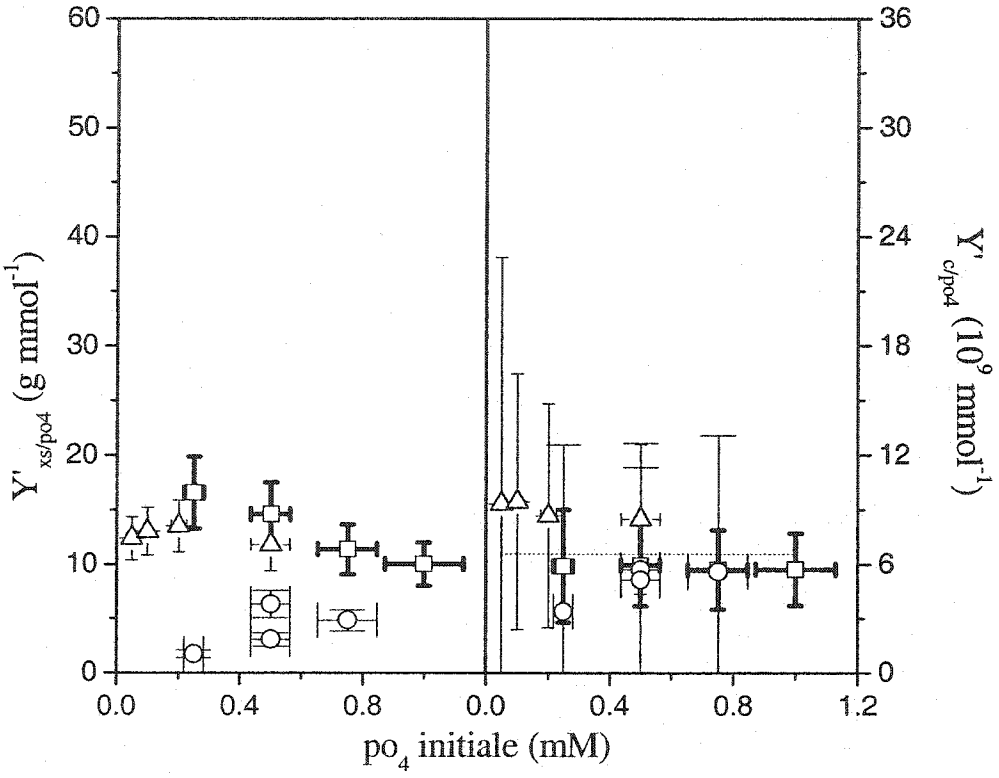


Figure 4.11: **Rendements corrigés de croissance en biomasse sèche et en prolifération cellulaire en fonction de la concentration initiale en phosphate. □ Première expérience (barres d'erreur foncées),○ seconde expérience (barres d'erreur minces à larges extrémités),△ troisième expérience (barres d'erreur minces à petites extrémités), ----- rendement moyen en prolifération cellulaire.**

Une telle correction a pour effet de regrouper les rendements calculés, suggérant ainsi une diminution des erreurs d'estimation du rendement. En ce qui concerne la biomasse sèche cependant, les mêmes tendances identifiées précédemment sont toujours présentes, mais à moins grande échelle. Le fait que le rendement en biomasse tende à

augmenter en même temps que l'apport nutritionnel diminue démontrerait un accroissement de l'efficacité cellulaire dans l'utilisation de leurs ressources. D'autre part, un rendement constant en biomasse d'environ 12 à 15 g $mmol^{-1}$ pourrait être estimé en ne tenant compte que de la première et de la troisième expérience et ce, en supposant que le phosphate n'est limitant qu'en deçà de 0.6 mM dans ces expériences. Il n'en demeure pas moins que les résultats de la seconde expérience présentent des rendements nettement inférieurs à ceux des deux autres et ne suivent aucunement la même tendance. Ceci tend à confirmer que le rendement de croissance en biomasse n'est pas directement relié au phosphate, mais plutôt indirectement, via un effet domino provenant d'autres variables.

En ce qui concerne la prolifération cellulaire, la correction du calcul des rendements a pour effet de regrouper tous les résultats autour d'une moyenne qui ne dévie pas significativement d'aucun d'entre eux. En tenant compte des incertitudes expérimentales et des erreurs de calculs engendrées, le rendement de la prolifération cellulaire en fonction du phosphate semble donc être constant à 6.6×10^9 cellules $mmol^{-1}$ et ce, même à de très faibles concentrations pour les cultures en suspension. Wilson (1976) observe lui aussi un rendement cellulaire constant en cuvée (environ 8.2×10^9 cellules $mmol^{-1}$) en fonction de la concentration initiale en phosphate pour des cellules d'*Acer pseudoplatanus* L.

Un fait intéressant est observé en comparant deux tests effectués avec 0.5 mmol de phosphate lors de la seconde expérience. Dans le premier cas (cercle inférieur à la

Figure 4.10 et à la Figure 4.11), tout le phosphate est ajouté dès l'inoculation alors que dans le second (cercle supérieur à la Figure 4.10 et à la Figure 4.11), la moitié du phosphate est ajouté au début de la culture et l'autre moitié l'est à la troisième journée de culture, avant qu'une limitation se fasse sentir. Pour ce qui est de la biomasse sèche, le rendement est significativement affecté par la stratégie d'alimentation du phosphate alors que tel n'est pas le cas pour la prolifération cellulaire. Dans ce dernier cas, peu importe le moment de l'ajout en absence de limitation, le rendement en prolifération cellulaire demeure relativement constant. Ceci renforce l'idée qu'un lien direct entre la prolifération cellulaire et la disponibilité en phosphate existe.

En comparant les rendements en biomasse sèche obtenus avec ceux présentés dans la littérature (Tableau 4.1), de très grandes variations sont retrouvées. En effet, ces rendements passent de 1.35 à plus de 12.4 g $mmol^{-1}$, alors que tous les auteurs allèguent la présence d'une limitation en phosphate. Il est vrai que ces valeurs se rapportent à différentes espèces, mais de telles variations sont aussi observées chez une même espèce (*Daucus carota*).

Tableau 4.1: Rendements en phosphate pour la croissance de la biomasse sèche

Rendement apparent ($g\ mmol^{-1}$)	Espèce	Source
2.84	Banane	Curtis et coll. (1991)
4.21	Bindweed	Curtis et coll. (1991)
12.39	*Claviceps purpurea*	Pazoutova et coll. (1981)
3.37 à 8.00	*Daucus carota*	Dougall et Weyrauch (1980)
2.50	*Daucus carota*	Curtis et coll. (1991)
3.24	Millet	Curtis et coll. (1991)
1.35	*Nicotiana tabacum*	Curtis et coll. (1991)
3.00	*Papaver somniferum*	Curtis et coll. (1991)
2.24	Pomme de terre	Curtis et coll. (1991)

Un nombre moins élevé de travaux ont été réalisés en termes de prolifération cellulaire. Les quelques valeurs recensées sont présentées au Tableau 4.2.

Tableau 4.2: Rendements en phosphate pour la prolifération cellulaire

Rendement apparent ($10^9\ mmol^{-1}$)	Espèce	Source
3.95	*Galium mollugo* L.	Wilson et Marron (1970)
2.47	*Galium mollugo* L.	Wilson et Marron (1970)
8.2	*Acer pseudoplatanus*	Wilson (1976)
6.6	*Escholtzia californica*	présents travaux

Les rendements en prolifération cellulaire présentent aussi une certaine variation. Ces variations dans les rendements peuvent être le résultat de conditions d'opération

différentes, de milieux de culture différents, de lignées acclimatées ou de réserves intracellulaires différentes à l'inoculation.

Suite à ces analyses de rendement, l'étude des taux de croissance est effectuée à partir des courbes de croissance obtenues. De manière générale, les taux de croissance utilisés pour fins de comparaison sont obtenus par une régression linéaire du logarithme de la variable de croissance en fonction du temps. Cependant, lorsque les taux de croissance doivent être comparés aux concentrations initiales d'un nutriment étudié par des cultures en cuvée, de Tremblay (1991) suggère plutôt d'utiliser le taux de croissance à l'inoculation. Étant donné que le phosphate est d'abord absorbé par les cellules puis utilisé de manière endogène, son effet sur la croissance devrait se faire sentir à plus long terme. Dans cette optique, le taux maximum de croissance de la biomasse sèche devrait aussi être utilisé pour une telle comparaison. Alors que le premier taux de croissance décrit est obtenu par régression, les deux autres sont déterminés suite au calcul des taux de croissance moyens locaux tels qu'exposés à la section 3.9. La Figure 4.12 présente l'évolution de ces trois taux de croissance spécifiques pour la biomasse sèche.

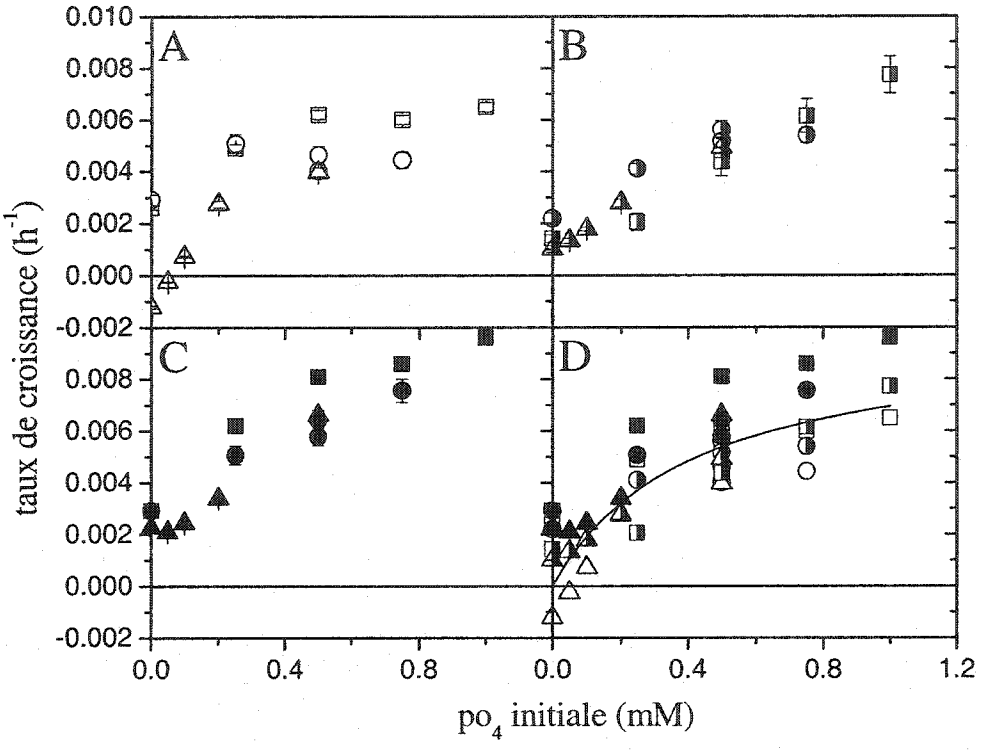


Figure 4.12: **Estimation du taux de croissance de la biomasse sèche en fonction de la concentration initiale en phosphate selon trois méthodes. A. À l'inoculation. B. Moyen (par régression). C. Maximum. D. Les trois méthodes regroupées. carrés: première expérience, cercles : seconde expérience, triangles : troisième expérience, — cinétique de Monod.**

À première vue, il semble que la concentration en phosphate affecte le taux de croissance. Celui-ci augmente avec une disponibilité accrue du nutriment. Toutefois, les trois techniques présentent une idée ambiguë du type de cinétique. Alors que les taux initiaux montrent clairement une cinétique de Monod, les taux par régression

varient linéairement avec la concentration en phosphate et la courbe des taux maxima se situe quelque part entre les deux tendances. Ceci laisse croire que l'utilisation complémentaire des trois techniques améliore la compréhension du système. En effectuant une régression sur la représentation de Lineweaver-Burk (annexe E), une cinétique de Monod paraît adéquate (r^2=0.72) pour décrire l'effet de la concentration en phosphate sur le taux spécifique de croissance en biomasse sèche. Cette relation a aussi été observée par Burns et coll. (1991) de même que par Kato et coll. (1977). Dans le cas présent, les taux de croissance sont représentés en fonction de la concentration initiale en phosphate, donc de la disponibilité nutritionnelle, et non en fonction de la concentration réellement présente lorsque le taux de croissance est mesuré. Ce type de cinétique est donc significatif, mais les valeurs calculées pour ces paramètres n'ont pas de signification physique et doivent être mesurées ou estimées autrement pour que la cinétique soit utilisée dans le cas d'un suivi de croissance.

Le même type de figure est réalisé pour la prolifération cellulaire en fonction de la concentration initiale en phosphate (Figure 4.13). Dans ce cas, les trois méthodes d'estimation du taux de prolifération cellulaire en fonction de la concentration initiale en phosphate vont dans le sens d'une cinétique de Monod.

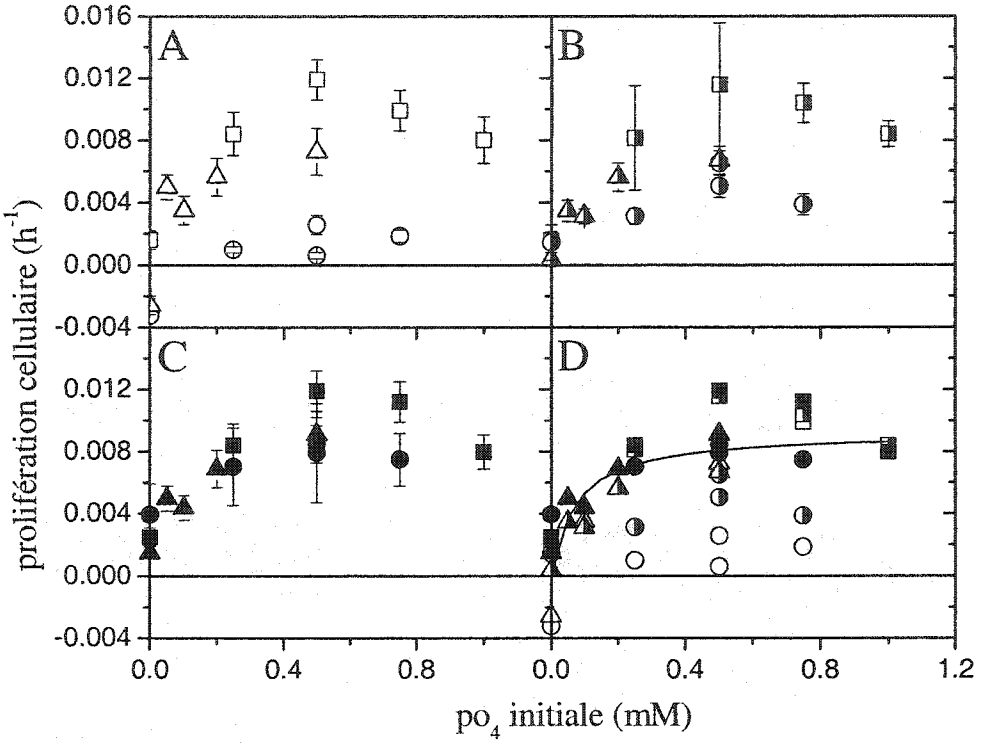


Figure 4.13: **Estimation du taux de prolifération cellulaire en fonction de la concentration initiale en phosphate selon trois méthodes. A. À l'inoculation. B. Moyen (par régression). C. Maximum. D. Trois méthodes regroupées. carrés: première expérience, cercles : seconde expérience, triangles : troisième expérience, — cinétique de Michaelis-Menten.**

Il est toutefois clair que les taux de prolifération initiaux de la seconde expérience ne suivent pas la tendance générale. Ceci est fort probablement provoqué par une purge nutritionnelle des inocula plus prolongée dans ce cas que lors des autres expériences. Étant donné que la prolifération cellulaire est la première variable de croissance à

plafonner lors d'un épuisement nutritionnel (Sirois, 1997), celle-ci est plus sensible à la période de purge préinoculatoire. Cet effet se fait aussi sentir sur les taux de croissance obtenus par régression, puisqu'il s'agit d'une moyenne. Quant au profil des taux de croissance moyens locaux maxima, il n'est pas affecté par la période de latence accrue lors de la seconde expérience. Ce résultat suggère donc l'importance de préconiser cette dernière méthode pour déterminer le type de cinétique associée aux nutriments rapidement absorbés.

En effectuant une régression linéaire sur une représentation de Lineweaver-Burk, une cinétique de Monod permet de décrire la tendance générale des points expérimentaux (r^2=0.55). Néanmoins, en observant le graphique C de la Figure 4.13, il apparaît que le taux de prolifération cellulaire calculé pour une concentration initiale de 0.5 mM en phosphate est significativement supérieur à ceux calculés à des concentrations de 0.25 et 0.75 mM pour la première expérience : ceci est moins évident pour la seconde expérience. Cela laisse croire que la courbe présente un optimum dans cette région et qu'il peut y avoir inhibition de la prolifération cellulaire à d'aussi faibles concentrations que sous les 1 mM.

4.3. Nitrate

Dans ses précédents travaux, Sirois (1997) soutient que le nitrate est utilisé dès son entrée dans la cellule, au même titre que les glucides pour l'espèce utilisée. Or, la littérature (section 2.4.2.2) montre que ce nutriment est d'abord absorbé, entreposé au besoin, puis utilisé au gré du métabolisme cellulaire. Afin de déterminer les rendements des variables de croissance en nitrate, deux expériences pour lesquelles ce dernier est limitant ont été réalisées, chacune précédée d'une purge préinoculatoire en azote.

Les figures qui suivent présentent les courbes de croissance en biomasse sèche (Figure 4.14) et en concentration cellulaire (Figure 4.15) obtenues lors de la première expérience. Contrairement à la seconde (résultats non montrés), les profils expérimentaux de la première expérience sont tronqués en fin de culture, ne permettant pas d'identifier clairement le maximum de croissance dans le cas de la biomasse sèche. Pour contrer ce problème qui empêche le calcul de rendements, les courbes du taux de croissance sont modélisées à l'aide de polynômes d'ordres 2 à 6 de manière à reproduire le plus fidèlement possible leur tendance. Puis, la concentration en biomasse sèche est reconstruite dans le temps pour chaque essai. De cette manière, les maxima de croissance obtenus pour chaque essai représentent une bonne estimation des maxima expérimentaux puisque les valeurs obtenues découlent directement des taux de croissance.

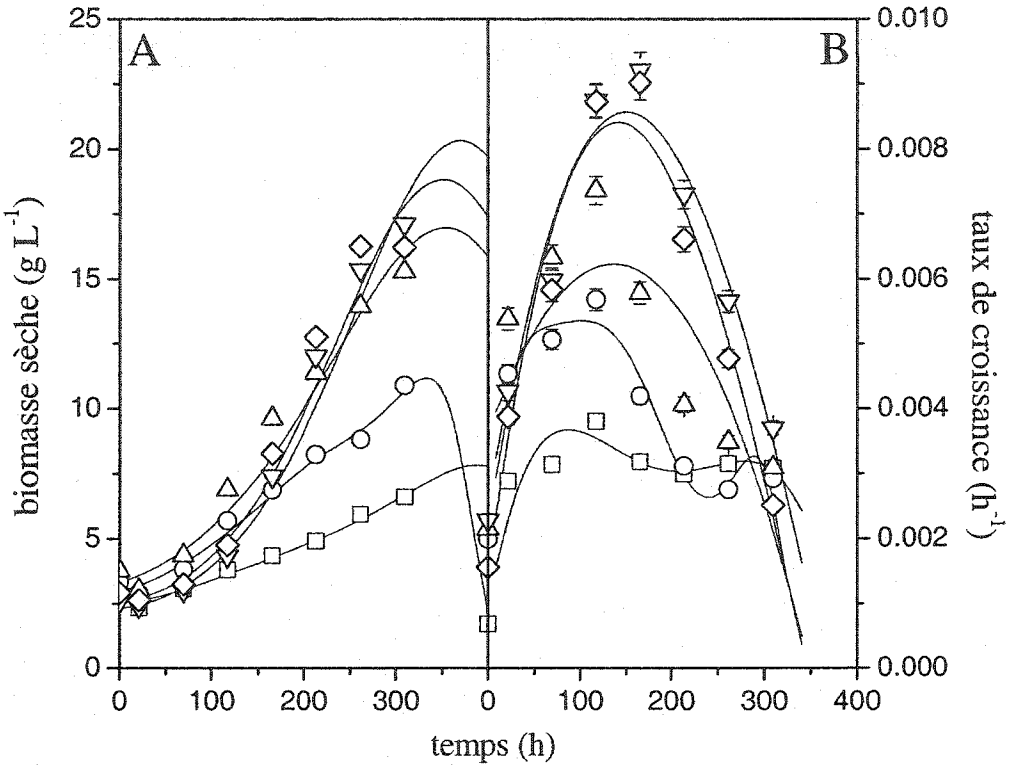


Figure 4.14: **Croissance de la biomasse sèche à différentes concentrations initiales en nitrate. A. Concentrations en biomasse sèche. B. Taux de croissance. Concentration initiale en nitrate : □ 0 mM, ○ 2 mM, △ 5 mM, ▽ 10 mM, ◇ 20 mM. — courbes obtenues d'un modèle polynomial (2<ordre<6) du taux de croissance.**

En ce qui concerne la prolifération cellulaire, quatre des cinq essais montrent clairement un maximum alors qu'il en va tout autrement pour le dernier. Cependant, en prolongeant le profil du taux de prolifération cellulaire, il apparaît que ce dernier devient négatif en moins d'une période d'échantillonnage et que l'accroissement de la

concentration cellulaire pendant ce temps est négligeable par rapport à l'erreur sur la mesure.

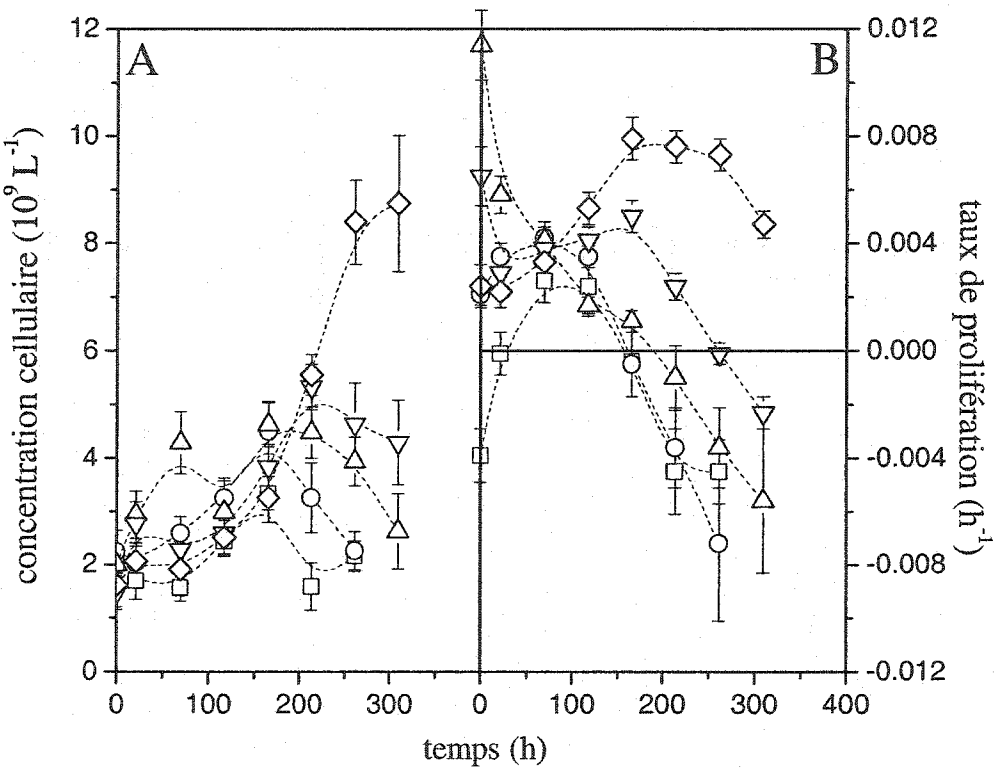


Figure 4.15: **Prolifération cellulaire à différentes concentrations initiales en nitrate. A. Concentrations cellulaires. B. Taux de prolifération. Concentration initiale en nitrate : □ 0 mM, ○ 2 mM, △ 5 mM, ▽ 10 mM, ◇ 20 mM.**

À partir de ces courbes, des rendements conventionnels sont calculés et présentés à la Figure 4.16. Cependant, ces derniers doivent être corrigés comme antérieurement. En effet, de manière à effectuer les essais dans des conditions normales de culture et ainsi

éviter tout effet secondaire non désiré (e.g. pH), les expériences sont réalisées en milieu B5 conventionnel, et donc en présence d'ammonium.

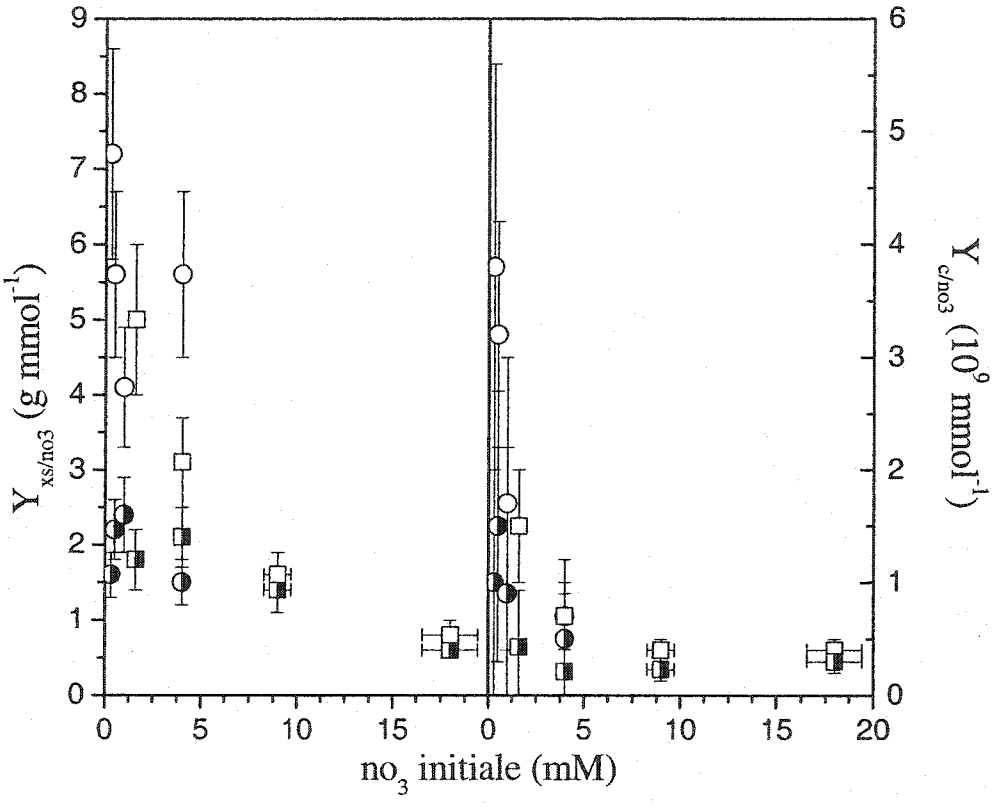


Figure 4.16: **Rendements conventionnels et corrigés de croissance en biomasse sèche et de prolifération cellulaire en fonction de la concentration initiale en nitrate.**
□ conventionnels, première expérience, ○ conventionnels, seconde expérience
◧ corrigés, première expérience, ◑ corrigés, seconde expérience.

En conséquence, les rendements calculés doivent être corrigés en associant la croissance présente dans les cultures sans nitrate à la présence d'ammonium. Malgré

une diminution de la plage sur laquelle s'étendent les nouveaux rendements en biomasse sèche, une différence significative entre ceux obtenus avec de faibles concentrations initiales en nitrate (< 5 mM) et celui obtenu à haute concentration (18 mM) demeure. Un rendement constant s'avère impossible dans ce genre de situation. À l'inverse, les rendements corrigés sur une base de prolifération cellulaire permettent de tracer une droite entre 0.30×10^9 $mmol^{-1}$ et 0.32×10^9 $mmol^{-1}$ tout en croisant l'ensemble des points expérimentaux des deux expériences à l'intérieur de leur erreur expérimentale respective. Ceci suggère que le rendement en nitrate est constant sur une base de prolifération cellulaire, alors que celui calculé sur une base de biomasse est très probablement biaisé par l'entreposage nutritionnel intracellulaire d'autres nutriments.

Au surplus, le rendement en ammonium obtenu par Sirois (1997) est de $0.3 \pm 0.1 \times 10^9$ $mmol^{-1}$. Des rendements égaux en nitrate et en ammonium représentent un résultat tout à fait logique puisque dans les deux cas, il s'agit d'une source d'azote et que ces deux sources azotées se retrouvent ultimement réduites et liées à l'α-cétoglutarate pour former la glutamine. Ces rendements se comparent d'ailleurs à celui de 0.263×10^9 $mmol^{-1}$ calculé par King (1977) pour des cultures d'*Acer pseudoplatanus* L. limitées en nitrate.

Quant aux taux de croissance et de prolifération, ceux-ci sont estimés selon les trois méthodes décrites précédemment. La Figure 4.17 présente les taux de croissance en biomasse pour les deux expériences réalisées en limitation de nitrate.

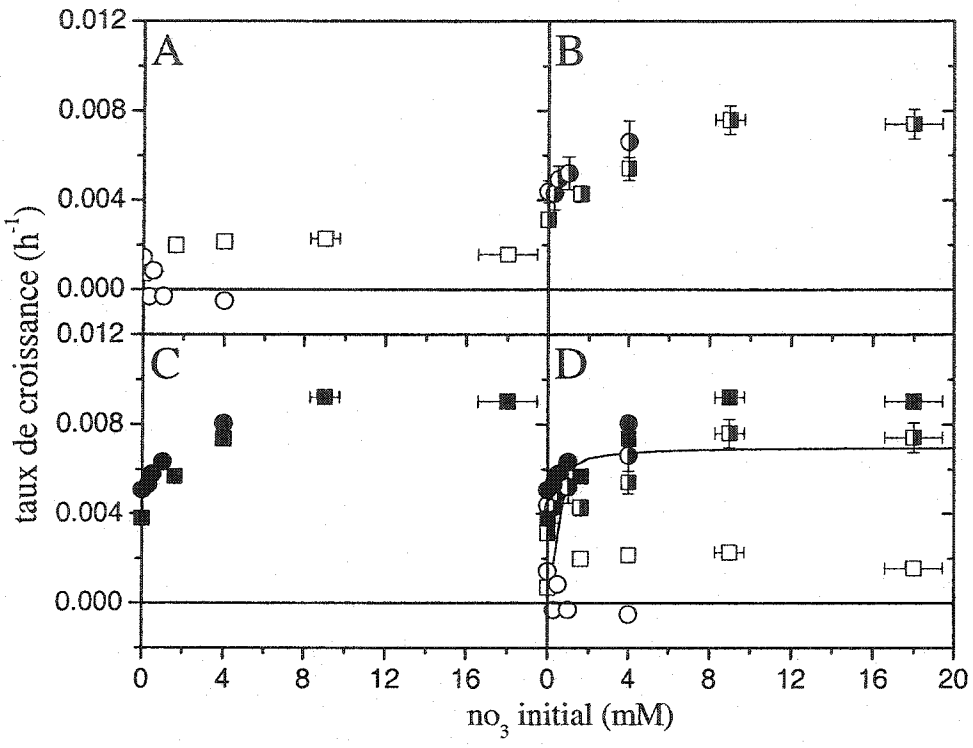


Figure 4.17: **Estimation du taux de croissance en biomasse sèche en fonction de la concentration initiale en nitrate selon trois méthodes. A. À l'inoculation. B. Moyen (par régression). C. Maximum. D. Trois méthodes regroupées. carrés: première expérience ; cercles: seconde expérience ; — cinétique de Monod.**

Contrairement aux taux initiaux de croissance (A) qui semblent être constants, les taux moyen (B) et maximum (C) laissent supposer une inhibition à une concentration initiale inférieure à environ 6 mM. Il est important de rappeler que dans le cas de cultures effectuées en cuvée, les représentations des taux de croissance en fonction des

concentrations initiales en nutriments ne servent qu'à identifier des tendances et non à déterminer des valeurs de paramètres telles que les constantes d'inhibition. En effectuant une régression sur une représentation de Lineweaver-Burk telle que décrite à l'annexe E, un coefficient de régression (r^2) de 0.02 est obtenu. La qualité de la régression est grandement affectée par deux aspects majeurs : les taux initiaux ne suivent aucunement la tendance des deux autres méthodes en plus d'être excessivement bas, et la présence de taux de croissance non nuls à des concentrations très près de 0 mM.

Les taux initiaux très bas s'expliquent par la présence d'une phase de latence plus ou moins prononcée. En les enlevant de la régression, le coefficient atteint 0.43. En ce qui concerne les taux non nuls à très faibles concentrations, ceci concorde avec les résultats de Rho et André (1991) de même que ceux de Clement et coll. (1978) qui n'observent pas d'effet sur la croissance tant qu'il y a présence de nitrate dans le milieu de culture. Cependant, alors que ces auteurs observent un taux de croissance constant et indépendant de la concentration en nitrate, les résultats de la Figure 4.17 B et C démontrent une inhibition lorsque la concentration initiale est inférieure à environ 6 mM.

Une cinétique de Monod ne convient donc pas telle quelle pour la description de ces résultats, mais une forme présentant une borne inférieure non nulle ferait très bien l'affaire. Néanmoins, tel que mentionné dans la revue de littérature, Clement et coll. (1978) observent une inhibition de la croissance à plus haute concentration en nitrate.

Ceci empêche donc l'éventualité d'ajouter tout le nitrate en début de culture lorsque celui-ci doit soutenir une croissance sur une longue période, ce qui représenterait une importante quantité.

Les taux de prolifération cellulaire en fonction de la concentration initiale en nitrate sont présentés à la Figure 4.18. Les profils obtenus ressemblent à ceux de la croissance de la biomasse sèche, à l'exception d'un maximum pour les trois méthodes lors de la première expérience. Alors que ce maximum, statistiquement significatif, correspond à une concentration initiale de 9 mM pour les taux initiaux, ce maximum se retrouve à 4 mM pour les taux moyens et maximum. Lors de la seconde expérience, le essai à concentration initiale de 4 mM est reproduit sans qu'un taux de prolifération si important que lors de la première expérience soit obtenu. Il est toutefois impossible, sans un essai à plus haute concentration initiale, de confirmer ou d'infirmer systématiquement le maximum de la première expérience.

Une régression permettant d'apprécier la possibilité d'une cinétique de Monod est tout de même réalisée et le coefficient obtenu est de 0.10. Cette faible corrélation est provoquée par la présence des maxima, par une forte dispersion des points à faibles concentrations initiales et par la présence de taux de prolifération non nuls. Comme pour la biomasse sèche, la prolifération cellulaire ne suit très probablement pas une cinétique de Monod selon la concentration en nitrate.

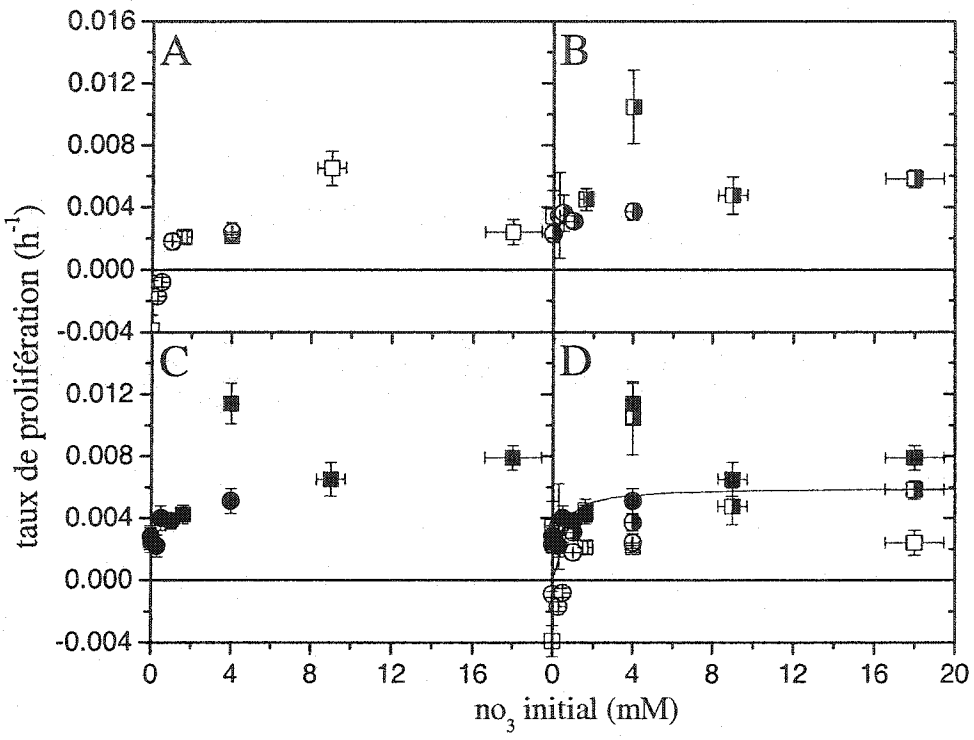


Figure 4.18: **Estimation du taux de prolifération cellulaire en fonction de la concentration initiale en nitrate selon trois méthodes. A. À l'inoculation. B. Moyen (par régression). C. Maximum. D. Trois méthodes regroupées. carrés: première expérience ; cercles: seconde expérience ; triangles: troisième expérience ; — cinétique de Monod.**

4.4. Interactions ammonium, nitrate et pH

Selon Raven (1985), l'absorption du nitrate par la cellule lui demande plus d'énergie par mole que dans le cas de l'ammonium. Au surplus, le nitrate doit ensuite être réduit en deux étapes successives avant d'être utilisé par la cellule. Il en résulte que l'utilisation du nitrate comme source azotée est moins rentable pour la cellule que celle de l'ammonium. L'utilisation de l'ammonium devrait donc être préconisée comme source azotée.

Cependant, l'utilisation simultanée de ces deux sources représente la norme puisqu'un changement de proportion ammonium/nitrate affecte négativement la croissance (section 2.4.2.3). Il est connu que la consommation d'ammonium s'accompagne d'un relargage protonique qui implique l'acidification du milieu de culture. D'autre part, la consommation du nitrate se fait par cotransport protonique alcalinisant le milieu. Il est très probable que la diminution de croissance observée par plusieurs auteurs quand le rapport ammonium/nitrate est changé soit en fait le résultat d'une perturbation du pH environnant.

Les échanges ioniques transmembranaires sont liés au gradient de protons chez les végétaux. Ce va-et-vient continu de protons a un impact sur le pH intracellulaire. De tels changements de pH ont pour effet d'inhiber fortement le métabolisme cellulaire. À titre d'exemple, un changement de pH modifie l'état d'ionisation de tous les réactifs et produits d'hydrolyse de l'ATP et influence profondément la variation d'énergie libre

d'hydrolyse. Cette dernière est relativement constante à bas pH, puis diminue linéairement à un pH supérieur à 7.0, passant d'environ –9.0 kcal mol^{-1} (pH=7.0) à –13.0 kcal mol^{-1} (pH=10.0) (Rawn, 1990). Aussi, l'efficacité des systèmes de cotransport (symport et antiport) est directement reliée au gradient de protons chez les plantes (Alberts et coll., 1992).

Le pH doit donc demeurer à l'intérieur de certaines limites. Lorsque le pH sort de ces limites (~4.5 < pH < ~6.5, résultats expérimentaux non montrés), la croissance cellulaire s'en trouve affectée. Par exemple, Ullrich-Eberius et coll. (1984) de même que Furihata et coll. (1992) observent que le taux de consommation du phosphate est maximal à des pH se situant entre 5.0 et 6.0, où la forme $H_2PO_4^-$ (pKa = 7.21) domine grandement les formes H_3PO_4 (pKa = 2.12) et HPO_4^{2-} (pKa = 12.67). De plus, Bedell et coll. (1999) mesurent des taux de consommation d'ammonium et de nitrate constants chez les conifères à des pH se situant entre 3.0 et 5.5. Veliky et Rose (1973) avancent qu'un pH optimal pour la production de biomasse est de 5.0, résultat obtenu avec *Daucus carota*.

Les sections qui suivent présentent les résultats obtenus lors de l'étude des interactions entre les sources azotées et le pH environnemental.

4.4.1. Source azotée et contre-ions

La première expérience réalisée dans cette optique avait pour objectif de vérifier l'effet de l'élimination du nitrate du milieu de culture et d'examiner si les contre-ions habituels de l'ammonium ont un effet quelconque sur la croissance. Des cultures en flacons ont donc été réalisées où la croissance (Figure 4.19) et l'évolution des concentrations ioniques et du pH (Figure 4.20) ont été comparées pour différentes modifications du milieu de culture B5.

Comme les résultats rapportés dans la littérature le laissaient présager, la suppression totale du nitrate a un effet drastique sur les cultures qui provoque l'inhibition de toute croissance en biomasse. Les taux de croissance des cultures sans nitrate se comparent aux taux de croissance des cultures sans aucun azote. Par ailleurs, une certaine prolifération cellulaire se produit pour les cultures sans nitrate, mais celle-ci est réduite de moitié. Toutefois, la prolifération des cultures avec ammonium uniquement est significativement supérieure aux cultures sans azote pendant la période de croissance positive (<150 h). Dans tous les cas, le contre-ion n'a pas d'effet significatif sur les changements engendrés. L'inhibition de la croissance provient donc d'une autre source.

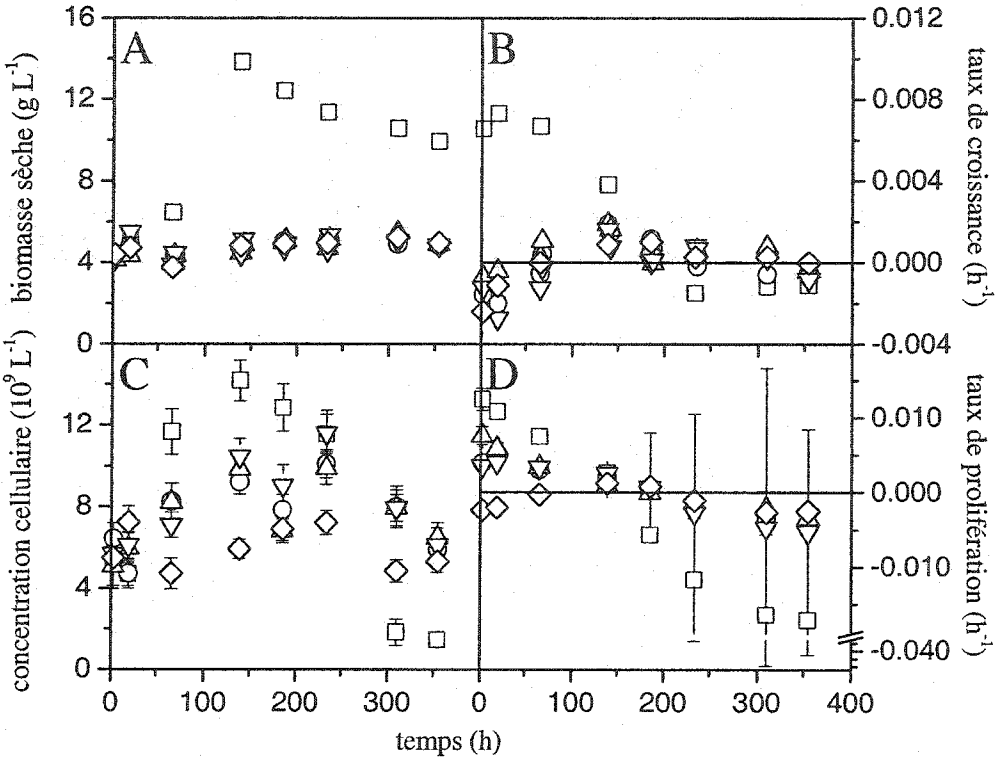


Figure 4.19: **Croissance et prolifération cellulaire en fonction de la source d'azote et du contre-ion. A. Concentrations en biomasse sèche. B Taux de croissance en biomasse sèche. C. Concentration cellulaire. D. Taux de prolifération cellulaire.** □ **KNO_3 et $(NH_4)_2SO_4$ (milieu B5),** ○ **50% NH_4Cl et 50% $(NH_4)_2SO_4$,** △ **NH_4Cl,** ▽ **$(NH_4)_2SO_4$,** ◇ **sans azote.**

Lors de cette expérience, l'ammonium disparaît rapidement du milieu de culture. Afin d'éviter une pénurie imprévue en azote, la consommation de ce nutriment pour une croissance normale est estimée, puis des ajouts périodiques de solution d'ammonium concentrée et tamponnée à un pH de 5.5 sont effectués. Il apparaît que dès le premier

ajout (environ 10 mM NH_4 à 65 h), les cellules n'ont déjà plus la capacité d'absorption habituelle puisque très peu d'ammonium est consommé.

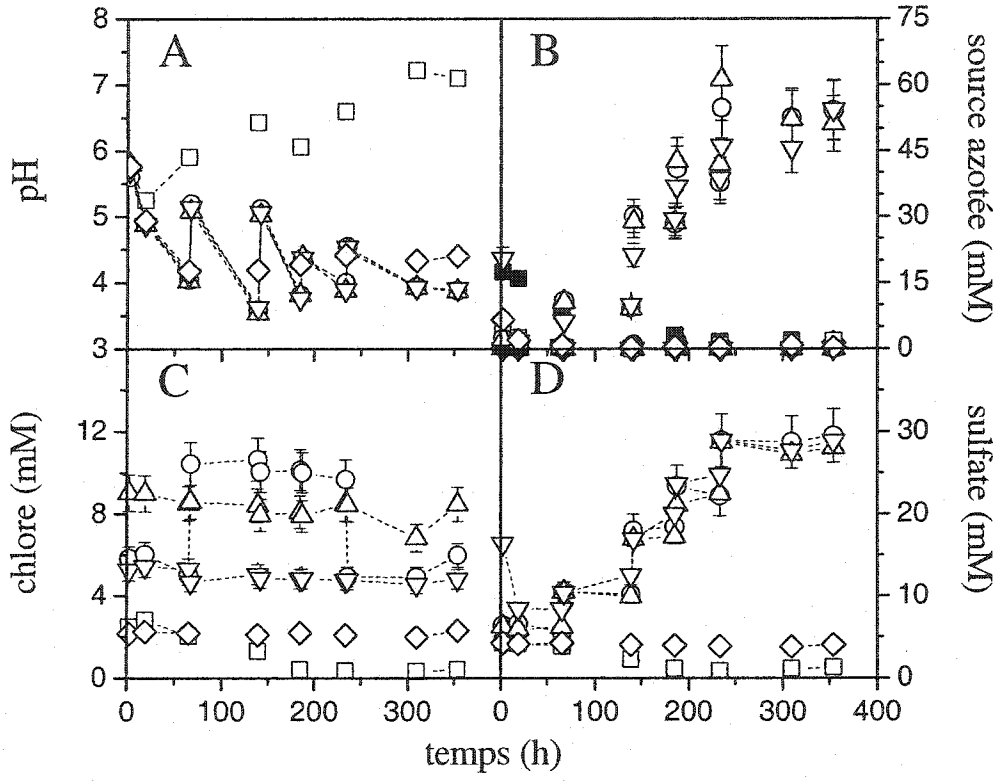


Figure 4.20: **Concentrations ioniques en fonction de la source d'azote et du contre-ion. A. pH. B. Source azotée (foncé : nitrate, clair : ammonium). C. Chlore. D. Sulfate. □ KNO_3 et $(NH_4)_2SO_4$ (milieu B5), ○ 50% NH_4Cl et 50% $(NH_4)_2SO_4$, △NH_4Cl,▽$(NH_4)_2SO_4$, ◇sans azote.**

Pendant ces soixante premières heures, le pH est descendu à près de 4, ce qui est beaucoup trop acide pour les cultures de cellules végétales. Le gradient protonique

transmembranaire est alors perturbé. La consommation d'ammonium et l'ensemble du métabolisme cellulaire sont fortement perturbé, ce qui expliquerait l'absence de consommation de l'ion. En comparant les profils des contre-ions, il semble que le sulfate et le chlore ne soient pas davantage consommés. Toutefois, le pH suit exactement le même profil dans les deux cas, laissant croire que sa variation n'est pas causée par les contre-ions mais bien par la consommation d'ammonium reliée à un relargage protonique.

Cette expérience indique clairement qu'il est impossible d'éliminer (ou de réduire fortement) le nitrate du milieu de culture sans provoquer un abaissement nocif du pH. Certaines actions doivent donc être envisagées afin de contrecarrer cette baisse de pH s'il est désiré de n'utiliser que l'ammonium comme source d'azote pour les cultures de cellules végétales.

4.4.2. Contrôle du pH extracellulaire

La première tentative pour rétablir une croissance cellulaire conventionnelle en absence de nitrate consiste à contrôler le pH du milieu de culture à un point de consigne à l'aide d'un contrôleur intermittent rudimentaire et d'une solution de KOH. Lorsque le pH descend sous une valeur limite, le contrôleur envoie une dose de tampon chimique, ce qui diminue instantanément l'acidité du milieu.

La Figure 4.21 présente la croissance et la prolifération cellulaire résultants de cette expérience. Il apparaît que le taux de croissance en biomasse sèche des cultures à pH

régulé est légèrement supérieur aux cultures non contrôlées. Néanmoins, les taux atteints sont de loin inférieurs aux taux de croissance obtenus au moyen du milieu B5, ce qui se traduit par une concentration finale en biomasse sèche moindre que la normale.

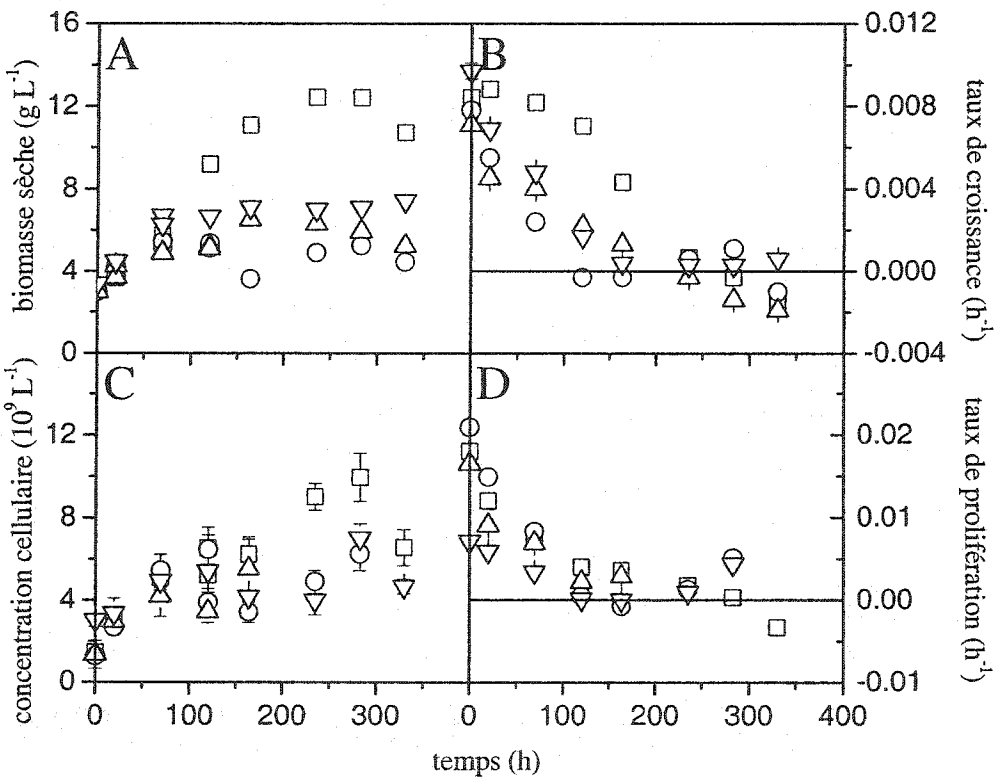


Figure 4.21: **Comparaison de la croissance de cultures alimentées en ammonium et dont le pH extracellulaire est contrôlé. A. Concentrations en biomasse sèche. B. Taux de croissance en biomasse sèche. C. Concentration cellulaire. D. Taux de prolifération cellulaire. □ KNO_3 et $(NH_4)_2SO_4$ (milieu B5), ○ 50% NH_4Cl et 50% $(NH_4)_2SO_4$, pH non contrôlé ; △ 50% NH_4Cl et 50% $(NH_4)_2SO_4$, pH limité à 5.0 ; ▽ 50% NH_4Cl et 50% $(NH_4)_2SO_4$, pH limité à 5.5.**

Dans le cas de la prolifération cellulaire, les taux des cent premières heures sont inférieurs aux taux de prolifération en milieu B5, mais aussi aux taux des cultures non contrôlées. Ce résultat, surprenant aux premiers abords, suggère que le contrôle du pH extracellulaire perturbe l'activité cellulaire, amenuisant ainsi son taux de prolifération. La concentration cellulaire finale atteinte dans les cultures contrôlées est statistiquement la même que dans les cultures non régulées, confirmant ainsi que le contrôle extracellulaire du pH ne permet pas de régler les perturbations engendrées par l'absence de nitrate.

La Figure 4.22 présente les profils ioniques et de pH obtenus lors de cette expérience. Alors que les profils de concentration en sulfate démontrent des tendances semblables dans le cas de cultures dont le pH est contrôlé ou non, les profils de concentration en chlore présentent de grandes variations pour les cultures à pH régulé. Comme le laissaient croire les profils de croissance, l'ammonium n'est pas accumulé dans le cas des cultures à pH régulé. Ceci confirme donc que l'accumulation de l'ammonium dans le milieu de culture est le résultat d'un blocage total ou partiel des mécanismes d'absorption provoqué par une acidification du milieu de culture. Cependant, bien qu'une régulation du pH extracellulaire provoque l'absorption de l'ammonium, le métabolisme intracellulaire semble toujours perturbé, ce qui se répercute sur la croissance et la prolifération qui sont toujours inhibées.

Une action indirecte sur le gradient protonique par la régulation périodique du pH extracellulaire s'avère donc inadéquate. Une autre approche doit être envisagée.

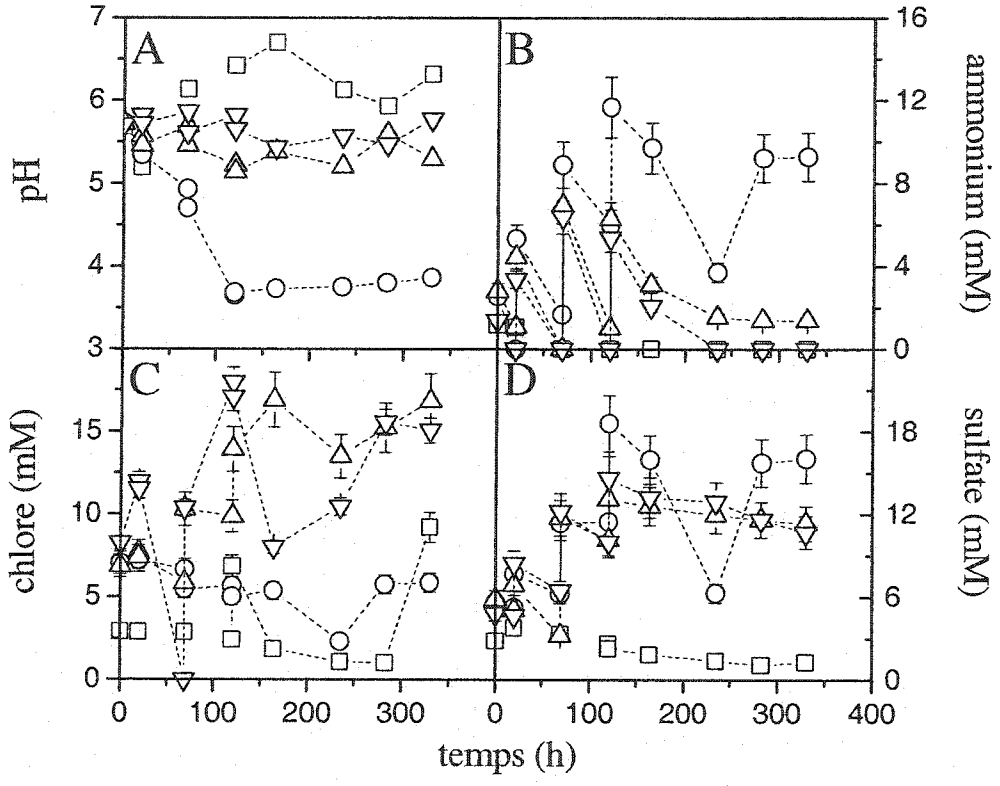


Figure 4.22: **Comparaison de l'évolution du pH et d'ions de cultures alimentées en ammonium et dont le pH extracellulaire est contrôlé. A. pH. B. Ammonium. C. Chlore. D. Sulfate. □ KNO_3 et $(NH_4)_2SO_4$ (milieu B5), ○ 50% NH_4Cl et 50% $(NH_4)_2SO_4$, pH non contrôlé ; △ 50% NH_4Cl et 50% $(NH_4)_2SO_4$, pH limité à 5.0 ; ▽ 50% NH_4Cl et 50% $(NH_4)_2SO_4$, pH limité à 5.5.**

4.4.3. Régulation métabolique du pH

Les deux expériences suivantes testent d'autres moyens de régulation du pH moins radicaux que ceux utilisés précédemment. Le premier essai consiste à utiliser un tampon chimique biocompatible pour réguler le pH au fur et à mesure que le besoin se fait sentir dans le milieu de culture. De cette manière, les changements soudains de pH provoqués par l'ajout d'une base ou d'un acide sont évités et le milieu de culture demeure en pseudo-équilibre protonique. Le tampon utilisé est l'acide 2-[N-morpholino]ethanesulfonique (MES) dont le pKa est de 6.1, le plus bas des tampons biocompatibles disponibles.

Le second mode de régulation du pH est plus invasif. Il s'agit de remplacer le sulfate d'ammonium par du citrate d'ammonium. Le citrate est un anion organique intermédiaire du cycle de Krebs. Son utilisation devrait avoir un impact significatif sur le pH et la croissance cellulaire.

Les résultats obtenus avec l'utilisation de ces deux tampons sont présentés à la Figure 4.23. En comparant les cultures avec MES (symboles clairs en A) à celles sans MES ni citrate (symboles clairs en B), il apparaît que l'utilisation du tampon chimique n'a pas d'effet significatif sur le pH extracellulaire. En effet, les cultures dont le rapport NO3/NH4 est d'au moins 1/1 présentent un profil de pH similaire, alors que les cultures dont ce rapport est moindre présentent une diminution significative du pH avec ou sans utilisation du tampon.

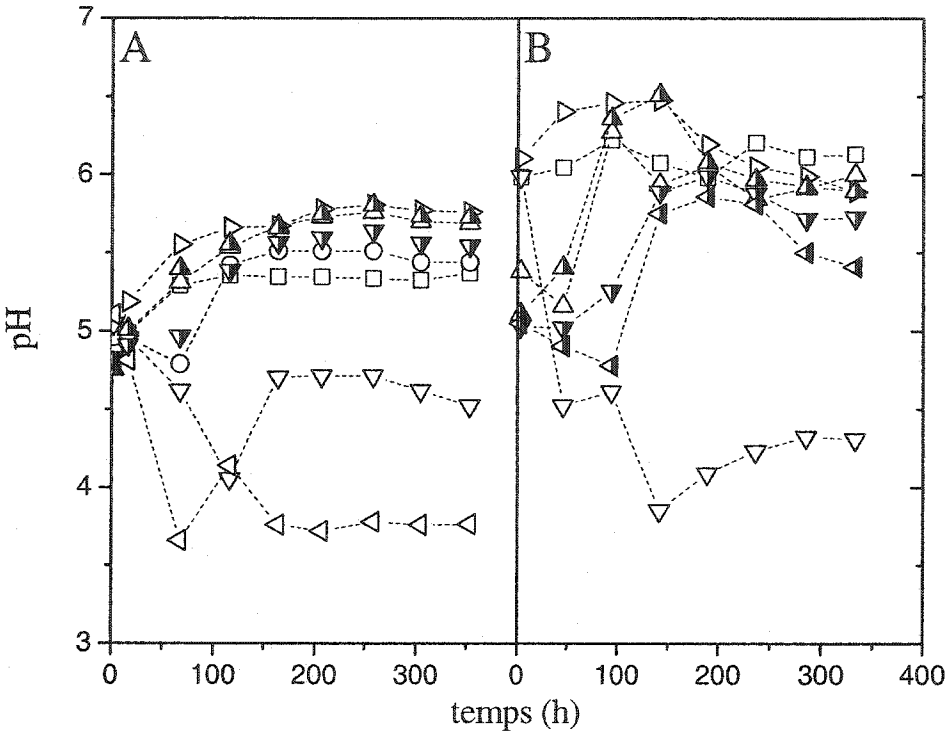


Figure 4.23: **Évolution du pH extracellulaire en fonction du ratio NO_3/NH_4 et du mode de régulation du pH. A. Première expérience : comparaison du MES et du citrate, ratio exprimés en mM NO_3/mM NH_4 (avec MES)/mM NH_4 (avec citrate). B. Seconde expérience : comparaison du milieu conventionnel B5 et du citrate, ratios exprimés en mM NO_3/mM NH_4 (avec SO_4)/mM NH_4 (avec citrate). □ 0/0/0, ▷ 20/0/0, △ 15/5/0, ○ 10/10/0, ▽ 5/15/0, ◁ 0/20/0, ◭ 15/0/5, ▼ 5/0/15, ◀ 0/0/20.**

En ce qui concerne l'utilisation du citrate, il permet de maintenir le pH dans une plage acceptable, soit entre 4.5 et 6.0 et ce, même en l'absence totale de nitrate (B). En comparant les deux modes de régulation du pH, l'utilisation du citrate d'ammonium

s'avère donc beaucoup plus efficace pour maintenir le pH extracellulaire dans une plage plus acceptable pour la culture de cellules végétales.

La Figure 4.24 présente la consommation des sources d'azote pour chaque essai avec du MES ou du citrate. Il appert que les taux de consommation ne sont en rien perturbés par l'utilisation de ces deux produits chimiques. L'utilisation du citrate d'ammonium permet même une consommation de l'ammonium sans présence de nitrate, ce qui était impossible sans régulation du pH extracellulaire (Figure 4.20), mais possible avec un certain contrôle (Figure 4.22).

Finalement, la Figure 4.25 compare les taux de croissance et de prolifération moyens (obtenus par régression) pour chaque essai. Il est très clair que la régulation progressive et constante du pH telle que proposée par les deux méthodes utilisées ramène les taux de croissance en biomasse sèche au maximum, observés indépendamment de la proportion des sources azotées, à l'exception du MES avec utilisation unique de l'ammonium. La concentration de MES utilisée est constante à 20 mM. Il se peut qu'un ratio MES/NH_4 de 1/1 soit insuffisant pour soutenir la croissance en biomasse sèche, ce qui expliquerait le résultat obtenu. Tel n'est pas le cas pour le citrate qui permet d'atteindre le taux maximum avec l'utilisation exclusive de l'ammonium. En ce qui a trait à la prolifération cellulaire, un comportement semblable est observé : les taux de prolifération s'approchent du taux maximum observé avec l'utilisation de l'une ou l'autre des deux méthodes, indépendamment du rapport des sources azotées.

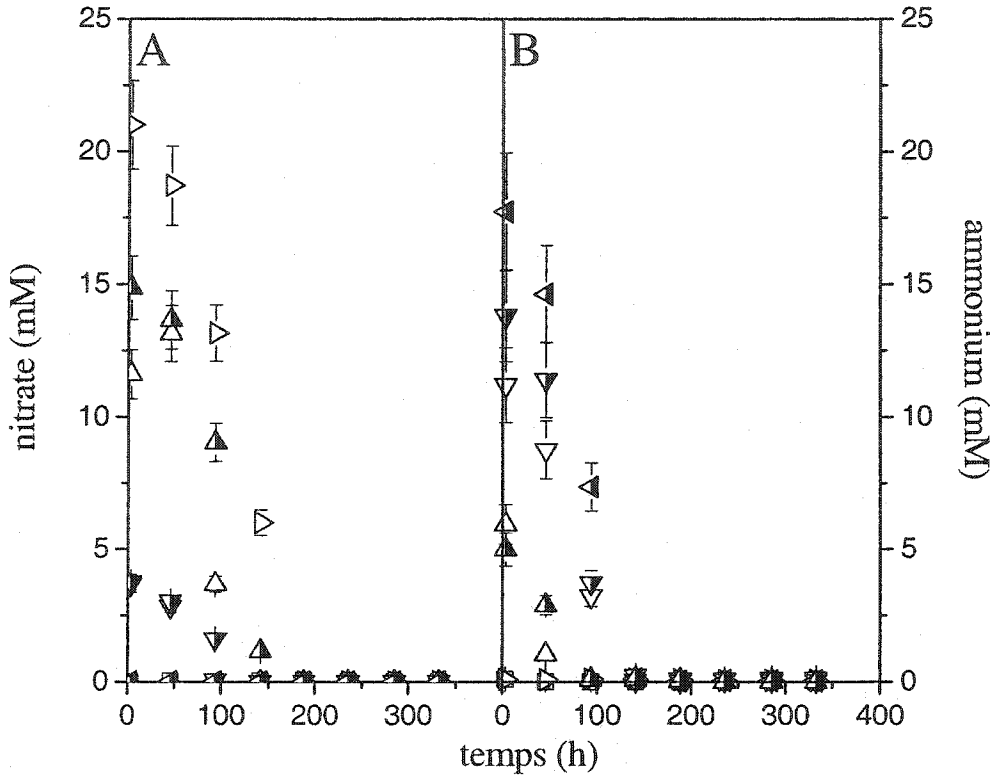


Figure 4.24: **Consommation de l'azote en fonction du rapport NO_3/NH_4 à l'inoculation, et de l'utilisation ou non du citrate. A. Nitrate. B. Ammonium. Rapports exprimés en mM NO_3/mM NH_4 (avec MES)/mM NH_4 (avec citrate) □ 0/0/0 ▷ 20/0/0, △ 15/5/0, ▽ 5/15/0, ◁ 0/20/0, ◭ 15/0/5, ▽ 5/0/15, ◀ 0/0/20.**

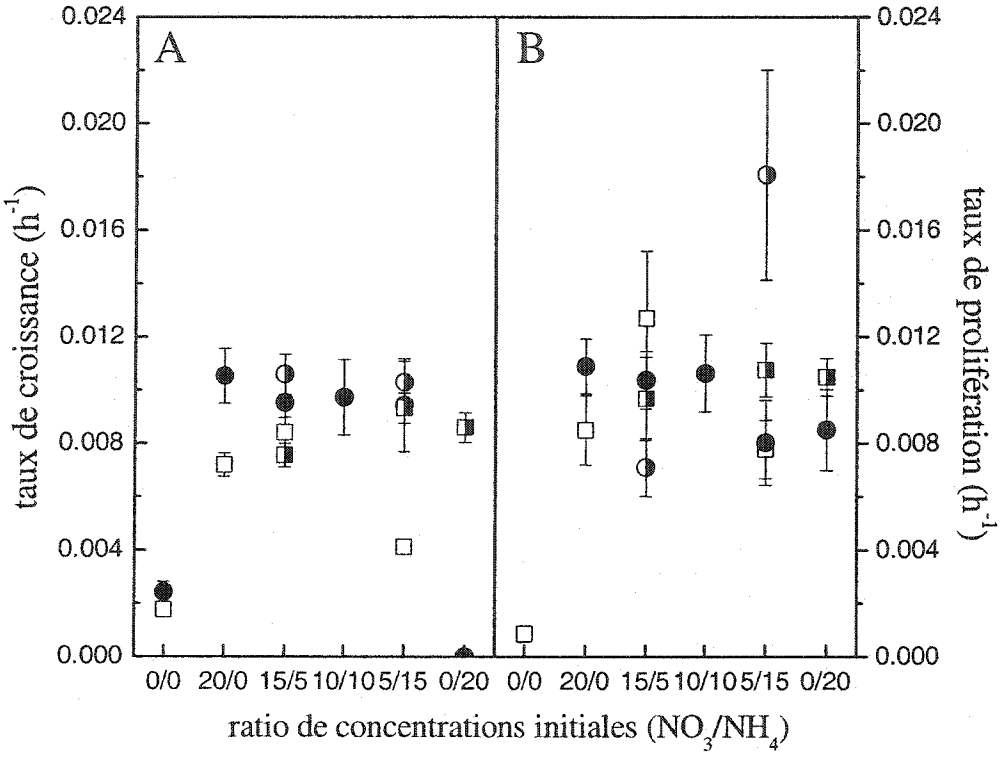


Figure 4.25: **Taux de croissance et de prolifération en fonction du rapport NO_3/NH_4 à l'inoculation et du mode de régulation du pH. A. Taux de croissance en biomasse sèche. B. Taux de prolifération cellulaire. Première expérience ◑ NH_4 avec citrate, ● NH_4 avec MES. Seconde expérience : □ aucune régulation, ◧ NH_4 avec citrate**

Ces résultats démontrent qu'une régulation biochimique progressive est bénéfique à la fois pour la croissance en biomasse sèche et pour la prolifération cellulaire. L'action du MES sur le pH suit les lois d'équilibre chimique des charges. Cependant, la régulation du pH par l'utilisation du citrate est plus invasive.

L'annexe F présente en détail un bilan protonique démontrant l'effet régulatoire de l'utilisation du citrate en présence d'ammonium comme seule source d'azote. En résumé, la réduction du nitrate consomme des protons et l'ammonium résultant est fixé sur un α-cétoglutarate qui est obtenu par oxydation du glucose, ce qui génère des protons. En utilisant uniquement de l'ammonium, il n'y a plus de consommation de protons, mais il y en a toujours qui sont générés par la glycolyse. L'utilisation du citrate combinée à l'ammonium élimine le besoin d'oxyder du glucose pour assimiler l'ammonium et ainsi, annule la génération de protons.

En tenant compte de la consommation des nutriments en cause et de ce phénomène, l'utilisation de citrate d'ammonium provoque un équilibre des charges générées et consommées ne perturbant aucunement le métabolisme cellulaire. De plus, le citrate est un tampon chimique naturel pouvant se retrouver sous 4 formes ($C_6H_8O_6$, pKa=3.128, $C_6H_7O_6^-$, pKa=4.761, $C_6H_6O_6^{2-}$, pKa=6.396, $C_6H_5O_6^{3-}$). Il tamponne donc directement le milieu de croissance.

4.4.4. Source azotée et masse cellulaire

La source azotée et la régulation du pH influencent donc la croissance en biomasse sèche ainsi que la prolifération cellulaire des cultures de cellules végétales. Le suivi de la masse cellulaire moyenne (ng ou g 10^{-9}) permet d'apprécier l'influence combinée d'un traitement sur les deux paramètres de croissance et de déterminer si, d'un point de vue métabolisme de croissance, ce traitement favorise le grossissement cellulaire ou la

division des cellules. Alors que dans le premier cas la masse cellulaire moyenne augmente, elle diminue dans le second.

La Figure 4.26 présente l'évolution de la masse cellulaire moyenne comparée à la croissance en biomasse sèche et en prolifération cellulaire. La partie A démontre que, suite à une diminution de la masse cellulaire moyenne pendant les 100 premières heures de culture, la culture contenant plus de nitrate que d'ammonium (sans régulation de pH) présente une remontée alors que la culture alimentée avec plus d'ammonium que de nitrate demeure au minimum. Cette masse cellulaire moyenne minimale semble avantageuse, *a priori*, puisqu'un des objectifs des présents travaux est de maximiser la prolifération cellulaire. Cependant, en observant les données de la partie B, il appert que cette masse cellulaire minimale résulte d'une forte inhibition de la croissance de la biomasse sèche.

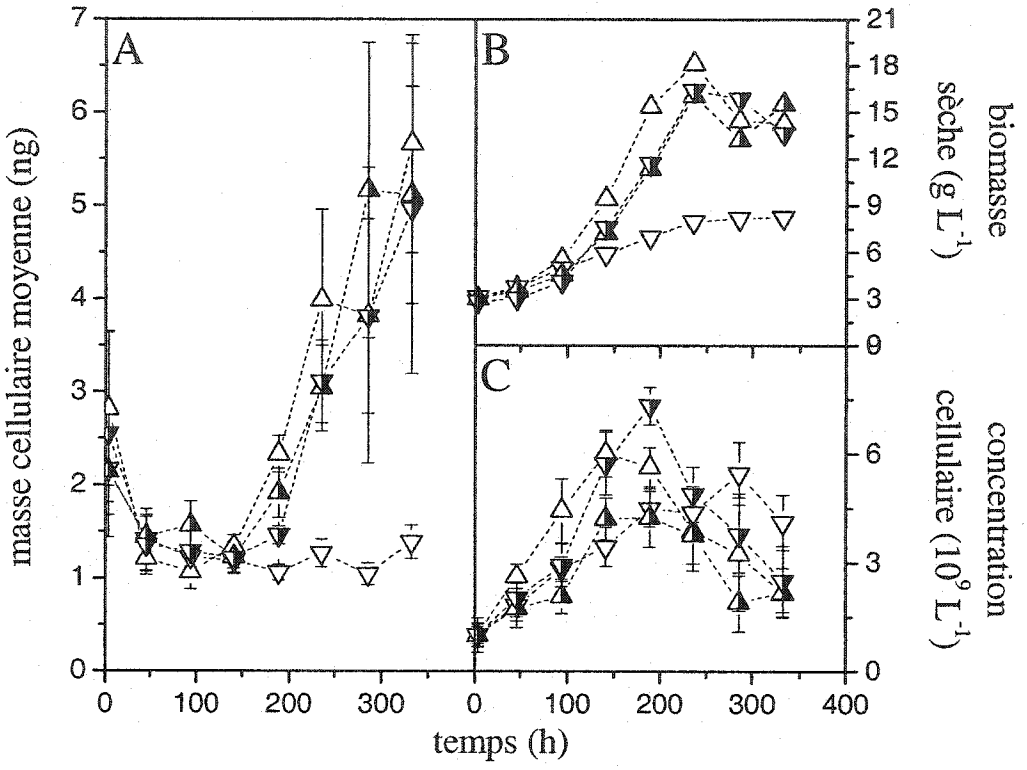


Figure 4.26: **Effet du rapport NO_3/NH_4 et de la régulation du pH sur l'évolution de la masse cellulaire moyenne. A. Masse cellulaire moyenne. B. Biomasse sèche. C. Concentration cellulaire. Rapports exprimés en mM NO_3/mM NH_4 (avec SO_4)/mM NH_4 (avec citrate) : △ 15/5/0, ▽ 5/15/0, ◭ 15/0/5, ▼ 5/0/15**

En supposant que cette culture ait atteint une masse cellulaire minimale critique (masse minimale pour qu'une cellule soit fonctionnelle), cette situation expliquerait le ralentissement en prolifération cellulaire survenu vers 100 heures. Il faut effectivement garder à l'esprit que la croissance en biomasse sèche et la prolifération cellulaire sont deux variables caractérisant de façon différente l'évolution de mêmes cellules. Il est

donc logique, voire évident, que ces deux variables soient reliées et complémentaires et qu'une forte perturbation de l'une ou de l'autre ait des répercussions sur la seconde.

Dans le cas des cultures dont le pH est régulé au moyen du citrate, les profils de masse cellulaire, de même que la biomasse sèche et la concentration cellulaire, suivent la même tendance. Un seul point diffère significativement dans le profil de concentration cellulaire de la culture principalement alimentée en nitrate (vers 200 heures). Les deux points entourant ce dernier suivent toutefois la même tendance, soit une prolifération cellulaire plus abondante dans le cas de l'utilisation d'ammonium.

Afin de vérifier cette possibilité, deux cultures en bioréacteurs dont les profils d'alimentation en azote diffèrent, ont été réalisés en parallèle. Alors que ces deux cultures sont alimentées en nitrate et en ammonium pendant les 150 premières heures, l'alimentation en ammonium est supprimée dans une des cultures. Tandis que la biomasse croît sans différence significative (Figure 4.27A), la tendance de la prolifération cellulaire semble changer en comparant les deux courbes.

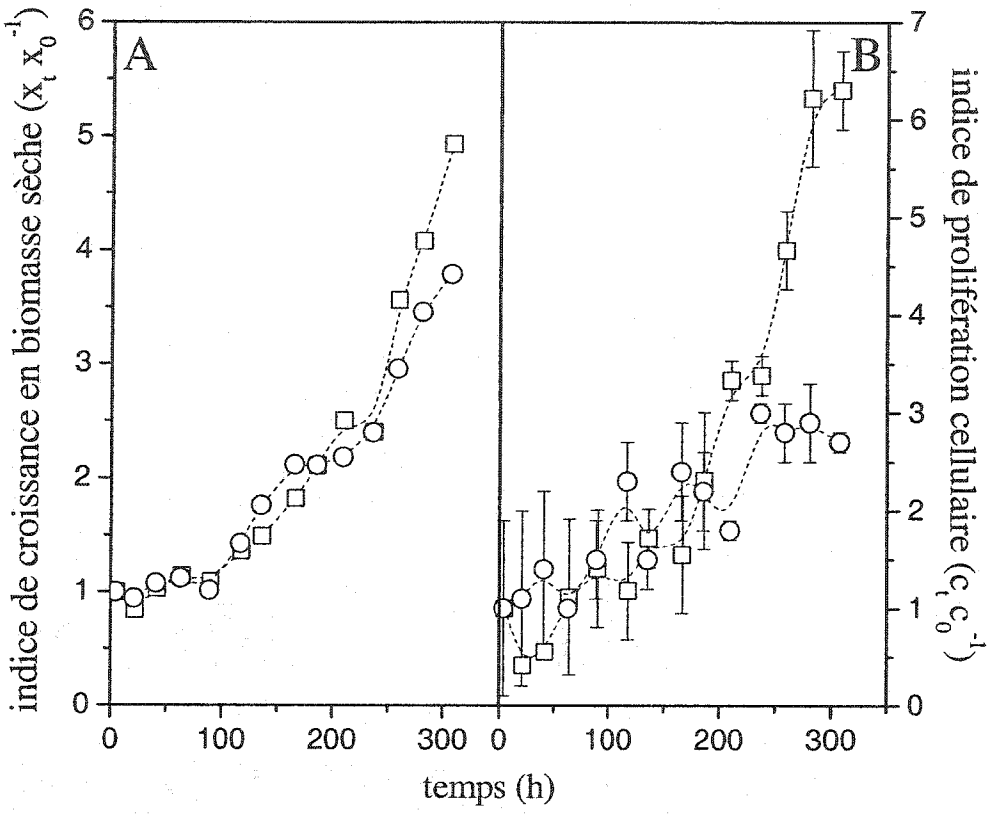


Figure 4.27: **Effet de l'ammonium sur l'évolution de la biomasse sèche et de la concentration cellulaire. A. Biomasse sèche. B. Concentration cellulaire. □ Alimentation soutenue en ammonium (citrate), ○ alimentation partielle en ammonium.**

Dans les heures qui suivent le changement d'alimentation de la source d'azote, la prolifération cellulaire de la culture où l'alimentation en ammonium a été supprimée semble plafonner alors que la biomasse continue de croître. Dans le cas de la culture où l'alimentation en ammonium est soutenue, la prolifération cellulaire continue paralèllement à une croissance de la biomasse sèche. Ces phénomènes se répercutent

sur la masse cellulaire (Figure 4.28). Toutefois, les grandes erreurs expérimentales obtenues lors de ces calculs ne permettent pas de bien apprécier ce phénomène, clairement illustré par la figure précédente.

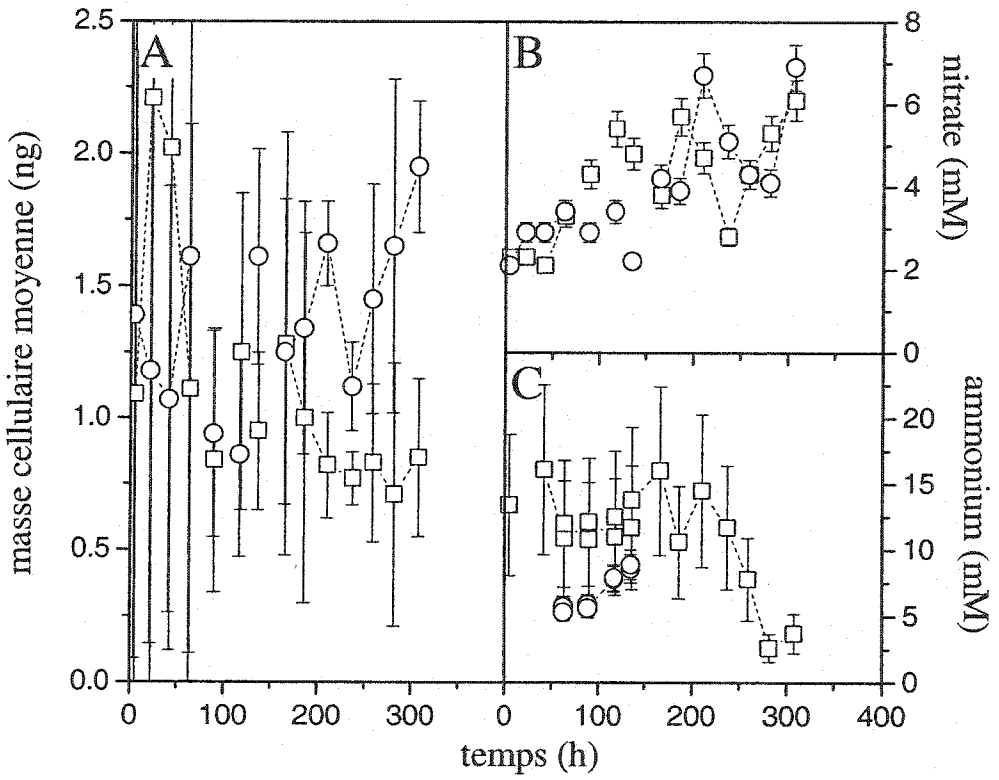


Figure 4.28: **Effet de l'ammonium sur l'évolution de la masse cellulaire moyenne. A. Masse cellulaire moyenne. B. Nitrate. C. Ammonium. □Alimentation soutenue en ammonium (citrate),◯ alimentation partielle en ammonium.**

Alors que la masse cellulaire moyenne de la culture alimentée de façon soutenue en ammonium demeure au minimum atteint (environ 0.75-0.80 ng), celle de la culture

dont le nitrate devient la seule source d'azote s'accroît pour atteindre plus de 1.5 ng, soit le double de la précédente. Ces résultats, aussi observés dans d'autres expériences (résultats non montrés), suggèrent que la nature même de la source azotée a une influence directe sur les mécanismes spécifiques de croissance. Ceci est soutenu par l'observation de Crawford et Glass (1998) qui rapportent que la présence de nitrate dans le milieu de culture altère le métabolisme cellulaire et induit certains gènes. De plus, l'ammonium affectecte fortement le métabolisme du nitrate (section 2.4.2.3). Selon ces résultats, le nitrate favoriserait l'élongation cellulaire (accroissement de la masse) alors que l'ammonium stimulerait la division cellulaire tel que rapporté par Pépin (1996) et Sirois (1997).

4.5. Discussion sur les rendements

En ce qui a trait aux rendements, leur calcul peut être effectué par rapport à la croissance en biomasse sèche ou à la prolifération cellulaire. Dans le cas de la biomasse sèche, cette mesure tient compte de la croissance en tant que formation d'organites et de macromolécules faisant partie intégrante de la cellule. Toutefois, cette mesure comprend aussi l'accumulation intracellulaire, sous forme de réserves, d'ions et de molécules qui ne sont pas, à proprement parler, de la biomasse. Ces espèces chimiques intracellulaires n'ont pas de fonction active. Elles provoquent donc un biais d'estimation de l'augmentation de la croissance des organismes vivants.

À l'opposé, le dénombrement cellulaire ne tient aucunement compte de ce que les cellules contiennent, mais uniquement de leur nombre. Cette mesure est une estimation épurée de la croissance des cellules. Aucun biais n'est induit par accumulation ou non de nutriments intracellulaires. Il est logique que les rendements des nutriments accumulés soient relativement constants lorsqu'ils sont calculés sur une base de nombre de cellules et qu'ils présentent des variations importantes sur une base de biomasse.

Le rendement d'un nutriment utilisé principalement pour des fonctions structurales doit être calculé sur une base de biomasse sèche dès son entrée dans la cellule. Le rendement d'un nutriment utilisé pour diverses fonctions métaboliques dès son entrée dans la cellule peut être calculé sur la base de la biomasse sèche ou du dénombrement cellulaire. Le rendement d'un nutriment absorbé et partiellement entreposé de façon intracellulaire doit être calculé sur une base de dénombrement cellulaire.

5. MODÉLISATION

Lorsque le bioprocédé est bien connu et compris, sa modélisation par les principes premiers (boîte blanche) devient possible. Cette approche est utilisée dans les sections suivantes pour le développement des modèles massiques et cellulaire. Il est à noter qu'une présentation au congrès international de l'IFAC (Sirois et coll., 1999) de même qu'une publication (Sirois et coll., 2000 ; présentée à l'annexe G) sur les techniques de modélisation présentées ici, sont extraites de ce chapitre.

À volume pseudo-constant, les modèles mathématiques des bioprocédés ont la forme générale suivante (Bastin et Dochain, 1990) :

$$\frac{d\xi}{dt} = K\varphi(\xi) - D\xi - q(\xi) + f(\xi) \qquad 5.1$$

où ξ est le vecteur des variables d'état, K, la matrice des constantes de rendement, φ, le vecteur des taux de réactions, D, le taux de dilution, q, le vecteur des débits de sortie (généralement sous forme gazeuse) et f, le vecteur des débits d'alimentation. Cependant, lorsque le volume varie de manière significative par l'effet de l'échantillonnage, de l'évaporation et par l'ajout de concentrés de nutriments, le bilan massique sur les variables d'état doit être repris en tenant compte de ces facteurs :

$$\frac{d\Xi}{dt} = K'\varphi'(\Xi) - \left(\frac{Q_{éch}}{V}\right)\Xi - Q(\Xi) + F(\Xi) \qquad 5.2$$

Cette forme originale du modèle utilise des variables absolues (e.g. biomasse sèche totale en grammes). Dans le cadre de ce projet, il est souhaité que les modèles

développés décrivent l'évolution de variables relatives (e.g. biomasse sèche en grammes par litre de culture). Lorsque les volumes d'échantillonnage et l'évaporation sont négligeables, l'équation 5.1 demeure inchangée. Dans le cas contraire, il faut tenir compte de ces variations et modifier le modèle en conséquence (démonstration à l'annexe E) :

$$\frac{d(\xi)}{dt} = K\varphi(\xi) - \frac{1}{V}\left(Q_{éch} + \frac{dV}{dt}\right)\xi - q(\xi) + f(\xi) \qquad 5.3a$$

$$\frac{dV}{dt} = V\sum_{m=1}^{i}\frac{f(\xi_m)}{\xi_{f,m}} - Q_{évap} - Q_{éch} \qquad 5.3b$$

où ξ est le vecteur des variables d'état, q, le vecteur des débits de sortie et f, le vecteur des débits d'alimentation, tous relatifs au milieu de culture. Quant à $Q_{éch}$, $Q_{évap}$ et $\xi_{f,m}$, ce sont respectivement le débit d'échantillonnage, le débit d'évaporation et la concentration de ξ dans son débit d'alimentation $f(\xi)$.

5.1. Modèle massique non ségrégué

Le modèle massique non ségrégué est le plus simple et le plus souvent développé. La croissance n'est caractérisée que par la biomasse sèche totale et les autres variables d'état sont liées par des rendements et/ou des taux d'absorption à la variable de croissance massique. Cette façon de faire est généralement préconisée comme première approche d'un bioprocédé.

5.1.1. Retour sur le modèle non ségrégué de Sirois (1997)

Le seul modèle du genre, développé pour les cellules d'*Eschscholtzia californica* en suspension dans des conditions de culture similaires à celles de la présente étude, est le modèle de Sirois (1997) obtenu à partir du schème réactionnel suivant :

$$po_{4e} \xrightarrow{\varphi 1} po_{4i} \qquad 5.4a$$

$$nh_{4e} \xrightarrow{\varphi 2} nh_{4i} \qquad 5.4b$$

$$s + no_3 + po_{4i} + nh_{4i} \xrightarrow{\varphi 3} x \qquad 5.4c$$

dont les matrices et les vecteurs correspondant à l'équation 5.1 sont :

$$\xi^T = [x \quad c \quad s \quad no_3 \quad po_{4e} \quad nh_{4e} \quad po_{4i} \quad nh_{4i}] \qquad 5.5a$$

$$K = \begin{bmatrix} 0 & 0 & k_x & 0 \\ 0 & 0 & 0 & k_c \\ 0 & 0 & -k_s & 0 \\ 0 & 0 & -k_{no3} & 0 \\ -k_{po_4,\phi} & 0 & 0 & 0 \\ 0 & -k_{nh_4,\phi} & 0 & 0 \\ k_{po_4,\phi} & 0 & -k_{po_4} & 0 \\ 0 & k_{nh_4,\phi} & -k_{nh_4} & 0 \end{bmatrix} \qquad 5.5b$$

$$\varphi^T = [\phi_1 x \quad \phi_2 x \quad \mu_x x \quad \mu_c c] \qquad 5.5c$$

$$f^T = [0 \quad 0 \quad f_s \quad f_{no_3} \quad f_{po_{4e}} \quad f_{nh_{4e}} \quad 0 \quad 0] \qquad 5.5d$$

$$q^T = [0 \quad 0 \quad 0 \quad 0 \quad 0 \quad 0 \quad 0 \quad 0] \qquad 5.5e$$

$$\mu_x = \mu_x^* \left(\frac{s}{K_{x,s} + s} \right) \left(\frac{n_t}{K_{x,n_t} + n_t} \right) \prod_{n=no_3,po_{4,e},nh_{4,i}} \left(\frac{K_{x,n,1}}{K_{x,n,1} + n^{K_{x,n,2}}} \right) \qquad 5.5f$$

$$\mu_c = \mu_c^* \left(\frac{s}{K_{c,s} + s} \right) \prod_{n=no_3,po_{4,e},nh_{4,i}} \left(\frac{K_{c,n,1}}{K_{c,n,1} + n^{K_{c,n,2}}} \right) \qquad 5.5g$$

Toutes les variables, y compris les variables intracellulaires, sont exprimées en concentration relative au volume de culture. De plus, la concentration cellulaire (c) n'apparaît pas explicitement dans le schème réactionnel. La principale hypothèse de l'auteur, quant à cette variable, consiste à considérer la division cellulaire comme une réorganisation de l'arrangement cellulaire plutôt qu'un accroissement nécessitant la consommation supplémentaire de certains nutriments. L'évolution du modèle est donc exclusivement basée sur la biomasse et la concentration cellulaire est considérée comme une variable supplémentaire, indépendante de la croissance en biomasse.

Cependant, comme le démontrent les travaux présentés au chapitre précédent, ces deux variables qui caractérisent la croissance sont intimement liées, l'une pouvant même être une source de limitation de la seconde. Le schème réactionnel et le modèle de Sirois (1997) doivent donc être modifiés pour incorporer ces deux variables de croissance interdépendantes régissant chacune certaines parties spécifiques du métabolisme cellulaire.

5.1.2. Améliorations du modèle non ségrégué

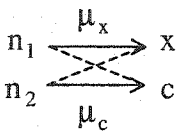
La première modification du modèle non ségrégué consiste à incorporer la concentration cellulaire dans le schème réactionnel et à identifier la cause d'épuisement de chaque nutriment. De plus, les concentrations intracellulaires des nutriments sont exprimées relativement au milieu de culture, soit en mM. Quant au volume de culture, il est considéré pseudo-constant.

5.1.2.1. Schème réactionnel

Le premier élément d'un schème réactionnel est sans contredit la variable de croissance. Or, les présents travaux démontrent que l'emploi d'une seule variable de croissance ne suffit pas à décrire adéquatement les phénomènes de croissance et d'utilisation nutritionnelle. La première modification au schème réactionnel consiste à utiliser conjointement deux variables de croissance intimement reliées entre elles puisqu'elles décrivent différemment l'évolution des mêmes cellules. Pour y arriver, une nouvelle relation est utilisée pour compléter celle déjà employée.

Dans un schème réactionnel conventionnel (e.g. équation 5.4), la flèche continue indique que le réactif de gauche est utilisé pour former le produit de droite. Cette relation demeure, mais sa signification change légèrement. Dans le contexte de l'utilisation conjointe de deux variables de croissance, la flèche continue indique que l'absorption du réactif de gauche est dirigée par le produit de droite. La seconde relation est représentée par une flèche pointillée et signifie que le réactif de gauche sert

aussi à la formation du produit de droite sans que son assimilation en soit directement affectée. L'exemple suivant démontre ce concept par l'utilisation hypothétique du nutriment n_1 consommé proportionnellement à la biomasse et du nutriment n_2 qui l'est en fonction de la prolifération cellulaire :



5.6

En ce qui a trait aux nutriments, les résultats expérimentaux confirment que les glucides (sucrose et glucose) sont utilisés proportionnellement à un accroissement de la biomasse avec les cellules d'*Eschscholtzia californica*. L'épuisement de ce nutriment est donc associé à la croissance en biomasse sèche mais sa disparition du milieu de culture affecte la prolifération cellulaire. Le schème réactionnel partiel du glucose résultant est le suivant :



5.7a

Comme rapporté aux second et quatrième chapitres, le phosphate est rapidement absorbé par les cellules et cette absorption semble proportionnelle à l'aire interfaciale cellule-environnement. La variable représentant le plus adéquatement l'accroissement de cette aire et la plus utilisée est la biomasse sèche. L'absorption du phosphate est donc dirigée par la concentration en biomasse. Quant à son utilisation, les résultats présentés à la Figure 4.8 suggèrent fortement que l'utilisation de ce nutriment est directement reliée à la prolifération cellulaire. Ces deux phénomènes sont donc représentés par le schème partiel suivant :

$$po_{4e} \xrightarrow{\varphi_{po4}} po_{4i} \qquad 5.7b$$

$$po_{4i} \xrightarrow[\mu_c]{x} c \qquad 5.7c$$

où le taux d'absorption φ_{po4} est fonction de la concentration en biomasse sèche.

De façon similaire, les résultats précédents confirment que l'ammonium est rapidement absorbé, proportionnellement à la concentration en biomasse sèche et que son utilisation sur une plus longue période limite la prolifération cellulaire. De manière similaire au phosphate, le schème suivant est obtenu :

$$nh_{4e} \xrightarrow{\varphi_{nh4}} nh_{4i} \qquad 5.7d$$

$$nh_{4i} \xrightarrow[\mu_c]{x} c \qquad 5.7e$$

où le taux d'assimilation φ_{nh4} est fonction de la concentration en biomasse sèche.

La concentration initiale du nitrate est élevée et son profil d'absorption ressemble énormément à celui du glucose. Ceci suggère que le nitrate est utilisé proportionnellement à la biomasse. Les résultats de récentes expériences plus détaillées (Figure 4.13) permettent de calculer un rendement constant en prolifération cellulaire qui respecte les erreurs expérimentales. Ceci permet donc d'associer l'absorption du nitrate à la concentration en biomasse et son utilisation proportionnelle à la prolifération cellulaire :

$$no_{3e} \xrightarrow{\varphi_{no3}} no_{3i} \qquad 5.7f$$

$$no_{3i} \xrightarrow[\mu_c]{x} c \qquad 5.7g$$

où le taux d'absorption φ_{no3} est fonction de la concentration en biomasse sèche.

Le schème réactionnel final comprenant les deux variables de croissance de même que les nutriments qui les affectent significativement est obtenu en regroupant les schèmes partiels 5.7a à 5.7g et en ajoutant l'effet autocatalytique aux variables de croissance :

$$po_{4e} \xrightarrow{\varphi_{po4}} po_{4i} \qquad 5.8a$$

$$nh_{4e} \xrightarrow{\varphi_{nh4}} nh_{4i} \qquad 5.8b$$

$$no_{3e} \xrightarrow{\varphi_{no3}} no_{3i} \qquad 5.8c$$

$$po_{4i} + nh_{4i} + no_{3i} \xrightarrow[\mu_c]{g \; \mu_x} x \; c \qquad 5.8d$$

5.1.2.2. Absorption du nitrate

Selon le schème partiel 5.7f et 5.7g, le nitrate est consommé du milieu de culture pour être ensuite utilisé proportionnellement à la prolifération cellulaire comme source azotée. Alors que l'assimilation du phosphate et de l'ammonium semble directement reliée à la surface d'échange (représentée ici par la biomasse), l'absorption du nitrate semble aussi dépendante de sa concentration extracellulaire. Des trois systèmes de

transport du nitrate, un seul serait efficace à plus de 250 μM (Crawford et Glass, 1998) et serait linéaire par rapport à la concentration en nitrate dans le milieu de culture (Crawford, 1995).

Les taux de consommation moyens en nitrate (mmol g^{-1} h^{-1}) sont calculés entre chaque échantillon (voir annexe E) de chaque série de flacons-test (première expérience) où le rapport de NH4/NO3 est changé d'une série à l'autre (section 4.4.3). Les résultats obtenus sont présentés en fonction de la concentration moyenne en nitrate entre les deux échantillons (Figure 5.1). Il apparaît que les taux de consommation en nitrate augmentent de façon linéaire avec sa concentration extracellulaire. Cette particularité doit donc être insérée dans le modèle de croissance.

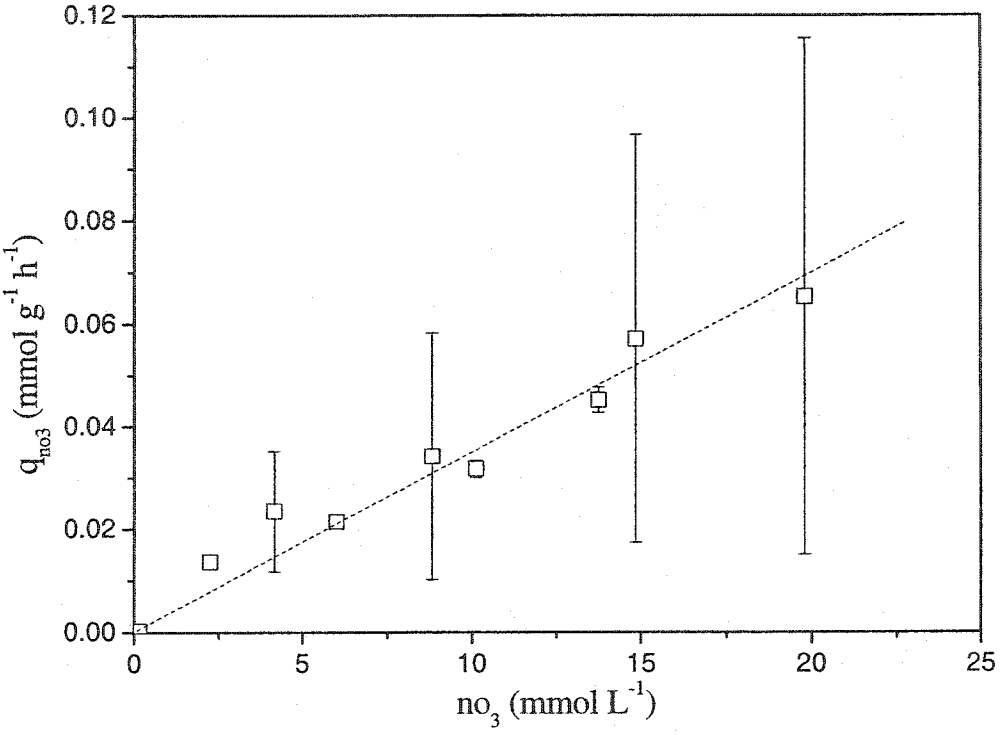


Figure 5.1 : Taux de consommation du nitrate en fonction de sa concentration dans le milieu de culture. ☐ taux moyen calculés, ----- régression linéaire.

5.1.2.3. Concentrations intracellulaires

Lorsque les nutriments sont absorbés par les cellules, leur disponibilité et leur effet de concentration (associés à un effet de proximité) sont logiquement définis par l'environnement intracellulaire et ce, de façon exclusive. Exprimer leur concentration par rapport au volume total peut s'avérer une bonne approximation lorsque la croissance n'est quantifiée que par l'accroissement de la biomasse. Cependant, en considérant la division cellulaire, cette hypothèse ne tient plus.

En effet, lorsqu'une cellule mère se divise, la concentration des nutriments intracellulaires demeure la même par rapport au volume de culture alors que la quantité disponible dans chaque cellule fille a diminuée de moitié. Les concentrations intracellulaire des nutriments limitant la prolifération cellulaire devraient donc être exprimées relativement à la concentration cellulaire (mmol 10^{-9}) de manière à représenter la diminution de disponibilité nutritionnelle résultant des divisions cellulaires.

Par ailleurs, les concentrations intracellulaires estimées par le modèle sont relatives à la concentration intracellulaire initiale. En d'autres mots, les profils obtenus sont relatifs et non absolus, i.e. les concentrations intracellulaires initiales estimées sont toujours nulles. Ils ne tiennent pas compte de la concentration intracellulaire du nutriment déjà présente dans l'inoculum. Il faut donc s'attendre à ce que les profils estimés suivent la même tendance que des profils mesurés, mais avec un décalage égal à la concentration intracellulaire dans l'inoculum.

5.1.2.4. Variations du volume

En ce qui a trait au volume de culture, celui-ci a jusqu'à maintenant été considéré pseudo-constant sur un interval d'échantillonnage mathématique (1 h), i.e. le temps entre deux calculs lors de la simulation. Cette hypothèse est acceptable pour des cultures en cuvée, effectuées dans des laps de temps relativement courts, dont le temps caractéristique d'évaporation (> 2800 h) n'est ni significatif par rapport au temps de

culture (< 500 h) ni par rapport aux temps caractéristiques de croissance (100 à 1000 h).

Il apparaît que le temps caractéristique d'évaporation peut s'avérer assez près des faibles taux de croissance (facteur inférieur à 3). Autrement dit, à faibles taux de croissance, le taux d'évaporation peut influencer significativement le comportement des variables du modèle et son exclusion peut engendrer des erreurs de prédiction. Ce terme est absent du précédent modèle. Cette erreur se trouvait directement incorporée aux paramètres des taux de croissance qui étaient utilisés pour minimiser l'erreur d'estimation.

5.1.2.5. Cinétiques de croissance

Lors de l'étude nutritionnelle du chapitre 4, l'expérience dont les résultats sont présentés à la Figure 4.10 suggèrait une cinétique favorisant la croissance en fonction de la concentration initiale en phosphate. Or, puisque le phosphate est rapidement absorbé puis utilisé sur une plus grande période de croissance, cet effet sur la vitesse de croissance peut être provoqué par un accroissement de la disponibilité et de la concentration intracellulaire de ce nutriment.

Une simulation a été réalisée pour vérifier si une cinétique d'inhibition de la croissance par le phosphate extracellulaire peut se traduire par une cinétique apparante de favorisation dû à une absorption rapide de ce nutriment. Le modèle simplifié utilisé est le suivant :

$$\frac{dx}{dt} = \mu_x^* \left(\frac{K_{po4e,1}}{K_{po4e,1} + po_{4e}^{K_{po4e,2}}} \right) x \qquad 5.9a$$

$$\frac{dc}{dt} = \mu_c^* \left(\frac{K_{po4e,1}}{K_{po4e,1} + po_{4e}^{K_{po4e,2}}} \right) c \qquad 5.9b$$

$$\frac{dpo_{4e}}{dt} = -\phi_{po_4} x \qquad 5.9c$$

$$\frac{dpo_{4i}}{dt} = \phi_{po_4} x - k_{po_4/c} \mu_c^* \left(\frac{K_{po4e,1}}{K_{po4e,1} + po_{4e}^{K_{po4e,2}}} \right) c \qquad 5.9d$$

dont les valeurs des paramètres sont présentées au Tableau 5.1.

Tableau 5.1 : Valeur des paramètres et variables utilisées dans le modèle simplifié

Paramètre	Valeur	Variable	Valeur
μ_x*	0.008 h^{-1}	t	0 – 200 h
μ_c*	0.010 h^{-1}	x(0)	3 g L^{-1}
$K_{po4,1}$	1 mM	c(0)	2 x 10^9 L^{-1}
$K_{po4,2}$	1	po4e(0)	0 – 1 mM
$k_{po4/c}$	0.152 mmol 10^{-9} (cellule)	po4i(0)	0 mM
ϕ_{po4}	0.003 mmol g^{-1} h^{-1}		

Les résultats de cette simulation, présentés à la Figure 5.2, démontrent qu'il est possible que la tendance observée expérimentalement puisse être le résultat d'un effet de disponibilité nutritionnelle intracellulaire.

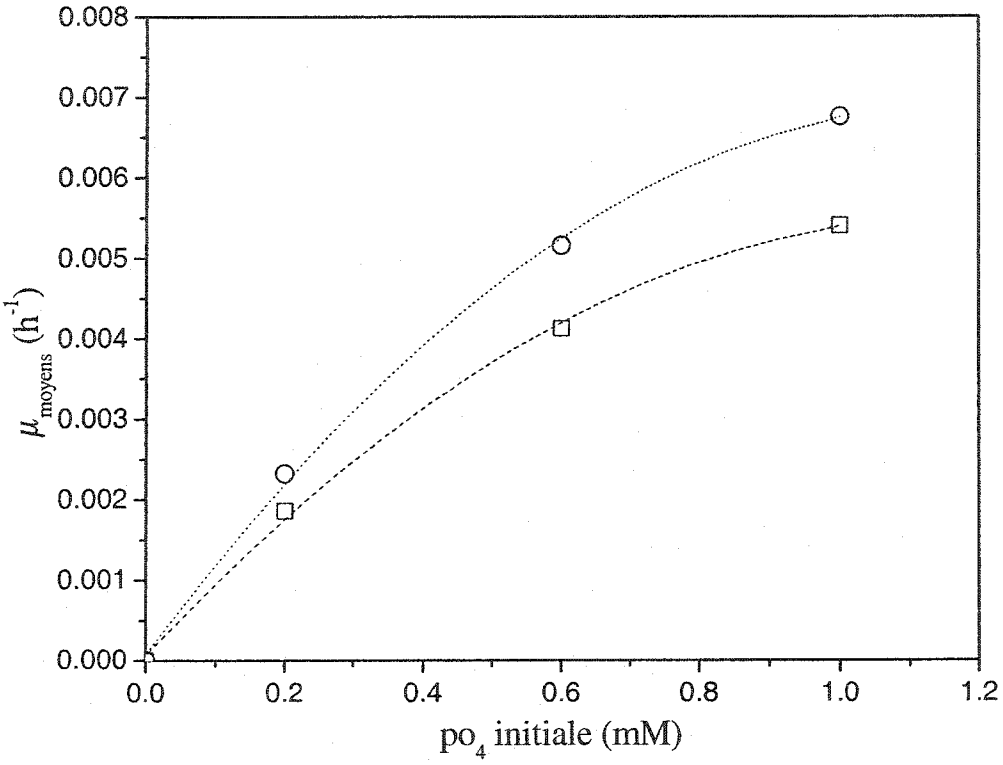


Figure 5.2 : Taux de croissance et de prolifération moyens simulés en fonction de la concentration initiale en phosphate. □ taux de croissance, ○ taux de prolifération cellulaire, ····· et ------- tendances interpolées.

En outre, la forme de la cinétique de croissance présentée par Sirois (1997) peut aussi bien décrire une cinétique favorisant ou inhibant la croissance comme il est possible de le constater à la démonstration E6 de l'annexe E. Pour ces raisons, cette cinétique est utilisée dans le développement des modèles de croissance.

La même réflexion s'impose dans le cas des autres nutriments. En utilisant la cinétique de Sirois (1997), le second coefficient de cette dernière est utilisé pour décrire un effet de favorisation ou d'inhibition. Quant au premier coefficient, sa valeur permet d'accroître ou d'annuler l'effet du nutriment sur le taux de croissance concerné.

5.1.3. Développement du nouveau modèle non ségrégué

En s'appuyant sur les modifications proposées ci-haut, un nouveau modèle de croissance non ségrégué est développé. Sa forme découle directement du schème réactionnel. En tenant compte des variations de volume (système 5.3) et de l'absorption particulière du nitrate, les matrices du modèle résultent du schème 5.8.

$$\xi^T = \begin{bmatrix} x & c & g & po_{4e} & no_{3e} & nh_{4e} & po_{4i} & no_{3i} & nh_{4i} \end{bmatrix} \qquad 5.10a$$

$$K = \begin{bmatrix} 0 & 0 & 0 & k_x & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & k_c \\ 0 & 0 & 0 & -k_{g/x} & 0 \\ -k_{po_4,\phi} & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & -k_{no_3,\phi} & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & -k_{nh_4,\phi} & 0 & 0 \\ k_{po_4,\phi} & 0 & 0 & 0 & -k_{po_4/c} \\ 0 & k_{no_3,\phi} & 0 & 0 & -k_{no_3/c} \\ 0 & 0 & k_{nh_4,\phi} & 0 & -k_{nh_4/c} \end{bmatrix} \qquad 5.10b$$

$$\varphi^T = \begin{bmatrix} \phi_{po_4} x & \phi_{no_3} x\, no_3 & \phi_{nh_4} x & \mu_x x & \mu_c c \end{bmatrix} \qquad 5.10c$$

$$f^T = \begin{bmatrix} 0 & 0 & f_g & f_{po_4} & f_{no_3} & f_{nh_4} & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix} \qquad 5.10d$$

$$q^T = [0 \quad 0 \quad 0 \quad 0 \quad 0 \quad 0 \quad 0 \quad 0 \quad 0] \qquad 5.10e$$

Dans le système 5.10, toutes les concentrations sont relatives au volume de culture. Les équations 5.11a à 5.11c obtenues de ce système sont corrigées pour exprimer l'évolution des nutriments intracellulaires en fonction de la concentration cellulaire (c).

$$\frac{dpo_{4i}}{dt} = \phi_{po_4} x - k_{po_4/c}\mu_c c - \frac{1}{V}\left(Q_{éch} + \frac{dV}{dt}\right)po_{4i} \qquad 5.11a$$

$$\frac{dno_{3i}}{dt} = \phi_{no_3} x\, no_3 - k_{no_3/c}\mu_c c - \frac{1}{V}\left(Q_{éch} + \frac{dV}{dt}\right)no_{3i} \qquad 5.11b$$

$$\frac{dnh_{4i}}{dt} = \phi_{nh_4} x - k_{nh_4/c}\mu_c c - \frac{1}{V}\left(Q_{éch} + \frac{dV}{dt}\right)nh_{4i} \qquad 5.11c$$

Cette correction se fait en divisant les deux cotés de l'équation par la concentration cellulaire et en effectuant un changement de variable approprié des deux côtés de l'équation. Les concentrations des nutriments intracellulaires, relatives à la concentration cellulaire, sont décrites par les équations 5.12a à 5.12c.

$$\frac{d\overline{po_{4i}}}{dt} = \phi_{po_4}\left(\frac{x}{c}\right) - k_{po_4/c}\mu_c - \frac{1}{V}\left(Q_{éch} + \frac{dV}{dt}\right)\overline{po_{4i}} \qquad 5.12a$$

$$\frac{d\overline{no_{3i}}}{dt} = \phi_{no_3}\left(\frac{x}{c}\right)no_3 - k_{no_3/c}\mu_c - \frac{1}{V}\left(Q_{éch} + \frac{dV}{dt}\right)\overline{no_{3i}} \qquad 5.12b$$

$$\frac{d\overline{nh_{4i}}}{dt} = \phi_{nh_4}\left(\frac{x}{c}\right) - k_{nh_4/c}\mu_c - \frac{1}{V}\left(Q_{éch} + \frac{dV}{dt}\right)\overline{nh_{4i}} \qquad 5.12c$$

Les variables surlignées représentent des concentrations relatives à la concentration cellulaire. Le système matriciel résultant de cette opération est le suivant :

$$\xi^T = \left[x \quad c \quad g \quad po_{4e} \quad no_{3e} \quad nh_{4e} \quad \overline{po_{4i}} \quad \overline{no_{3i}} \quad \overline{nh_{4i}}\right] \qquad 5.13a$$

$$K = \begin{bmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & k_x & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & k_c & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -k_{g/x} & 0 & 0 \\ -k_{po_4,\phi} & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & -k_{no_3,\phi} & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & -k_{nh_4,\phi} & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & k_{po_4,\phi} & 0 & 0 & 0 & 0 & -k_{po_4/c} \\ 0 & 0 & 0 & 0 & k_{no_3,\phi} & 0 & 0 & 0 & -k_{no_3/c} \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & k_{nh_4,\phi} & 0 & 0 & -k_{nh_4/c} \end{bmatrix} \quad 5.13b$$

$$\varphi^T = \begin{bmatrix} \phi_{po_4} x & \phi_{no_3} x\, no_3 & \phi_{nh_4} x & \phi_{po_4} \frac{x}{c} & \phi_{no_3} \frac{x}{c} no_3 & \phi_{nh_4} \frac{x}{c} & \mu_x x & \mu_c c & \mu_c \end{bmatrix} \quad 5.13c$$

$$f^T = \begin{bmatrix} 0 & 0 & f_g & f_{po_4} & f_{no_3} & f_{nh_4} & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix} \quad 5.13d$$

$$q^T = \begin{bmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix} \quad 5.13e$$

De manière à garder intègre la notion de *matrice des taux de réaction* (φ), la matrice K peut être divisée en deux sous-matrices. Le système matriciel suivant résulte de cette opération et s'incorpore au modèle de l'équation 5.3.

$$\xi^T = \begin{bmatrix} x & c & g & po_{4e} & no_{3e} & nh_{4e} & \overline{po_{4i}} & \overline{no_{3i}} & \overline{nh_{4i}} \end{bmatrix} \quad 5.14a$$

$$K_1 = \begin{bmatrix} 0 & 0 & 0 & k_x & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & k_c \\ 0 & 0 & 0 & -k_{g/x} & 0 \\ -k_{po_4,\phi} & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & -k_{no_3,\phi} & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & -k_{nh_4,\phi} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix} \qquad 5.14b$$

$$K_2 = \begin{bmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ k_{po_4,\phi} & 0 & 0 & 0 & -k_{po_4/c} \\ 0 & k_{no_3,\phi} & 0 & 0 & -k_{no_3/c} \\ 0 & 0 & k_{nh_4,\phi} & 0 & -k_{nh_4/c} \end{bmatrix} \qquad 5.14c$$

$$\varphi^T = \begin{bmatrix} \phi_{po_4} x & \phi_{no_3} x\, no_3 & \phi_{nh_4} x & \mu_x x & \mu_c c \end{bmatrix} \qquad 5.14d$$

$$f^T = \begin{bmatrix} 0 & 0 & f_g & f_{po_4} & f_{no_3} & f_{nh_4} & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix} \qquad 5.14e$$

$$q^T = \begin{bmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix} \qquad 5.14f$$

où, dans le modèle 5.3,

$$K\varphi = K_1\varphi + K_2\varphi\frac{1}{c} \qquad 5.14g$$

$$\mu_x = \mu_x^* \left(\frac{g}{K_{x,g} + g} \right) \left(\frac{n_t}{K_{x,n_t} + n_t} \right) \prod_{n=no_3,po_{4,e},nh_{4,i}} \left(\frac{K_{x,n,1}}{K_{x,n,1} + n^{K_{x,n,2}}} \right) \qquad 5.14h$$

$$\mu_c = \mu_c^* \left(\frac{g}{K_{c,g} + g} \right) \left(\frac{n_{t,i}}{K_{c,n_{t,i}} + n_{t,i}} \right) \left(\frac{po_{4,i}}{K_{c,po_{4i}} + po_{4,i}} \right) \prod_{n=no_3,po_{4,e},nh_{4,i}} \left(\frac{K_{c,n,1}}{K_{c,n,1} + n^{K_{c,n,2}}} \right) \qquad 5.14i$$

5.1.4. Évaluation des valeurs des paramètres du modèle

Les paramètres à déterminer dans le modèle de croissance définit par le système matriciel 5.14 sont les constantes de réaction des matrices K_1 et K_2, de même que les taux spécifiques de consommation (ϕ_{po4}, ϕ_{no3} et ϕ_{nh4}). En ce qui a trait aux taux spécifiques de croissance (μ_x et μ_c), ceux-ci demeurent inchangés. Le but est d'apprécier l'effet des modifications de structure du modèle. Les deux premières cinétiques de Monod dans l'équation 5.14h et les trois premières cinétiques, elles aussi de Monod dans l'équation 5.14i, servent à provoquer un arrêt de croissance lorsque le nutriment correspondant est épuisé. Avec des constantes très faibles, ces termes deviennent des échelons dont la valeur est nulle à n~0 et non nulle autrement. Les deuxième et troisième cinétiques de la seconde équation n'apparaissaient pas de façon explicite dans le précédent modèle. Des conditions de logique (μ=0 si n=0) étaient implicitement utilisées lors des simulations.

En ce qui a trait à la valeur des paramètres, les constantes des réactions autocatalytiques de croissance (k_x et k_c) sont égales à 1 selon les lois de conservation

de la masse. Il en est de même pour les constantes de consommation ($k_{n,\phi}$) puisqu'il n'y a aucune perte lors de l'absorption nutritionnelle nette. Il reste donc quatre constantes de réaction (k_n) qui consistent en des rendements de croissance. Les rendements utilisés dans le cas présent sont ceux obtenus au chapitre précédent, soient de 0.31 g g^{-1}, 6.6 x 10^9 $mmol^{-1}$, 0.3 x 10^9 $mmol^{-1}$ et 0.3 x 10^9 $mmol^{-1}$ pour les glucides, le phosphate, le nitrate et l'ammonium respectivement. Les constantes correspondantes sont indiquées au Tableau 5.2 à la fin de cette section.

Dans le cas des taux spécifiques de consommation (ϕ_{po4}, ($\phi_{no3}no_3$) et ϕ_{nh4}), ceux-ci sont mesurés expérimentalement. Celui du phosphate est déterminé par Sirois (1997) à 0.003 mmol g^{-1} h^{-1}. Dans le cas du nitrate, le taux de consommation spécifique est fonction de sa concentration extracellulaire, tel que démontré à la Figure 5.1. Le taux spécifique relatif à la concentration en nitrate (ϕ_{no3}) est obtenu en calculant la pente tracée sur le graphique de cette figure. Le résultat obtenu est de 0.0035 L g^{-1} h^{-1}.

Finalement, le taux de consommation de l'ammoniac est fonction du contre-ion utilisé. Comme démontré à la section 4.4, l'utilisation du citrate d'ammonium minimise l'effet pH des sources azotées. Ceci a un impact direct sur le taux d'absorption de l'ammonium. Sirois (1997) détermine un taux spécifique de 0.016 mmol g^{-1} h^{-1} lorsque l'ammonium est lié au sulfate. Toutefois, lorsque le citrate d'ammonium est utilisé, le taux spécifique de consommation passe à 0.025 mmol g^{-1} h^{-1}, lequel est déterminé graphiquement par la pente du taux de

consommation en fonction de la concentration en biomasse, soit une augmentation de 47 %.

Le Tableau 5.2 résume des paramètres du modèle et de leurs valeurs respectives.

Tableau 5.2 : Paramètres du modèle massique non ségrégué

Paramètre	Valeur	Source
k_x	1 g g^{-1}	conservation de la masse
k_c	1 (cellule) $(cellule)^{-1}$	conservation de la masse
$k_{po4,\phi}$	1 mmol $mmol^{-1}$	conservation de la masse
$k_{no3,\phi}$	1 mmol $mmol^{-1}$	conservation de la masse
$k_{nh4,\phi}$	1 mmol $mmol^{-1}$	conservation de la masse
$k_{g/x}$	3.23 g g^{-1}	Sirois (1997)
$k_{po4/c}$	0.152 mmol 10^{-9} (cellule)	expérimentation
$k_{no3/c}$	3.33 mmol 10^{-9} (cellule)	expérimentation
$k_{nh4/c}$	3.33 mmol 10^{-9} (cellule)	Sirois (1997)
ϕ_{po4}	0.003 mmol g^{-1} h^{-1}	Sirois (1997)
ϕ_{no3}	0.0035 L g^{-1} h^{-1}	expérimentation
ϕ_{nh4} (avec sulfate)	0.016 mmol g^{-1} h^{-1}	Sirois (1997)
ϕ_{nh4} (avec citrate)	0.025 mmol g^{-1} h^{-1}	expérimentation

Dans le cas des taux maximum de croissance (μ_x* et μ_c*) et des constantes d'inhibition apparaissant dans les termes de produits (Π) de ces cinétiques, les valeurs des paramètres du modèle sont déterminées à l'aide de cultures expérimentales par minimisation de l'erreur d'estimation du modèle tel que décrit au chapitre 6.

5.2. Modèle physiologique massique

Suite à son amélioration, le modèle non ségrégué représente mieux les phénomènes de croissance lors de cultures de cellules végétales. Cependant, quoique la croissance en biomasse sèche et la prolifération cellulaire soient reliées par l'absorption (fonction de la biomasse sèche) et l'utilisation des nutriments (fonction de la concentration cellulaire), l'évolution de celles-ci est définie par deux taux de croissance indépendants, tous les deux fonctions des concentrations ioniques. Or, ces deux variables de croissance sont intimement reliées puisqu'elles décrivent, chacune à leur façon, le comportement en croissance de la même culture. Un modèle plus représentatif de cet aspect est donc souhaitable et permettrait de décrire la croissance dans son ensemble. Ces deux variables de croissance y seraient intimement reliées et toutes les phases de croissance y seraient décrites.

Ce nouveau modèle est de nature ségréguée et il est basé sur la physiologie primaire des cellules. L'objectifs est de décrire l'interévolution de différents types de cellules desquelles seraient déduites à la fois la croissance de la biomasse sèche et celle de la concentration cellulaire.

5.2.1. Hypothèses de modélisation

De manière à développer un modèle de croissance ségrégué basé sur la physiologie primaire de la cellule (sa grosseur et sa masse), le cycle cellulaire de celle-ci sert de point de départ à la modélisation.

5.2.1.1. Cycle cellulaire

Les quatre phases successives du cycle cellulaire type d'une cellule eucaryote sont présentées à la Figure 5.3 (Alberts et coll., 1992). La période entre deux divisions cellulaires appelée interphase débute avec la phase G_1. L'activité cellulaire pendant cette phase est centrée sur les activités biosynthétiques. La cellule commence à augmenter en masse. Cet accroissement massique se poursuit jusqu'à la fin du cycle. La phase G_1 possède la durée la plus variable de tout le cycle. Selon Alberts et coll., (1992), les cellules ne passeraient par le point de départ (point critique marquant la fin de la phase G_1) qu'après avoir atteint une taille critique. À ce moment, la cellule débute la synthèse de son ADN, ce qui marque son entrée en phase S. Cette phase, d'une durée constante, se termine par la fin de la réplication des chromosomes. À ce stade, la cellule entre en phase G_2. Cette phase est caractérisée par une latence métabolique. La cellule y demeure jusqu'au début de la mitose qui marque le début de la phase M. Lors de cette dernière étape, la division cellulaire s'accomplit et se termine par la cytodiérèse (division cytoplasmique).

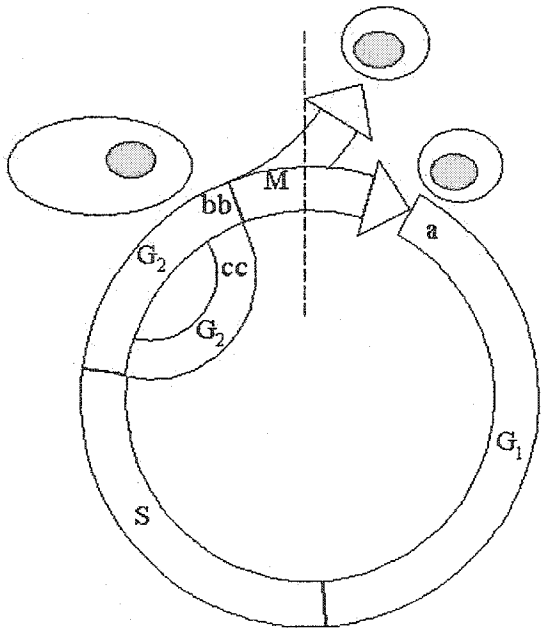


Figure 5.3 : Cycle et ségrégation cellulaires

Les deux variables qui caractérisent la croissance peuvent être reliées à ce cycle cellulaire. Ainsi, la ligne pointillée de la Figure 5.3 marque l'endroit dans le cycle cellulaire où la division apparente se produit. À ce moment, la cellule mère se divise clairement en deux cellules filles. Le suivi de la concentration cellulaire correspond donc au suivi du passage moyen des cellules à ce point. D'autre part, la masse cellulaire augmente le long du cycle cellulaire. Les cellules en fin de phase G_2 ont une masse deux fois plus élevée que celles en début de la phase G_1. Ainsi, en connaissant la concentration cellulaire totale à un temps donné, la biomasse sèche permet de déterminer la distribution cellulaire le long du cycle de croissance. En admettant que la masse des cellules à la fin de l'interphase est le double de celle au début de

l'interphase, ce qui est logique puisque la cellule se divise en deux, le suivi simultané de la concentration cellulaire et de la biomasse sèche permet d'estimer si les cellules en moyenne, sous certaines conditions, tendent vers une taille minimale (la division force le métabolisme) ou vers une taille maximale (l'élongation cellulaire prime sur la division).

5.2.1.2. Bases de modélisation

Pour la modélisation, les extrémités du cycle cellulaire sont utilisées comme limites du système, i.e. plus la fraction cellulaire associée à une limite est importante, plus les cellules en moyenne tendent vers cette limite. La séparation choisie est donc la division apparente indiquée par un trait pointillé sur la Figure 5.3. Les cellules localisées après cette démarcation sont dites de type "a" alors que celles qui se trouvent à l'autre extrémité du cycle et qui s'apprêtent à se diviser, sont dites de type "bb". Le doublement de la lettre représente la taille de la cellule qui a le potentiel de se diviser en deux cellules "a".

Certains facteurs affectent positivement ou négativement le taux de division cellulaire (Sirois, 1997). Alberts et coll. (1992) rapportent que les cellules peuvent demeurer en G_2, attendant alors le moment propice pour effectuer la mitose. Ceci se traduit par une latence de certaines cellules en interphase pendant un temps variable. Pour la modélisation, un troisième type de cellules est défini, soit les cellules "cc" qui ne sont

en fait que des cellules de type "bb" qui ne peuvent se diviser pour une raison quelconque.

5.2.1.3. Schème réactionnel

Le modèle physiologique massique ségrégué est donc basé sur l'évolution de trois types différents de cellules. Les trois variables de croissance principales sont donc les biomasses x_a, x_{bb} et x_{cc}. D'un point de vue conceptuel, le passage de l'état "a" à l'état "bb" correspond à l'expansion cellulaire, soit l'augmentation en biomasse sèche. Quant à la division cellulaire, elle est représentée par le passage des cellules "bb" à l'état "a". Lorsqu'une limitation de la division cellulaire se présente, les cellules "a" passent directement à l'état "cc" lors de leur expansion. L'inactivation des cellules pleinement expansées peut aussi survenir et serait fonction des conditions nutritionnelles extra et intracellulaires. Cette inactivation est décrite par le passage des cellules "bb" à "cc". Le schème réactionnel partiel suivant représente ces comportements.

$$\begin{aligned} x_{bb} &\xrightarrow{\mu_\alpha} x_a \\ x_a &\xrightarrow{\mu_\beta} x_{bb} \\ x_a &\xrightarrow{\mu_{\gamma,a}} x_{cc} \\ x_{bb} &\xrightarrow{\mu_{\gamma,bb}} x_{cc} \end{aligned} \qquad 5.15a$$

Parallèlement à la croissance, une partie des cellules meurent dû à divers facteurs physico-chimiques. Toutes ces pertes sont regroupées en une seule réaction désignée par l'expression mortalité cellulaire, dont le schème partiel est le suivant.

$$x_a + x_{bb} + x_{cc} \longrightarrow \text{débrits cellulaires} \qquad 5.15b$$

Ayant déterminé les liens entre les diverses biomasses, une relation doit être définie afin de relier ces phénomènes de croissance à la concentration cellulaire. En choisissant la division apparente du cycle cellulaire comme limite du système, les biomasses de part et d'autre de cette limite sont reliées à la concentration cellulaire. De cette manière, la concentration cellulaire s'obtient directement par la sommation des produits de chaque type de biomasse et de sa masse cellulaire moyenne.

L'augmentation de la concentration cellulaire est inclue dans le schème réactionnel par l'utilisation de la flèche pointillée puisqu'elle est indispensable au modèle et qu'elle s'obtient à partir des biomasses sans toutefois en consommer. Il est donc évident que sa croissance est due aux trois types de biomasses, mais que celles-ci ne sont mathématiquement pas affectées par cette réaction. Le schème partiel représentant ce phénomène est le suivant.

$$x_a + x_{bb} + x_{cc} \dashrightarrow c \qquad 5.15c$$

Le phosphate, l'ammonium et le nitrate sont accumulés rapidement par les cellules puis utilisés sur une plus longue période pour la croissance, comme ce fût le cas lors du développement du modèle non ségrégué. Il est aussi admis que l'absorption se fait proportionnellement à la surface de membrane disponible et donc, proportionnellement à l'ensemble de la biomasse sèche. Le schème d'assimilation de ces nutriments est le suivant.

$$\begin{aligned} po_{4e} &\xrightarrow{\varphi_{po_4}} po_{4i} \\ no_{3e} &\xrightarrow{\varphi_{no_3}} no_{3i} \\ nh_{4e} &\xrightarrow{\varphi_{nh_4}} nh_{4i} \end{aligned} \qquad 5.15d$$

L'utilisation de chaque nutriment est associé à une réaction adéquate de formation de la biomasse. Cette tâche est simplifiée par l'interprétation des rendements de croissance calculés aux sections 41, 4.2 et 4.3. En se basant sur les hypothèses de modélisation, lorsqu'un nutriment est principalement utilisé pour l'expansion cellulaire, son rendement est fonction de la biomasse. Par opposition, un nutriment utilisé pour la division cellulaire ou pour toute activité proportionnelle à la concentration cellulaire possède un rendement proportionnel à celle-ci.

Il s'ensuit que la disposition des nutriments dans le schème réactionnel est grandement facilitée. Ainsi, seuls les glucides ont un rendement qui est fonction de la biomasse sèche puisque leur utilisation est proportionnelle à l'expansion cellulaire. Les trois autres nutriments (phosphate, ammonium et nitrate) présentent des rendements qui sont fonction de la concentration cellulaire. Le schème réactionnel résultant est le suivant :

$$\begin{aligned} po_{4i} + \; no_{3i} + \; nh_{4i} &\xrightarrow{\mu_\alpha} x_a \\ g &\xrightarrow{\mu_\beta} x_{bb} \end{aligned} \qquad 5.15e$$

Le schème réactionnel complet pour le modèle physiologique massique ségrégué est obtenu en combinant les schèmes partiels 5.15a à 5.15e.

$$po_{4e} \xrightarrow{\varphi_{po_4}} po_{4i} \qquad 5.16a$$

$$no_{3e} \xrightarrow{\varphi_{no_3}} no_{3i} \qquad 5.16b$$

$$nh_{4e} \xrightarrow{\varphi_{nh_4}} nh_{4i} \qquad 5.16c$$

$$po_{4e} + no_{3e} + nh_{4e} + x_{bb} \xrightarrow{\mu_\alpha} x_a \qquad 5.16d$$

$$g + x_a \xrightarrow{\mu_\beta} x_{bb} \qquad 5.16e$$

$$x_a \xrightarrow{\mu_{\gamma,a}} x_{cc} \qquad 5.16f$$

$$x_{bb} \xrightarrow{\mu_{\gamma,bb}} x_{cc} \qquad 5.16g$$

$$x_a + x_{bb} + x_{cc} \xrightarrow{\varphi_m} \text{(débris cellulaires)} \qquad 5.16h$$

$$x_a + x_{bb} + x_{cc} \dashrightarrow c \qquad 5.16i$$

5.2.1.4. Cinétiques de croissance

Les cinétiques de croissance (μ) définies dans le schème réactionnel 5.16 sont fonctions des conditions nutritionnelles extracellulaires comme pour le modèle précédent. Au même titre que les cinétiques de croissance de la biomasse (μ_x) et de prolifération cellulaire (μ_c) du modèle non ségrégué, les cinétiques associées à l'expansion (μ_β) et à la division (μ_α) cellulaires sont reliées aux concentrations des quatre nutriments majeurs. L'équation de μ_x est donc utilisée pour déterminer μ_β alors que l'équation de μ_c sert de base pour μ_α.

Le taux d'expansion de la biomasse ne pouvant se diviser ($\mu_{\gamma,a}$) devrait logiquement être le même que le taux d'expansion (μ_β), puisque ces deux taux caractérisent le même processus métabolique. Les seules différences résident dans l'état de la biomasse résultante et dans les causes d'activation/désactivation de ces cinétiques. Puisque les cellules "bb" peuvent se diviser alors que les cellules "cc" en seraient incapables, un groupe de termes est ajouté à chaque équation pour tenir compte de cette particularité. Ces termes sont obtenus de l'équation de division cellulaire (5.14i). Ce sont les termes d'épuisement des nutriments limitant la division cellulaire ($n_{t,i}$ et po_{4i}). Ils ne sont utilisés que pour faire passer la croissance d'une cinétique d'expansion à l'autre.

$$\mu_\beta = f\left(\left(\frac{n_{t,i}}{K_{n_{t,i}} + n_{t,i}}\right),\left(\frac{po_{4,i}}{K_{po_{4i}} + po_{4,i}}\right)\right) \qquad 5.17a$$

$$\mu_{\gamma,a} = f\left(1-\left(\frac{n_{t,i}}{K_{n_{t,i}} + n_{t,i}}\right),1-\left(\frac{po_{4,i}}{K_{po_{4i}} + po_{4,i}}\right)\right) \qquad 5.17b$$

Le taux d'inactivation cellulaire ($\mu_{\gamma,bb}$) doit être relié aux facteurs activant ou désactivant la division. Selon Sirois (1997), les deux principaux nutriments servant d'interrupteurs à ce mécanisme sont l'ammonium et le phosphate intracellulaires. Le taux d'inactivation serait donc inversement proportionnel à la concentration de ces

deux variables. La cinétique d'inhibition de Jerusaliwski et Engambervediev (1969) est donc utilisée pour chacun de ces nutriments.

$$\mu_{\gamma,bb} = \mu^{*}_{\gamma,bb}\left(\frac{K_{\gamma,po_4}}{K_{\gamma,po_4} + \overline{po_{4i}}}\right)\left(\frac{K_{\gamma,nh_4}}{K_{\gamma,nh_4} + \overline{nh_{4i}}}\right) \qquad 5.18$$

5.2.1.5. Cinétiques de mortalité

Finalement, un certain nombre de phénomènes physico-chimiques affectent la viabilité de tous les types de cellules. Cependant, certains types de cellules peuvent être plus sensibles à certains facteurs. À titre d'exemple, les cellules à paroi mince ou altérée et les cellules plus grosses devraient être plus sensibles à l'agitation mécanique que les cellules à paroi plus épaisse et les petites cellules. Comme il est généralement admis, le taux de mortalité est supposé être proportionnel à la concentration en biomasse (e.g. Bailey et Nicholson, 1989 ; Bramble et coll., 1991 ; Hooker et Lee, 1992 ; Glicklis et coll. 1998). Toutefois, la constante de mortalité peut varier d'un type de biomasse à l'autre. Ainsi, les cellules de type "a" sont plus petites et résultent d'une division cellulaire. Leur taux de mortalité devrait donc être beaucoup plus faible que les plus grosses cellules. Considérant aussi que la mortalité survient principalement lorsque la source en hydrates de carbone est épuisée, l'équation suivante est suggérée pour la mortalité des cellules "a" :

$$\theta_{m,a} = \theta^*_{m,a}\left(1 - \frac{g}{K_g + g}\right) \qquad 5.19a$$

alors que la mortalité des cellules plus grosses devrait suivre une forme plus traditionnelle :

$$\theta_{m,bb} = \theta^*_{m,bb} \qquad 5.19b$$

$$\theta_{m,cc} = \theta^*_{m,cc} \qquad 5.19c$$

5.2.2. Développement du modèle

Les matrices du modèle différentiel (équations 5.3) s'obtiennent des bilans massiques découlant du schème réactionnel et des discussions précédentes :

$$\xi^T = [x_a \quad x_{bb} \quad x_{cc} \quad g \quad po_{4e} \quad no_{3e} \quad nh_{4e} \quad po_{4i} \quad no_{3i} \quad nh_{4i}] \qquad 5.20a$$

$$K = \begin{bmatrix} 0 & 0 & 0 & k^{a}_{x_a/x_{bb}} & -k^{a}_{x_{bb}/x_a} \\ 0 & 0 & 0 & -k^{bb}_{x_a/x_{bb}} & k^{bb}_{x_{bb}/x_a} \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & -k^{min}_{g/x} J_g^{-1} \\ -k_{po_4,\phi} & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & -k_{no_3,\phi} & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & -k_{nh_4,\phi} & 0 & 0 \\ k_{po_4,\phi} & 0 & 0 & -k_{po_4/x} & 0 \\ 0 & k_{no_3,\phi} & 0 & -k_{no_3/x} & 0 \\ 0 & 0 & k_{nh_4,\phi} & -k_{nh_4/x} & 0 \end{bmatrix}$$

$$\begin{bmatrix} -k^{a}_{x_{cc}/x_a} & 0 & -k_{m/x_a} & 0 & 0 \\ 0 & -k^{bb}_{x_{cc}/x_{bb}} & 0 & -k_{m/x_{bb}} & 0 \\ k^{cc}_{x_{cc}/x_a} & k^{cc}_{x_{cc}/x_{bb}} & 0 & 0 & -k_{m/x_{cc}} \\ -k^{min}_{g/x} J_g^{-1} & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix} \quad 5.20b$$

$$\varphi^T = \left[\phi_{po_4}\sum x_i \quad \phi_{no_3}\, no_3 \sum x_i \quad \phi_{nh_4}\sum x_i \quad \mu_\alpha x_{bb} \quad \mu_\beta x_a \quad \mu_{\gamma,a} x_a \quad \mu_{\gamma,bb} x_{bb} \right.$$
$$\left. \theta_{m,a} x_a \quad \theta_{m,bb} x_{bb} \quad \theta_{m,cc} x_{cc} \right] \quad 5.20c$$

$$f^T = \begin{bmatrix} 0 & 0 & 0 & f_g & f_{po_4} & f_{no_3} & f_{nh_4} & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix} \quad 5.20d$$

$$q^T = \begin{bmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix} \quad 5.20e$$

où

$$J_g = \frac{K_g^J}{K_g^J + g} \qquad 5.20f$$

La particularité de ce modèle réside dans la concentration cellulaire qui n'est pas obtenue par une équation différentielle, mais par une équation algébrique. La concentration cellulaire est obtenue de la biomasse sèche en utilisant la masse cellulaire (ρ). Selon la limite du système, les cellules "cc" ont les mêmes taille et masse que les cellules "bb". Puisque ces dernières se divisent en deux cellules "a", il s'ensuit que la masse cellulaire des cellules "bb" et "cc" est le double de la masse cellulaire des cellules "a". La concentration cellulaire s'obtient donc selon l'équation 5.21.

$$c = \frac{1}{\rho_a}\left(x_a + 0.5x_{bb} + 0.5x_{cc}\right) \qquad 5.21$$

où ρ_a est la masse cellulaire des plus petites cellules, celles de type "a".

Dans le modèle décrit par l'équation 5.20, l'absorption des nutriments intracellulaires se retrouve dans l'équation correspondant à la division cellulaire, mais est exprimée en mmol g^{-1} alors que les rendements calculés sont plutôt en mmol par million de cellules. Pour effectuer la transformation d'unité, il s'agit de multiplier le terme de croissance par l'inverse de la masse cellulaire correspondant au type de biomasse exprimé dans ce terme. À titre d'exemple, le second terme de droite du bilan massique suivant sur le phosphate intracellulaire :

$$\frac{dpo_{4i}}{dt} = \phi_{po_{4i}}\left(x_a + x_{bb} + x_{cc}\right) - k_{po_4/x_a}\mu_\alpha x_{bb} - \frac{1}{V}\left(Q_{ech} + \frac{dV}{dt}\right)po_{4i} \qquad 5.22$$

est modifié pour effectuer un changement de variables sur le rendement de la croissance.

$$\frac{dpo_{4i}}{dt} = \phi_{po_{4i}}\left(x_a + x_{bb} + x_{cc}\right) - \frac{k_{po_4/c_a}}{\rho_a}\mu_\alpha x_{bb} - \frac{1}{V}\left(Q_{ech} + \frac{dV}{dt}\right)po_{4i} \quad 5.23$$

Ce modèle est modifié pour que les concentrations intracellulaires soient exprimées en terme de mmol par million de cellules. Les matrices composant le modèle final sont les suivantes :

$$\xi^T = \left[x_a \quad x_{bb} \quad x_{cc} \quad g \quad po_{4e} \quad no_{3e} \quad nh_{4e} \quad \overline{po_{4i}} \quad \overline{no_{3i}} \quad \overline{nh_{4i}}\right] \quad 5.24a$$

$$K_1 = \begin{bmatrix} 0 & 0 & 0 & k^a_{x_a/x_{bb}} & -k^a_{x_{bb}/x_a} \\ 0 & 0 & 0 & -k^{bb}_{x_a/x_{bb}} & k^{bb}_{x_{bb}/x_a} \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ -k_{po_4,\phi} & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & -k_{no_3,\phi} & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & -k_{nh_4,\phi} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix}$$

$$\begin{bmatrix} -k^a_{x_{cc}/x_a} & 0 & -k_{m/x_a} & 0 & 0 \\ 0 & -k^{bb}_{x_{cc}/x_{bb}} & 0 & -k_{m/x_{bb}} & 0 \\ k^{cc}_{x_{cc}/x_a} & k^{cc}_{x_{cc}/x_{bb}} & 0 & 0 & -k_{m/x_{cc}} \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix} \quad 5.24b$$

$$K_2 = \begin{bmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & -k_{g/x}^{min} \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ k_{po_4,\phi} & 0 & 0 & -k_{po_4/c} & 0 \\ 0 & k_{no_3,\phi} & 0 & -k_{no_3/c} & 0 \\ 0 & 0 & k_{nh_4,\phi} & -k_{nh_4/c} & 0 \end{bmatrix}$$

$$\begin{bmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ -k_{g/x}^{min} & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix} \quad 5.24c$$

$$\varphi^T = \left[\phi_{po_4} \sum x_i \quad \phi_{no_3}\, no_3 \sum x_i \quad \phi_{nh_4} \sum x_i \quad \mu_\alpha x_{bb} \quad \mu_\beta x_a \quad \mu_{\gamma,a} x_a \quad \mu_{\gamma,bb} x_{bb} \right.$$

$$\left. \theta_{m,a} x_a \quad \theta_{m,bb} x_{bb} \quad \theta_{m,cc} x_{cc} \right] \quad 5.24d$$

$$f^T = \begin{bmatrix} 0 & 0 & 0 & f_g & f_{po_4} & f_{no_3} & f_{nh_4} & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix} \quad 5.24e$$

$$q^T = \begin{bmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix} \quad 5.24f$$

où, dans le modèle de l'équation 5.3,

$$K\varphi = K_1\varphi + K_2\chi\varphi \quad 5.24g$$

$$\chi = \begin{bmatrix} c^{-1} & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & c^{-1} & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & c^{-1} & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & (\rho_a c)^{-1} & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & J_g^{-1} & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & J_g^{-1} & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix} \qquad 5.24h$$

$$c = \frac{1}{\rho_a}\left(x_a + 0.5x_{bb} + 0.5x_{cc}\right) \qquad 5.24i$$

et

$$J_g = \frac{K_g^J}{K_g^J + g} \qquad 5.24j$$

Les cinétiques de croissance sont obtenues par :

$$\mu_\alpha = \mu_\alpha^*\left(\frac{g}{K_g + g}\right)\left(\frac{\overline{n_{t,i}}}{K_{n_{t,i}} + \overline{n_{t,i}}}\right)\left(\frac{\overline{po_{4,i}}}{K_{po_{4i}} + \overline{po_{4,i}}}\right)\prod_{n=no_3,po_{4,e},\overline{nh_{4,i}}}\left(\frac{K_{\alpha,n,1}}{K_{\alpha,n,1} + n^{K_{\alpha,n,2}}}\right) \qquad 5.24k$$

$$\mu_\beta = \mu_{exp}\left(\frac{\overline{n_{t,i}}}{K_{n_{t,i}} + \overline{n_{t,i}}}\right)\left(\frac{\overline{po_{4,i}}}{K_{po_{4i}} + \overline{po_{4,i}}}\right) \qquad 5.24l$$

$$\mu_{\gamma,a} = \mu_{exp}\left[1 - \left(\frac{\overline{n_{t,i}}}{K_{n_{t,i}} + \overline{n_{t,i}}}\right)\left(\frac{\overline{po_{4,i}}}{K_{po_{4i}} + \overline{po_{4,i}}}\right)\right] \qquad 5.24m$$

$$\mu_{\gamma,bb} = \mu^*_{\gamma,bb}\left(\frac{K_{\gamma,po_4}}{K_{\gamma,po_4} + \overline{po_{4i}}}\right)\left(\frac{K_{\gamma,nh_4}}{K_{\gamma,nh_4} + \overline{nh_{4i}}}\right) \qquad 5.24n$$

où

$$\mu_{exp} = \mu^*_{exp}\left(\frac{g}{K_g + g}\right)\prod_{n=no_3,po_{4,e},\overline{nh_{4,i}}}\left(\frac{K_{\beta,n,1}}{K_{\beta,n,1} + n^{K_{\beta,n,2}}}\right) \qquad 5.24o$$

alors que les cinétiques de mortalité sont obtenues des équations suivantes :

$$\theta_{m,a} = \theta^*_{m,a}\left(1 - \frac{g}{K_g + g}\right) \qquad 5.24p$$

$$\theta_{m,bb} = \theta^*_{m,bb} \qquad 5.24q$$

$$\theta_{m,cc} = \theta^*_{m,cc} \qquad 5.24r$$

5.2.3. Évaluation des valeurs des paramètres

Les constantes des réactions de transformation de la biomasse ($k_{x/x}$ et $k_{m/x}$) sont fonction de la référence choisie. Puisque la division cellulaire se produit selon un mode binaire, la biomasse des petites cellules "a" doit doubler lors du passage en "bb". Lors de cette phase, 1 g de biomasse "a", la référence, doit donc devenir 2 g de biomasse "bb", ou "cc" le cas échéant. Pendant la seconde phase, soit le passage de "bb" à "a", aucun gain de poids n'est obtenu, i.e. 1 gramme de biomasse "bb" devient 1 gramme de biomasse "a". Dans ce cas, la division cellulaire est considérée comme un réarrangement de la biomasse. Les valeurs des constantes de réaction découlant de ces déductions sont présentées au Tableau 5.3.

Par ailleurs, une valeur unitaire est assignée à chacune des constantes de mortalité en supposant que la perte d'un gramme de biomasse, peu importe sa nature, résulte en un gramme de fragments de biomasse morte. Les constantes d'absorption ($k_{n,\phi}$) ont aussi une valeur de 1, en reconnaissant qu'il y a conservation de la matière.

Les valeurs des constantes de rendements proviennent du modèle non ségrégué puisqu'il s'agit exactement des mêmes phénomènes. Les taux de consommation sont aussi les mêmes que précédemment. Le Tableau 5.3 résume ces constantes.

Tableau 5.3 : Constantes de réaction et taux spécifiques de consommation du modèle massique ségrégué et leur valeur

Paramètre	Valeur	Source
$k^{a}_{xa/xbb}$	1 g g^{-1}	conservation de la masse
$k^{bb}_{xa/xbb}$	1 g g^{-1}	conservation de la masse
$k^{a}_{xbb/xa}$	1 g g^{-1}	conservation de la masse
$k^{bb}_{xbb/xa}$	2 g g^{-1}	d.b. & c.m. [1]
$k^{a}_{xcc/xa}$	1 g g^{-1}	conservation de la masse
$k^{cc}_{xcc/xa}$	2 g g^{-1}	d.b. & c.m. [1]
$k^{bb}_{xcc/xbb}$	1 g g^{-1}	conservation de la masse
$k^{cc}_{xcc/xbb}$	1 g g^{-1}	conservation de la masse
$k_{m/xa}$	1 g g^{-1}	conservation de la masse
$k_{m/xbb}$	1 g g^{-1}	conservation de la masse
$k_{m/xcc}$	1 g g^{-1}	conservation de la masse
$k_{po4,\phi}$	1 mmol $mmol^{-1}$	conservation de la masse
$k_{no3,\phi}$	1 mmol $mmol^{-1}$	conservation de la masse
$k_{nh4,\phi}$	1 mmol $mmol^{-1}$	conservation de la masse
$k^{min}_{g/x}$	1.58 g g^{-1}	expérimentation
$k_{po4/c}$	0.152 mmol 10^{-9} (cellule)	expérimentation
$k_{no3/c}$	3.33 mmol 10^{-9} (cellule)	expérimentation
$k_{nh4/c}$	3.33 mmol 10^{-9} (cellule)	Sirois (1997)
K^{J}_{g}	8.8 g L^{-1}	expérimentation
ϕ_{po4}	0.003 mmol g^{-1} h^{-1}	Sirois (1997)
ϕ_{no3}	0.0035 L g^{-1} h^{-1}	expérimentation
ϕ_{nh4} (avec sulfate)	0.016 mmol g^{-1} h^{-1}	Sirois (1997)
ϕ_{nh4} (avec citrate)	0.025 mmol g^{-1} h^{-1}	expérimentation

[1] d.b. & c.m. : exigence de la division binaire et de la conservation de la masse.

Les quatre cinétiques de croissance englobent vingt constantes dont trois d'entre elles (K_{po4i}, K_g et K_{nh4i}) servent à établir un échelon. Elles sont donc fixées à de faibles

valeurs, soit environ un centième de la concentration nominale du nutriment dans le milieu de culture (un vingtième dans le cas du glucose puisqu'il y a un léger ralentissement avant l'arrêt total de croissance dans ce cas). Les autres constantes sont déterminées au chapitre 6 par la simulation de cultures expérimentales de manière à minimiser l'erreur d'estimation par le modèle de la biomasse sèche totale mesurée.

Finalement, les profils de concentration cellulaire sont directement reconstruits à partir des profils de biomasse obtenus et de l'équation 5.24i. La masse cellulaire minimum (ρ_a) est utilisée pour minimiser l'erreur d'estimation des profils de concentration cellulaire par le modèle.

Le modèle physiologique massique comprend donc quarante et une constantes, dont vingt et une sont directement mesurées ou calculées. Toutes les autres qui sont déterminées par minimisation de l'erreur d'estimation sont des constantes des cinétiques de croissance ou de mortalité. À cela s'ajoute la masse cellulaire minimale qui permet de reconstruire les profils de concentration cellulaire.

5.2.4. Simplification de la cinétique associée à la division

Les simulations présentées au chapitre suivant génèrent des valeurs de constantes de la cinétique associée à la division cellulaire (α) qui suggère que les concentrations ioniques n'ont pas d'impact significatif sur le taux de division dans les plages utilisées. C'est ce que démontre la Figure 5.4 des taux de croissances spécifiques de la cinétique

de division cellulaire en fonction de la concentration de chaque nutriment dans le milieu de culture.

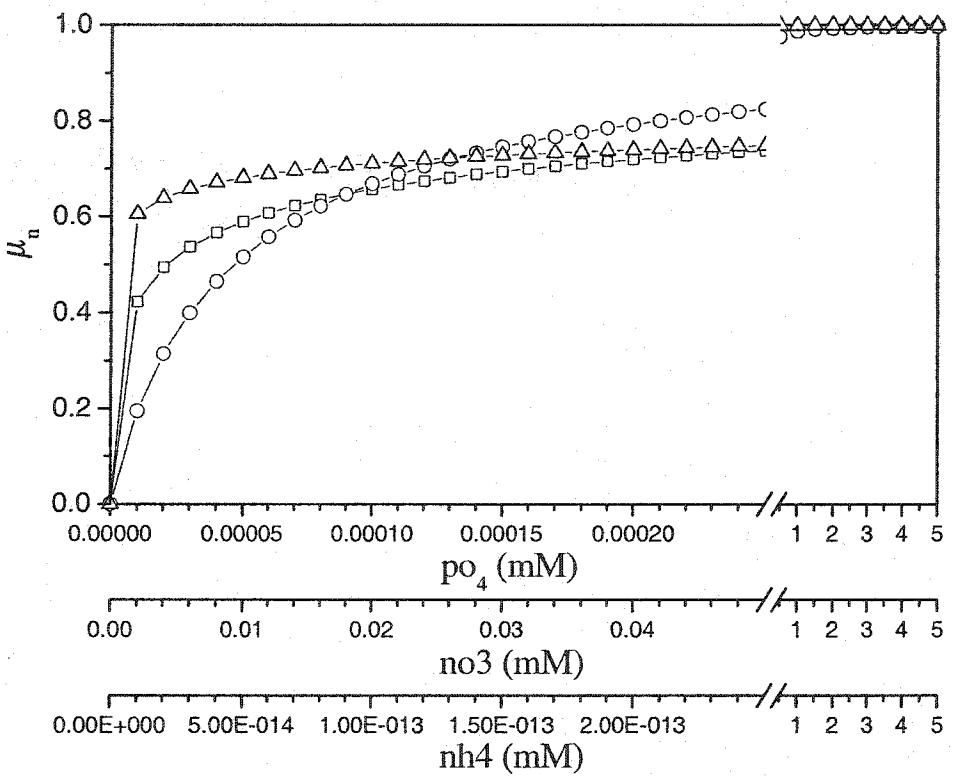


Figure 5.4 : Taux de prolifération cellulaire en fonction de la concentration des nutriments principaux.□ μ_{po4},○ μ_{no3},△ μ_{nh4}.

Ces cinétiques sont donc retirées du modèle physiologique massique (équation 5.24k) pour donner l'équation 5.24k'.

$$\mu_\alpha = \mu_\alpha^* \left(\frac{g}{K_{\alpha,g} + g} \right) \left(\frac{nh_{4,i}}{K_{\alpha,nh_{4,i}} + nh_{4,i}} \right) \left(\frac{po_{4,i}}{K_{\alpha,po_{4i}} + po_{4,i}} \right) \qquad 5.24k'$$

où seulement μ_α* est estimé. Le retrait de ces six constantes estimées fait diminuer le nombre de paramètres estimés par rapport aux vingt et un paramètres calculés ou mesurés. Le nombre total de paramètre passe donc de quarante et un à trente-cinq.

5.3. Modèle physiologique cellulaire

Le modèle physiologique cellulaire est très similaire au modèle physiologique massique. Il repose sur la même base, le cycle cellulaire, mais décrit plutôt l'évolution de différents types de cellules plutôt que de biomasse. D'un point de vue conceptuel, cette façon de faire est plus représentative du procédé à l'étude. L'unité de base est bel et bien la cellule et non la biomasse puisque c'est la cellule en tant qu'entité qui métabolise, synthétise, produit, respire, et non la biomasse. Tous les modèles précédents, soit ceux présentés ici et ceux publiés par d'autres auteurs, ne sont pas à rejeter pour autant puisque leurs prédictions sont généralement acceptables.

5.3.1. Hypothèses de modélisation

Les hypothèses de modélisation reposent sur les mêmes fondements que ceux du modèle physiologique massique, mais sont orientées différemment.

5.3.1.1. Cycle cellulaire et bases de modélisation

Comme pour le modèle physiologique massique, le point critique est la division apparente du cycle cellulaire de la Figure 5.3. Les trois types de cellules posées sont celles qui se trouvent aux limites du système : de petites cellules filles (a)

immédiatement après la division, des cellules mères prêtes à se diviser (bb) avant la division et des cellules expansées sans capacité de se diviser (cc).

5.3.1.2. Schème réactionnel

Le schème partiel des cellules est obtenu du précédent schème partiel des biomasses puisque les phénomènes physiologiques sont les mêmes.

$$\begin{aligned} c_{bb} &\xrightarrow{\mu_\alpha} c_a \\ c_a &\xrightarrow{\mu_\beta} c_{bb} \\ c_a &\xrightarrow{\mu_{\gamma,a}} c_{cc} \\ c_{bb} &\xrightarrow{\mu_{\gamma,bb}} c_{cc} \end{aligned} \qquad 5.25a$$

$$c_a + c_{bb} + c_{cc} \longrightarrow \text{débris cellulaires} \qquad 5.25b$$

Puisque la concentration cellulaire de chaque type de cellule est connue, la concentration totale en biomasse peut directement être obtenue de ces estimations.

$$c_a + c_{bb} + c_{cc} \dashrightarrow x \qquad 5.25c$$

L'absorption nutritionnelle, se fait proportionnellement à la surface de membrane disponible, et donc, proportionnellement à l'ensemble de la biomasse sèche. Ceci n'implique donc aucun changement au niveau du schème réactionnel, mais des ajustements sont à prévoir dans les matrices du modèle.

$$\begin{aligned} po_{4e} &\xrightarrow{\varphi_{po_4}} po_{4i} \\ no_{3e} &\xrightarrow{\varphi_{no_3}} no_{3i} \\ nh_{4e} &\xrightarrow{\varphi_{nh_4}} nh_{4i} \end{aligned} \qquad 5.25d$$

Les nutriments sont utilisés selon la cinétique qui leur sont associée. Le choix du cycle cellulaire et de la division apparente comme point critique du système fait en sorte que l'association nutriment-cinétique, la phénoménologie du système, est indépendante de la base de calcul choisie (biomasse ou unité cellulaire). Seuls les valeurs des paramètres sont appelées à changer.

Puisque les glucides ont un rendement qui est fonction de la biomasse sèche et que les trois autres nutriments (phosphate, ammonium et nitrate) présentent des rendements qui sont fonction de la concentration cellulaire, le schème réactionnel obtenu est le suivant :

$$po_{4i} + no_{3i} + nh_{4i} \xrightarrow{\mu_\alpha} c_a \qquad g \xrightarrow{\mu_\beta} c_{bb} \qquad 5.25e$$

Le schème réactionnel complet pour le modèle physiologique cellulaire est obtenu depuis les schèmes partiels des équations 5.25a à 5.25e.

$$po_{4e} \xrightarrow{\varphi_{po_4}} po_{4i} \qquad 5.26a$$

$$no_{3e} \xrightarrow{\varphi_{no_3}} no_{3i} \qquad 5.26b$$

$$nh_{4e} \xrightarrow{\varphi_{nh_4}} nh_{4i} \qquad 5.26c$$

$$po_{4e} + no_{3e} + nh_{4e} + c_{bb} \xrightarrow{\mu_\alpha} c_a \qquad 5.26d$$

$$g + c_a \xrightarrow{\mu_\beta} c_{bb} \qquad 5.26e$$

$$c_a \xrightarrow{\mu_{\gamma,a}} c_{cc} \qquad 5.26f$$

$$c_{bb} \xrightarrow{\mu_{\gamma,bb}} c_{cc} \qquad 5.26g$$

$$c_a + c_{bb} + c_{cc} \xrightarrow{\varphi_m} \text{(débris cellulaires)} \qquad 5.26h$$

$$c_a + c_{bb} + c_{cc} \dashrightarrow x \qquad 5.26i$$

5.3.1.3. Cinétiques de prolifération et de mortalité cellulaires

Les formes de cinétiques de croissance développées pour le modèle physiologique massique représentent des phénomènes particuliers (division cellulaire, expansion cellulaire, etc.) indépendants de la base de calcul choisie. Elles sont donc appliquées au modèle physiologique cellulaire. Il en est de même pour les cinétiques de mortalité. La version corrigée 5.24j', dont l'amplitude du taux est indépendante des concentrations ioniques, est utilisée sans intermédiaire pour la cinétique de division.

5.3.2. Développement du modèle

Les matrices de prolifération cellulaire du modèle différentiel de l'équation 5.3 sont les suivantes.

$$\xi^T = \begin{bmatrix} c_a & c_{bb} & c_{cc} & g & po_{4e} & no_{3e} & nh_{4e} & po_{4i} & no_{3i} & nh_{4i} \end{bmatrix} \quad 5.27a$$

$$K = \begin{bmatrix}
0 & 0 & 0 & k^{a}_{c_a/c_{bb}} & -k^{a}_{c_{bb}/c_a} & & & & & \\
0 & 0 & 0 & -k^{bb}_{c_a/c_{bb}} & k^{bb}_{c_{bb}/c_a} & & & & & \\
0 & 0 & 0 & 0 & 0 & & & & & \\
0 & 0 & 0 & 0 & -k_{g/c}J_g^{-1} & & & & & \\
-k_{po_4,\phi} & 0 & 0 & 0 & 0 & & & & & \\
0 & -k_{no_3,\phi} & 0 & 0 & 0 & & & & & \\
0 & 0 & -k_{nh_4,\phi} & 0 & 0 & & & & & \\
k_{po_4,\phi} & 0 & 0 & -k_{po_4/c} & 0 & & & & & \\
0 & k_{no_3,\phi} & 0 & -k_{no_3/c} & 0 & & & & & \\
0 & 0 & k_{nh_4,\phi} & -k_{nh_4/c} & 0 & & & & &
\end{bmatrix}$$

$$\begin{bmatrix}
-k^{a}_{c_{cc}/c_a} & 0 & -k_{m/c_a} & 0 & 0 \\
0 & -k^{bb}_{c_{cc}/c_{bb}} & 0 & -k_{m/c_{bb}} & 0 \\
k^{cc}_{c_{cc}/c_a} & k^{cc}_{c_{cc}/c_{bb}} & 0 & 0 & -k_{m/c_{cc}} \\
-k_{g/c}J_g^{-1} & 0 & 0 & 0 & 0 \\
0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\
0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\
0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\
0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\
0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\
0 & 0 & 0 & 0 & 0
\end{bmatrix} \quad 5.27b$$

$$\varphi^T = \begin{bmatrix} \phi_{po_4} x & \phi_{no_3} no_3 x & \phi_{nh_4} x & \mu_\alpha c_{bb} & \mu_\beta c_a & \mu_{\gamma,a} c_a & \mu_{\gamma,bb} c_{bb} & \theta_{m,a} c_a & \theta_{m,bb} c_{bb} & \theta_{m,cc} c_{cc} \end{bmatrix} \quad 5.27c$$

$$f^T = \begin{bmatrix} 0 & 0 & 0 & f_g & f_{po_4} & f_{no_3} & f_{nh_4} & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix} \quad 5.27d$$

$$q^T = \begin{bmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix} \quad 5.27e$$

où

$$J_g = \frac{K_g^J}{K_g^J + g} \quad 5.27f$$

Les taux de consommation sont fonction de la concentration en biomasse, tel que décrit par les trois premiers termes de l'équation 5.27c. Toutefois, la biomasse sèche n'est pas directement estimée par le modèle physiologique de prolifération cellulaire de l'équation 5.27. Elle s'obtient à l'aide de la masse cellulaire minimale (ρ_a) puisque les cellules "bb" et "cc" ont théoriquement une masse du double de celles des cellules "a" :

$$x = \rho_a \left(c_a + 2c_{bb} + 2c_{cc} \right) \quad 5.28$$

Le rendement en glucose est exprimé en grammes de glucose par gramme de biomasse. Le premier terme de droite du bilan massique est corrigé avec la masse cellulaire des cellules "a" (ρ_a) selon l'équation 5.29.

$$\frac{dg}{dt} = -k_{g/x}^{min} J_g^{-1} \left(\mu_\beta + \mu_{\gamma,a} \right) \rho_a c_a - \frac{1}{V} \left(Q_{ech} + \frac{dV}{dt} \right) po_{4i} + f(g) \quad 5.29$$

Une correction est aussi apportée au modèle cellulaire pour exprimer les concentrations intracellulaires des nutriments, en fonction de la concentration

cellulaire et non du volume de culture. Le modèle physiologique cellulaire résultant de ces opérations est le suivant.

$$\xi^T = \begin{bmatrix} c_a & c_{bb} & c_{cc} & g & po_{4e} & no_{3e} & nh_{4e} & \overline{po_{4i}} & \overline{no_{3i}} & \overline{nh_{4i}} \end{bmatrix} \qquad 5.30a$$

$$K_1 = \begin{bmatrix} 0 & 0 & 0 & k^a_{c_a/c_{bb}} & -k^a_{c_{bb}/c_a} \\ 0 & 0 & 0 & -k^{bb}_{c_a/c_{bb}} & k^{bb}_{c_{bb}/c_a} \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ -k_{po_4,\phi} & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & -k_{no_3,\phi} & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & -k_{nh_4,\phi} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix}$$

$$\begin{bmatrix} -k^a_{c_{cc}/c_a} & 0 & -k_{m/c_a} & 0 & 0 \\ 0 & -k^{bb}_{c_{cc}/c_{bb}} & 0 & -k_{m/c_{bb}} & 0 \\ k^{cc}_{c_{cc}/c_a} & k^{cc}_{c_{cc}/c_{bb}} & 0 & 0 & -k_{m/c_{cc}} \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix} \qquad 5.30b$$

$$K_2 = \begin{bmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & -k_{g/x}^{min} & -k_{g/x}^{min} & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ k_{po_4,\phi} & 0 & 0 & -k_{po_4/c} & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & k_{no_3,\phi} & 0 & -k_{no_3/c} & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & k_{nh_4,\phi} & -k_{nh_4/c} & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix} \quad 5.30c$$

$$\varphi^T = \begin{bmatrix} \phi_{po_4} x & \phi_{no_3}\, no_3 x & \phi_{nh_4} x & \mu_\alpha c_{bb} & \mu_\beta c_a & \mu_{\gamma,a} c_a & \mu_{\gamma,bb} c_{bb} \\ & & & & & \theta_{m,a} c_a & \theta_{m,bb} c_{bb} & \theta_{m,cc} c_{cc} \end{bmatrix} \quad 5.30d$$

$$f^T = \begin{bmatrix} 0 & 0 & 0 & f_g & f_{po_4} & f_{no_3} & f_{nh_4} & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix} \quad 5.30e$$

$$q^T = \begin{bmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix} \quad 5.30f$$

où, dans le modèle 5.3,

$$K\varphi = K_1\varphi + K_2\chi\varphi \quad 5.30g$$

et où

$$\chi = \begin{bmatrix} c^{-1} & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & c^{-1} & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & c^{-1} & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & c^{-1} & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & \rho_a J_g^{-1} & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & \rho_a J_g^{-1} & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix} \qquad 5.30h$$

$$x = \rho_a \left(c_a + 2c_{bb} + 2c_{cc} \right) \qquad 5.30i$$

et

$$J_g = \frac{K_g^J}{K_g^J + g} \qquad 5.30j$$

Les cinétiques de croissance sont obtenues par les équations suivantes.

$$\mu_\alpha = \mu_\alpha^* \left(\frac{g}{K_{\alpha,g} + g} \right) \left(\frac{nh_{4,i}}{K_{\alpha,nh_{4,i}} + nh_{4,i}} \right) \left(\frac{po_{4,i}}{K_{\alpha,po_{4i}} + po_{4,i}} \right) \qquad 5.30k$$

$$\mu_\beta = \mu_{exp} \left(\frac{\overline{n_{t,i}}}{K_{n_{t,i}} + \overline{n_{t,i}}} \right) \left(\frac{\overline{po_{4,i}}}{K_{po_{4i}} + \overline{po_{4,i}}} \right) \qquad 5.30l$$

$$\mu_{\gamma,a} = \mu_{exp} \left[1 - \left(\frac{\overline{n_{t,i}}}{K_{n_{t,i}} + \overline{n_{t,i}}} \right) \left(\frac{\overline{po_{4,i}}}{K_{po_{4i}} + \overline{po_{4,i}}} \right) \right] \qquad 5.30m$$

$$\mu_{\gamma,bb} = \mu^{*}_{\gamma,bb}\left(\frac{K_{\gamma,po_4}}{K_{\gamma,po_4} + \overline{po_{4i}}}\right)\left(\frac{K_{\gamma,nh_4}}{K_{\gamma,nh_4} + \overline{nh_{4i}}}\right) \qquad 5.30n$$

où

$$\mu_{exp} = \mu^{*}_{exp}\left(\frac{g}{K_{\beta,g} + g}\right)_{n=no_3,po_{4,e},\overline{nh_{4,i}}}\prod\left(\frac{K_{\beta,n,1}}{K_{\beta,n,1} + n^{K_{\beta,n,2}}}\right) \qquad 5.30o$$

Les cinétiques de mortalité sont obtenues des équations suivantes.

$$\theta_{m,a} = \theta^{*}_{m,a}\left(1 - \frac{g}{K_g + g}\right) \qquad 5.30p$$

$$\theta_{m,bb} = \theta^{*}_{m,bb} \qquad 5.30q$$

$$\theta_{m,cc} = \theta^{*}_{m,cc} \qquad 5.30r$$

5.3.3. Évaluation des valeurs des paramètres

Les valeurs des constantes de réactions cellulaires ($k_{c/c}$ et $k_{m/c}$) sont obtenues suivant les principes de division binaire et de conservation du nombre. Contrairement au modèle physiologique massique précédent, l'expansion cellulaire (l'augmentation massique) est considérée comme un réarrangement cellulaire dans ce cas-ci. Les constantes d'assimilation ($k_{n,\phi}$) sont obtenues par conservation de la masse. Les valeurs des constantes de rendements et des taux d'assimilation sont les mêmes que celles utilisées précédemment, telles que présentées au Tableau 5.4.

Tableau 5.4 : Constantes de réaction et taux spécifiques de consommation du modèle cellulaire ségrégué et leur valeur

Paramètre	Valeur	Source
$k_{ca/cbb}$	2 (cellule) $(cellule)^{-1}$	division binaire
$k_{cbb/ca}$	1 (cellule) $(cellule)^{-1}$	conservation du nombre
$k_{ccc/ca}$	1 (cellule) $(cellule)^{-1}$	conservation du nombre
$k_{ccc/cbb}$	1 (cellule) $(cellule)^{-1}$	conservation du nombre
$k_{m/ca}$	1 (cellule) $(cellule)^{-1}$	conservation du nombre
$k_{m/cbb}$	1 (cellule) $(cellule)^{-1}$	conservation du nombre
$k_{m/ccc}$	1 (cellule) $(cellule)^{-1}$	conservation du nombre
$k_{po4,\phi}$	1 mmol $mmol^{-1}$	conservation de la masse
$k_{no3,\phi}$	1 mmol $mmol^{-1}$	conservation de la masse
$k_{nh4,\phi}$	1 mmol $mmol^{-1}$	conservation de la masse
$k^{min}_{g/x}$	1.58 g g^{-1}	expérimentation
$k_{po4/c}$	0.152 mmol 10^{-9} (cellule)	expérimentation
$k_{no3/c}$	3.33 mmol 10^{-9} (cellule)	expérimentation
$k_{nh4/c}$	3.33 mmol 10^{-9} (cellule)	Sirois (1997)
K^J_g	8.8 g L^{-1}	expérimentation
ϕ_{po4}	0.003 mmol g^{-1} h^{-1}	Sirois (1997)
ϕ_{no3}	0.0035 L g^{-1} h^{-1}	expérimentation
ϕ_{nh4} (avec sulfate)	0.016 mmol g^{-1} h^{-1}	Sirois (1997)
ϕ_{nh4} (avec citrate)	0.025 mmol g^{-1} h^{-1}	expérimentation

Comme pour le modèle précédent, les constantes des cinétiques de croissance sont déterminées au chapitre 6 à l'aide de simulation de cultures expérimentales de manière à minimiser l'erreur d'estimation de la concentration cellulaire totale, à l'exception des constantes échelons K_{po4i}, K_g et K_{nh4i} qui ont la même valeur que pour le modèle physiologique massique.

La concentration en biomasse sèche totale est estimée parallèlement au modèle différentiel de l'équation 5.3 par l'équation 5.30i à partir des profils de concentrations cellulaires et de la masse cellulaire minimale (ρ_a).

Le modèle cellulaire différentiel comprend trente-cinq constantes dont vingt et une sont directement mesurées ou calculées. Celles déterminées par minimisation de l'erreur d'estimation de la concentration cellulaire font toutes partie des cinétiques de prolifération ou de mortalité. À cela s'ajoute la masse cellulaire minimale pour l'estimation de la biomasse totale.

5.4. Modélisation descriptive

Les modèles développés dans les sections précédentes sont complètement autonomes. Ils ne requièrent aucun apport d'informations pendant leur fonctionnement, ce qui en fait des modèles prédictifs mais les empêchent d'être utilisés pour suivre le comportement des cultures en temps réel. Un nouveau modèle de croissance, directement relié à la culture à suivre, est développé pour y parvenir.

5.4.1. Hypothèses de modélisation

Ce nouveau modèle doit être relié à la croissance des cultures par des variables fiables mesurées en continu. Le nombre de variables qui répondent à ce critère est peu élevé pour le système utilisé. Le Tableau 5.5 présente les variables mesurées en temps continu pour des cultures de cellules végétales et la raison de leur rejet comme source d'informations pour le modèle le cas échéant.

Tableau 5.5: Variables mesurées en continu lors de cultures de cellules végétales en suspension

Variable	Objet	Raison du rejet
Conductivité	Concentration ionique totale	Quasi constante en milieu contrôlé*
CTR	Production de bioxyde de carbone	---
OUR	Consommation d'oxygène	---
Oxygène dissous	Concentration en oxygène dans le milieu	Concentration contrôlée
PH	Concentration protonique	Non relié aux variables modélisées*
R_Q	Rapport respiratoire	Non relié aux variables modélisées*

* observations expérimentales antérieures

Le CTR et le OUR sont donc deux variables qui peuvent servir au modèle. À prime abord, le nombre maximum de variables indépendantes pouvant être suivies directement (indépendemment du modèle) en temps réel par un tel système est donc de deux. Cependant, comme mentionné à la section 2.4.1, la demande en ATP et donc la demande respiratoire, est directement liée à la composition élémentaire de la biomasse (Penning de Vries et coll., 1974). Puisque la composition de la biomasse est fonction des ions absorbés (de Guch et van der Plas, 1996), la demande en ATP et donc les coûts respiratoires sont grandement fonction de l'absorption ionique et de la synthèse des protéines (de Visser et coll., 1992 ; Penning de Vries et coll., 1974 ; van der Werf et coll., 1988). Pour ces raisons, les profils de respiration sont difficilement utilisables pour assurer un suivi fiable de l'évolution des cultures. Ils dépendent de plusieurs variables qui ne sont pas nécessairement reliées directement avec une variable du modèle de croissance.

Le CTR est directement relié à la consommation en glucides et ainsi, au rendement associé à ce nutriment. Comme démontré à la section 4.1, ce rendement peut varier en fonction de la concentration en glucides dans le milieu de culture. Une faiblesse dans la corrélation entre une variable de croissance et le CTR est donc à prévoir. Dans ce contexte, une étude est réalisée sur la relation entre ces deux variables de suivi (le CTR et le OUR) et les variables de croissance (c, x, μ_c, et μ_x), à l'aide des cultures utilisées pour développer les modèles précédents. Les coefficients de régression

linéaire entre ces variables de même que les écarts types résultants sont présentés au Tableau 5.6.

Tableau 5.6: Moyennes des coefficients de régression linéaire (r^2) et écarts types obtenus avec les 14 cultures utilisées pour le développement des modèles

	CTR	OUR
c	0.8 ± 0.3	0.8 ±0.2
x	0.6 ± 0.4	0.7 ± 0.4
μ_c	-0.3 ±0.4	-0.3 ± 0.4
μ_x	0.1 ± 0.5	-0.1 ± 0.5

Il semble donc que les meilleures corrélations correspondent à un suivi de la concentration cellulaire à l'aide du CTR ou du OUR qui représentent des solutions équivalentes d'un point de vue statistique. Cependant, le calculs des ces deux variables de culture :

$$OUR_m = k_L a\left[\frac{C^*_{air}}{y_{air}}\left(\frac{y^E_{air}Q^E_{air} + Q^E_{O_2}}{Q^E_{air} + Q^E_{O_2}}\right)\right] \qquad 5.31$$

$$CTR_m = \frac{1}{V}\left(y^S_{CO_2}Q^S_T - y^E_{CO_{2,air}}Q^E_{air}\right) \qquad 5.32$$

indique que le OUR dépend de la mesure du coefficient de transfert d'oxygène (k_La). Or ce paramètre n'est mesuré que périodiquement aux 12 heures et plus par la technique de la pente respiratoire (Aubry, 1995). De plus, sa mesure est très sensible aux conditions de culture au moment de la mesure. Par ailleurs, le CTR est mesuré en continu et ne dépend que des débits massiques des gaz, de la mesure du bioxyde de carbone des gaz de sortie et du volume de la culture. Cette variable est donc choisie

pour la description en temps réel du comportement des variables de croissance des cultures en bioréacteur.

5.4.2. Développement du modèle

Puisque seul le CTR peut être utilisé afin d'évaluer la croissance de cultures en bioréacteur, il appert que seul le modèle non ségrégué peut être utilisé puisque les variables de croissances des modèles ségrégués sont intimement liées, leur conférant ainsi trois degrés de liberté.

Le suivi de la prolifération cellulaire des cultures en bioréacteur pourrait être réalisé en adaptant le bilan massique sur la concentration cellulaire en estimateur direct.

$$\frac{dc}{dt} = \left[\mu - \frac{1}{V}\left(Q_{éch} + \frac{dV}{dt}\right)\right]c + \gamma_c(c_m - c) \qquad 5.33$$

avec

$$c_m = \Lambda CTR_m \qquad 5.34$$

Cependant, la lecture du CTR_m à chaque cycle d'acquisition (10s) est légèrement bruitée (<5%). Ce bruit de mesure est amplifié par le paramètre de suivi Λ et est propagé dans le modèle ce qui affecte tous les signaux. Afin de minimiser ce bruit, un régresseur de la concentration cellulaire mesurée (c_m) par les moindres carrés récursifs avec facteur d'oubli (Astrom et Wittenmark, 1995) est développé de la manière suivante sous une forme discrétisée :

$$c^{e}_{m,t} = c^{e}_{m,t-1} + K_{c,t}\left(CTR_t - \Lambda_t^{-1} c^{e}_{m,t-1}\right) \tag{5.35a}$$

$$K_{c,t} = P_{c,t-1}\Lambda_t^{-1}\left(\lambda_c + \Lambda_t^{-1} P_{c,t-1}\Lambda_t^{-1}\right)^{-1} \tag{5.35b}$$

$$P_{c,t} = \left(1 - K_{c,t}\Lambda_t^{-1}\right)P_{c,t-1}\lambda_c^{-1} \tag{5.35c}$$

où c^{e}_{m} est l'estimation directe de la mesure de la concentration cellulaire par le régresseur des moindres carrés, K est le gain d'estimation et P est la matrice de covariance. De plus, une étude expérimentale du paramètre de suivi Λ démontre que sa valeur varie dans le temps tel que montré à la Figure 5.5.

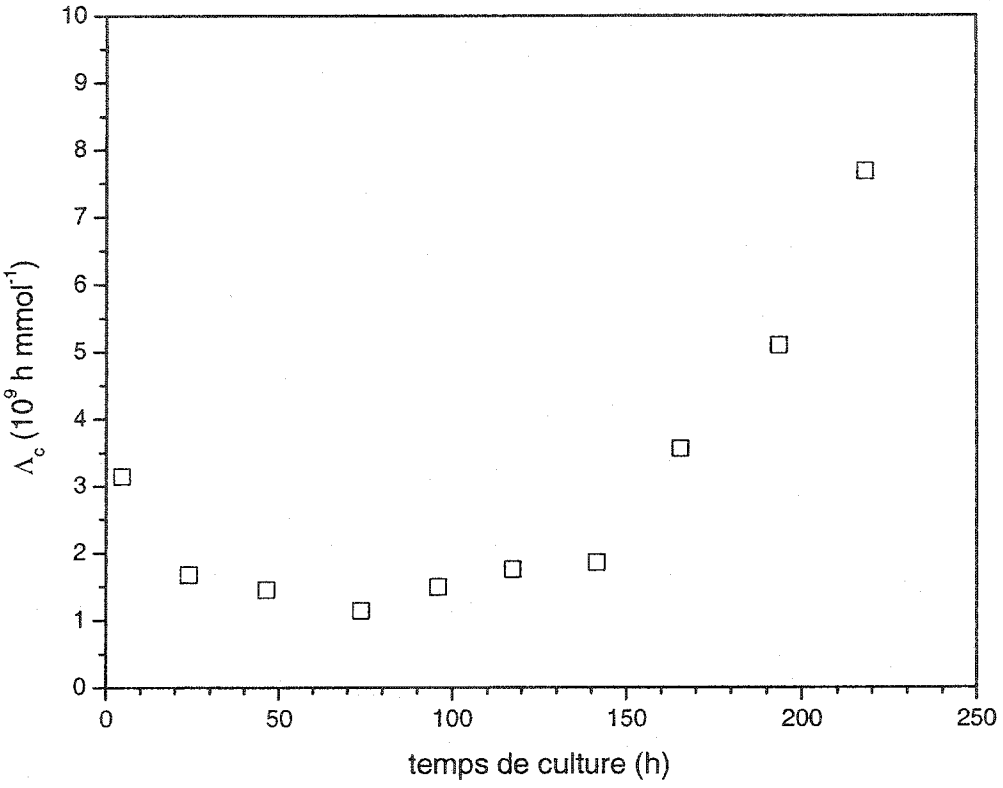


Figure 5.5: Variation de Λ_c lors d'une culture type de cellules végétales en bioréacteur

Ce coefficient doit aussi être suivi en continu. Pour ce faire, un estimateur (régresseur) de Λ par les moindres carrés récursifs avec facteur d'oubli (Astrom et Wittenmark, 1995) est développé comme suit:

$$\Lambda_t = \Lambda_{t-1} + K_{\Lambda,t}\left(\Lambda_{m,t} - \Lambda_{t-1}\right) \qquad 5.36a$$

$$K_{\Lambda,t} = P_{\Lambda,t-1}\left(\lambda_\Lambda + P_{\Lambda,t-1}\right)^{-1} \qquad 5.36b$$

$$P_{\Lambda,t} = \left(1 - K_{\Lambda,t}\right)P_{\Lambda,t-1}\lambda_\Lambda^{-1} \qquad 5.36c$$

où Λ_m est le dernier quotient [c $(CTR)^{-1}$] mesuré suite à l'échantillonnage.

La correction de la concentration cellulaire provenant du suivi du CTR représente une compensation à une incapacité du modèle à prédire adéquatement la croissance cellulaire. Or, connaissant la masse cellulaire à un instant donné et en admettant que cette variable est pseudo-constante sur un court interval de temps défini (10 secondes dans ce cas-ci), la correction de la concentration cellulaire peut directement être appliquée à la biomasse sèche. L'estimation en continu de la biomasse sèche provenant d'une variable mesurée (x^e_m) se fait donc comme suit :

$$x^e_{m,t} = \left(\frac{x_{t-1}}{c_{t-1}}\right) c^e_{m,t} \qquad 5.37$$

Il en résulte que le modèle discret utilisé pour le suivi en continu des variables de croissance est décrit par les équations 5.38a à 5.38m.

$$\xi_t = \xi_{t-1} + T\left[K\varphi(\xi) - \frac{1}{V}\left(Q_{éch} + \left(\frac{V_t - V_{t-1}}{T}\right)\right)\xi - q(\xi) + f(\xi) + \Gamma_\xi\left(\xi^e_m - \xi\right)\right]_{t-1} \qquad 5.38a$$

$$\frac{V_t - V_{t-1}}{T} = \left[V\sum_{z=1}^{i}\frac{f(\xi_z)}{\xi_{f,z}} - Q_{évap} - Q_{éch}\right]_{t-1} \qquad 5.38b$$

où

$$\xi^T = \left[x \quad c \quad g \quad po_{4e} \quad no_{3e} \quad nh_{4e} \quad \overline{po_{4i}} \quad \overline{no_{3i}} \quad \overline{nh_{4i}}\right] \qquad 5.38c$$

$$K_1 = \begin{bmatrix} 0 & 0 & 0 & k_x & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & k_c \\ 0 & 0 & 0 & -k_{g/x} & 0 \\ -k_{po_4,\phi} & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & -k_{no_3,\phi} & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & -k_{nh_4,\phi} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix} \qquad 5.38d$$

$$K_2 = \begin{bmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ k_{po_4,\phi} & 0 & 0 & 0 & -k_{po_4/c} \\ 0 & k_{no_3,\phi} & 0 & 0 & -k_{no_3/c} \\ 0 & 0 & k_{nh_4,\phi} & 0 & -k_{nh_4/c} \end{bmatrix} \qquad 5.38e$$

$$\varphi^T = \begin{bmatrix} \phi_{po_4} x & \phi_{no_3} x\, no_3 & \phi_{nh_4} x & \mu_x x & \mu_c c \end{bmatrix} \qquad 5.38f$$

$$f^T = \begin{bmatrix} 0 & 0 & f_g & f_{po_4} & f_{no_3} & f_{nh_4} & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix} \qquad 5.38g$$

$$q^T = \begin{bmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix} \qquad 5.38h$$

$$\Gamma^T = \begin{bmatrix} \gamma_x & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & \gamma_c & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix} \quad 5.38i$$

$$\xi_m^T = \begin{bmatrix} x_{m,t-1}^e & c_{m,t-1}^e & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix} \quad 5.38j$$

$$K\varphi = K_1\varphi + K_2\varphi\frac{1}{c} \quad 5.38k$$

$$\mu_x = \mu_x^*\left(\frac{g}{K_{x,g}+g}\right)\left(\frac{n_t}{K_{x,n_t}+n_t}\right)\prod_{n=no_3,po_{4,e},nh_{4,i}}\left(\frac{K_{x,n,1}}{K_{x,n,1}+n^{K_{x,n,2}}}\right) \quad 5.38l$$

$$\mu_c = \mu_c^*\left(\frac{g}{K_{c,g}+g}\right)\left(\frac{n_{t,i}}{K_{c,n_{t,i}}+n_{t,i}}\right)\left(\frac{po_{4,i}}{K_{c,po_{4i}}+po_{4,i}}\right)\prod_{n=no_3,po_{4,e},nh_{4,i}}\left(\frac{K_{c,n,1}}{K_{c,n,1}+n^{K_{c,n,2}}}\right)$$

5.38m

Ce modèle est utilisé conjointement avec les estimateurs suivants.

$$c^{e}_{m,t} = c^{e}_{m,t-1} + K_{c,t}\left(CTR_t - \Lambda_t^{-1} c^{e}_{m,t-1}\right) \qquad 5.35a$$

$$K_{c,t} = P_{c,t-1}\Lambda_t^{-1}\left(\lambda_c + \Lambda_t^{-1} P_{c,t-1}\Lambda_t^{-1}\right)^{-1} \qquad 5.35b$$

$$P_{c,t} = \left(1 - K_{c,t}\Lambda_t^{-1}\right)P_{c,t-1}\lambda_c^{-1} \qquad 5.35c$$

et

$$\Lambda_t = \Lambda_{t-1} + K_{\Lambda,t}\left(\Lambda_{m,t} - \Lambda_{t-1}\right) \qquad 5.36a$$

$$K_{\Lambda,t} = P_{\Lambda,t-1}\left(\lambda_\Lambda + P_{\Lambda,t-1}\right)^{-1} \qquad 5.36b$$

$$P_{\Lambda,t} = \left(1 - K_{\Lambda,t}\right)P_{\Lambda,t-1}\lambda_\Lambda^{-1} \qquad 5.36c$$

avec la correction simultanée de la biomasse sèche selon l'équation 5.37.

$$x^{e}_{m,t} = \left(\frac{x_{t-1}}{c_{t-1}}\right)c^{e}_{m,t} \qquad 5.37$$

5.4.3. Évaluation des valeurs des paramètres

Les paramètres du modèle descriptif sont les mêmes que ceux du modèle non ségrégué. Les valeurs des deux facteurs d'oubli (λc et λ_Λ) sont déterminées en fonction de la période historique désirée, sachant que l'intervalle d'échantillonnage est de 10

secondes et que le nombre d'échantillons historiques considérés par le modèle (Astrom et Wittenmark, 1995) est obtenu par l'équation 5.39.

$$N = \frac{2}{1-\lambda} \qquad 5.39$$

Les valeurs obtenues sont présentées au Tableau 5.7. Les gains d'estimation (γ) sont déterminés par simulation de manière à assurer une convergence du suivi sans dégradation des mesures par le bruit ou l'action excessive.

Tableau 5.7: Facteurs d'oubli, échantillons et périodes historiques

	λ	N	P (h)
c	0.999	2 000	5.6
Λ	0.9999	20 000	55.6

5.5. Amélioration postoptimisation des modèles

La démonstration E4 de l'annexe E indique que l'absorption nutritionnelle est accrue par une augmentation de la biomasse sèche. Ceci repose sur l'hypothèse voulant que le transfert soit proportionnel à la surface disponible. Or, les cellules en se divisant, accroissent la surface cellulaire totale sans qu'il y ait nécessairement augmentation de la biomasse sèche. De fait, l'absorption nutritionnelle augmente avec la division cellulaire tel qu'observé lors des cultures d'optimisation. Cette démonstration (E5 de l'annexe E) qui résulte d'observations faites pendant la phase d'optimisation en continu, représente un ajout postoptimisation aux modèles de croissance.

6. SIMULATIONS ET VALIDATION

6.1. Outils de simulation

6.1.1. Logiciel et fonctions

Les modèles développés au chapitre précédent sont simulés à l'aide du logiciel MatLab 5.3 (MathWorks inc.). La fonction ODE45 qui permet de simuler des systèmes d'équations différentielles est utilisée pour minimiser les erreurs d'estimation du volume, mais génère des temps d'attente trop importants et des problèmes de saturation de mémoire pour les boucles de minimisation des erreurs d'estimation des cultures. Il en est de même pour les fonctions ODE23 et ODE23T. Une fonction similaire à ODE23 utilisant l'approche de Runge-Kutta du second ordre (Bequette, 1998) a donc été programmée. L'utilisateur peut spécifier le pas maximum admissible (1 heure dans ce cas-ci) d'intégration dans cette nouvelle fonction. Celle-ci utilise une valeur de pas la plus près possible, mais inférieure au pas maximum spécifié pour générer un nombre entier d'étapes de calcul entre le temps initial et le temps final spécifiés.

Quant à la minimisation des erreurs d'estimation des cultures, la fonction CONSTR (maintenant remplacée par FMINCON) qui permet de minimiser une fonction à plusieurs variables sujette à certaines contraintes est employée. Le critère de minimisation est défini à la section suivante et les contraintes sont spécifiées pour chaque cas.

6.1.2. Calcul des erreurs d'estimation

Afin de pouvoir comparer les performances d'estimation des modèles et d'optimiser leur fiabilité, trois méthodes de calcul des erreurs d'estimation sont présentées. Les deux premières sont utilisées pour quantifier et qualifier les performances des modèles alors que la troisième méthode est utilisée pour minimiser l'erreur d'estimation.

6.1.2.1. Erreur relative moyenne

L'erreur relative moyenne (ERM) génère une valeur en pourcentage représentant l'erreur moyenne d'estimation. L'erreur relative de chaque culture est tout d'abord calculée selon :

$$e_k = \frac{\sum_{i=1}^{j} \left| v_{e,i} - v_{m,i} \right|}{\sum_{i=1}^{j} v_{m,i}} \qquad 6.1$$

où i représente l'échantillon, j, le nombre d'échantillons, k, la culture, $v_{e,i}$ et $v_{m,i}$, les variables estimées et mesurées à l'échantillon i. L'ERM est obtenue en faisant la moyenne des erreurs relatives des cultures :

$$e_{moy} = \frac{\sum_{k=1}^{L} e_k}{L} * 100\% \qquad 6.2$$

où L représente le nombre de cultures étudiées. L'avantage de cette méthode est qu'elle exprime un pourcentage, ce qui donne une idée rapide de l'importance de l'erreur.

6.1.2.2. Coefficient de détermination multiple empirique

Le coefficient de détermination multiple empirique (CDME) qualifie la capacité du modèle d'effectuer des régressions sur plusieurs tests indépendants. De manière similaire au coefficient de régression linéaire r^2, le CDME ne peut être appliqué qu'à un seul essai ou à un ensemble d'essais regroupés indistinctement en un lot de résultats. Le CDME est obtenu par l'équation suivante :

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^{j} \left(v_{e,i} - v_{m,i}\right)^2}{\sum_{i=1}^{j} \left(v_{m,moy} - v_{m,i}\right)^2} \qquad 6.3$$

où $v_{m,moy}$ représente la valeur moyenne de la variable mesurée. Cette technique présente comme principal avantage, une bonne sensibilité mathématique. Toute déviation de la courbe d'estimation des points expérimentaux se fait sentir significativement sur cet indice de corrélation.

Le CDME donne une meilleure idée de la qualité de la corrélation à haute précision, alors que l'ERM est plus significative lorsque les courbes s'éloignent l'une de l'autre. Le coefficient moyen est obtenu par la moyenne mathématique des coefficients de chaque culture.

6.1.2.3. Carré pondéré des erreurs

Le carré pondéré des erreurs (CPE) est utilisé comme critère de minimisation simultanée des erreurs d'estimation de la biomasse sèche et de la concentration cellulaire. Le carré des erreurs d'une variable estimée pour une culture s'obtient par l'équation 6.4.

$$e_v^2 = \sum_{i=1}^{j} \left(v_{e,i} - v_{m,i}\right)^2 \qquad 6.4$$

Lorsque le carré de l'erreur doit être compilé pour plus d'une culture, le carré de chaque culture est pondéré par le nombre d'échantillons de cette culture afin d'éviter que les expériences échantillonnées plus fréquement n'aient un poids plus important dans le processus d'optimisation.

$$e_{Pv}^2 = \sum_{k=1}^{L} \left(\frac{\sum_{i=1}^{j} \left(v_{e,i} - v_{m,i}\right)^2}{j} \right) \qquad 6.5$$

De la même manière, il est facile de compiler le carré des erreurs simultanément pour différentes variables selon l'équation 6.5. Par la suite, le carré total des erreurs est calculé en additionnant le carré pondéré de chaque culture pondéré pour chaque variable:

$$e_{PP}^2 = WE_{Pv}^2 \qquad 6.6a$$

où

$$E_{Pv}^{2\ T} = \begin{bmatrix} e_{P1}^2 & e_{P2}^2 & \dots & e_{P(n-1)}^2 & e_{Pn}^2 \end{bmatrix} \qquad 6.6b$$

$$W = \begin{bmatrix} w_1 & 0 & \dots & 0 & 0 \\ 0 & w_2 & \dots & 0 & 0 \\ \dots & \dots & & \dots & \dots \\ 0 & 0 & \dots & w_{n-1} & 0 \\ 0 & 0 & \dots & 0 & w_n \end{bmatrix} \qquad 6.6c$$

Les gains de pondération w_q sont définis par l'inverse du carré de la moyenne des valeurs mesurées pour chaque variable.

$$w_q = v_{q,moy}^{-2} \qquad 6.6d$$

Dans le cas présent, la minimisation de l'erreur d'estimation est faite sur la concentration en biomasse sèche et la concentration cellulaire. Le système 6.6 devient donc

$$e_{PP}^2 = \begin{bmatrix} w_x & 0 \\ 0 & w_c \end{bmatrix} \begin{bmatrix} e_{Px}^2 \\ e_{Pc}^2 \end{bmatrix} \qquad 6.7$$

Afin d'éviter un amenuisement numérique du carré total des erreurs pouvant créer des problèmes de convergence, l'équation précédente est normalisée pour la concentration en biomasse sèche :

$$e_{PPN}^2 = \begin{bmatrix} 1 & 0 \\ 0 & w_c w_x^{-1} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} e_{Px}^2 \\ e_{Pc}^2 \end{bmatrix} \qquad 6.8$$

Le système 6.8 est utilisé pour minimiser simultanément les erreurs d'estimation de la biomasse sèche et de la concentration cellulaire.

6.2. Modèle massique non ségrégué

Le modèle massique non ségrégué est implanté dans MatLab et la croissance de cultures opérées sous différentes conditions est simulée.

6.2.1. Estimation des paramètres et généralisation

Les constantes des cinétiques de croissance de biomasse et de prolifération cellulaire sont déterminées à l'aide des résultats expérimentaux de 14 cultures, de manière à minimiser l'erreur d'estimation des variables de croissance. L'utilisation de plusieurs cultures différentes représente un élément clé de ce projet de recherche qui permet de généraliser le modèle.

La croissance de la biomasse sèche du modèle massique non ségrégué est indépendante de la prolifération cellulaire. Les constantes de la cinétique de croissance sont donc déterminées en premier lieu de manière à minimiser l'erreur d'estimation de la biomasse sèche à l'aide de l'équation 6.5. Celle-ci est aussi utilisée à l'étape subséquente lors de laquelle l'erreur d'estimation de la concentration cellulaire est minimisée à l'aide des constantes de la cinétique de prolifération cellulaire. La forme du modèle massique non ségrégué ne permet que de prédire la phase de croissance exponentielle. L'erreur d'estimation n'est donc comptabilisée qu'entre le début de la culture et le moment où il y a arrêt de croissance. Les résultats de simulation pour chacune des cultures utilisées sont illustrés à l'annexe H.

Les valeurs des paramètres obtenues par minimisation des erreurs d'estimation des variables de croissance sont présentées au Tableau 6.1.

Tableau 6.1 : Constantes des cinétiques du modèle massique non ségrégué

Paramètre	Valeur	Source	Paramètre	Valeur	Source
μ_c*	0.013 h^{-1}	simulations	μ_x*	0.029 h^{-1}	simulations
$K_{c,po4e,1}$	73 mM	simulations	$K_{x,po4e,1}$	2.0 mM	simulations
$K_{c,po4e,2}$	-0.64	simulations	$K_{x,po4e,2}$	0.15	simulations
$K_{c,no3e,1}$	48 mM	simulations	$K_{x,no3e,1}$	1.1 mM	simulations
$K_{c,no3e,2}$	1.7	simulations	$K_{x,no3e,2}$	0.16	simulations
$K_{c,nh4i,1}$	1124 mM	simulations	$K_{x,nh4i,1}$	2.0 mM	simulations
$K_{c,nh4i,2}$	-0.20	simulations	$K_{x,nb4i,2}$	0.22	simulations
K_g	1 g L^{-1}	fixée (échelon)			
K_{po4i}	0.01 mM	fixée (échelon)			
K_{nti}	0.2 mM	fixée (échelon)			

L'erreur relative moyenne (ERM) d'estimation de la biomasse sèche est de 14 %, ce qui correspond à un coefficient de détermination multiple empirique (CDME) de 0.63. La Figure 6.1 présente les valeurs de ces deux paramètres pour les cultures utilisées lors de l'ajustement des paramètres du modèle.

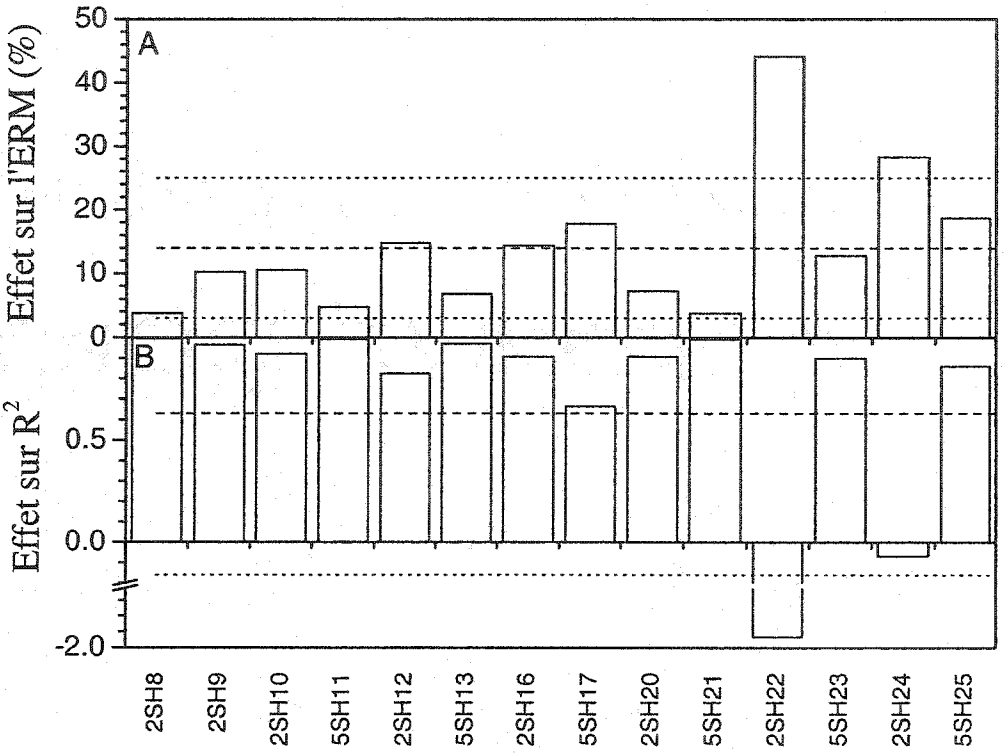


Figure 6.1 : ERM et CDME sur la biomasse sèche, obtenus pour chaque culture lors de l'ajustement du modèle massique non ségrégué. ----- moyenne, ····· ± 1 écart-type.

Les cultures 2SH22 et 2SH24 sont grandement responsables des erreurs d'estimation de la biomasse. En effet, l'ERM et le CDME passent à 10 % (-4 %) et 0.91 (+0.27) respectivement lorsque ces cultures n'entrent pas dans les calculs. Ces variations, de même que l'erreur résiduelle du modèle, peuvent être causées par différents facteurs externes non considérés par le modèle de croissance tel que la qualité et l'âge de l'inoculum, la qualité du milieu de culture, la concentration des autres nutriments,

l'état physiologique cellulaire, etc. L'utilisation de protocoles expérimentaux rigoureux permet de limiter les variations majeures sans toutefois les éliminer.

Les erreurs sur la concentration cellulaire sont de 20 % pour l'ERM et de 0.56 pour le CDME. Ceux-ci sont présentés à la Figure 6.2 pour chacune des cultures utilisées.

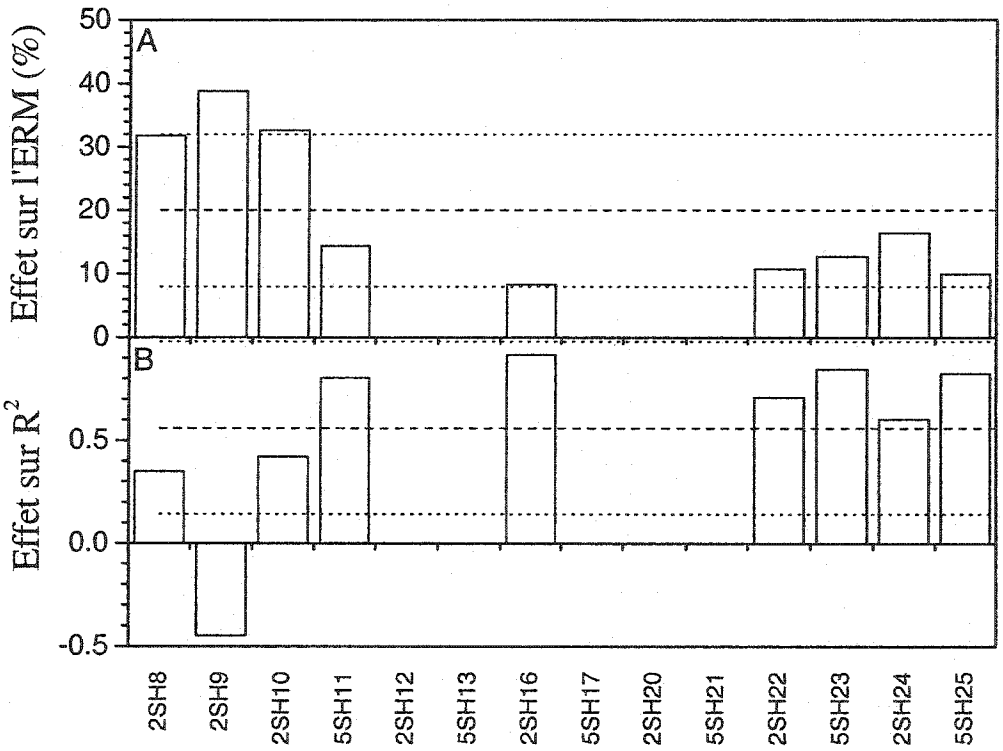


Figure 6.2 : ERM et CDME sur la concentration cellulaire, obtenus pour chaque culture lors de l'ajustement du modèle massique non ségrégué. ----- moyenne, ····· ± 1 écart-type.

Les 3 premières cultures amplifient l'erreur d'estimation de la concentration cellulaire, particulièrement la culture 2SH9. En retirant cette dernière culture, l'ERM et le CDME passent à 17 % (-3 %) et 0.68 (+0.12) respectivement puis à 12 % (-8 %) et 0.78 (+0.22) si 2SH8 et 2SH10 sont aussi retirées. La concentration cellulaire est sensible à l'efficacité enzymatique, à l'échantillonnage, aux nombreuses manipulations effectuées sur l'échantillon, au temps de mise en solution, à la qualité des enzymes utilisées, à l'expérimentateur, etc.

6.2.2. Analyse de sensibilité des paramètres

Afin de déterminer l'importance relative de chaque paramètre du modèle, leurs valeurs sont modifiées de ±50 % et leur impact sur l'erreur d'estimation est obtenu par simulation. La Figure 6.3 présente la variation maximale résultantes pour l'ERM et le CDME sur l'estimation de la biomasse sèche.

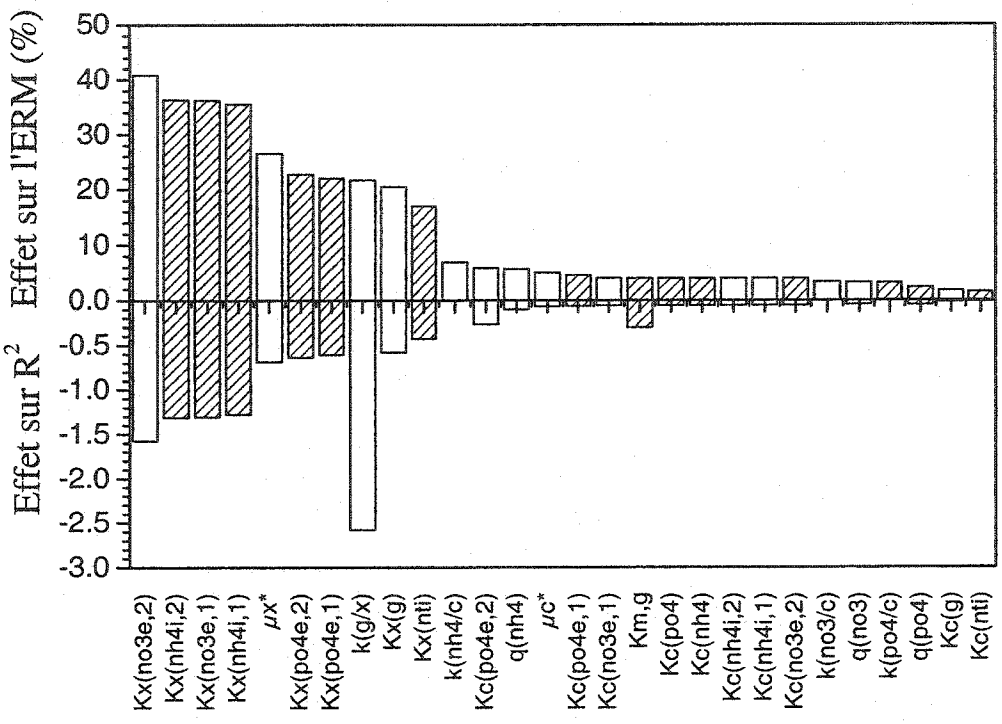


Figure 6.3 : Effets maximum d'une variation de 50 % des paramètres du modèle massique de croissance non ségrégué sur l'estimation de la biomasse sèche. ☐ variation provenant de –50 %, ▨ variation provenant de +50 %.

Les paramètres du taux de croissance de la biomasse (μ_x* et K_x) et la constante de rendement en glucides ($k_{g/x}$) affectent principalement la qualité d'estimation de la croissance de la biomasse. L'impact des paramètres du taux de croissance s'explique par l'accumulation rapide des erreurs produite par la forme exponentielle de la croissance de la biomasse. La valeur de ces paramètres est déterminée en minimisant

le carré de l'erreur d'estimation du modèle ce qui diminue leur impact sur la précision du modèle dans sa forme finale.

L'impact important de la constante de rendement en glucides sur la précision d'estimation du modèle, particulièrement sur le CDME, provient du fait qu'il s'agit d'une constante minimale de rendement en glucides. Ce paramètre varie en fonction de la concentration en glucides dans le milieu de culture selon les résultats présentés à la section 4.1. Or, en variant uniquement la constante minimale sans ajuster la constante de Jerusaliwski qui lui est associée, son impact devient important. En outre, le changement de la valeur de cette constante provoque l'arrêt prématuré ou le prolongement indu de la phase de croissance en biomasse sèche ce qui affecte directement la qualité de description (prédiction) du modèle. L'impact des autres paramètres est moindre que celui des paramètres discutés plus haut.

La Figure 6.4 présente la variation maximale obtenue pour l'ERM et le CDME sur l'estimation de la concentration cellulaire.

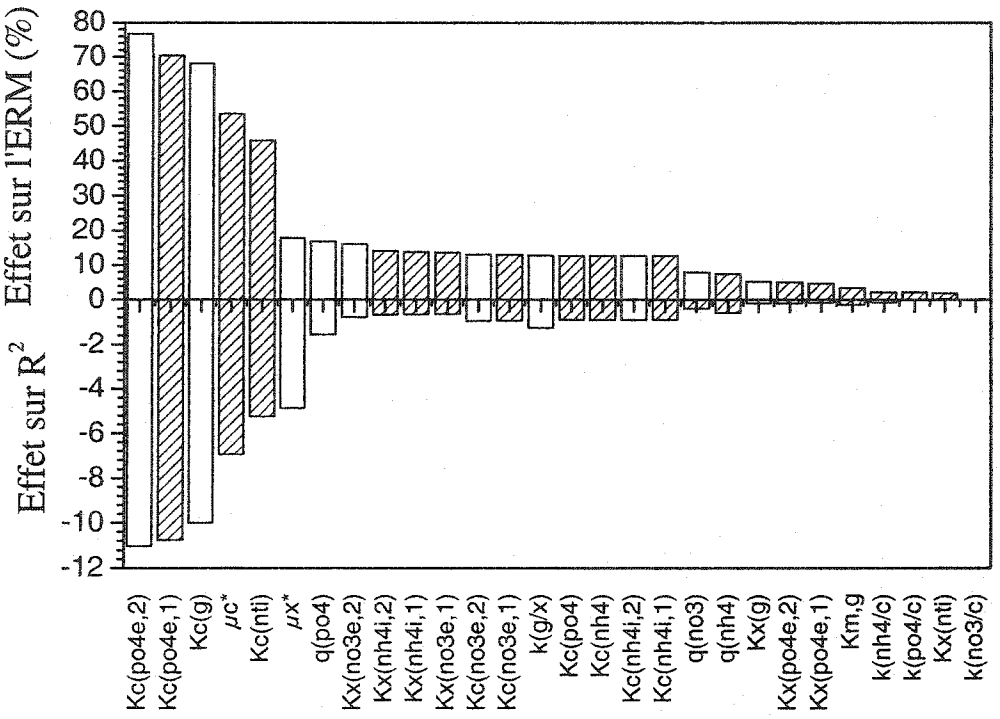


Figure 6.4 : Effets maximum d'une variation de 50 % des paramètres du modèle de croissance sur l'estimation de la concentration cellulaire. ☐ variation provenant de –50 %, ▨ variation provenant de +50 %.

Comme précédemment, les paramètres qui influençent le plus l'estimation de la concentration cellulaire sont ceux du taux de prolifération cellulaire. Cependant, leur impact est beaucoup plus grand (70 % à 80 % d'erreur supplémentaire comparé à 30 % à 40 % précédemment pour l'ERM et –4 à –12 comparé à –1 à –3 pour le CDME). La précision des estimations des profils de concentration cellulaire est donc largement affectée par les valeurs des paramètres de la cinétique de prolifération cellulaire. Le

taux d'absorption en phosphate se fait ensuite sentir par son impact sur la concentration extracellulaire en phosphate qui influencent la cinétique de prolifération. Par la suite, les paramètres de la cinétique de croissance en biomasse affectent la prolifération cellulaire par l'assimilation nutritionnelle qui est fonction de la concentration en biomasse et qui influence la cinétique de prolifération.

6.2.3. Validation

Le modèle massique de croissance non ségrégué est validé au moyen cultures autres que celles utilisées pour son développement afin de vérifier sa généralisation. Les trois cultures simulées, dont les résultats sont illustrés à l'annexe I, furent alimentée en continu avec 3 ou 4 solutions nutritionnelles alors que le modèle fut développé avec des cultures en cuvée ou alimentées avec un seul nutriment.

La Figure 6.5 compare les erreurs d'estimation de la biomasse sèche pour ces trois cultures. L'estimation de la concentration en biomasse des cultures 2SH35 et 2SH37 est décrite par le modèle avec des ERM de 17 % et 15 % et des CDME de 0.78 et 0.76 respectivement.Les erreurs obtenus sont plus grande (28 % et 0.64) pour la culture 2SH40. Ceci est provoquée par une croissance soudaine vers 160 h. Le profil est rejoint par le modèle vers 380 h (Figure I.3).

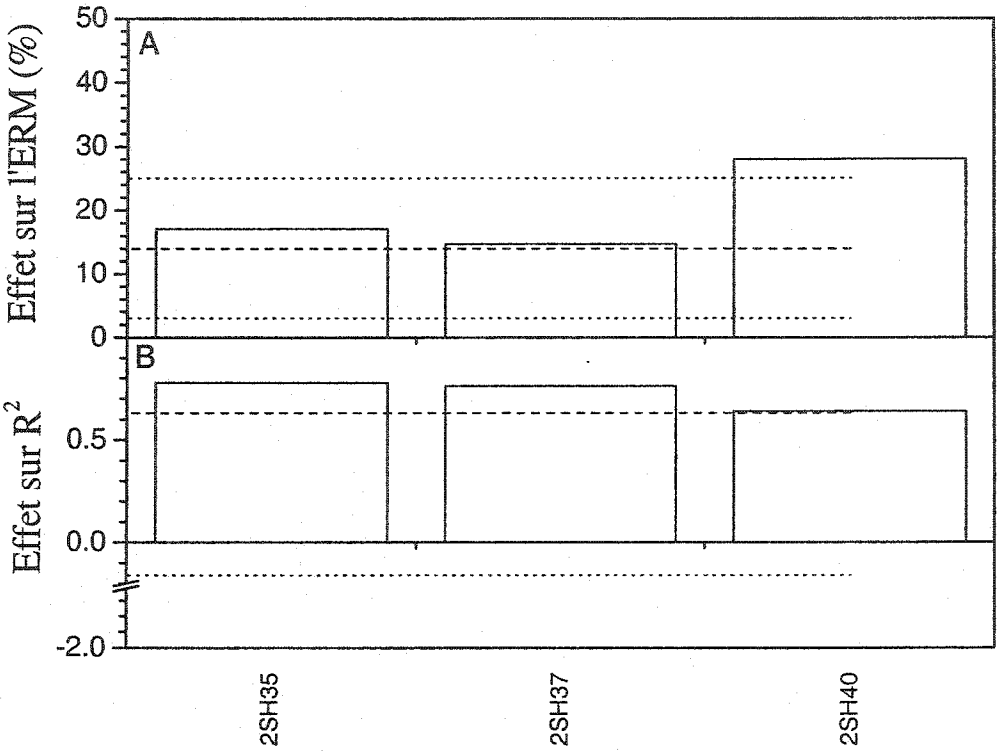


Figure 6.5 : **ERM et CDME sur la biomasse sèche, obtenus pour les cultures postdéveloppement par le modèle massique non ségrégué. ----- moyenne, ····· ± 1 écart-type.**

Les performances du modèle pour l'estimation de la prolifération cellulaire des 3 cultures alimentées sont supérieures à la moyenne des précédentes cultures (Figure 6.6). Ces résultats confirment la généralisation du modèle massique de croissance non ségrégué et sa capacité à prédire le comportement de cultures opérées différemment que celles utilisées lors de son développement.

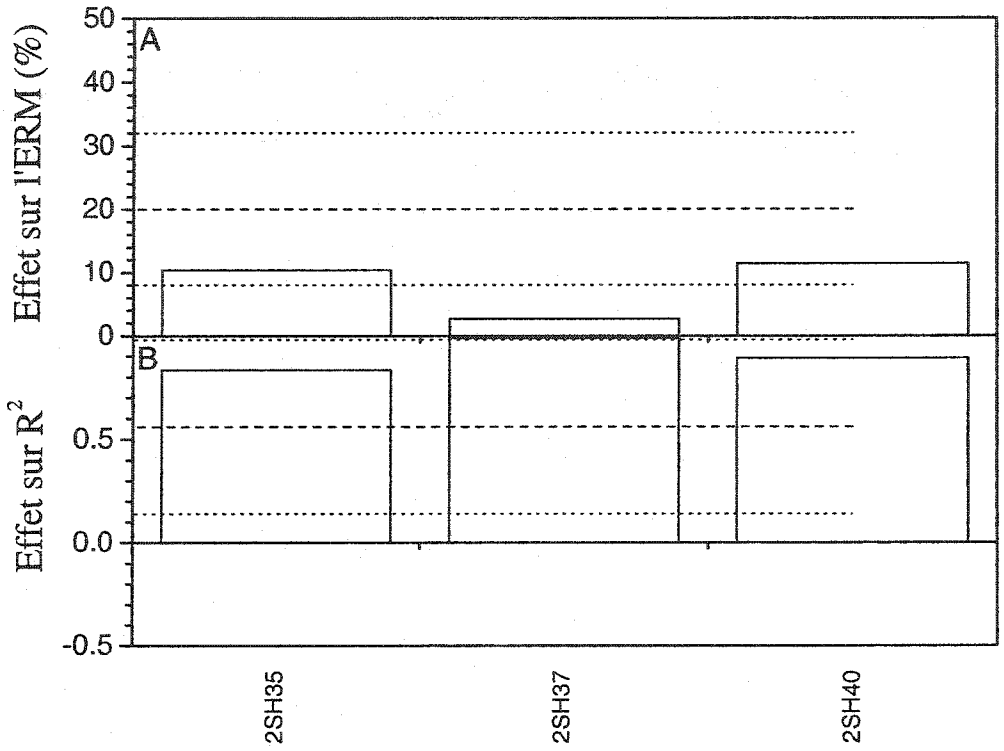


Figure 6.6 : **ERM et CDME sur la concentration cellulaire obtenus pour les cultures postdéveloppement par le modèle massique non ségrégué. ----- moyenne, ····· ± 1 écart-type.**

6.3. Modèle physiologique massique

La même procédure d'ajustement et de validation que précédemment est utilisée pour le modèle physiologique massique. En plus, une expérience réalisée en flacons est présentée pour tenter de valider l'hypothèse de base de ségrégation.

6.3.1. Estimation des paramètres et généralisation

Pour généraliser le modèle physiologique massique, les constantes des cinétiques d'expansion, de division et de mortalité sont déterminées au moyen des 14 cultures de développement. L'équation 6.8 est utilisée pour minimiser simultanément les erreurs d'estimation de ces deux variables de croissance intimement liées. Contrairement au modèle non ségrégué, le modèle physiologique massique couvre toutes les phases de la croissance cellulaire. Les erreurs d'estimation calculées résultent donc de prédictions qui couvrent l'ensemble des culture. Les résultats de ces simulations sont présentés à l'annexe J.

Les valeurs des paramètres des cinétiques qui minimisent les erreurs d'estimation des variables de croissance sont présentées au Tableau 6.2. La valeur de la masse cellulaire minimale caractérisant l'ensemble des cultures est de 1.43 ng.

Tableau 6.2 : Constantes des cinétiques du modèle physiologique massique

Paramètre	Valeur	Source	Paramètre	Valeur	Source
μ_{α}*	0.060 h^{-1}	simulations	μ_{exp}*	0.020 h^{-1}	simulations
$K_{\alpha,po4e,1}$	90.0 mM	simulations	$K_{exp,po4e,1}$	1.8 mM	simulations
$K_{\alpha,po4e,2}$	-0.42	simulations	$K_{exp,po4e,2}$	0.16	simulations
$K_{\alpha,no3e,1}$	74.0 mM	simulations	$K_{exp,no3e,1}$	4.0 mM	simulations
$K_{\alpha,no3e,2}$	-0.92	simulations	$K_{exp,no3e,2}$	0.18	simulations
$K_{\alpha,nh4i,1}$	1140 mM	simulations	$K_{exp,nh4i,1}$	2.3 mM	simulations
$K_{\alpha,nh4i,2}$	-0.21	simulations	$K_{exp,nh4i,2}$	0.27	simulations
$\mu_{\gamma,bb}$*	1.8 x 10^{-3} h^{-1}	simulations	$\theta_{m,a}$	0.0050 h^{-1}	simulations
$K_{\gamma,po4}$	0.050 mM	simulations	$\theta_{m,bb}$	0 h^{-1}	simulations
$K_{\gamma,nh4}$	0.16 mM	simulations	$\theta_{m,cc}$	0.013 h^{-1}	simulations
K_g	1.0 g L^{-1}	fixée (échelon)			
K_{po4i}	0.010 mM	fixée (échelon)			
K_{nti}	0.20 mM	fixée (échelon)			

L'ERM global d'estimation de la biomasse sèche est de 15 % avec un CDME de 0.83. La Figure 6.7 compare la valeur de ces deux paramètres pour chaque culture utilisée lors de la quantification des paramètres des cinétiques de croissance. L'ERM est accrue significativement pour les cultures 2SH16 et 5SH23. Le CDME est plutôt abaissé par les cultures 2SH22 et 5SH23. En retirant ces cultures du calcul de l'indice concerné, les valeurs de l'ERM et du CDME passent respectivement à 13 % (-2 %) et 0.89 (+0.06).

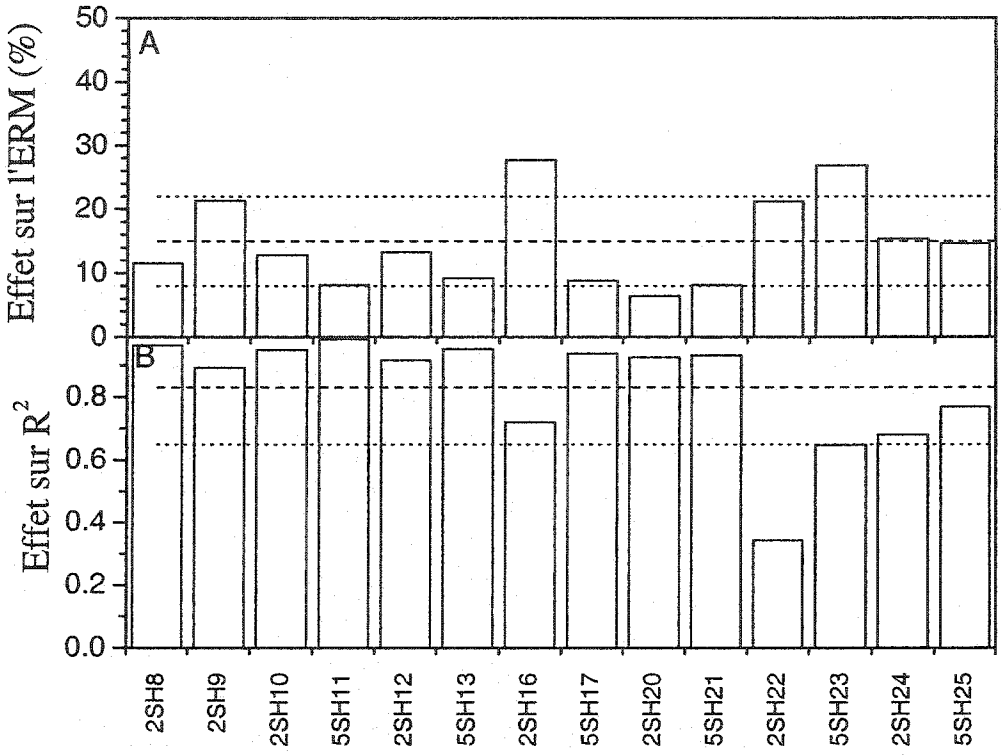


Figure 6.7 : ERM et CDME sur la biomasse sèche, obtenus pour chaque culture lors de l'ajustement du modèle physiologique massique. ----- moyenne, ····· ± 1 écart-type.

L'ERM et le CDME obtenus suite à la phase de minimisation sont de 17 % et 0.67 respectivement pour la prédiction de la prolifération cellulaire. La Figure 6.8 présente la valeur de ces indices pour chacune des cultures utilisées. L'erreur est partagée entre toutes les cultures.

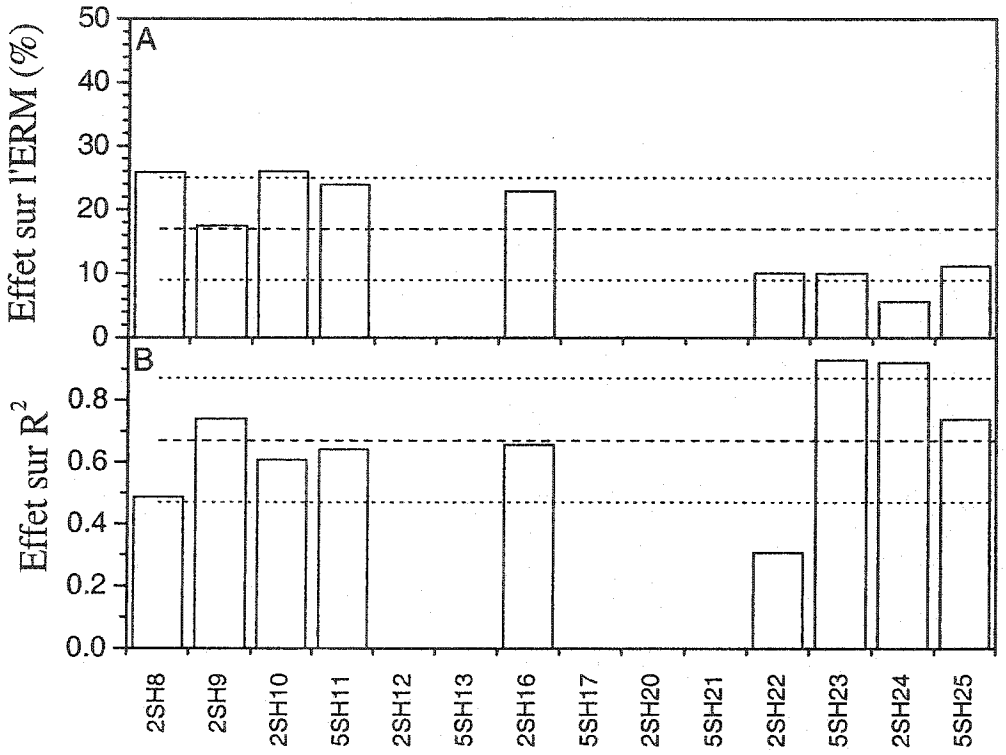


Figure 6.8 : ERM et CDME sur la concentration cellulaire obtenus pour chaque culture lors de l'ajustement du modèle physiologique massique. ----- moyenne, ····· ± 1 écart-type.

L'estimation conjointe des deux variables de croissances induit une source de variation supplémentaire dans le modèle. En effet, la concentration cellulaire est déduite des concentrations des trois types de biomasses sèches. La minimisation de l'erreur d'estimation d'une des deux variables de croissance entraîne inévitablement une correction semblable (ajustée par la masse cellulaire minimale) sur l'autre variable, qu'elle soit bénéfique ou non pour l'estimation de cette dernière. Les valeurs des

paramètres qui ont été retenues sont donc un compromis de minimisation du carré des erreurs d'estimation des profils des deux variables de croissance.

Il est important de rappeler que ce modèle de croissance permet de prédire le comportement de la croissance durant toutes les phases de culture. Cette amélioration est très significative puisqu'elle permet non seulement de prédire la fin de la phase de croissance exponentielle, mais aussi d'en comprendre la cause et d'évaluer des stratégies d'alimentation pour la relancer. De plus, le comportement des différents types de biomasses suggère fortement l'état physiologique cellulaire, à savoir la tendance des cellules à se diviser ou à s'expanser.

6.3.2. Analyse de sensibilité des paramètres

L'erreur d'estimation maximale de la biomasse sèche résultant d'une modification de ±50 % de la valeur de chaque paramètre du modèle est présentée à la Figure 6.9. Il appert que le modèle physiologique massique est plus stable par rapport aux erreurs de détermination de ses paramètres que le modèle non ségrégué (i.e. les perturbations de ±50 % génèrent des erreurs moins grande). Ainsi, l'augmentation de l'ERM maximale est de 22 % alors qu'elle était de 41 % pour le modèle massique non ségrégué (Figure 6.3). De même, la plus importante diminution du CDME générée par le modèle non ségrégué est de 2.5 (Figure 6.3) alors qu'elle est de moins de 0.90 dans le présent cas.

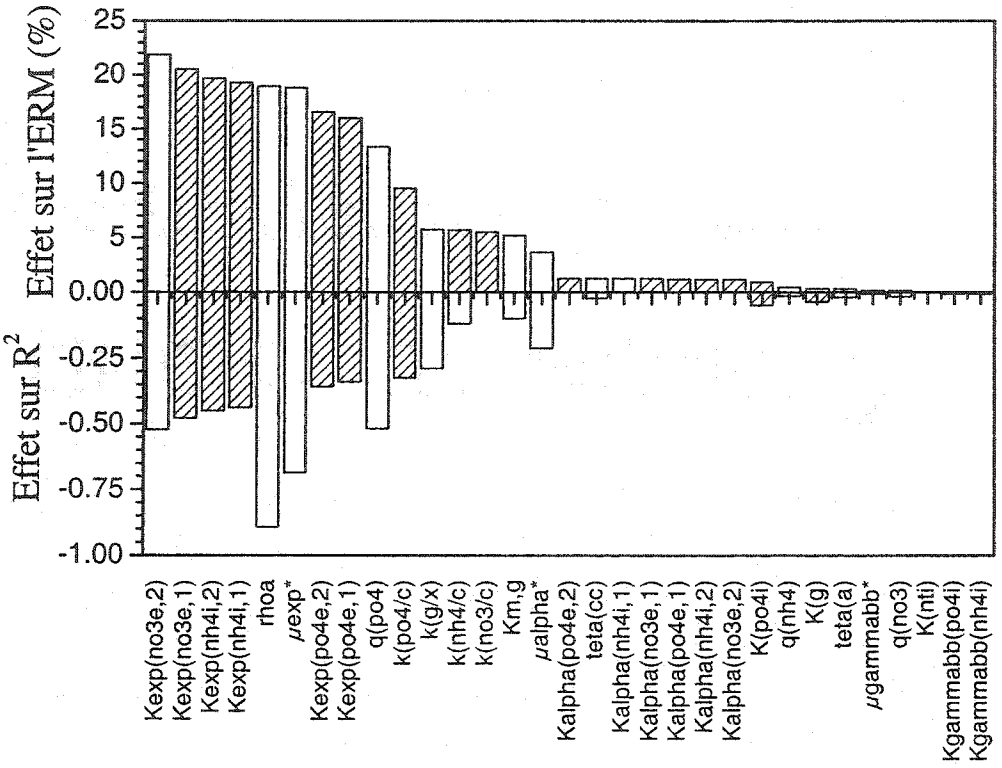


Figure 6.9 : Effets maximum d'une variation de 50 % des paramètres du modèle de croissance physiologique massique sur l'estimation de la biomasse sèche.

☐ variation provenant de –50 %, ▨ variation provenant de +50 %.

La précision du modèle est fortement reliée à la valeur des constantes de la cinétique d'expansion cellulaire. L'impact réel de la valeur de ces paramètres, amplifié par une croissance exponentielle, est diminué puisqu'ils sont déterminés par minimisation du carré de l'erreur d'estimation du modèle. L'imact significatif de l'autre paramètre d'importance majeure, la masse cellulaire minimale, est tout à fait logique puisqu'il fait

le lien entre les différents types de biomasse sèche et la concentration cellulaire. Puisque l'utilisation des nutriments ioniques est proportionnelle à la prolifération cellulaire, cette constante affecte directement les profils de croissance en biomasse sèche. Les autres paramètres ont un impact moindre sur la convergence du modèle physiologique massique comme celui observé pour le modèle massique non ségrégué.

La Figure 6.10 présente les effets maximum sur les erreurs d'estimation de la concentration cellulaire du modèle physiologique massique lors du test d'analyse de sensibilité des paramètres. Les effets maximum sur l'ERM et le CDME sont moindres pour le modèle physiologique massique que pour le modèle massique non ségrégué ce que confirme la plus grande stabilité du premier par rapport aux erreurs de détermination des valeurs de ses paramètres. Cette amélioration est flagrante pour l'estimation de la concentration cellulaire où l'effet maximum se situe sous les 18 %, alors qu'il était de près de 80 % pour le modèle massique non ségrégué (Figure 6.4). De même, l'effet maximum sur le CDME du modèle physiologique massique est passé sous l'unité alors qu'il dépassait la dizaine pour le modèle massique non ségrégué. Comme il fallait s'y attendre, les paramètres influençant l'erreur d'estimation de la concentration cellulaire sont sensiblement les mêmes que ceux pour la biomasse sèche.

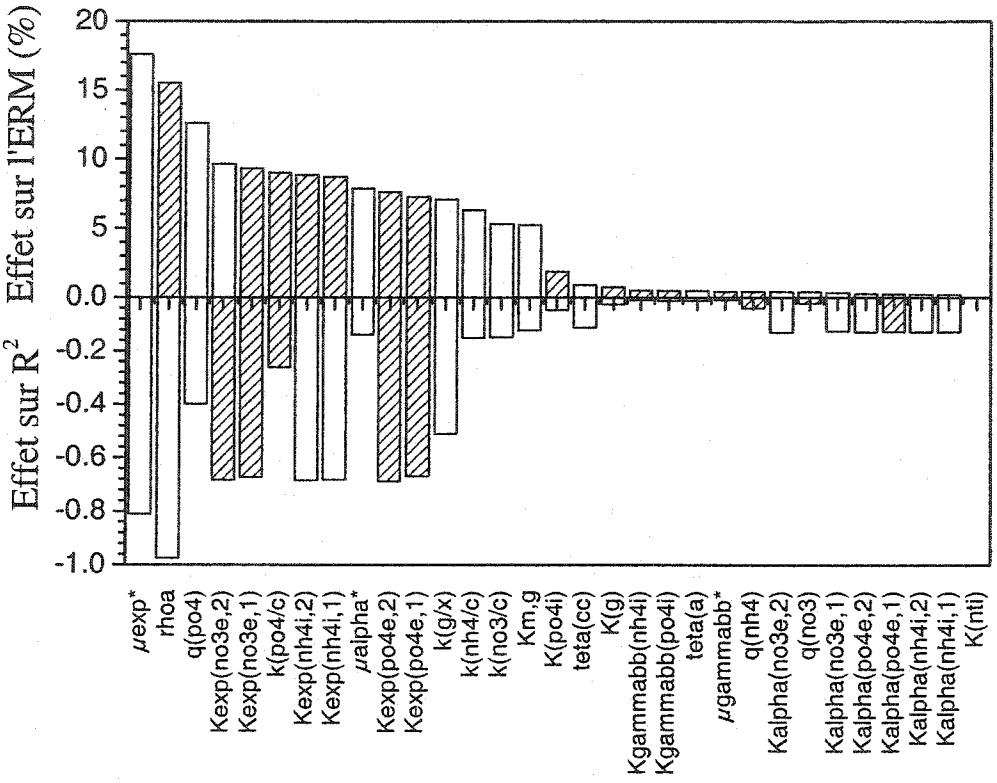


Figure 6.10 : Effets maximum d'une variation de 50 % des paramètres du modèle de croissance physiologique massique sur l'estimation de la concentration cellulaire. ☐ variation provenant de –50 %, ▨ variation provenant de +50 %.

6.3.3. Validation

Le modèle de croissance physiologique massique doit être validé pour sa généralisation et pour sa ségrégation.

6.3.3.1. Généralisation des prédictions

La généralisation du modèle physiologique massique est vérifiée à l'aide des cultures 2SH35, 2SH37 et 2SH40, dont les profils sont présentés à l'annexe K. La Figure 6.11 compare les erreurs d'estimation de la biomasse sèche pour chacune des trois cultures et pour l'erreur moyenne d'estimation du modèle. L'ERM des trois cultures postdéveloppement (12 % à 19 %) se situent près de l'erreur moyenne du modèle (15 %), ce qui confirme sa généralisation.

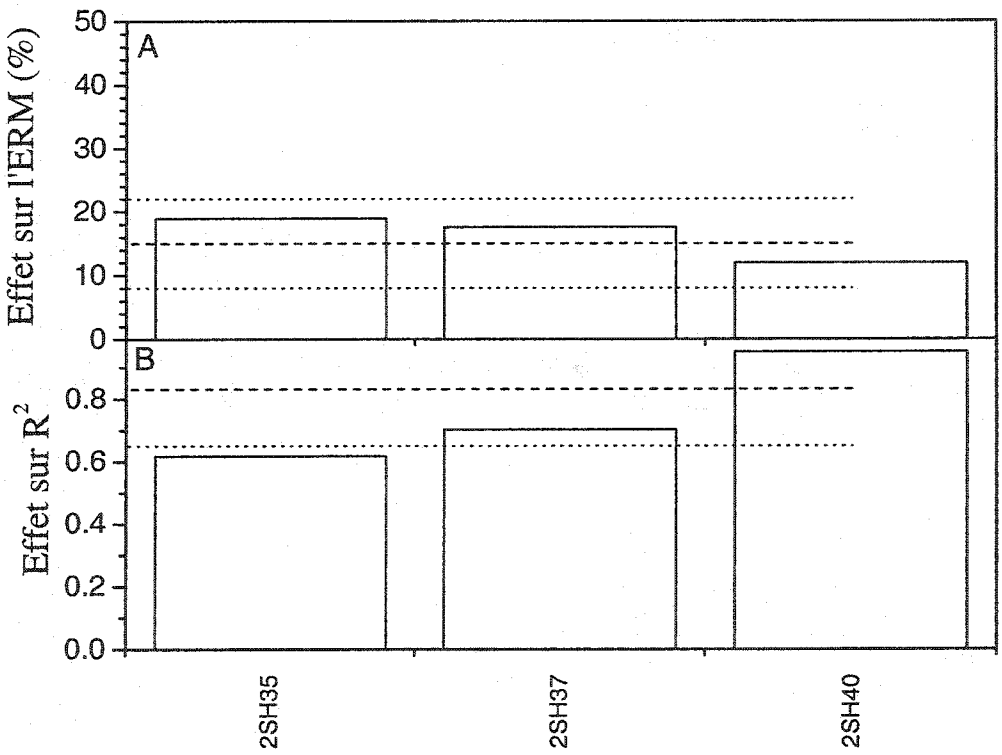


Figure 6.11 : ERM et CDME sur la biomasse sèche, obtenus pour les cultures postdéveloppement par le modèle physiologique massique. ----- moyenne, ····· ± 1 écart-type.

Le CDME des cultures 2SH37 et 2SH40 (0.70 et 0.95) se situent dans la zone normale d'erreurs de prédiction (0.65 à 1.0), alors que la culture 2SH35 présente un coefficient plus faible de 0.60. Selon la figure K.1 (annexe K), il appert que les prédictions des variables de croissance ne sont plus valides à partir de 240 h suite à un arrêt de croissance imprévu. L'étude plus approfondie des variables de cette culture permet d'identifier une limitation nutritionnelle autre que celles modélisées, soit l'ion sulfate (Figure 6.12).

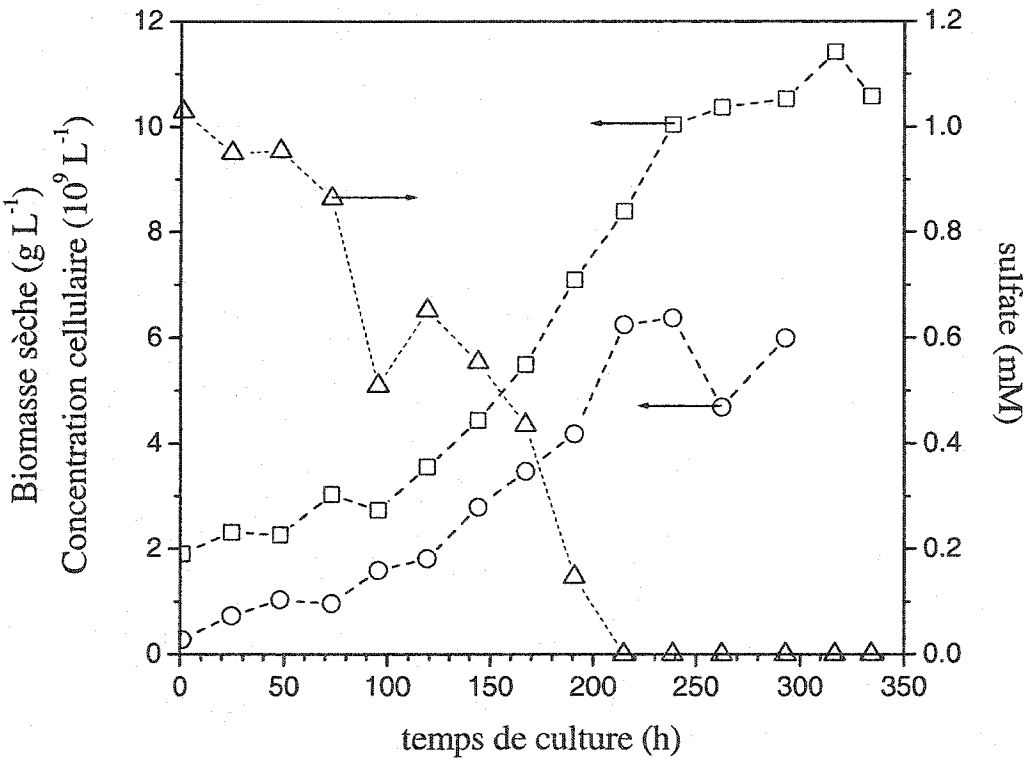


Figure 6.12 : Évolution des variables de croissance et du sulfate lors de la culture 2SH35.

□ biomasse sèche, ○ concentration cellulaire, △ sulfate.

Le CDME est plus sensible à ce genre de situation puisque l'erreur y est cumulée au carré (équation 6.3) contrairement à l'ERM. Cette situation rappelle une propriété importante des modèles mathématiques, soit que leur fiabilité se limite aux variables modélisées et aux conditions environnementales similaires.

les erreurs de prédiction de la prolifération cellulaire (Figure 6.13) des cultures postdéveloppement sont en deçà de l'erreur résiduelle du modèle, à la fois pour l'ERM (4 % à 6 %) et pour le CDME (0.97 à 0.99).

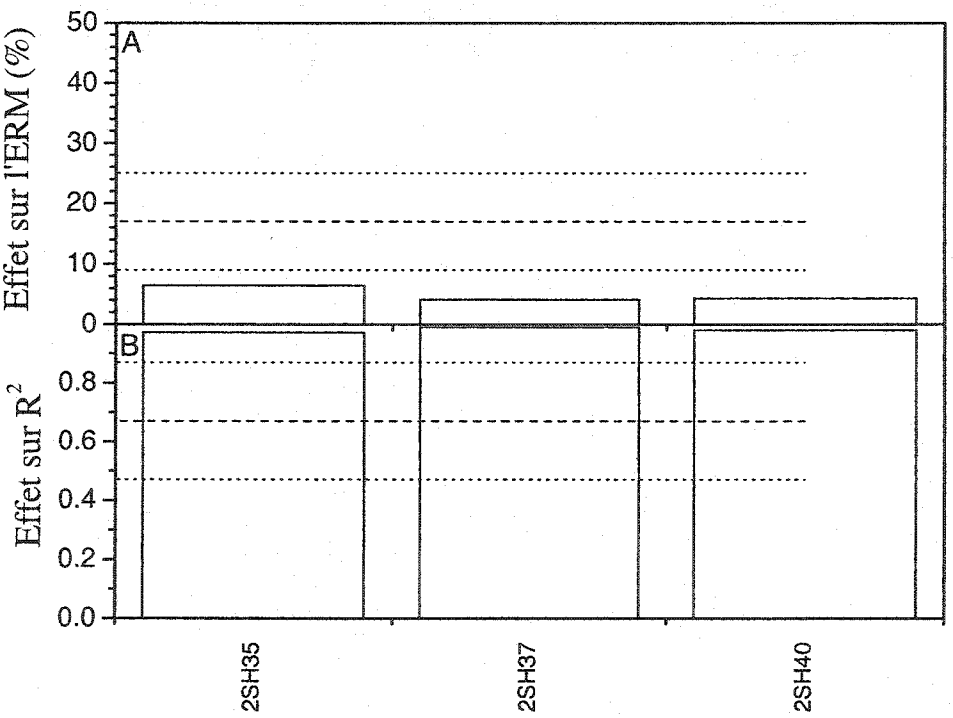


Figure 6.13 : ERM et CDME sur la concentration cellulaire, obtenus pour les cultures postdéveloppement par le modèle physiologique massique. ----- moyenne, ····· ± 1 écart-type.

6.3.3.2. Ségrégation physiologique

La principale hypothèse du modèle physiologique massique repose sur le cycle cellulaire stipulant qu'il existe trois types de cellules, deux expansées et une divisée. Quoique logique en division binaire, il est actuellement très difficile voire impossible de mesurer la concentration ou la proportion de chaque type de cellule. Les observations au microscope confirment la tendance générale de la suspension vers de petites ou de grosses cellules, mais leur quantification demeure trop subjective.

Afin de pallier ces difficultés, une expérience en flacon est réalisée où le modèle lui-même est mis à profit pour valider cette hypothèse de modélisation. Une culture mère inoculée au jour 0 est suivie et utilisée pour inoculer chaque culture fille dont l'évolution est aussi suivie. À la fin de l'expérience, le modèle physiologique massique est utilisé pour prédire le comportement de la culture mère. Les prédictions obtenues pour chaque journée de la culture mère servent ensuite de conditions initiales au modèle physiologique massique appliqué à la prédiction des cultures filles. Si l'hypothèse de base est exacte, les tendances des prédictions de croissance des cultures filles devraient être adéquates lorsque leurs conditions initiales sont imposées par les prédictions de la culture mère.

Les résultats de cette expérience sont présentés à l'annexe L. Ils indiquent que les profils prédits de biomasse sèche et ceux de concentration cellulaire suivent les tendances des résultats expérimentaux jusqu'à l'instant où l'arrêt de croissance est

prédit. Cet arrêt de croissance et de prolifération survient généralement quelques heures trop tôt et est très probablement causé par des variations dans les valeurs de certains paramètres du modèle (e.g. les rendements, les taux maximum de croissance) entre l'environnement utilisé pour développer le modèle (en bioréacteur) et l'environnement expérimental (en flacons).

Toutefois, en ne tenant compte que des 200 premières heures de culture, de manière à éliminer les erreurs de limitation provoquées par un changement de système, la moyenne des erreurs de prédiction des cultures filles et de la culture mère est de 17 % pour l'ERM et de 0.78 pour le CDME pour la biomasse sèche et de 11 % et 0.73 pour la concentration cellulaire. Ces erreurs sont donc semblables à celles du modèle (15±7 % et 0.83±0.18 pour la biomasse sèche, 17±8 % et 0.67±0.20 pour la concentration cellulaire). En outre, les profils de croissance différents des cultures filles pendant les phases de latence et de croissance exponentielle sont adéquatement prédits par le modèle dans les plages des erreurs résiduelles du modèle avec des conditions initiales imposées par les prédictions de la culture mère. Cette expérience suggère donc que l'hypothèse de ségrégation cellulaire du modèle physiologique massique est justifiée.

6.4. Modèle physiologique cellulaire

Le modèle physiologique cellulaire possède la même forme que le modèle physiologique massique à l'exception de l'unité de base. Les paramètres de cinétique sont déterminés au moyen des mêmes procédures que celles utilisées avec le modèle physiologique. Il en va de même pour la procédure de validation du modèle.

6.4.1. Estimation des paramètres et généralisation

Les constantes des cinétiques d'expansion, de division et de mortalité sont déterminées au moyen des 14 cultures de développement afin de généraliser le modèle physiologique cellulaire. Pour ce faire, l'équation 6.8 est utilisée pour minimiser simultanément les erreurs d'estimation de la biomasse sèche et de la concentration cellulaire totale. Les résultats de ces simulations sont présentés à l'annexe M et les valeurs des paramètres obtenues sont résumés au Tableau 6.3.

Tableau 6.3 : Constantes des cinétiques du modèle cellulaire ségrégué et leur valeur

Paramètre	Valeur	Source	Paramètre	Valeur	Source
K_g	1 g L^{-1}	fixée (échelon)	μ_{exp}*	0.020 h^{-1}	simulations
K_{po4i}	0.010 mM	fixée (échelon)	$K_{exp,po4e,1}$	1.8 mM	simulations
K_{nti}	0.20 mM	fixée (échelon)	$K_{exp,po4e,2}$	0.16	simulations
μ_α*	0.060 h^{-1}	simulations	$K_{exp,no3e,1}$	4.0 mM	simulations
$\mu_{\gamma,bb}$*	1.8 x 10^{-3} h^{-1}	simulations	$K_{exp,no3e,2}$	0.18	simulations
$K_{\gamma,po4}$	0.050 mM	simulations	$K_{exp,nh4i,1}$	2.3 mM	simulations
$K_{\gamma,nh4}$	0.16 mM	simulations	$K_{exp,nh4i,2}$	0.27	simulations
$\theta_{m,a}$	0.0050 (cellule) $(cellule)^{-1}$	simulations			
$\theta_{m,bb}$	0 (cellule) $(cellule)^{-1}$	simulations			
$\theta_{m,cc}$	0.030 (cellule) $(cellule)^{-1}$	simulations			

La masse cellulaire minimale caractérisant l'ensemble des cultures est de 1.43 ng, ce qui est cohérant avec celle observée expérimentalement.

L'ERM associée à la prédiction de la croissance de la biomasse sèche est de 15 %, alors que le CDME est de 0.83. La Figure 6.14 compare les valeurs minimales de ces indices pour chaque culture simulée lors de la détermination des valeurs des paramètres des cinétiques.

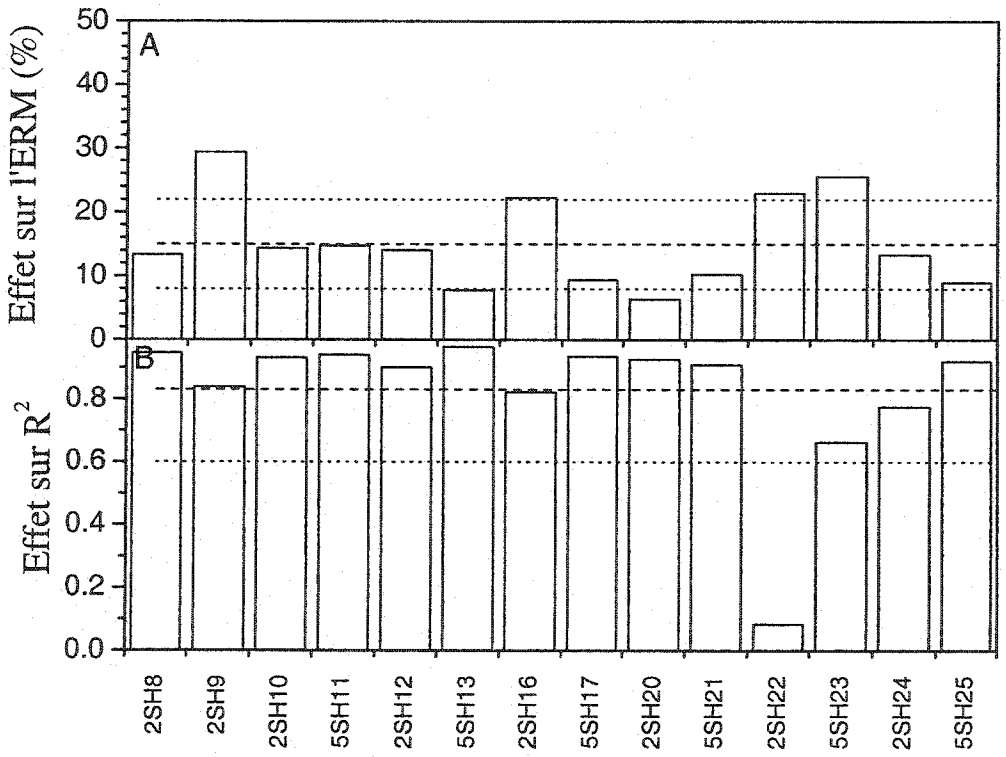


Figure 6.14 : ERM et CDME sur la biomasse sèche, obtenus pour chaque culture lors de l'ajustement du modèle physiologique cellulaire. ----- moyenne, ····· ± 1 écart-type.

Encore une fois, les résultats obtenus présentent moins de variations que dans le cas du modèle massique non ségrégué. L'ERM et le CDME de la prédiction de la prolifération cellulaire sont respectivement de 18 % et 0.65. La Figure 6.15 illustre les résultats obtenus pour chaque culture.

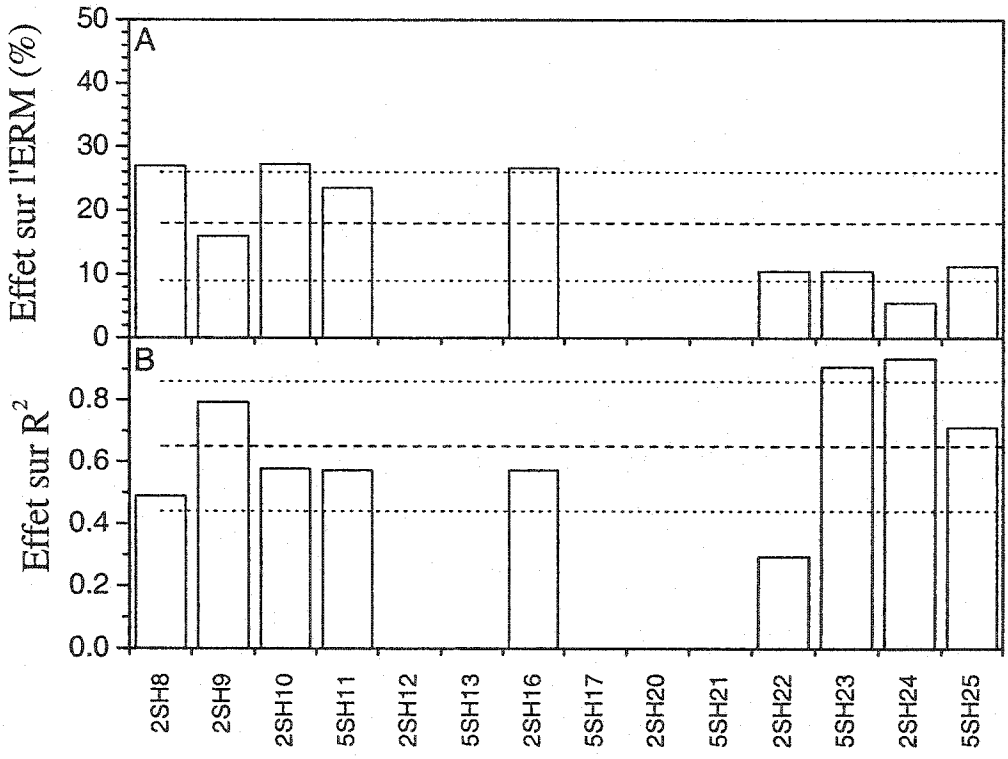


Figure 6.15 : ERM et CDME sur la concentration cellulaire, obtenus pour chaque culture lors de l'ajustement du modèle physiologique cellulaire. ----- moyenne, ····· ± 1 écart-type.

Les mêmes sources d'erreurs identifiées précédemment peuvent affecter la précision du modèle cellulaire. De plus, l'estimation conjointe des deux variables de croissance interdépendantes constitue un compromis entre les estimations optimales de chacune de ces deux variables. Des erreurs d'estimation réduites et donc de meilleures prédictions seraient obtenues si la valeur de la masse cellulaire minimale était déterminée de manière indépendante pour chaque culture. Cependant, le but premier de la phase de modélisation de ce projet est de développer des modèles prédictifs généralisés. Cette option n'a donc pas été retenue pour les présents travaux.

6.4.2. Analyse de sensibilité des paramètres

La Figure 6.16 présente l'erreur d'estimation maximale de la biomasse sèche résultant d'une modification de ±50 % de la valeur de chaque paramètre du modèle physiologique cellulaire. Il apparaît immédiatement que le modèle est de loin plus sensible à la valeur de la masse cellulaire minimale qu'à tout autre paramètre. Toutefois, comme pour les constantes de la cinétique d'expansion qui suivent dans l'ordre d'influence du modèle, la masse cellulaire minimale est déterminée par minimisation de l'erreur conjointe d'estimation des variables de croissance. L'impact de ces paramètres sur la convergence du modèle est donc minimisé.

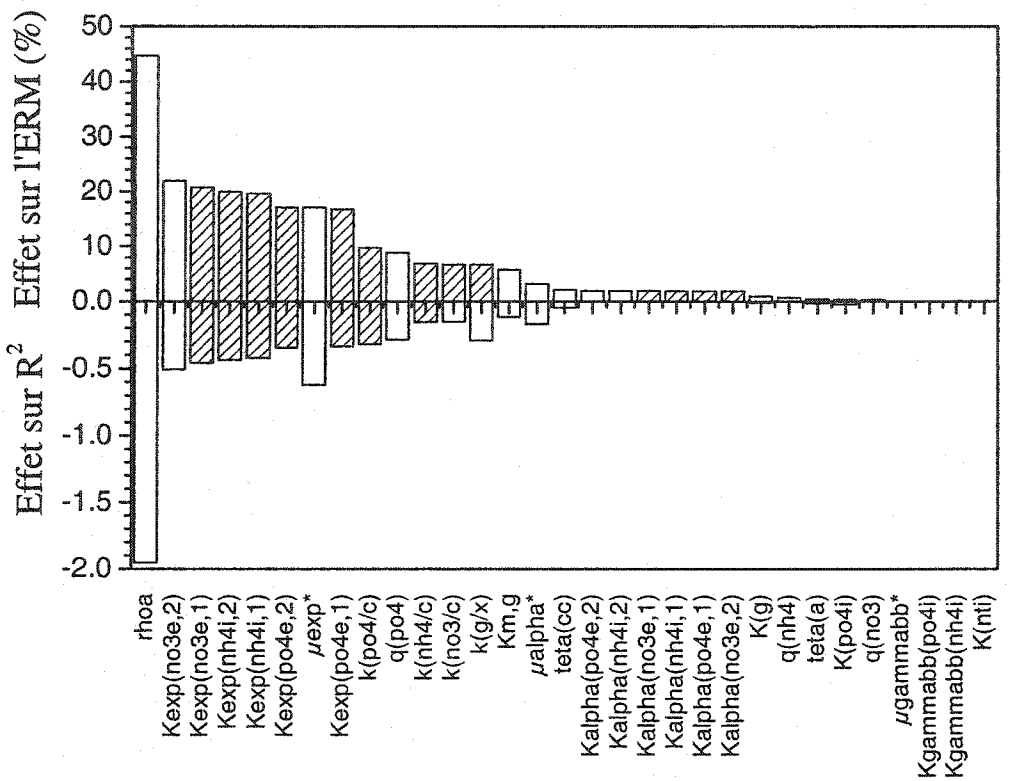


Figure 6.16 : Effets maximum d'une variation de 50 % des paramètres du modèle de croissance cellulaire sur l'estimation de la biomasse sèche. ☐ variation provenant de –50 %, ▨ variation provenant de +50 %.

Il est préférable que les paramètres qui ont un impact significatif sur la stabilité du modèle soient déterminés par minimisation de l'erreur d'estimation plutôt qu'expérimentalement. De cette manière, la divergence du modèle est réduite au minimum admissible imposé par le choix des variables modélisées et la forme mathématique du modèle.

Les erreurs d'estimation maximales de la concentration cellulaire résultant d'une modification de ±50 % de la valeur de chaque paramètre du modèle physiologique cellulaire sont présentées à la Figure 6.17.

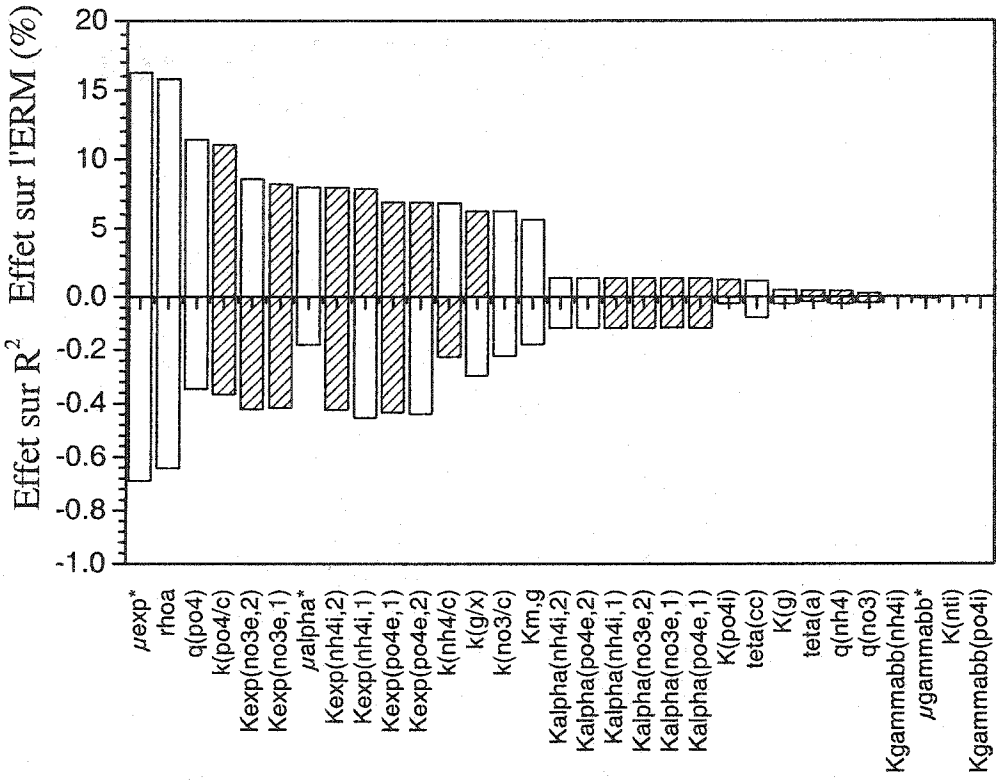


Figure 6.17 : Effets maximum d'une variation de 50 % des paramètres du modèle physiologique de croissance cellulaire sur l'estimation de la concentration cellulaire. ☐ variation provenant de –50 %, ▨ variation provenant de +50 %.

Les paramètres qui influencent principalement la stabilité du modèle sont les mêmes que pour les modèles précédents, mais dans un ordre différant légèrement.

L'importance moindre de la masse cellulaire minimale ici en comparaison avec les prédictions de croissance en biomasse sèche provient de la base de calcul du modèle qui correspond maintenant à la concentration cellulaire. L'estimation de la biomasse dépend donc principalement de cette masse cellulaire minimale.

6.4.3. Validation

Les expériences de validation réalisées pour le modèle physiologique cellulaire sont les mêmes que celles effectuées pour le modèle physiologique massique.

6.4.3.1. Prédiction de cultures postdéveloppement

Les cultures 2SH35, 2SH37 et 2SH40 sont utilisées afin de valider la modèle physiologique cellulaire et les résultats des simulations se trouvent à l'annexe N. Les erreurs d'estimation de la biomasse sèche de chacune des cultures sont représentées à la Figure 6.18 et comparées à l'erreur résiduelle du modèle physiologique cellulaire. L'ERM de même que le CDME des trois cultures se trouvent à moins d'un écart-type de la moyenne du modèle physiologique cellulaire, confirmant ainsi la généralisation de ce modèle.

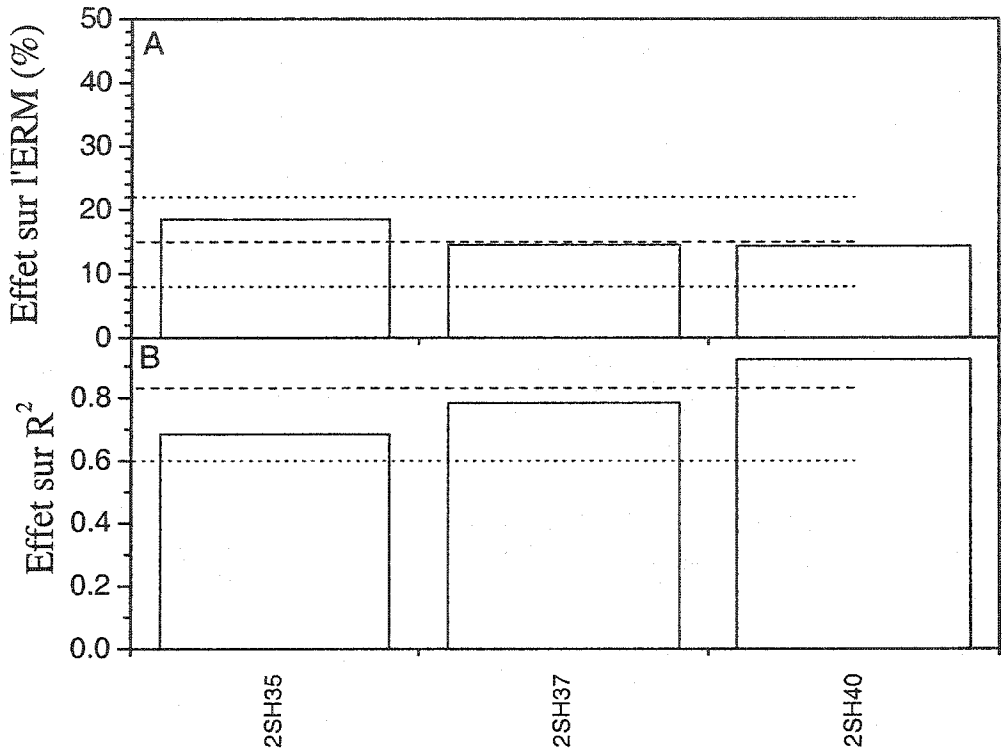


Figure 6.18 : ERM et CDME sur la biomasse sèche, obtenus pour les cultures postdéveloppement par le modèle physiologique cellulaire. ----- moyenne, ····· ± 1 écart-type.

La Figure 6.19 présente les valeurs de l'ERM et du CDME pour les prédictions de la concentration cellulaire. Il s'avère que les estimations générées par le modèle physiologique cellulaire sont précises puisqu'elles se situent entre 3 % et 6 % pour l'ERM et à plus de 0.98 pour le CDME.

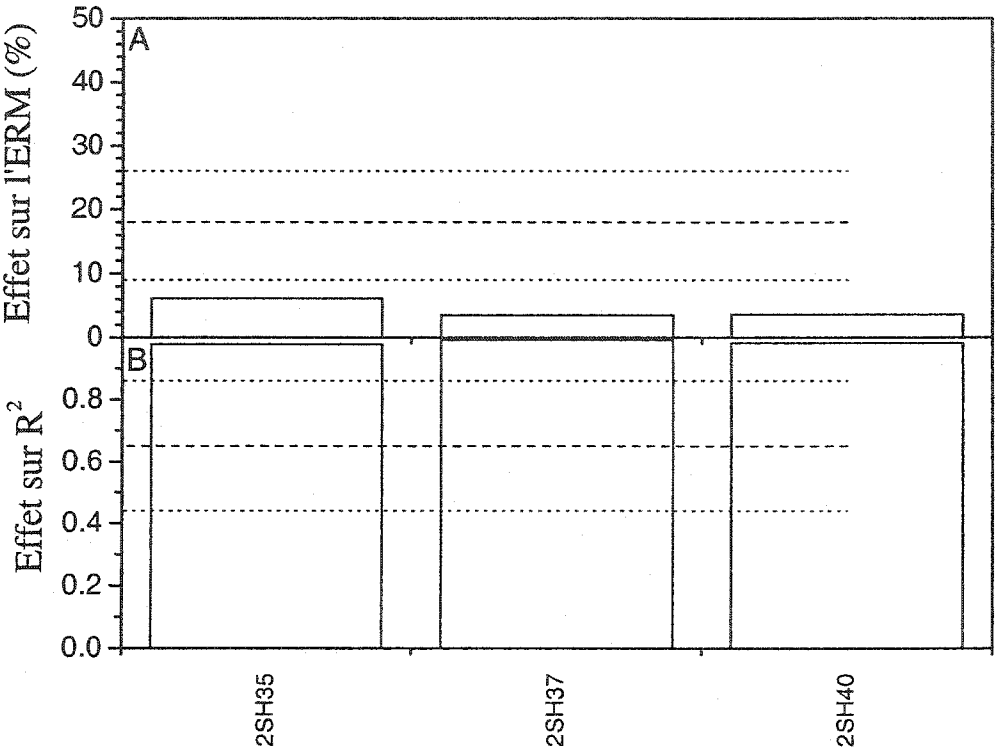


Figure 6.19 : ERM et CDME sur la concentration cellulaire, obtenus pour les cultures postdéveloppement par le modèle cellulaire. ----- moyenne, ····· ± 1 écart-type.

6.4.3.2. Prédiction de cultures mères et de cultures filles

L'hypothèse de base du modèle physiologique cellulaire est très similaire à celle du modèle physiologique massique, mais elle place plutôt la cellule au centre du système biologique en la considérant comme entité de base. Selon cette hypothèse, , il existe trois types de cellules : un type de petites cellules divisées et deux types de grosses cellules prêtes à se diviser. L'expérience décrite pour la validation de la ségrégation du

modèle physiologique massique à la section 6.3.3.2 est donc utilisée pour la validation de la ségrégation du modèle physiologique cellulaire. Dans ce cas-ci cependant, ce sont les prédictions des différents types de cellules de la culture mère qui sont utilisées comme conditions initiales des cultures filles.

Les résultats de ces simulations sont présentés à l'annexe O. Comme dans le cas du modèle précédent, les tendances des profils de biomasse sèche et de concentrations cellulaires suivent les tendances expérimentales. En outre, le modèle cellulaire prédit aussi un arrêt prématuré de la croissance.

De manière à éliminer les erreurs provenant d'un changement de système de culture, les erreurs de simulation sont compilées pendant les 200 premières heures. Les valeurs moyennes des indices de suivi, pour toutes les cultures filles et la culture mère sont de 19 % et 0.76 pour l'ERM et le CDME de la biomasse sèche, alors qu'ils sont de 12 % et 0.68 pour la concentration cellulaire. Ces valeurs sont comprises dans les marges d'erreurs résiduelles du modèle cellulaire (15±7 % et 0.83±0.23 pour la biomasse sèche, 18±9 % et 0.65±0.21 pour la concentration cellulaire). La capacité de ce modèle à reproduire des profils aux allures différentes pour chaque culture fille confirme que l'hypothèse de ségrégation cellulaire de même que le choix de la cellule comme centre du système soient justifiées.

6.5. Comparaison des trois modèles

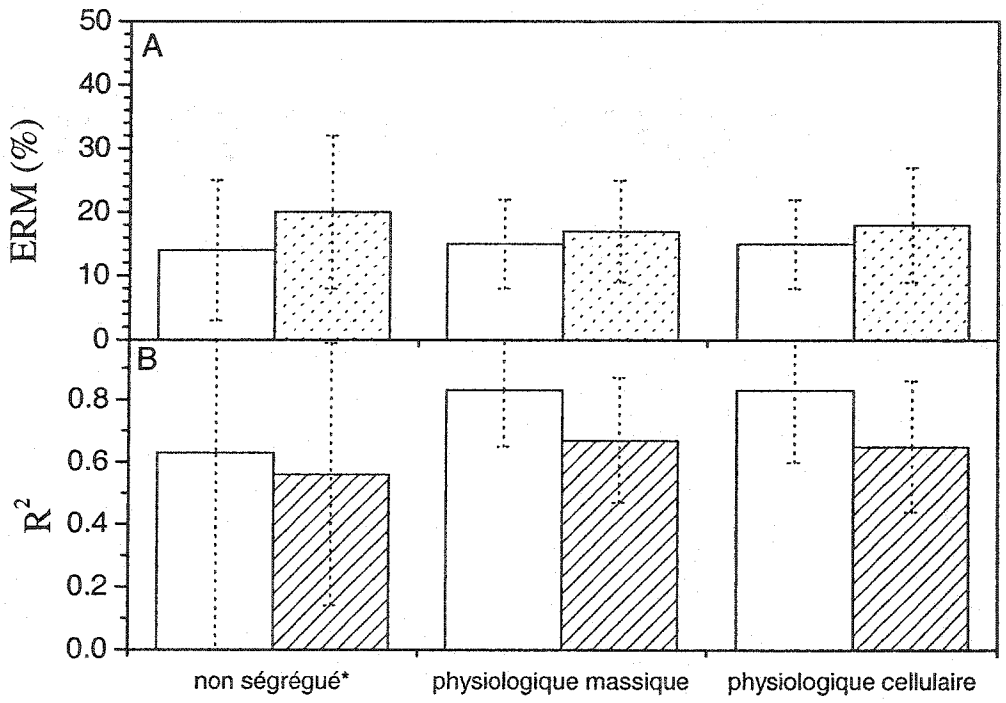
Les trois modèles élaborés au chapitre précédent et analysés dans ce chapitre-ci possèdent des caractéristiques qui leur sont propres et qui influencent leur capacité de prédiction du comportement de cultures de cellules végétales en suspension. Le modèle massique non ségrégué se différencie principalement des deux autres du fait que les deux variables de croissance sont estimées indépendamment. D'autre part, le modèle physiologique massique est basé sur l'évolution de trois types de biomasses alors que le modèle physiologique cellulaire considère la cellule au centre du système de croissance.

6.5.1. Prédiction des profils de croissance et de prolifération

Les trois modèles sont utilisés pour prédire le comportement des mêmes cultures. Les profils comparés de ces trois modèles (annexe P) indiquent que les modèles physiologiques ségrégués possèdent un avantage majeur sur le modèle massique non ségrégué. Ils décrivent entièrement les courbes de croissance, incluant une phase de latence ou même une régression suite à l'inoculation, alors que le modèle ségrégué ne décrit que la phase de croissance exponentielle sans donner aucun indice sur ce qui peut survenir par la suite.

La Figure 6.1 compare les erreurs de suivi (ERM et CDME) pour ces trois modèles. Les modèles physiologiques ségrégués présentent des niveaux d'erreurs comparables au modèle non ségrégué malgré leur description plus étendue des cultures, ce qui est

très positif. De plus, les modèles ségrégués représentent mieux les différents comportements des cultures et sont plus facile à généraliser, ce qui se traduit par un écart-type moindre.



* évalués uniquement sur la période de croissance exponentielle.

Figure 6.20 : Comparaison des indices de prédiction ERM et CDME des trois modèles de croissance. ☐ biomasse sèche, ▨ concentration cellulaire.

6.5.2. Prédiction des concentrations nutritionnelles intracellulaires

Aux annexes H à O, les profils d'estimation des variables de croissance de même que ceux des concentrations extracellulaires en nutriments sont comparés aux résultats expérimentaux. Cependant, aucune mesure expérimentale des concentrations intracellulaires de ces nutriments n'y est rapportée. Une expérience en flacons est donc réalisée de manière à valider les tendances similaires d'estimation des nutriments intracellulaires par les trois modèles de croissance.

Selon les modèles de croissance, les sources d'azote et de phosphate sont consommées rapidement, accumulées puis utilisées au besoin sur une plus longue période. Les nutriments azotés sont le nitrate et l'ammonium. Il est généralement admis qu'ils se trouvent sous diverses formes dans la cellule (section 2.4.2). L'ammonium est fixé à l'acide α-cétoglutarate pour former le glutamate, puis une seconde molécule d'ammonium s'y fixe pour former la glutamine (section 2.4.2.1). Afin d'inclure ces deux dernier composés dans la comparaison des profils nutritionnels intracellulaires mesurés et estimés, la somme des concentrations mesurées de ces composés (et normalisées en fonction de leur contenu en azote, e.g. $[gln]_{i,N} = 2[gln]_i$, $[glu]_{i,N}=[glu]_i$) est comparée à un profil typique de la somme des concentrations intracellulaires en ammonium généré par les modèles. La Figure 6.21 présente les résultats obtenus des cultures en flacons

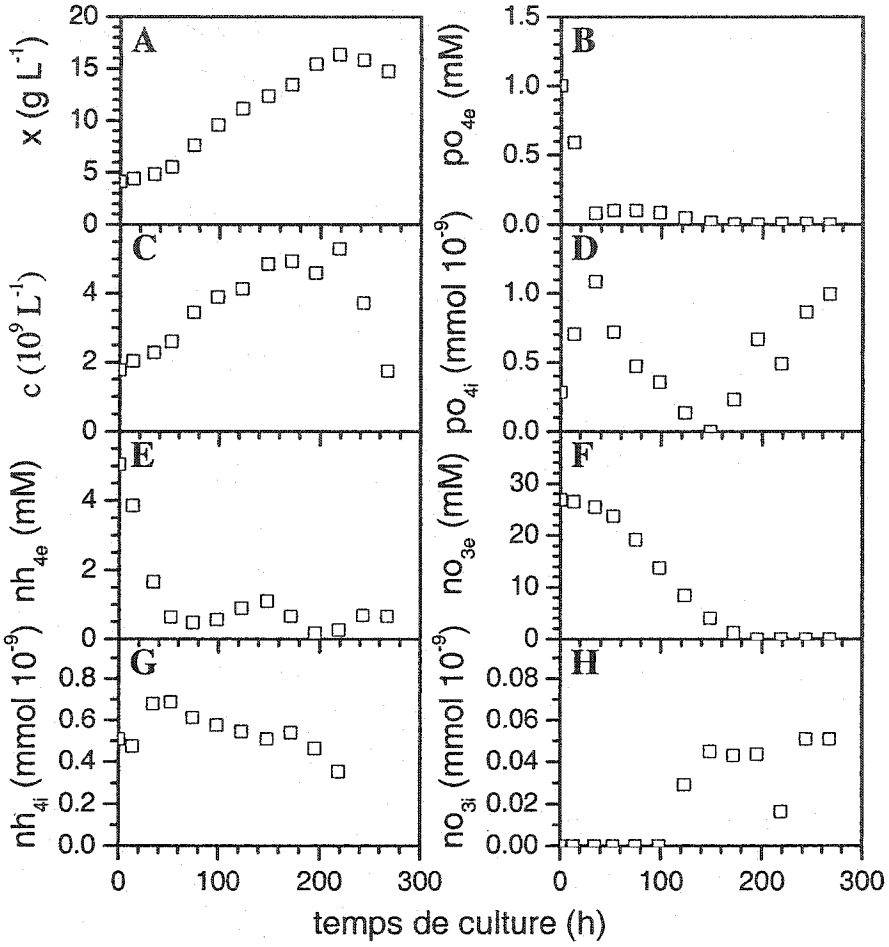


Figure 6.21 : Mesures expérimentales des variables de croissance et de concentrations nutritionnelles extracellulaires et intracellulaires en flacons.

Les profils de phosphate et d'ammonium intracellulaires (D et G) confirment l'hypothèse de modélisation des nutriments endogènes. En effet, une phase d'accumulation prédomine le métabolisme de ces nutriments jusqu'à leur disparition du milieu de culture, laquelle est suivie par une phase de consommation intracellulaire

jusqu'à la fin de la prolifération cellulaire. Dans le cas du nitrate, le profil de sa concentration intracellulaire suggère que ce dernier est rapidement transformé suite à son entrée dans la cellule comme rapporté à la section 2.4.2.2. Les résultats obtenus avec le phosphate et l'ammonium suggèrent que l'utilisation d'un terme d'accumulation jumelé à un terme de consommation endogène des nutriments limitant rapidement absorbés convient à la description de la croissance des cellules végétales en suspension.

6.5.3. Indices statistiques de comparaison

La détermination de paramètres d'un modèle par minimisation des erreurs d'estimation doit reposer sur un minimum de points expérimentaux afin d'être significative. Dans le cadre de ce projet, l'utilisation de 14 cultures différentes permet une généralisation des modèles comme démontré précédemment. Le Tableau 6.4 présente les conditions d'opération de ces cultures.

Le nombre de points expérimentaux ayant servi à la détermination des paramètres des cinétiques de croissance de la biomasse sèche et de prolifération cellulaire est de 149 en biomasse sèche et de 77 en concentration cellulaire; pour un total de 226 points expérimentaux. Le Tableau 6.5 présente le rapport nombre de points expérimentaux/ nombre de constantes déterminées par minimisation des erreurs (NP/NC).

Tableau 6.4 : Conditions d'opération des 17 cultures utilisées lors des simulations de développement et de validation

Culture	Bioréacteur	Caractéristiques des ajouts				
		Temps (h)	Glucides ($g\ L^{-1}$)	PO_4 (mM)	NH_4 (mM)	NO_3 (mM)
2SH8	2 L	177		1.5	5	
5SH9	5 L	177		1.5	8	
2SH10	2 L	70		1.5	8	
5SH11	5 L	70		1.5	8	
2SH12	2 L			(aucun ajout)		
5SH13	5 L			(aucun ajout)		
2SH16	2 L			(aucun ajout)		
5SH17	5 L			(aucun ajout)		
2SH20	2 L	0			2	
5SH21	2 L	0			2 (glutamine)	
2SH22	2 L	24		0.3		
		69		0.4		
		118		0.4		
5SH23	5 L	24				2
		54				3
		78				3
		102				5
		127				7
		151				12
		177				10
2SH24	2 L	30			0.8	
		49			0.5	
		74			0.9	
		97			1.5	
		123			2.1	
		150			2.6	

Tableau 6.4 : Conditions d'opération des 17 cultures utilisées lors des simulations de développement et de validation (suite)

Culture	Bioréacteur	Caractéristiques des ajouts				
		Temps (h)	Glucides (g L^{-1})	PO_4 (mM)	NH_4 (mM)	NO_3 (mM)
5SH25	5 L	30				5
		48				6
		74				10
		97				12
		123				5
Culture	Bioréacteur	Caractéristiques des ajouts				
		Temps (h)	Glucides (g L^{-1})	PO_4 (mM)	NH_4 (mM h^{-1})	NO_3 (mM)
2SH35	2 L	48	2	2.9	0.09	0
		73	1	0.1	0.07	1
		96	2	0.2	0.08	1
		119	1	0.1	0.08	1
		144	2	0.2	0.13	2
		167	2	0.2	0.15	2
		191	3	0.2	0.17	2
		215	4	0.3	0.28	2
		239	5	0.4	0.44	4
		263	8	0.5	0.28	4
		293	4	0.3	0.32	4
2SH37	2 L	48		5	3	0.1
		73	0.1	2	2	0.2
		96	0.2	2	2	0.2
		119	0.3	3	2	0.2
		144	0.2	2	2	0.1
		167	0.3	4	3	0.1
		191	0.4	5	4	0.27
		215	0.5	7	5	0.47
		239	0.6	7	5	0.68
		263	0.5	8	6	0.4

Tableau 6.4 : Conditions d'opération des 17 cultures utilisées lors des simulations de développement et de validation (suite)

Culture	Bioréacteur	Caractéristiques des ajouts				
		Temps (h)	Glucides ($g\ L^{-1}$)	PO_4 (mM)	NH_4 ($mM\ h^{-1}$)	NO_3 (mM)
2SH40	2 L	22	2	0.0	0.11	3
		53	0	0.0	0.00	0
		71	0	0.7	0.06	1
		95	0	0.0	0.00	0
		120	5	0.0	0.07	2
		146	2	0.0	0.10	2
		167	1	0.0	0.08	7
		193	2	0.1	0.12	2
		214	4	0.3	0.22	3
		241	3	0.3	0.20	3
		264	6	0.4	0.00	3
		286	4	0.3	0.14	3
		309	4	0.4	0.27	4
		334	8	0.5	0.28	5
		358	5	0.4	0.26	3
		366	7	0.6	0.38	6
		381	4	0.2	0.00	2

Tableau 6.5 : Rapport NP/NC pour les trois modèles de croissance

	non ségrégué*	physiologique massique	physiologique cellulaire
NP	226	226	226
NC	14	15	15
NP/NC	**16**	**15**	**15**

* phase de croissance uniquement

Ces résultats démontrent que la détermination des constantes des équations de cinétique repose sur plus de 15 points par paramètre pour tous les modèles développés dans le cadre du présent projet. Ceci renforce la signification des résultats obtenus.

L'indice de complexification utile (Équation 6.9) est un autre outil utile pour comparer les résultats de différents modèles et évaluer la nécessité du niveau de complexité entre chacun.

$$I_C = \frac{\left(PM / PM_R\right)}{\left(NC / NC_R\right)} \qquad 6.9$$

PM y représente la précision du modèle, NC, le nombre de constante et R réfère au modèle de référence. De manière à comparer les trois modèles de croissance, la précision du modèle est définie par la moyenne des deux indices ERM et CDME selon l'équation 6.10.

$$PM = \frac{1}{2}\left((1 - ERM) + CDME\right) \qquad 6.10$$

et le modèle non ségrégué sert de référence (I_C=1). Le Tableau 6.6 présente l'indice de complexification utile pour les trois modèles.

Tableau 6.6: Indexe de complexification utile pour les trois modèles de croissance

	non ségrégué*	physiologique	cellulaire
NC	14	15	15
Biomasse sèche			
ERM	14 %	15%	15%
CDME	0.63	0.83	0.83
PM	0.75	0.84	0.84
$\mathbf{I_C}$	**1**	**1.05**	**1.05**
Concentration cellulaire			
ERM	20 %	17 %	18 %
CDME	0.56	0.67	0.65
PM	0.68	0.75	0.74
$\mathbf{I_C}$	**1**	**1.03**	**1.02**

* phase de croissance exponentielle uniquement

Cette analyse révèle que les indices statistiques sont semblables pour les trois modèles. L'augmentation de l'I_C justifie le niveau de complexité des modèles physiologiques ségrégués. Au surplus, puisque le modèle non ségrégué n'est plus valable à la fin de la phase de croissance exponentielle, l'obtention de ces résultats confirme que la complexification mathématique des modèles permet de poursuivre la description des cultures au-delà de la croissance exponentielle sans perte de fiabilité, ce qui serait impossible avec le modèle ségrégué.

6.6. Modèle descriptif

Le modèle descriptif est validé en deux étapes. Premièrement, une simulation est réalisée afin de vérifier la capacité du modèle à filtrer le bruit de mesure. Dans un second temps, le modèle descriptif de suivi en continu est implanté sans action basée sur ses prédictions. Les ajouts nutritionnels sont effectués manuellement.

6.6.1. Filtre de suivi de la concentration cellulaire

L'efficacité du filtre par régression par les moindres carrés est vérifiée à l'aide d'une simulation où la mesure du CTR évolue à un rythme de 0.01 (mM h^{-1}) (h^{-1}) pendant 12 h, puis régresse au même rythme pendant les 12 h suivantes. De plus, un bruit aléatoire ($|\pm\omega|<5$ %) est ajouté à cette mesure. Ces deux particularités permettent de mieux représenter les conditions expérimentales. La Figure 6.22 présente les résultats obtenus de cette simulation.

Il appert que le régresseur minimise le bruit aléatoire, générant ainsi une mesure indirecte de la concentration cellulaire non bruitée. En comparant ce profil filtré avec le profil de référence obtenu directement de l'évolution du CTR non bruité, il apparaît que l'erreur d'estimation provenant de l'utilisation de ce filtre demeure sous les 1 %, ce qui est négligeable. Cet algorithme sera donc utilisé en situation réelle où le bruit de mesure se situe généralement sous le seuil du 5 % utilisé pour les simulations.

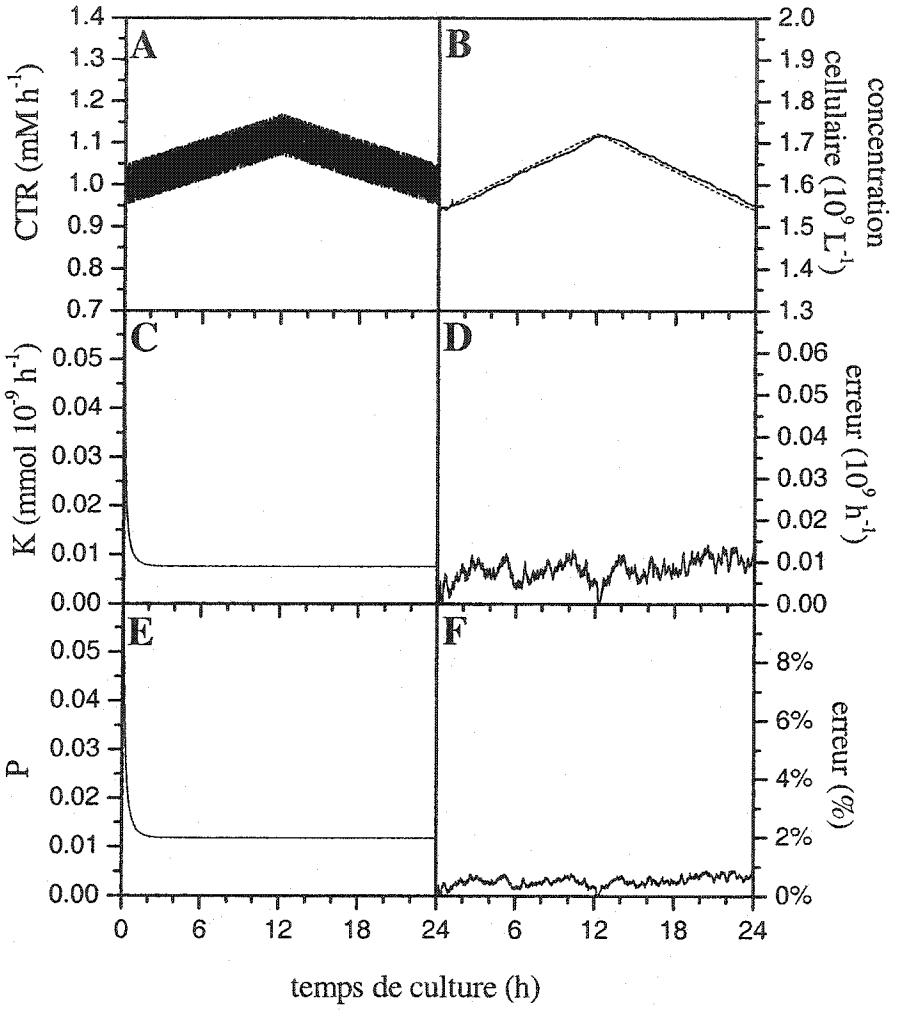


Figure 6.22 : **Simulation du régresseur par les moindres carrés sur la correction en continu de la concentration cellulaire**

6.6.2. Suivi en temps réel d'une culture de cellules végétales

Par la suite, l'algorithme entier de prédiction du modèle descriptif est implanté pour le suivi d'une culture en temps réel. Les résultats d'expérimentation illustrés à la Figure 6.23 sont obtenus avec des gains de suivi (γ_c et γ_x) de 0.5.

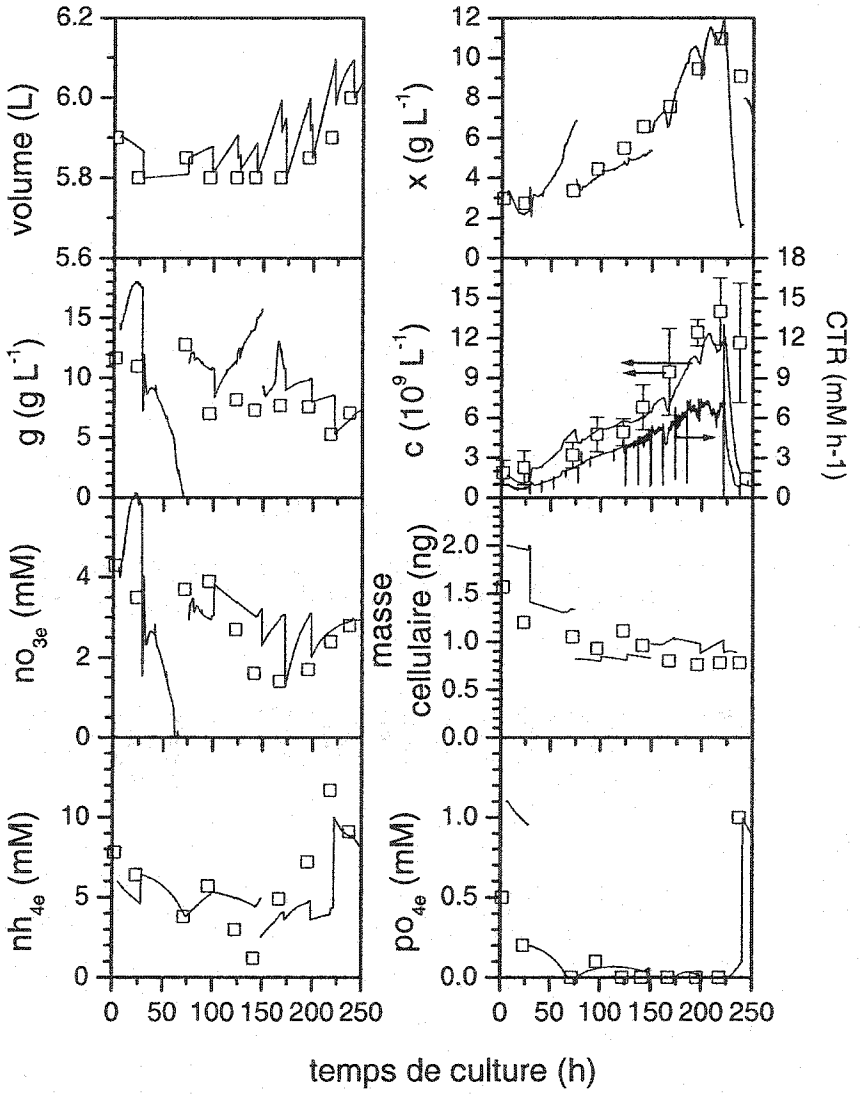


Figure 6.23 : Suivi en continu de la culture 5SH57 à l'aide du modèle descriptif de croissance

Le modèle descriptif permet de suivre en continu les variables de croissance (x et c) de même que l'évolution des concentrations en nutriments extracellulaires jusqu'à la fin de la période de croissance exponentielle. Cependant, lorsque la croissance en biomasse et la prolifération cellulaire cessent, entre 200 et 225 heures, le modèle descriptif ne semble plus satisfaisant. Ce comportement est normal puisqu'il s'agit d'une caractéristique du modèle non ségrégué utilisé comme structure de base du modèle descriptif.

Le suivi en continu de la concentration cellulaire s'effectue à l'intérieur de l'erreur expérimentale du dénombrement cellulaire ce qui valide l'efficacité du suivi de la croissance par le CTR. Aussi, le modèle décrit le comportement de la biomasse sèche avec une erreur généralement inférieure à 10%. Cependant, le réajustement de la concentration cellulaire entre les échantillons de 24 et 72 heures est directement amplifié par la masse cellulaire surestimée pendant cette période faisant ainsi diverger l'estimation de la concentration en biomasse sèche. Une réinitialisation des valeurs de la concentration en biomasse sèche et de la concentration cellulaire permet de ramener les profils de suivi près des valeurs expérimentales. Toutefois, une correction un peu trop importante à 72 heures impose une seconde correction vers 150 heures.

Cet exemple illustre une limitation du modèle de suivi. En effet, l'utilisation de ce modèle permet le suivi des 11 variables (3 de croissance (x, c, ρ_c), 4 nutriments extracellulaires, 3 nutriments intracellulaires et 1 volume de culture) basé sur une seule mesure, le CTR. Alors que le comportement de chaque variable (représenté par les

dérivées) est interrelié, leurs valeurs initiales représentent des degrés de liberté supplémentaires. À l'inoculation d'une culture, ces degrés de liberté sont comblés par les valeurs initiales imposées par les conditions de culture. Toutefois, lors d'une réinitialisation pendant la culture, les variables réinitialisées présentent des degrés de libertés additionnels impossibles à combler autrement que par une mesure expérimentale précise et immédiate.

En ce qui concerne les cultures de cellules végétales, la mesure de la biomasse sèche n'est disponible que 24 heures après l'échantillonnage. Le degré de liberté associé à sa réinitialisation doit être comblé par l'opérateur qui pose une valeur en se basant sur son expérience et les tendances des profils expérimentaux et descriptifs dans l'ensemble. Il est facile d'admettre que, dans cette situation, une erreur de réinitialisation est possible.

Cette erreur de réinitialisation se répercute sur les estimations en continu des concentrations des nutriments. En effet, les consommations en glucides et en nitrate (qui n'étaient pas modifiées selon la section 5..1.2.2) sont alors surestimées puisqu'elles sont directement reliées au taux de croissance et à la concentration en biomasse sèche par leur rendement. Une réinitialisation des concentrations nutritionnelles est donc effectuée parallèlement à celle de la biomasse. Dans le cas de la culture 5SH57, une mesure imprécise surévaluée de la concentration en glucose implique que ce profil doit être réinitialisé plus tard (vers 150 heures). De même, une

fausse valeur initiale en phosphate impose une réinitialisation après 24 heures de culture.

En résumé, le modèle descriptif permet de suivre en temps réel les variables du modèle de croissance en admettant que leurs valeurs initiales soient mesurées de façon précise. Dans la négative, les variables présentant une déviation importante par rapport aux profils expérimentaux doivent être réinitialisées prudemment. La principale limitation de ce modèle consiste donc en un effet pervers découlant de sa propriété la plus intéressante : l'estimation simultanée en temps réel de onze variables de culture basée uniquement sur une mesure en continu.

7. STRATÉGIE D'OPTIMISATION EN TEMPS RÉEL

L'objectif de cette dernière partie du projet consiste à développer et implanter une stratégie d'optimisation en temps réel de la prolifération cellulaire d'une culture de cellules végétales. Pour ce faire, le problème d'optimisation est tout d'abord explicitement défini, puis un aperçu des principes de commande optimale et sous-optimale est effectué. Par la suite, un contrôleur adaptatif sous-optimisant multivariable (CASOM) est développé et implanté pour l'optimisation en temps réel d'une culture de cellules végétales en bioréacteur.

7.1. Définition du problème d'optimisation

L'objectif d'optimisation du bioprocédé consiste à maximiser la prolifération cellulaire, ce qui revient à maximiser la concentration cellulaire dans un temps de culture donné. Puisque l'indice de performance s'écrit généralement sous l'une des formes suivantes (van Impe, 1993) :

$$J_1[u] = \vartheta_{t_f} t_f - \sum \vartheta_v v \qquad 7.1$$

$$J_2[u] = -\frac{1}{\vartheta_{t_f} t_f} \sum \vartheta_v v \qquad 7.2$$

où J est l'indice de performance, u, la variable manipulée, ϑ, l'indice de coût de la variable v et t_f, le temps final d'opération du procédé. L'indice de performance à minimiser dans le cas du procédé étudié est défini par

$$J_1[f] = \vartheta_{t_f} t_f - \vartheta_c c \qquad 7.3$$

ou

$$J_2[f] = -\frac{\vartheta_c c}{\vartheta_{t_f} t_f} \qquad 7.4$$

et ce, pour des conditions initiales fixes (ξ_0), indépendantes de l'algorithme d'optimisation. Les contraintes d'optimisations encadrant ce problème sont les suivantes :

$$\forall t \in [0, t_f] \qquad \xi_t \geq 0 \qquad 7.5$$

$$\forall t \in [0, t_f] \qquad f_t \geq 0 \qquad 7.6$$

combinées à l'une des deux contraintes exclusives suivantes :

$$t_f \text{ est fixé} \qquad 7.7a$$

$$N = \xi_{0,n} + \int_0^{t_f} V f_n(t) dt \qquad 7.7b$$

cette dernière équation signifiant que la quantité totale (N) d'un nutriment (n) disponible et utilisé est fixée. Vouloir déterminer à la fois la quantité totale de nutriment à utiliser et le temps de culture résulterait en une impossibilité mathématique quant à l'optimisation du système. Selon van Impe (1993), définir la quantité totale de nutriment ajoutée est équivalent à une contrainte physique sur le volume sous la forme :

$$V_{t_f} \text{ est fixé} \qquad 7.8$$

Les résultats précédents obtenus en cuvée alimentée (e.g. 5SH57 du chapitre précédent et autres résultats non présentés) démontrent qu'un arrêt de croissance se produit généralement suite à une limitation autre que celles identifiées par les modèles de croissance entre 200 et 300 heures de culture. L'utilisation de la contrainte 7.8 permet d'assurer une optimisation continue de la phase de croissance jusqu'à ce que le volume maximum du bioréacteur soit atteint ($V_{tf}=V_{max}$) ou jusqu'à ce qu'une limitation externe survienne.

7.2. Commande optimale

7.2.1. Changement de variables

De manière à faciliter les calculs à venir, des variables absolues (e.g. mmol totale) sont utilisées à la place des variables relatives (e.g. mM). Les indices de performance et la contrainte 7.7b sont réajustés sous la forme suivante :

$$J_1[f] = \vartheta_{t_f} t_f - \vartheta_C C \qquad 7.9$$

$$J_2[f] = -\frac{\vartheta_C C}{\vartheta_{t_f} t_f} \qquad 7.10$$

$$N = \xi_{0,n} + \int_0^{t_f} F_n(t)dt \qquad 7.11$$

La forme originale du modèle de croissance non ségrégué, représentée par l'équation 5.2, est utilisée conjointement à l'équation 5.3b où le volume est incorporé à la sommation pour utiliser les débits nutritionnels absolus.

$$\frac{d\Xi}{dt} = K\Phi(\Xi) - \left(\frac{Q_{éch}}{V}\right)\Xi - Q(\Xi) + F(\Xi) + \Gamma_{\Xi}(\Xi_m - \Xi) \qquad 7.12a$$

$$\frac{dV}{dt} = \sum_{z=1}^{i} \frac{F(\xi_z)}{\xi_{f,z}} - Q_{évap} - Q_{éch} \qquad 7.12b$$

Ce modèle peut être réécrit sous la forme de modèle d'espace d'états linéaires :

$$\frac{d}{dt}\begin{bmatrix}\Xi\\ V\end{bmatrix} = f\left(\begin{bmatrix}\Xi\\ V\end{bmatrix}\right) + bF(\Xi) \qquad 7.13a$$

Une attention particulière doit être apportée à $f\left(\begin{bmatrix}\Xi\\ V\end{bmatrix}\right)$ qui désigne ici les termes qui sont fonctionsdes variables d'état (et non le vecteur des débits relatifs) tel que décrit par

$$f\left(\begin{bmatrix}\Xi\\ V\end{bmatrix}\right) = \begin{bmatrix} K\Phi(\Xi) - \left(\frac{Q_{éch}}{V}\right)\Xi - Q(\Xi) + \Gamma_{\Xi}(\Xi_m - \Xi) \\ -Q_{évap} - Q_{éch} \end{bmatrix} \qquad 7.13b$$

$$b = \begin{bmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & g_f^{-1} & po_f^{-1} & no_{3f}^{-1} & nh_{4f}^{-1} & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix} \qquad 7.13c$$

7.2.2. Principe Minimum d'optimisation

Le Principe Minimum stipule que le Hamiltonien décrit par l'équation suivante doit être minimisé pour toute valeur de la variable manipulée (F(Ξ)) :

$$H = \lambda^T \left(f(\Xi) + bF(\Xi) \right) \tag{7.14a}$$

qui devient, par définition :

$$H = \phi + \psi F(\Xi) \tag{7.14b}$$

Il en découle donc que

$$\phi = \lambda^T f\left(\begin{bmatrix} \Xi \\ V \end{bmatrix} \right) \tag{7.15a}$$

et

$$\psi = \lambda^T b \tag{7.15b}$$

Le vecteur adjoint (λ) satisfait le système différentiel suivant :

$$\frac{d\lambda}{dt} = -\frac{\partial H}{\partial t} = -\frac{\partial f}{\partial \xi}^T \lambda \tag{7.16a}$$

En combinant ces équations avec le modèle d'espace d'états (7.13), il résulte un système différentiel comprenant 20 équations de premier ordre (deux fois l'ordre du vecteur des variables d'état dans le modèle). Afin de résoudre ce système, 20 conditions limites doivent être spécifiées. Alors que 10 d'entre elles proviennent des valeurs initiales des variables d'état qui sont fixées, une condition supplémentaire

provient du volume final théorique qui doit être égal au volume maximal. Les 9 autres conditions limites sont obtenues par la différentiation de l'indice de performance tel que décrit par van Impe (1993) :

$$\lambda_i(t_f) = \frac{\partial J}{\partial \xi_i} \qquad 7.17$$

7.2.3. Contrôle extrême : Principe Minimum de Pontryagin

Le Principe Minimum de Pontryagin stipule qu'une loi de contrôle extrême découle de la minimisation du Hamiltonien pour toutes les fonctions de contrôle admissibles. Ceci implique que

$$\frac{\partial H}{\partial F(\Xi)} = 0 \qquad 7.18$$

Or, le terme de la variable de commande apparaissant de façon linéaire dans les équations du système, celle-ci disparaît lors de la différentiation. Ce résultat typique des cuvées alimentées provoque un système de contrôle bang-singulier-bang. En effet, l'action de contrôle est uniquement basée sur le signe du coefficient de la variable de commande (ψ) dans l'équation 7.15b. Pour chaque variable manipulée (F_n), les actions de contrôle découlant de cette loi de commande sont définies par

$$F_n = \begin{cases} F_{n,max} & \text{si} \quad \psi > 0 \\ F_{n,sing} & \text{si} \quad \psi = 0 \\ 0 & \text{si} \quad \psi < 0 \end{cases} \qquad [t, t+1[\qquad 7.19$$

En plus d'être une loi de commande avec action "tout ou rien", il peut donc exister des intervalles de temps singuliers pour lesquels la loi de commande optimale ne peut déterminer d'action à prendre. van Impe (1993) présente un raisonnement simple pour déterminer la loi de commande pendant ces intervalles, mais générant une multitude de calculs analytiques lors de sa résolution. Il s'agit de différencier le coefficient ψ de la loi de commande jusqu'à ce que cette dernière apparaisse de façon linéaire dans l'équation résultante. Ceci se produit lors de la seconde différenciation. En posant u comme étant la loi de commande et d comme étant défini par

$$d = \frac{\partial f}{\partial \xi} b \qquad 7.20$$

il résulte que la loi de commande singulière est obtenue par

$$u_{sing}(t) = \frac{\lambda^T [(\partial f/\partial \xi) d - (\partial d/\partial \xi) f]}{\lambda^T (\partial d/\partial \xi) b} \qquad 7.21$$

Contrairement au contrôleur optimal présenté par van Impe (1993), le contrôleur obéissant aux lois 7.19 et 7.21 est directement relié à la culture en temps réel par l'utilisation du modèle descriptif développé au chapitre précédent. Le contrôleur ne repose donc pas uniquement sur la précision du modèle, mais aussi sur les perturbations du procédé qui seraient considérées par leurs répercussions sur le CTR. Toutefois, la structure mathématique du contrôleur résultant est complexe et génère d'importants développements analytiques.

7.3. Commande adaptative sous-optimisante multivariable

Comme alternative aux problèmes générés par le contrôleur optimal, van Impe (1993) propose une démarche qui rallie les notions de commande optimale et de commande linéarisante adaptative. Le contrôleur obtenu de cette façon combine des performances sous-optimales et une robustesse face aux incertitudes du modèle et aux perturbations du bioprocédé.

Le contrôleur présenté par van Impe (1993) permet de contrôler une variable manipulée de manière à optimiser simultanément deux taux de réactions : les taux de croissance et de production. L'objectif de cette section est de généraliser cette loi de commande de manière à manipuler simultanément plusieurs variables afin d'optimiser plusieurs taux spécifiques. Une importante propriété soulevée par van Impe (1993) est utilisée à cette fin : soit le découplage des cinétiques et des nutriments.

Lors de l'élaboration de contrôleurs sous-optimum linéarisants, le problème d'optimisation devient un problème de choix de points de consigne. En effet, les situations traitées par van Impe (1993) consistent à optimiser les cinétiques de croissance et de production par la manipulation du débit d'alimentation de la source de carbone. De manière similaire, le présent cas traite de la manipulation de débits d'alimentation en nutriments de manière à optimiser la croissance de cellules végétales en bioréacteur. Quant à la partie linéarisante ou adaptative du contrôleur, il s'agit

d'appliquer la procédure de conception de ce type de contrôleurs tel que présenté par Bastin et Dochain (1990).

7.3.1. Découplage des taux spécifiques de prolifération cellulaire

L'objectif d'optimisation étant de maximiser la prolifération cellulaire, l'équation du modèle descriptif devant être maximisée est le taux de prolifération cellulaire décrit par

$$\mu_c = \mu_c^* \left(\frac{g}{K_{c,g} + g} \right) \left(\frac{n_{t,i}}{K_{c,n_{t,i}} + n_{t,i}} \right) \left(\frac{po_{4,i}}{K_{c,po_{4i}} + po_{4,i}} \right) \left(\frac{K_{c,po_4,1}}{K_{c,po_4,1} + po_4^{K_{c,po_4,2}}} \right) \left(\frac{K_{c,no_3,1}}{K_{c,no_3,1} + no_3^{K_{c,no_3,2}}} \right) \left(\frac{K_{c,nh_4,1}}{K_{c,nh_4,1} + nh_4^{K_{c,nh_4,2}}} \right) \quad 5.38m$$

Alors que le premier terme de cette équation (μ_c*) est un paramètre du modèle, les trois taux spécifiques qui suivent ne sont en fait que des interrupteurs permettant d'induire un arrêt de prolifération cellulaire lorsqu'un de ces trois nutriments vient à manquer. Ces cinétiques ne réagissent aucunement aux variations des concentrations nutritionnelles tant et aussi longtemps que ces nutriments sont présents dans le milieu de culture. Elles deviennent donc des conditions au problème d'optimisation sous la forme :

$$\forall t \in [0, t_f] \qquad g_t > 0 \qquad 7.22$$

$$\forall t \in [0, t_f] \qquad (no_3 + nh_4)_t > 0 \qquad 7.23$$

$$\forall t \in [0, t_f] \qquad po_{4i,t} > 0 \qquad 7.24$$

L'équation à optimiser, soumise aux conditions des équations 7.22 à 7.24, est donc réduite à :

$$\frac{\mu_c}{\mu_c^*} = \left(\frac{K_{c,po_4,1}}{K_{c,po_4,1} + po_4^{K_{c,po_4,2}}} \right) \left(\frac{K_{c,no_3,1}}{K_{c,no_3,1} + no_3^{K_{c,no_3,2}}} \right) \left(\frac{K_{c,nh_4,1}}{K_{c,nh_4,1} + nh_4^{K_{c,nh_4,2}}} \right) \qquad 7.25$$

Or, il appert que les trois taux spécifiques demeurant dans l'équation à optimiser sont indépendants les uns des autres, et chacun est fonction de nutriments différents. Ces trois taux spécifiques peuvent donc être découplés et maximisés indépendamment par la manipulation des débits d'alimentation de chacun des trois nutriments concernés.

7.3.2. Conception du contrôleur CASOM

Le contrôleur CASOM consiste en quatre contrôleurs à action indépendante, mais interreliés par le même modèle descriptif. Chacun de ces quatre contrôleurs peut être déduit indépendamment selon la procédure proposée par Bastin et Dochain (1990) et présentée ci-dessous.

La première étape consiste à obtenir un modèle reliant la variable contrôlée à la variable manipulée sous une forme entrée/sortie. Ceci correspond ici au modèle

descriptif développé au chapitre 5. Le bilan massique correspondant au nutriment dont la concentration doit être contrôlée en est extrait.

$$\frac{dn}{dt} = -\phi_n x - \frac{1}{V}\left(Q_{éch} + \frac{dV}{dt}\right)n + \frac{F_n}{V} \qquad 7.26$$

Par la suite, un modèle de référence stable et linéaire ($\lambda>0$) pour le suivi de l'erreur doit être spécifié :

$$\frac{d(n-n^*)}{dt} = -\lambda_n (n-n^*) \qquad 7.27$$

où n* représente la consigne à laquelle la concentration nutritionnelle doit être maintenue. La loi de commande linéarisante est alors obtenue en comparant les équations 7.26 et 7.27 de manière à éliminer la dérivée de la concentration cellulaire et en remplaçant la dérivée du volume de culture par son expression tirée du modèle descriptif (équation 5.38b) :

$$F_n = V\left[\frac{-\lambda_n (n-n^*) + \phi_n x + \frac{n}{V}\left(\sum_i^{\forall -n} \frac{F_i}{\xi_{f,i}} - Q_{évap}\right)}{\left(1 - n/n_f\right)}\right] \qquad 7.28$$

où la notation ($\forall$-n) signifie que la sommation est effectuée par rapport à toutes les variables d'état excepté n.

7.3.3. Choix des points de consigne

La dernière étape de la conception du contrôleur CASOM consiste à choisir des points de consigne générant un minimum de perte de performance par rapport à la commande optimale, d'où l'obtention d'une loi de commande sous-optimisante. La Figure 7.1 illustre les cinétiques de croissance et de prolifération spécifiques à chaque nutriment.

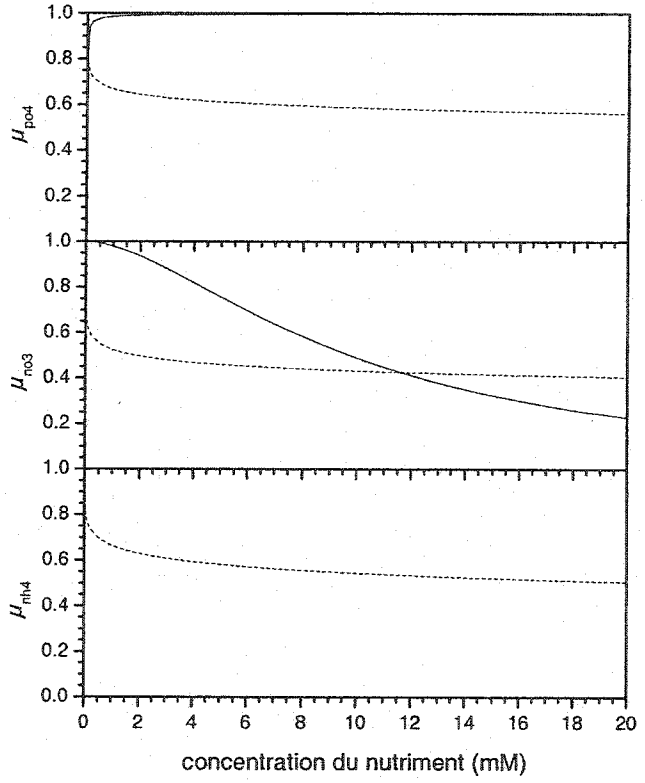


Figure 7.1: **Cinétiques de croissance et de prolifération spécifiques à chaque nutriment majeur. ----- cinétiques spécifiques de croissance, — cinétiques spécifiques de prolifération**

Les points de consigne doivent donc être choisis en fonction de ces courbes mais aussi en fonction des conditions décrites par les équations 7.22 à 7.24 en plus de tenir compte des contraintes expérimentales. Le taux de prolifération spécifique au phosphate est maximum pour des concentrations extracellulaires supérieures à environ 2 mM selon le modèle. La condition associée à ce nutriment (7.24) stipule que sa concentration intracellulaire doit être non nulle.

Selon ces principes théoriques, la consigne en phosphate devrait être de maintenir sa concentration extracellulaire au-delà de 2mM. Toutefois, ceci impliquerait une accumulation soutenue en phosphate intracellulaire. Or, selon la littérature, d'importantes accumulations nutritionnelles en phosphate peuvent s'avérer toxiques pour les cellules végétales. De manière à éviter tout risque de "choc toxique", une approche plus conservatrice est adoptée. Une concentration extracellulaire entre 0.1 et 0.3 mM en phosphate est maintenue jusqu'à ce que la concentration intracellulaire atteigne la barre du 1 mM. De faibles concentrations extracellulaires permettent de maintenir l'accumulation intracellulaire en phosphate et de l'interrompre rapidement en cessant d'alimenter la culture. Lorsque la concentration intracellulaire estimée a atteint 1 mM, un contrôle à action lente est effectué pour maintenir cette concentration à ce niveau.

Pour réaliser les deux phases de contrôle (maintien du phosphate extracellulaire à $po_{4e}^* = 0.1$ puis maintien du phosphate intracellulaire à $po_{4i}^* = 1.0$), l'équation 7.28

est utilisée avec une légère modification pour accommoder les deux phases distinctes de contrôle. L'équation utilisée est la suivante :

$$F_{po_4} = V\left[\frac{\eta + \frac{po_{4e}}{V}\left(\sum_i^{\forall -po_4} \frac{F_i}{\xi_{f,i}} - Q_{évap}\right)}{\left(1 - po_{4e}/po_{4,f}\right)}\right] \qquad 7.29$$

où

$$\eta = \begin{cases} -\lambda_{po_{4e}}\left(po_{4e} - po_{4e}^{*}\right) + \phi_n x & \text{pour} \quad t_0 \le t \le t_{po_{4i}=1mM} \\ -\lambda_{po_{4i}}\left(po_{4i} - po_{4i}^{*}\right) + k_{po_4/c}\mu_c c & \text{pour} \quad t_{po_{4i}=1mM} \le t \le t_f \end{cases} \qquad 7.30$$

Lorsque la première des deux conditions est utilisée, soit avant que la concentration intracellulaire n'atteigne 1 mM, cela revient à l'équation de commande originale.

Dans le cas du nitrate, la cinétique de prolifération suggère que sa concentration extracellulaire tende vers zéro. Toutefois, la condition 7.23 stipule qu'il se produit un arrêt de prolifération s'il vient à manquer d'azote extracellulaire. L'expérience de cultures antérieures démontre qu'il est extrêmement difficile de réactiver la prolifération cellulaire une fois celle-ci désactivée. Même dans le cas d'une réactivation, le profil obtenu serait très loin d'un profil optimal. Pour ces raisons d'ordre pratique, la consigne en nitrate est fixée à 3 mM de manière à maintenir une marge de sécurité, tout en minimisant son impact sur l'objectif d'optimisation.

En ce qui a trait à l'ammonium, la cinétique de prolifération spécifique de ce nutriment demeure à 1 (au maximum) peu importe sa concentration. Sa consigne ne peut donc

être basée que sur la condition 7.23. Comme dans le cas du nitrate, la concentration extracellulaire en ammonium doit être maintenue supérieure à zéro afin de s'assurer que la concentration totale en azote extracellulaire ne soit jamais nulle. Cependant, des concentrations excessives en ammonium extracellulaire provoqueraient des bouleversements importants sur le métabolisme cellulaire tel que démontré à l'annexe F. Ceci concorde tout à fait avec la littérature. La consigne est donc fixée à 5 mM en ammonium extracellulaire.

Finalement, la seule contrainte qui s'applique à l'alimentation du glucose est celle présentée par l'équation 7.22. Puisque de fortes concentrations en glucides ont un impact négatifs sur le métabolisme cellulaire (voir section 2.4.1), la consigne pour ce nutriment est fixée à 10 g L^{-1} sachant que cette concentration peut varier dans une plage approximative de 5 à 30 g L^{-1} sans affecter significativement le métabolisme (résultats non présentés).

7.3.4. Algorithme final du contrôleur CASOM

En somme, les débits d'alimentation apparaissant dans l'algorithme du modèle descriptif (équations 5.35 à 5.38) pour le suivi en temps réel de l'évolution des cultures sont maintenant déterminés par le système matriciel suivant :

$$f(\xi)=\frac{1}{V}\begin{bmatrix}0\\0\\F_g\\F_{po_4}\\F_{no_3}\\F_{nh_4}\\0\\0\\0\end{bmatrix}=\begin{bmatrix}0\\0\\\dfrac{-\lambda_g(g-g^*)+k_{g/x}\mu_x x+\dfrac{g}{V}\left(\sum_i^{\forall -g}\dfrac{F_i}{\xi_{f,i}}-Q_{évap}\right)}{\left(1-g/g_f\right)}\\\dfrac{\eta+\dfrac{po_{4e}}{V}\left(\sum_i^{\forall -po_4}\dfrac{F_i}{\xi_{f,i}}-Q_{évap}\right)}{\left(1-po_{4e}/po_{4,f}\right)}\\\dfrac{-\lambda_{no_3}(no_3-no_3^*)+\phi_{no_3}xno_3+\dfrac{no_3}{V}\left(\sum_i^{\forall -no_3}\dfrac{F_i}{\xi_{f,i}}-Q_{évap}\right)}{\left(1-no_3/no_{3,f}\right)}\\\dfrac{-\lambda_{nh_4}(nh_4-nh_4^*)+\phi_{nh_4}x+\dfrac{nh_4}{V}\left(\sum_i^{\forall -nh_4}\dfrac{F_i}{\xi_{f,i}}-Q_{évap}\right)}{\left(1-nh_4/nh_{4,f}\right)}\\0\\0\\0\end{bmatrix} \quad 7.31$$

où

$$\eta=\begin{cases}-\lambda_{po_{4e}}(po_{4e}-po_{4e}^*)+\phi_n x & \text{pour} \quad t_0\le t\le t_{po_{4i}=1mM}\\-\lambda_{po_{4i}}(po_{4i}-po_{4i}^*)+k_{po_4/c}\mu_c c & \text{pour} \quad t_{po_{4i}=1mM}\le t\le t_f\end{cases} \quad 7.30$$

Dans leurs formes actuelles, les bilans nutritionnels de 5.38 et les actions de commande de 7.31 qui comprennent un terme de taux de croissance de biomasse sèche ou de prolifération cellulaire sont biaisés par les incertitudes du modèle. En effet, les

taux de croissance ou de prolifération utilisés jusqu'à maintenant sont ceux du modèle non ségrégué. Ceux-ci doivent être corrigés selon les corrections du suivi de la concentration cellulaire afin de compenser pour les erreurs de modélisation. En comparant l'équation 5.38a du modèle descriptif à son homologue du modèle prédictif pour la concentration cellulaire, le taux de prolifération cellulaire corrigé est décrit par

$$\mu_c^{cor} = \mu_c + \gamma_c\left(1 - \frac{c_m^e}{c}\right) \qquad 7.32$$

Il en est de même pour le taux de croissance en biomasse sèche corrigé :

$$\mu_x^{cor} = \mu_x + \gamma_x\left(1 - \frac{x_m^e}{x}\right) \qquad 7.33$$

Le contrôleur CASOM est donc constitué des équations 5.35 à 5.37, 5.38a à 5.38f, 5.38g à 5.38m et 7.31, où les taux de croissance et de prolifération sont remplacés par les taux corrigés des équations 7.32 et 7.33.

7.4. Optimisation en temps réel de cultures de cellules végétales

Le contrôleur CASOM est implanté en temps réel de manière à vérifier s'il est physiquement réalisable et s'il peut mener à une optimisation en temps réel. Le Tableau 7.1 présente les valeurs des paramètres de suivi et de contrôle utilisés lors de l'expérimentation qui a généré les résultats présentés à la Figure 7.2, suite aux actions de contrôle décrites à la Figure 7.3.

Tableau 7.1 : Valeurs des paramètres de contrôle utilisés lors de l'implantation du CASOM

λ_g	0.12
λ_{po4e}	0.4
λ_{po4i}	0.2
λ_{no3}	0.24
λ_{nh4}	0.16

En observant les profils des variables de croissance (x, c et ρ) des graphiques B, D et F, il appert que les estimations découlant du modèle descriptif en boucle fermée concordent avec les points expérimentaux jusqu'à 160 heures. À ce moment, d'importantes oscillations dans la mesure du CTR (graphique J) se répercutent simultanément sur les estimations de la concentration cellulaire et de la biomasse sèche. Ces oscillations proviennent d'une limitation externe provoquant l'arrêt de la croissance dans les heures qui suivent.

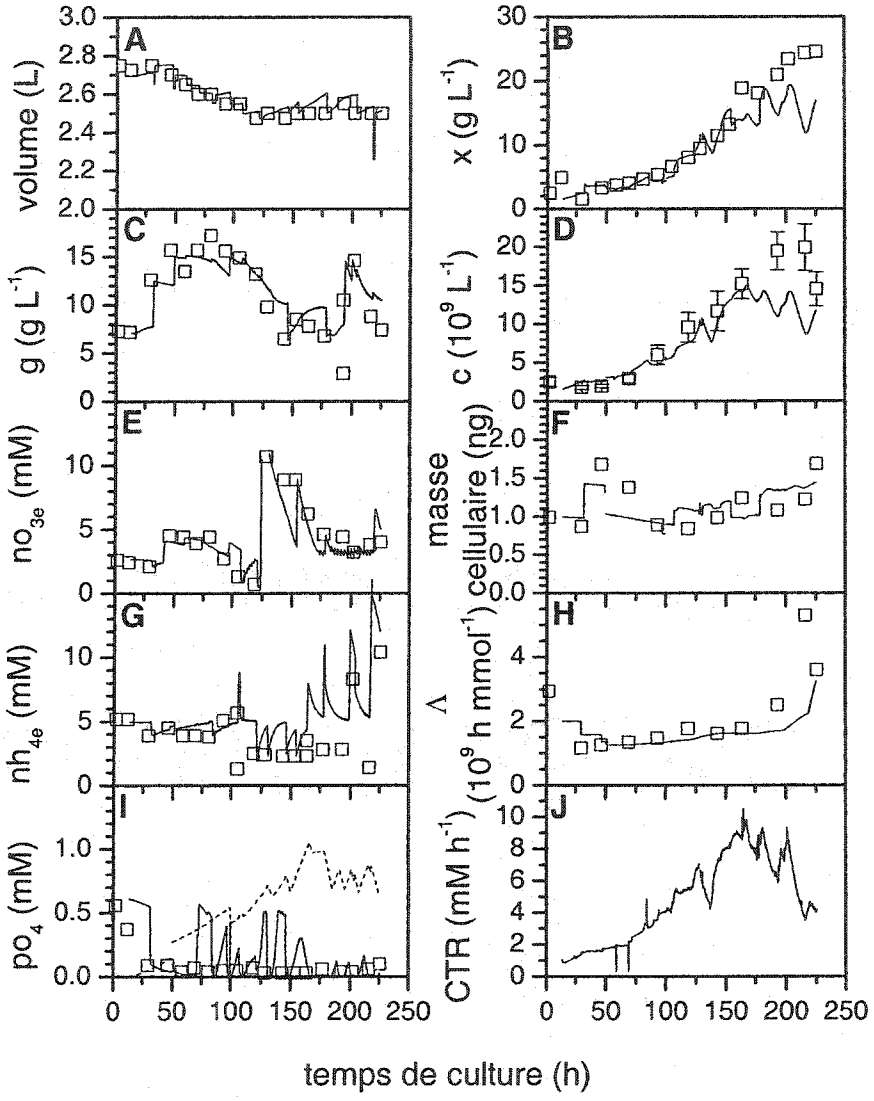


Figure 7.2 : **Suivi et sous-optimisation en temps réel de la croissance d'une culture de cellules végétales en suspension à l'aide du CASOM. ☐ mesure expérimentale, — estimation en temps réel. I. — phosphate extracellulaire, ----- phosphate intracellulaire. J. — mesure en continu.**

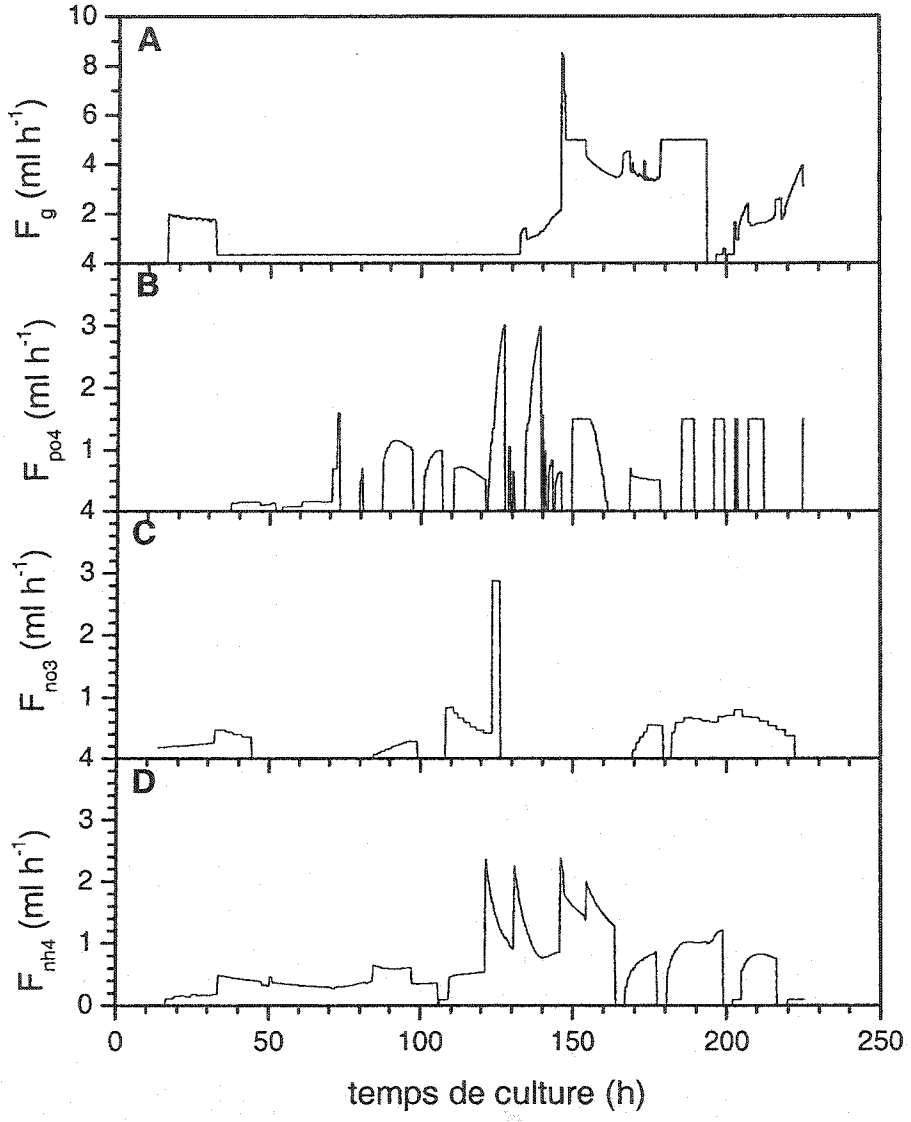


Figure 7.3: Débits d'alimentation des solutions nutritives générés par le CASOM.

Tel qu'illustré à la Figure 7.2H, l'implantation d'un régresseur des moindres carrés sur le gain d'estimation en temps réel de la concentration cellulaire (Λ) permet effectivement de suivre ses variations pendant la phase de croissance, jusqu'à environ

175 heures. À partir de ce moment la cinétique de variation de ce paramètre accélère rapidement, provoquant dès lors le décrochage du suivi.

La dernière catégorie de variables regroupe les concentrations nutritionnelles. En plus d'être suivies en temps réel, celles-ci doivent être contrôlées aux points de consigne spécifiés. Le suivi de ces variables par le modèle intégré au CASOM correspond aux points expérimentaux, confirmant ainsi sa capacité à décrire l'évolution des cultures avec les modifications apportées à la section précédente. Quant à la commande des concentrations nutritionnelles, chaque profil doit être étudié indépendamment.

Un problème d'étalonnage de la pompe du débit de glucose provoque une augmentation de la concentration à un peu plus de 15 g L^{-1} dans les deux premières journées de culture. Le débit d'alimentation est alors réduit au minimum (Figure 7.3A). Cependant, comme la présence de glucose est critique à toute forme de croissance avec l'espèce étudiée, une boucle de sécurité assurant un débit minimal non nul en tout temps est ajouté au système de commande. Considérant que la concentration en biomasse est faible à ce moment (< 5 g L^{-1}), le taux de consommation du glucose est peu élevé pendant la période qui suit (0.15 g h^{-1} en moyenne). Ceci explique la descente de la concentration en glucose sur une période d'une centaine d'heures. À ce moment, le contrôleur recommence à agir sur le débit d'alimentation.

Dans le cas du nitrate, les trente premières heures de culture sont réalisées avec une concentration maintenue près de la consigne de 3 mM. Par la suite, la concentration en biomasse sèche est initialisée à nouveau vers le haut, provoquant une augmentation théorique soudaine de la demande en nitrate. Le contrôleur réagit à la demande et accroît la concentration en nitrate. Comme la consigne est dépassée, l'action du contrôleur devient nulle. Malgré une prédiction ascendante de la concentration en nitrate à partir de 100 heures, la mesure par colorimétrie indique une faible concentration. Un ajout manuel est alors réalisé. Un emballement de la pompe du débit de nitrate triple la quantité à ajouter et la concentration en nitrate se retrouve à plus de 10 mM. Par la suite, le contrôleur laisse descendre cette variable et reprend son action vers 170 heures, de manière à maintenir avec succès sa concentration au point de consigne.

En ce qui concerne l'ammonium, le CASOM maintient la concentration de ce nutriment à son point de consigne pendant plus de 100 heures, malgré les actions (parfois importantes) faites sur les autres variables. À ce moment, une légère diminution (environ 2 mM) de la concentration en ammonium est observée. Le contrôleur maintient cette concentration pendant les 100 heures qui suivent jusqu'à ce qu'un arrêt de croissance et de prolifération survienne et qu'une accumulation nutritionnelle en résulte.

Quant au phosphate, le contrôleur de première phase effectue des ajouts graduels de manière à assurer une augmentation progressive de sa concentration intracellulaire

jusqu'à l'atteinte d'une millimole par litre interne. Cependant, il semble avoir failli à la tâche à deux reprises : vers 125 et 150 heures. Dans ces deux cas, la concentration extracellulaire est devenue nulle, provoquant un ralentissement de l'accumulation. Suite à l'atteinte du point de consigne intracellulaire, le contrôleur entre dans la seconde phase et maintient la concentration intracellulaire du phosphate près de cette consigne. La Figure 7.3B montre que le contrôleur génère une action « tout ou rien » pendant cette seconde phase. Ce phénomène prévisible est provoqué par l'impossibilité de relier directement la variable manipulée (F_{po4}) et la variable contrôlée (po_{4i}) sans la présence d'une dérivée de la concentration intracellulaire de ce nutriment. Cette méthode expérimentée précédemment (résultats non montrés) génère d'importants coups de dérivée, résultant en une dégénérescence de la qualité de contrôle.

En résumé, la majorité des sources de dégradation de la qualité de contrôle survenus lors de la culture sous-optimisée (Figure 7.2) sont le résultat de problèmes techniques indépendants du contrôleur. En outre, malgré ces sources d'erreurs qui sont en fait des perturbations externes, le CASOM permet de corriger la situation et de ramener les profils des concentrations nutritionnelles près de leur consigne respective. Dans l'ensemble, les résultats obtenus confirment que la structure du CASOM développé dans le cadre de ce projet permet de générer un suivi multivariable de même que des performances sous-optimisantes limitées par le choix des consignes et les perturbations externes.

8. CONCLUSION, RECOMMANDATIONS ET CONTRIBUTIONS

8.1. Conclusion

Les objectifs de ce projet de recherche étaient de développer des outils permettant d'améliorer la compréhension et la description de la phase de croissance des cultures de cellules végétales en suspension, puis de permettre leur optimisation multivariable en temps réel à partir d'un minimum d'informations obtenues en continu.

L'élaboration de deux modèles de croissance ségrégués, un centré sur la biomasse et l'autre sur la concentration cellulaire, a permis de décrire tous les stades de croissance observés (latence, exponentiel, plateau et mortalité) avec un minimum d'erreur d'estimation (moins de 15 %). Ces modèles, développés en ayant pour base le cycle cellulaire, ont permis de mieux cerner les phénomènes de disponibilité nutritionnelle menant à une limitation de la croissance de la biomasse ou de la prolifération cellulaire. De plus, la structure de chacun de ces deux modèles leur confère la possibilité de prédire simultanément la croissance de la biomasse et la prolifération cellulaire, confirmant ainsi de manière mathématique l'intime lien unissant ces deux variables de croissance.

Le développement d'un modèle descriptif de suivi de l'évolution de culture de cellules végétales en bioréacteur en temps réel a permis de confirmer que le métabolisme cellulaire repose principalement sur le phénomène de la division cellulaire, suivie par la mesure de la concentration cellulaire, plutôt que sur la croissance de la biomasse.

En effet, le lien ralliant l'évolution de la culture en bioréacteur à celle du modèle de croissance se fait directement entre la concentration cellulaire et le taux de transfert du bioxyde de carbone (CTR), ce dernier étant considéré en équilibre avec la production de bioxyde de carbone (CPR), suite à une perturbation singulière.

Finalement, la mise au point d'un contrôleur adaptatif sous-optimisant multivariable (CASOM) a permis de réaliser le contrôle simultané de quatre concentrations nutritionnelles en bioréacteur, alors qu'une seule variable est mesurée en continu. Ces résultats valident l'hypothèse de base sur laquelle reposait le développement de ce contrôleur, c'est-à-dire que les taux spécifiques de prolifération modélisés peuvent être découplés, donc maximisés indépendamment, lorsque la forme de cinétique de Sirois (1997) est utilisée. La généralisation de ce constat dicte donc que d'autres nutriments possiblement limitants et/ou affectant la prolifération cellulaire et/ou la croissance de la biomasse peuvent être directement ajoutés au CASOM sans modifications majeures.

Compte tenu de ces considérations, il est possible de conclure que les objectifs de départ initiant ces travaux de recherche sont pleinement atteints et que les résultats obtenus ouvrent la voie à diverses perspectives d'études.

8.2. Recommandations

Suite à ce projet de recherche, différentes avenues demeurent à explorer. Avant tout, un retour sur les travaux effectués s'impose. L'étude des nutriments et de leur potentiel de limitation a permis la mise en lumière du rôle prépondérant de la cellule en tant

qu'entité propre régissant le métabolisme cellulaire végétal en culture. Il est primordial que les études à venir traitant de l'évolution des suspensions de cellules végétales, soient centrées sur cette variable de croissance ou, du moins, l'incluent dans leur description (prédiction) de l'évolution de ces cultures.

En ce qui a trait à la modélisation des suspensions végétales, il serait avantageux de propager les prédictions du modèle non ségrégué à tous les stades de croissance. Ceci peut être réalisé par l'ajout d'une constante de mortalité dans les bilans de masse des variables de croissance. En plus d'améliorer les prédictions de ce modèle, ceci aurait un impact certain sur la qualité du suivi en temps réel des cultures par le modèle descriptif et sur la qualité de contrôle du CASOM.

Combiné à un modèle métabolique, le modèle cellulaire pourrait être mis à profit pour une étude plus spécifique de l'évolution des différentes phases du cycle cellulaire ainsi que leur impact direct sur certains réactions métaboliques en particulier. Ceci permettrait de déterminer les principales limitations métaboliques et d'effectuer un meilleur contrôle/suivi physiologique des cultures.

Pour ce qui est du contrôleur CASOM développé au chapitre 7, il serait très avantageux de raffiner son protocole d'implantation afin de minimiser les perturbations externes. De cette manière, il pourrait révéler son plein potentiel et générer des cultures quasi optimales. En outre, avec une instrumentation plus fiable,

particulièrement au niveau des pompes, le choix des points de consignes pourraient êtres plus audacieux, augmentant d'autant la qualité des résultats.

D'un point de vue plus général, différentes études peuvent être effectuées suite à ce projet. Tout d'abord, les profils des concentrations intracellulaires des modèles suivent les mêmes tendances que ceux découlant des variables intracellulaires mesurées. Or, la cellule peut accumuler certains nutriments sous diverses formes. Une étude spécifique portant sur l'accumulation intracellulaire des nutriments et traitant de leur formulation, de leur disponibilité et de leur impact limitant devrait être réalisée. En adaptant le modèle cellulaire aux résultats de ces travaux, plusieurs renseignements importants en découleraient.

Comme mentionné au début de la présente étude, la modélisation et à un autre niveau, le contrôle, se limitent aux quatre nutriments majeurs identifiés comme limitant d'une quelconque façon la croissance en biomasse ou la prolifération cellulaire des cultures de cellules végétales. Or, depuis le début des travaux de modélisation, il arrive de plus en plus souvent que des nutriments secondaires viennent limiter la croissance en biomasse et/ou la prolifération cellulaire (e.g. Mg, Cohelo (2000), SO_4, chapitre 6). Il est nécessaire d'élargir la description ionique des modèles de croissance à ces ions de manière à prolonger cette phase au-delà des limites actuelles. Pour ce faire, une étude exhaustive traitant de l'évolution de chacun de ces nutriments pourrait être réalisée ou plus simplement, une étude des corrélations des consommations interioniques permettrait de relier la consommation de certaines espèces ioniques à d'autres déjà

modélisées. Sans qu'un profil exact en soit déduit, une limitation possible due à ces autres nutriments serait identifiée avant qu'elle ne survienne.

Finalement, les principes développés dans le cadre de ce projet, ou découlant de travaux similaires, se limitent à l'étude de la phase de croissance des suspensions de cellules végétales en bioréacteur. En adaptant ces notions, il serait possible de les utiliser pour la modélisation, le contrôle voire l'optimisation en temps réel (par un CASOM adapté) de la phase de production de métabolites secondaires. Cette étape constituerait l'achèvement des travaux d'optimisation du bioprocédé de production de métabolites secondaires par la culture de cellules végétales.

8.3. Contributions à l'avancement des connaissances

La réalisation des travaux dont les résultats font l'objet de cette thèse ont permis d'améliorer l'état des connaissances à différents égards. La principale contribution apportée par ces travaux concerne la base de l'étude des suspensions de cellules végétales. La quasi-totalité des travaux réalisés utilisent la biomasse sèche comme variable de suivi de la croissance (chapitre 2). Les quelques chercheurs utilisant le compte cellulaire considèrent cette variable comme secondaire et indépendante de la biomasse.

Or, par une étude des limitations nutritionnelles et une modélisation basée sur le cycle cellulaire, les travaux de ce projet de recherche démontrent clairement que, dans un premier temps, la concentration cellulaire est primordiale à une caractérisation

adéquate de la phase de croissance de cultures de cellules végétales. Cette variable est aussi importante, sinon plus, que la biomasse sèche. Dans un second temps, les résultats du modèle cellulaire mettent en lumière le lien étroit reliant la concentration cellulaire à la biomasse sèche. Ces deux variables ne sont donc pas indépendantes, mais bien reliées. En somme, la concentration cellulaire doit remplacer la biomasse au centre de la caractérisation de l'évolution des suspensions de cellules végétales.

Quelques autres avancées sont aussi à mentionner. Tout d'abord, l'étude axée sur le métabolisme de l'azote a permis de démystifier l'impact du ratio NO_3/NH_4 sur la croissance des cellules végétales. Plusieurs auteurs (section 2.4.2.3) identifient une plage de ce rapport à l'extérieur de laquelle les organismes à l'étude ne peuvent croître. Ceci a pour effet de limiter la marge de manoeuvre des chercheurs dans l'élaboration des milieux de culture. Or, les travaux de ce projet sur les sources azotées et leur contre-ion, combinés à la démonstration biochimique se trouvant à l'annexe F, démontrent que l'impact associé au rapport NO_3/NH_4 provient en fait d'un effet de pH provoqué par un débalancement protonique. Le rapport des sources azotées n'est plus un facteur limitant lorsque des contre-ions appropriés sont sélectionnés.

D'un point de vue modélisation, la technique en deux étapes utilisée dans le cadre de ce projet permet de séparer les cinétiques associées à la croissance de la biomasse sèche de celles découlant de la prolifération cellulaire, puis d'associer ces cinétiques à leurs homologues d'un modèle ségrégué basé sur le cycle cellulaire. De cette manière,

un modèle ségrégué peut rapidement être obtenu grâce à l'information provenant du modèle non ségrégué.

Finalement, la théorie de commande adaptative sous-optimisante présentée par van Impe (1993) est généralisée au système multivariable en y adjoignant un modèle de croissance décrivant l'évolution des variables à contrôler. Cet outil permet le contrôle de plusieurs variables contenues dans les modèles de croissance à partir d'un minimum d'information. L'application utilisée dans ce cas-ci pour valider le développement de cet outil, contrôle individuellement et simultanément quatre concentrations nutritionnelles à partir d'une seule variable mesurée en continu.

BIBLIOGRAPHIE

Al-Rubeai, M., Singh, R.P., Emery, A.N. et Zhang, Z. 1995. Cell cycle and cell size dependence of susceptibility to hydrodynamic forces. Biotechnology and Bioengineering, 46, 88-92.

Alan H. Scragg. 1995. The Problems Associated with High Biomass Levels in Plant Cell Suspensions. Plant Cell. Tissue and Organ Culture, 43, 163-70.

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. 1992. Biologie moléculaire de la cellule. Paris: Flammarion.

Albiol, J., Campmajo, C., Casas, C. et Poch, M. 1995. Biomass estimation in Plant Cultures: A Neural Network Approach. Biotechnol. Prog., 11, 1, 88-92.

Ali, I.A., Kafkafi, U., Yamaguchi, I., Sugimoto, Y. et Inanaga, S. 1998. Response of oilseed rape plant to low root temperature and nitrate:ammonium ratios. Journal of Plant Nutrition, 21, 7, 1463-81.

Allen, G.J., Wyn Jones, R.G. et Leigh, R.A. 1995. Sodium transport in plasma membrane vesicules isolated from wheat genotypes with differing K/Na discrimination traits. Plant, Cell and Environment, 18, 105-15.

Ante A., H. VossMicrokinetics and mathematical simulatio of enhanced biological phosphorus removal. IEEE 1994; 1994.

Apostol, I., Low, P.S. 1989. Rapid stimulation of an oxidative burst during elicitation of cultured plant cells. Plant Physiology, 90, 109-16.

Archambault, J. 1991. Large-scale (20 l) culture of surface-immobilized *Catharanthus roseus* cells. Enzyme Microbiology and Technology, 13, November, 882-92.

Archambault J., L. Lavoie, R.D. Williams et C. Chavarie. 1991. Nutritionnal aspects of *Daucus carota* somatic embryo cultures performed in bioreactors. VIII ICPTCC; 1991; Florence, France.

Archambault, J., Volesky, B. et Kurz, W.G.W. 1990. Development of bioreactors for the culture of siurface immobilized plant cells. Biotechnology and Bioengineering, 35, 702-11.

Archambault, J., Volesky, B. et Kurz, W.G.W. 1990. Production of indole alkaloids by surface immobilized *C. roseus* cells. Biotechnology and Bioengineering, 35, 660-7.

Archambault, J., Williams, R.D., Bédard, C. et Chavarie, C. 1996. Production of sanguinarine by elicited plant cell culture I. Shake flask suspension cultures. Journal of Biotechnology, 46, 95-105.

Archambault, J., Williams, R.D., Perrier, M. et Chavarie, C. 1996. Production of sanguinarine by elicited plant cell culture III. Imobilized bioreactor cultures. Journal of Biotechnology, 46, 121-9.

Archambault, J., Williams, R.D., Lavoie, L., Pépin, M.-F. et Chavarie, C. 1994. Production of Somatic Embryos in a Helical Ribbon Impeller Bioreactor. Biotechnology and Bioengineering, 44, 930-43.

Aslam, M., Travis, R.L. et Rains, D.W. 1996. Evidence for substrate induction of a nitrate efflux system in barley roots. Plant Physiology, 112, 1167-75.

Aslam, M., Travis, R.L., Rains, D.W. et Huffaker, R.C. 1997. Differential effect of ammonium on the induction of nitrate and nitrite reguctase activities in roots of barley (*Hordeum vulgare*) seedling. Physiologia Plantarum, 101, 612-9.

Aubry D. 1995. Développement et commande d'un procédé de production de sanguinarine à partir de la culture en suspension de cellules de plantes. Montréal: École Polytechnique de Montréal.

Bacanamwo, M., Harper, J.E. 1997. The feedback mecanism of nitrate inhibition of nitrogenase activity in soybean may involve asparagine and/or products of its metabolism. Physiologia Plantarum, 100, 371-7.

Bailey and Ollis. The influence of Temperature and pH on Growth kineticsp 181-5.

Bailey C.M., Nicholson, H. 1989. A New Structured Model for Plant Cell Culture. Biotechnology and Bioengineering, 34, 1331-6.

Bailey, C.M., Nicholson, H. 1990. Optimal Temperature Control for a Structured Model of Plant Cell Culture. Biotechnology and Bioengineering, 35, 252-9.

Bailey, J.S. 1998. Varying the ratio of ^{15}N-labelled ammonium and nitrate-N supplied to perennial ryegrass: effects on nitrogen absorption and assimilation, and plant growth. New Phytol., 140, 505-18.

Bailey JE, Ollis DF. 1986. Biochemical Engineering Fundamentals. New York: McGraw Hill Inc.

Baker, D.C., Dougall, D.K., Gläβgen, W.E., Johnson, S.C., Metzger, J.W., Rose, A. et Seitz, H.U. 1994. Effects of supplied cinnamic acids and biosynthetic intermediates on the anthocyanins accumulated by wild carrot suspension cultures. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 39, 79-91.

Balagué, C., Wilson, G. 1982. Growth and alkaloid biosynthesis by cell suspensions of *Catharanthus roseus* in a chemostat under sucrose and phosphate limiting conditions. Physiologie Végétale, 20, 3, 515-22.

Ball, S., Guan, H.-P., James, M., Myers, A., Keeling, P., Mouille, G., Buléon, A., Colonna, P. et Preiss, J. 1996. From glycogen to amylopectin: A model for the biogenesis of plant starch granule. Cell, 86, 349-52.

Ballica, R., Ryu, D.D.Y. 1993. Effects of Rheological Properties and Mass Transfer on Plant Cell Bioreactor Performance: Production of Tropane Alkaloids. Biotechnology and Bioengineering, 42, 10, 1181-9.

Baltzis, B.C., Tsangaris, D.M. et Wang, K.-W. 1996. Utilisation of substituable substrates in a bioreactor under cycling: a study on process dynamics and optimisation. Chemical Engineering Science, 51, 15, 3801-11.

Barak, P., Smith, J.D., Krueger, A.R. et Peterson, L.A. 1996. Measurment of short-term nutrient uptake rates in cranberry by aeroponics. Plant, Cell and Environment, 19, 237-42.

Barford, J.P., Hall, R.J. 1978. An evaluation of the approaches to the mathematical modelling of microbial growth. Process Biochemistry, 22-9.

Basak, S., Velayudhan, A. et Ladisch, M.R. 1995. Simulation of diauxic production of cephalosporin C by *Cephalosporium acremonium*: Lag model for fed-batch fermentation. Biotechnol. Prog., 11, 626-631.

Bateman, K.S., Congiu, M., Tregear, G.W., Clarke, A.E. et Anderson, M.A. 1997. Bacitracin significantly reduces degradation of peptides in plant cell cultures. Biotechnology and Bioengineering, 53, 2.

Beck, E., Renner, U. 1989. Ammonium triggers uptake of NO3- by *Chenopodium rubrum* suspension culture cells and remobilization of their vacuolar nitrate pool. Plant Cell Physiology, 30, 4, 487-95.

Bedell, J.P., Chalot, M., Garnier, A. et Botton, B. 1999. Effects of nitrogen source on growth and activity of nitrogen-assimilating enzymes in Douglas-fir seedlings. Tree Physiology, 19, 205-10.

Beilby, M.J., Walker, N.A. 1996. Modeling the current-voltage charactheristics of *Chara* membranes: I. The effect of ATP removal and zero turgor. J. Membrane Biol., 149, 89-101.

Bhadra, R., Vani, S. et Shanks, J.V. 1993. Production of Indole Alkaloids by Selected Hairy Root Lines of *Catharanthus roseus*. Biotechnology and Bioengineering, 41, 5, 581-92.

Biddington, N.L. 1992. The influence of ethylene in plant tissue culture. Plant Growth Regulation, 11, 173-87.

Bieleski, R.L. 1973. Phosphate pools, phosphate transport, and phosphate availability. Ann. Rev. Plant Physiol., 24, 225-52.

Bieleski, R. L., I.B. Ferguson. 1983. Physiology and Metabolism of Phosphate and Its Compounds Encyclopedia of plant physiology. Inorganic plant nutrion. Laüchi, A. and Bieleski, R.L. ed. Volume 15a. Springer. p 422-49.

Bieleski, R.L., Laüchli, A. 1992. Phosphate uptake efflux and the deficiency in the water fern, *Azolla*. Plant Cell and Environnement, 15, 665-73.

Bloom, A.J., Jackson, L.E. et Smart, D.R. 1993. Root growth as a function of ammonium and nitrate in the root zone. Plant Cell and Environnement, 16, 199-206.

Bond, P.A., Fowler, M.W. et Scragg, A.H. Growth of *Catharanthus roseus* cell suspension in bioreactor: on-line analysis of oxygen and carbon dioxide levels in inlet and outlet gas streams. Biotechnology Letters, 10, 10, 713-8.

Botta, B., Dall'Olio, G., Ferrari, F., Monacelli, B., Pasqua, G., Scurria, R. et Delle Monache, G. 1989. Cell Suspension Cultures of *Cassia didymobotrya*: Optimization of Growth and Secondary Metabolite Production by Application of the Orthogonal Design Method. Journal of Plant Physiology, 135, 290-4.

Bowling, D.J.F. 1983. A Relationship between Phosphate Uptake and Membrane Electrical Potential in Excised Roots of *Helianthus annuus*. Journal of Experimental Botany, 34, 111-7.

Bown, A.W. 1985. CO_2 and intracellular pH. Plant, Cell and Environment, 8, 459-65.

Boxman, A.W., Roelofs, J.G.M. 1988. Some effects of nitrate versus ammonium nutrition on the nutrient fluxes in Pinus sylvestris seedlings. Effects of mycorrhizal infection. Canadian Journal of Botany, 66, 1091-7.

Bramble, J.L., Graves, D.J. 1991. Calcium and phosphate effects on growth and alkaloid production of *Coffea arabica*: Experimental results ans mathematical model. Biotechnology and Bioengineering, 37, 859-68.

Briskin, D.P., Poole, R.J. 1983. The plasma membrane ATPase of higher plant cells. Plant Physiology, 14, 1, 1-4.

Burns, I.G., Walker, R.L. et Moorby, J. 1997. How do nutriens drive growth? Plant and Soil, 196, 321-5.

Byun, S.Y., Pederson, H. et Chin, C.-K. 1990. Two-phase culture for the enhanced production of benzophenantridine alkaloids in cell suspensions of *Eschscholtzia californica*. Phytochemistry, 29, 10, 3135-9.

Cao, Y., Ward, J.M., Kelly, W.B., Ichida, A.M., Gaber, R.F., Anderson, J.A., Uozumi, N., Schroeder, J.I. et Crawford, N.M. 1995. Multiple genes, tissue specificity, and expression-dependent modulation contribute to the functional diversity of potassium channels in *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiology, 109, 1093-106.

Chang, Q., Randers-Eichhorn, L., Lakowicz, J.R. et Rao, G. 1998. Steam-sterilizable, fluorescence lifetime-based sensing film for dissolved carbon dioxide. Biotechnol. Prog., 13, 326-31.

Chapin, F.S.I., Bieleski, R.L. 1982. Mild phosphorus stress in barley and a related low-phosphorus-adapted barleygrass: Phosphorus fractions and phosphate absorption in relation to growth. Physiologia Planta, 54, 309-17.

Chapin, F.S.I., Moilanen, L. et Kielland, K. 1993. Preferential use of organic nitrogen for growth by a non-mycorrhizal arctic sedge. Nature, 361, 150-3.

Charlwood BV, Rhodes MJC. 1990. Secondary Products from plant tissue culture. Oxford: Clarendon Press.

Chauret, N., Archambault, J. 1991. Fluorometric detection after liquid chromatographic separation of benzophenantridine alkaloids obtained from cultured cells. Analytica Chimica Acta, 249, 231-4.

Choi, M.-S., Kwak, S.-S., Liu, J.-R., Park, Y.-G., Lee, M.-K. et An, N.-H. 1995. Taxol and related compuonds in korean native yews (*Taxus cuspidata*). Planta Med., 61, 264-6.

Clarkson, D.T., Scattergood, C.B. 1982. Growth and Phosphate Transport in Barley and Tomato Plants During the Development of, and Recovery from, Phosphate-stress. Journal of Experimental Botany, 33, 136, 865-75.

Clément B. 1999. Design et analyse statistique d'expériences industrielles. Montréal: École Polytechnique de Montréal.

Clement, C.R., Hopper, M.J. et Jones, L.H.P. 1978. The uptake of nitrate by *Lolium perenne* from flowing nutrient solution. Journal of Experimental Botany, 29, 109, 453-64.

Cline, S.D., Coscia, C.J. 1989. Ultrastructural changes associates with the accumulation and secretion of sanguinarine in *Papaver bracteatum* suspension cultures treated with fungal elicitor. Planta, 178, 303-14.

Cohelo H. 2000. Développement d'un procédé pour la culture à haute concentration de cellules végétales. Montréal: École Polytechnique de Montréal.

Collins-Pavao, M., Chin, C.-K. et Pederson, H. 1996. Taxol partitioning in two-phase plant cell cultures of *Taxus brevifolia* . Journal of Biotechnology, 49, 95-100.

Cosgrove, D.J. 1997. Relaxation in a high-stress environment: the molecular bases of extensible cell walls and cell enlargement. The Plant Cell, 9, July, 1031-41.

Coster, H.G.L., Steudle, E. et Zimmermann, U. 1977. Turgor Pressur Sensing in Plant Cell Membranes. Plant Physiology, 58, 636-43.

Cram, W.J. 1983. Chloride Accumulation in Plant Cells as a Homeostatic System: Energy Supply as a Dependent Variable. J. Membrane Biol., 74, 51-8.

Cram, W.J. 1973. Internal factors Regulating Nitrate and Chloride Influx in Plant Cells. Journal of Experimental Botany, 24, 19, 328-41.

Crawford, N.M. 1995. Nitrate: Nutrient and Signal for Plant Growth. The Plant Cell, 7, July, 859-68.

Crawford, N.M., Glass, A.D.M. 1998. Review - Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. Trends in Plant Science, 3, 10, 389-95.

Creelman, R.A., Mullet, J.E. 1997. Oligosaccharins, Brassinolides, and Jasmonates: Nontraditional Regulators of Plant Growth, Development, and Gene Expression. The Plant Cell, 9, July, 1211-23.

Cresswell, R.C., Syrett, P.J. 1982. The uptake of nitrite by the Diatom Phaeodactylum: Interactions between nitrite and nitrate. Journal of Experimental Botany, 33, 137, 1111-21.

Crist, R.H., Martin, J.R., Carr, D., Watson, J.R. et Clarke, H.J. 1994. Interaction of metals and protons with algae. 4. Ion exchange vs adsorption models and a reassessment of scatchard plots; ion-exchange rates and equilibria compared with calcium alginate. Environ. Sci. Technol., 28, 1859-66.

Culotta, E. 1995. Will plants profit from high CO2 ? Science, 268, May, 654-6.

Curtis, W.R., Emery, A.H. 1993. Plant Cell Suspension Culture Rheology. Biotechnology and Bioengineering, 42, 4, 520-6.

Curtis, W.R., Hasegawa, P.M. et Emery, A.H. 1991. Modeling Linear and Variable Growth in Phosphate Limited Suspension Cultures of Opium Poppy. Biotechnology and Bioengineering, 38, 4, 371-9.

Dahod, S.K. 1993. Dissolved carbon dioxide measurment and its correlation with operating parameters in fermentation processes. Biotechnol. Prog., 9, 655-60.

Davey, H.M., Davey, C.L., Woodward, A.M., Edmonds, A.N., Lee, A.W. et Kell, D.B. 1996. Oscillatory, stochastic and chaotic growth rate fluctuations in permittistatically controlled yeast cultures. BioSystems, 39, 43-61.

de Gucht, L.P.E., van der Plas, L.H.W. 1995. Growth Kinetics of Glucose-Limited *Petunia hybrida* Cells in Chemostat Cultures: Determination of Experimental Values for Growth and Maintenance Parameters. Biotechnology and Bioengineering, 47, 42-52.

de Gucht, L.P.E., van der Plas, L.H.W. 1996. Growth and respiration of *Petunia hybrida* cells in chemostat cultures: A comparison of glucose-limited and nitrate-limited cultures. Biotechnology and Bioengineering, 52, 412-22.

de Tremblay, M., Perrier, M., Chavarie, C. et Archambault, J. 1993. Fed-batch culture of hybridoma cells: comparison of optimal control approach and closed loop strategies. Bioprocess Engineering, 9, 13-21.

de Visser, R., C.J.T. Spitters et T.J. Bouma. 1992. Energy cost of protein turnover: Theoretical calculation and experimental estimation from regression of respiration on protein concentration of full-grown leaves Molecular, biochemical and physiological aspects of plant respiration . H. Lambers, L.H.W. van der Plas ed. The Hague: SPB Academic Publishing. p 493-508.

Dennis Francis, Nigel G. Halford. 1995. The Plant Cell Cycle. Physiologia Plantarum, 93, 365-74.

Do, C.B., Cormier, F. 1991. Effects of high ammonium concentrations on growth and anthocyanin formation in grape (*Vitis vinifera* L.) cell suspension cultured in a production medium. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 27, 169-74.

Doddema, H., Otten, H. 1979. Uptake of Nitrate by Mutants of Arabidopsis thaliana, Disturbed in Uptake or Reduction of Nitrate. III.Regulation. Physiologia Planta, 45, 339-46.

Doddema-Lennard, E.G., Robson, A.D. et Greenway, H. 1982. Effect of Phosphorus Deficiency and Water Deficit on Phosphatase Activities from Wheat Leaves. Journal of Experimental Botany, 33, 135, 682-93.

Dougall, D.K., LaBrake, S. et Whitten, G.H. 1983. The Effects of Limiting Nutrients, Dilution Rate, Culture pH, and temperature on the Yield Constant and Anthocyanin

Accumulation of Carrot Cells Grown in Semicontinuous Chemostat Cultures. Biotechnology and Bioengineering, 25, 569-79.

Dougall, D.K., Baker, D.C., Gakh, E.G., Redus, M.A. et Whittemore, N.A. 1998. Anthocyanins from wild carrot suspension cultures acylated with supplied carboxylic acids. Carbohydrate Research, 310, 177-89.

Dougall, D.K., Weyrauch, K.W. 1980. Growth and anthocyanin production by carrot suspension cultures grown under chemostat conditions with phosphate as the limiting nutrient. Biotechnology and Bioengineering, 22, 337-52.

Drapeau, D., Blanch, H.W. et Wilke, C.R. 1986. Growth Kinetics of *Dioscorea deltoidea* and *Catharanthus roseus* in Batch Culture. Biotechnology and Bioengineering, 28, 1555-63.

Ducos, J.P., Pareilleux, A. 1986. Effect of aeration rate and influence of pO_2 in large-scale cultures of *Catharanthus roseus*. Applied Microbiology and Biotechnology, 25, 101-5.

Dunlop, E.H., Namdev, P.K. et Rosenberg, M.Z. 1994. Effect of Fluid Shear Forces on Plant Cell Suspensions. Chemical Engineering Science, 49, 14, 2263-76.

Ebrahim, M.K.H., Zingsheim, O., Veith, R., Abo-Kassem, E. et Komor, E. 1999. Sugar uptake and storage by sugarcane suspension cells at different temperatures and high sugar concentrations. Journal of Plant Physiology, 154, 610-6.

Ecker, J.R. 1995. The ethylene signal transduction pathway in plants. Science, 268, May, 667-80.

Eilert, U., Kurz, W.G.W. et Constabel, F. 1985. Stimulation of sanguinarine accumulation in *Papaver somniferum* cell cultures by fungal elicitors. Journal of Plant Physiology, 119, 65-76.

Eriksson, T. 1966. Partial synchonization of cell division in suspension cultures of Haplopappus gracilis. Physiologia Plantarum, 19, 900-10.

Fairbairn, J.W., Steele, M.J. 1980. Bound forms of alkaloids in *Papaver somniferum* and *P. bracteatum*. Phytochemistry, 19, 2317-21.

Fencl, Z. 1966. Theoretical and methodological basis of continuous culture. I. Malek and Z.Fencl ed. New York: Academic Press. p 79-88.

Fett-Neto, A.G., Zhang, W.Y. et DiCosmo, F. 1994. Kinetics of Taxol production, growth, and nutrient uptake in cell suspensions of *Taxus cuspidata*. Biotechnology and Bioengineering, 44, 205-10.

Fiechter A. 1980. Advances in biochemical engineering. New-York: Springer Verlag.

Frazier, G.C. 1989. A Simple, Leaky Cell Growth Model for Plant Cell Aggregates. Biotechnology and Bioengineering, 33, 313-20.

Furbank, R.T., Badger, M.R. et Osmond, C.B. 1982. Photosynthetic oxygen exchange in isolated cells and chloroplasts of C3 plants. Plant Physiology, 70, 927-31.

Gamborg, O.L. The effects of amino acids and ammonium on the growth of plant cells in suspension culture. Plant Physiology, 45, 372-5.

Gamborg, O.L., Miller, R.A. et Ojima, K. 1968. Nutrient requirments of suspension cultures of soybean root cells. Experimental Cell Research, 50, 151-8.

Gauthier, D.A., Turpin, D.H. 1997. Interactions between inorganic phosphate (Pi) assimilation, photosynthesis and respiration in the Pi-limited green alga *Selenastrum minutum*. Plant Cell and Environnement, 20, 12-24.

Gehan O., M. M'Saad, M. Farza et E. PigeonRobust control and nonlinear estimation for bioprocess monitoringElsevier Science. Proceedings of the 14th world congress of International Federation of Automatic Control; 1999 Jul 5-1999 Jul 9; Beijing, China. Pergamon.

Geider, R.J., MacIntyre, H.L. et Kana, T.M. 1997. Dynamic model of phytoplankton growth and acclimatation: responses of the balanced growth rate and the chlorophyll a: carbon ratio to light, nutrient-limitation and temperature. Marine Ecology Progress Series, 148, 187-200.

Gerson, D.F., Kole, M.M., Ozum, B. et Oguztoreli, M.N. 1988. Substrate Concentration Control in Bioreactors. Biotechnology and Genetic Engineering Reviews, 6, September.

Gijsman, A.M. 1990. Nitrogen nutrition of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) on strongly aced sandy soil. I. Growth, nutrient uptake and ionic balance. Plant and Soil, 126, 53-61.

Glass, A.D.M., Siddiqi, M.Y., Ruth, T.J. et Rufty, T.W. 1990. Studies on the uptake of nitrate in barley II. Energetics. Plant Physiology, 93, 1585-9.

Glicklis, R., Mills, D., Sitton, D., Stortelder, W. et Merchuk, J.C. 1998. Polysaccharide production by plant cells in suspension: Experiments and mathematical modeling. Biotechnology and Bioengineering, 57, 6, 732-40.

Gniazdowska, A., Mikulska, M. et Rychter, A.M. 1998. Growth, nitrate uptake and respiration rate in bean roots under phosphate deficiency. Biologia Plantarum, 41, 2, 217-26.

Gong, X., Chen, F. 1997. Optimisation of culture medium for growth of *Haematococcus pluvialis*. Journal of Applied Phycology, 9, 5, 437-44.

Gong, X., Chen, F. 1998. Influence of medium components on astaxanthin content and production of *Haematococcus pluvialis*. Process Biochemistry, 33, 4, 385-91.

Goodchild, J.A., Givan, C.V. 1990. Influence of ammonium and extracellular pH on the amoni and organic acid contents of suspension culture cells of *Acer pseudoplatanus*. Physiologia Plantarum, 78, 29-37.

Gout, E., Bligny, R. et Douce, R. 1992. Regulation of Intracellular pH Values in Higher Plant Cells. Carbon-13 and phosphorous-31 nuclear magnetic resonance studies. The Journal of Biological Chemistry, 267, 20, 13903-9.

Griffiths B. 1984. The use of oxidation-reduction potential (ORP) to monito growth during a cell culture. 5th General Meeting of ESACT; 1982; Copenhagen, Danemark. p 113-6.

Grm, B., Mele, M. 1980. Model of Growth and Ergot Alkaloid Production of *Claviceps purpurea*. Biotechnology and Bioengineering, 22, 255-70.

Grosz, R., Stephanopoulos, G. et San, K.-Y. 1984. Studies on On-Line Bioreactor Identification. III. Sensitivity Problems with Respiratory and Heat Evolution Measurments. Biotechnology and Bioengineering , 26, 1198-208.

Grouzis, J.-P., Pouliquain, P., Rigaud, J., Grignon, C. et Gibrat, R. 1997. In vivo study of passiv nitrate transport by native and reconstituted plasma membrane vesicles from corn root cells. Biochimica Biophysica Acta, 1325, 329-42.

Grouzis, J.-P., Pouliquin, P., Rigaud, J., Grignon, C. et Gibrat, R. 1997. In vitro study of passive nitrate transport by native and reconstitued plasma membrane vesicles from corn root cells. Biochimica Et Biophysica Acta, 1325, 329-42.

Guardiola, J., Iborra, J.L. et Canovas, M. 1995. A Model That Links Growth and Secondary Metabolite Production in Plant Cell Suspension Cultures. Biotechnology and Bioengineering, 46, 3, 291-7.

Gupta, S.C., Beevers, L. 1983. Environmental influences on nitrite redectase activity in *Pisum sativum* L. Seedlings. Journal of Experimental Botany, 34, 148, 1455-62.

H.M. Nigra, M.A. Alvarez et A.M. Giulietti. 1990. Effect of Carbon and Nitrogen Sources on Growth and Solasodine Production in Batch Suspension Cultures of *Solanum eleagnifolium* Cav. Plant Cell. Tissue and Organ Culture, 21, 55-60.

Hagendoorn, M.J.M., van der Plas, L.H.W. et Segers, G.J. 1994. Accumulation of anthraquinones in *Morinda citrifolia* cell suspensions. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 38, 227-34.

Hammel, K.E., Cornwell, K.L. et Bassham, J.A. 1979. Stimulation of dark CO2 fixation by ammonia in isolated mesophyll cells of *Papaver somniferum* L. Plant and Cell Physiology, 20, 8, 1523-9.

Harkrader, R.J., Reinhart, P.C., Rogers, J.A., Jones, R.R., Wylie II, R.E., Lowe, B.K. et McEvoy, R.M. 1990. The history, Chemistry and Pharmacokinetics of Sanguinaria Extract. Journal of The Canadian Dental Association, 56, 7, 7-12.

Hatfield, P. M., R.D. Vierstra. 1990. Protein degradation Plant Physiology, Biochemistry and Molecular Biology. Bennis, D.T.and Turpin, D.H. ed. Longman scientific and technical.

Hayashi, T., Yoshida, K. et Sano, K. 1988. Formation of alkaloids in suspension-cultured *Colchicum autumnale*. Phytochemistry, 27, 1371-4.

Hegarty, P.K., Smart, N.J., Scragg, A.H. et Fowler, M.W. 1986. The aeration rate of *Cathanranthus roseus* L.G. Don suspension cultures in airlift bioreactors: the inhibitory effect at high aeration rates on culture growth. Journal of Experimental Botany, 37, 185, 1911-20.

Henzler, H.-J., Schedel, M. 1991. Suitability of the shaking flask for oxygen supply to microbiological cultures. Bioprocess Engineering, 7, 123-31.

Herbera, R., Johnson, C.B. 1997. Involvement of Magnesium and ATP in the Regulation of Nitrate Reductase Activity in *Sinapis alba*. Phytochemistry, 44, 1, 11-6.

Hewitt, E. J., D.P. Hucklesby et B.A. Notton. 1976. Nitrate Metabolism Plant Biochemistry. California Institute of Technology ed. New York: Academic Press. p 633-81.

Hilton, M.G., Rhodes, M.J.C. 1994. The effects of varying levels of Gamborg's B5 salts and temperature on the accumulation of starch and hyoscyamine in batch culture of transformed roots of *Datura stramonium*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 38, 45-51.

Ho, C.S., Shanahan, J.F. 1986. Carbon dioxide transfer in bioreactors. CRC Crit. Rev. Biotech., 4, 2, 185-252.

Ho, C.-H., Henderson, K.A. et Rorrer, G.L. 1995. Cell damage and oxygen mass transfer during cultivation of *Nicotiana tabacum* in a stirred-tank bioreactor. Biotechnology Progress, 11, 140-5.

Hoefnagel, M.H.N., Iren, f.V., Libbenga, K.R. et Plas, L.H.W.V.d. 1994. Possible role of adenylates in the engagement of the cyanide-resistant pathway in nutrient-starved *Catharanthus roseus* cells. Physiologia Plantarum, 90, 269-78.

Hohe, A., Winkelmann, T. et Schwenkel, H.-G. 1999. CO2 accumulation in bioreactor suspension cultures of *Cyclamen persicum* Mill. and its effect on cell growth and regeneration of somatic embryos. Plant Cell Reports, 18, 863-7.

Hooker, B.S., Lee, J.M. 1992. Application of a New Structured Model to Tobacco Cell Cultures. Biotechnology and Bioengineering, 39, 7, 765-74.

Horn, M.A., Meadows, R.P., Apostol, I., Jones, C.R., Gorenstein, D.G., Heinstein, P.F. et Low, P.S. 1992. Effect of elicitation and changes in extracellular pH on the

cytoplasmic and vacuolar pH of suspension-cultured soybean cells. Plant Physiol., 98, 680-6.

Hunt, G.J., Helgeson, P.J. 1989. A medium and simplified procedure for growing single cells from *Solanum* species. Plant Science, 60, 251-7.

I. Dvorak. 1983. Analysis of Time Hyerarchy in Plant Cell Volume Changes. J. Theor. Biol., 101, 87-112.

Imas, P., Bar-Yosef, B., Kafkafi, U. et Ganmore-Neumann, R. 1997. Phosphate induced carboxylate and proton release by tomato roots. Plant and Soil, 191, 35-9.

Imas, P., Bar-Yosef, B., Kafkafi, U. et Ganmore-Neumann, R. 1997. Release of carboxylic anions and protons by tomato roots in response to ammonium nitrate ratio and pH in nutrient solution. Plant and Soil, 191, 27-34.

Imsande, J., Touraine, B. 1994. N demand and the regulation of nitrate uptake. Plant Physiol., 105, 3-7.

Ingold W. Redox measurment. Principles and problems. Wilmington, USA.

Ireland, R. 1990. Amino acid and ureide biosynthesis Plant Physiology, Biochemistry and Molecular Biology. Bennis, D.T.and Turpin, D.H. ed. Longman scientific and technical.

Isaksson, A.J., Kaul, V. 1995. Identifying process models when some data are missing. Pulp and Paper Canada, 96, 8, 48-51.

Jack Dainty. 1962. Ion Transport and Electrical Potentials in Plant Cells. Annual Review of Plant Physiology, 13, 379-402.

Jacobs, T. 1997. Why do plant cells divide ? The Plant Cell, 9, 1021-9.

James WO. 1953. Plant respiration. Oxford: Clarendon Press.

Jessup, W., Fowler, M.W. 1976. Interrelationships between Carbohydrate Metabolism and Nitrogen Assimilation in Cultured Plant Cells I. Effects of Glutamate and Nitrate as Alternative Nitrogen Sources on Cells Growth. Planta (Berl.), 132, 119-23.

Jessup, W., Fowler, M.W. 1976. Interrelationships between Carbohydrate Metabolism and Nitrogen Assimilation in Cultured Plant Cells II. The effect of the nitrogen source and concentration on nutrient uptake and respiratory activity in cultured sycamore cells. Planta (Berl.), 132, 125-9.

Johannes, E., Crofts, A. et Sanders, D. 1998. Control of Cl^- efflux in Chara corallina by cytosolic pH, free Ca^{2+}, and phosphorylation indicates a role of plasma membrane anoin channels in cytosolic pH regulation. Plant Physiology, 118, 173-81.

Jolicoeur, M., Chavarie C., Carreau, P.J. et Archambault, J. 1992. Development of a helical-ribbon impeller bioreactor for high-density plant cell suspension culture. Biotechnology and Bioengineering, 39, 511-21.

Junker, B.H., Reddy, K., Gbewonyo, K. et Greasham, R. 1994. On-line and in-situ monitoring technology for cell density measurement in microbial and animal cell cultures. Bioprocess Engineering, 10, 195-207.

Kalk, J. P., A.F. Langlykke. 1986. Cost estimation for biotechnology projects Manual of industrial microbiology and biotechnology. Demain, A.H. and Sohaman, N.A. ed. Am. Soc. for Microb. p 363-85.

Kamen, A.A., Chavarie, C., André, G. et Archambault, J. 1992. Design o<parameters and performance of a surface baffled helical ribbon impeller bioreactor for the culture of shear sensitive cells. Chemical Engineering Science, 47, 9-11, 2375-80.

Kamminga-van Wijk, C., Prins, H.B.A. 1993. The kinetics of NH_4^+ and NO_3^- uptake by Douglas-fir from single N-solutions and from solutions containing both NH_4^+ and NO_3^-. Plant and Soil, 151, 91-6.

Kanazawa, T., Distefano, M. et Dassham, J.A. 1983. Ammonia regulation of intermediary metabolism in photosynthesizing and respiring *Chlorella pyrenoidosa*: Comparative effects of methylamine. Plant and Cell Physiology, 24, 6, 979-86.

Kato, A., Fukasawa, A., Shimizu, Y., Soh, Y. et Nagai, S. 1977. Requirement of PO4 3-, No3 -, So4 2-, K+, and Ca 2+ for the Growth of Tobacco cells in suspension culture. Journal of Fermentation Technology, 55, 3, 207-12.

Kende, H., Zeevaart, A.D. 1997. The Five "Classical" Plant Hormones. The Plant Cell, 9, July, 1197-210.

Khan, M.A., Ungar, I.A. et Showalter, A.M. 1999. Effects of salinity on growth, ion content, ans osmotic relations in *Halopyrum mucronatum* (L.) Stapf. Journal of Plant Nutrition , 22, 1, 191-224.

King, P. J. 1980. Plant tissue culture and the cell cycle Advances in Biochemical Engineering. Fiechter, A. ed. Volume 18. New York: Springer Verlag. p 1-38.

King, P.J. 1977. Studies on the Growth in Culture of Plant Cells XXII: Growth limitation by nitrate and glucose in chemostat cultures of *Acer pseudoplatanus* L. Journal of Experimental Botany, 28, 108, 142-55.

Kleinsmith LJ, Kish VM. 1988. Principles of cell biology. New York: Harper & Row Publishers Inc.

Kobayashi, Y., Fukui, H. et Tabata, M. 1991. Effect of carbon dioxide and ethylene on berbeline production and cell browning in *Thalictrum minus* cell cultures. Plant Cell Reports, 9, 496-9.

Komamine, A., M. Sakuta, M. Hirose, H. Hirano, T. Takagi, K. Kakegawa et Y. Ozeki. 1989. Regulation of secondary metabolism in relation to growth and differentiation Primary and secondary metabolism of plant cell cultures II. Kurz, Wolfgang G.W. ed. New York: Springer Verlag. p 49-52.

Konstantinov, K.B. 1996. monitoring and Control of the Physiological State of Cell Cultures. Biotechnology and Bioengineering, 52, 271-89.

Krens, F.A., Trifonova, A., Keizer, L.C.P. et Hall, R.D. 1996. The effect of exogenously-applied phytohormones on gene transfer efficiency in sugarbeet (*Beta vulgaris* L.). Plant Science, 116, 97-106.

Kronzucker, H.J., Glass, A.D.M. et Siddiqi, M.Y. 1999. Inhibition of nitrate uptake by ammonium in barley. Analysis of component fluxes. Plant Physiology, 120, 283-91.

Kronzucker, H.J., Siddiqi, M.Y. et Glass, A.D.M. 1997. Conifer root discrimination against soil nitrate and the ecology of forest succession. Nature, 385, 59-61.

Kronzucker, H.J., Siddiqi, M.Y. et Glass, A.D.M. 1999. Nitrate-ammonium synergism in rice. A subcellular flux analysis. Plant Physiology, 119, 1041-5.

Kvaalen, H., von Arnold, S. 1991. Effects of various partial pressures of oxygen and carbon dioxide on different stages of somatic embryosgenesis in *Picea abies*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 27, 49-57.

Lai, F.-M., McKersie, B.D. 1994. Regulation of storage protein synthesis by nitrogen and sulfur nutrients in alfalfa (*medicago sativa* L.) somatic embryos. Plant Science, 103, 209-21.

Lambers, H. 1980. The physiological significance of cyanide-resistant respiration in higher plants. Plant, Cell and Environment, 3, 293-302.

Laties, G. G. 1982. The cyanide-resistant alternative path in higher plant respiration Annual Review in Plant Physiology. Volume 33. Annual Reviews Inc. p 519-55.

Laukkanen, H., Julkunen-Titto, R. et Hohtola, A. 1997. Effect of different nitrogen nutrient on the viability, protein synthesis and tannin production of Scots pine callus. Physiologia Plantarum, 100, 982-988.

Layzell, D. B. 1990. N2 fixation, No3- reduction and NH4+ assimilation Plant Physiology, Biochemistry and Molecular Biology . Bennis, D.T.and Turpin, D.H. ed. Longman scientific and technical.

Lea, P. J. 1993. Nitrogen metabolism Plant biochemistry and Molecular biology. Lea, Peter J. and Leegood, Robert C. ed. New York: John Wiley and Sons. p 155-80.

Lea, P. J., R.D. Blackwell et K.W. Joy. 1992. Ammonia assimilation in higher plants Nitrogen metabolism of plants. Mengel, K. and Pilbeam, D.J. ed. Volume 33. Oxford: Clarendon press. p 153-86.

Lee, S.H., Chae, H.S., Lee, T.K., Kim, S.H., Shin, S.H., Cho, B.H., Cho, S.H., Kang, B.G. et Lee, W.S. 1998. Ethylene-Mediated Phospholipid Catabolic Pathway in Glucose-Starved Carrot Suspension Cells. Plant Physiology, 116, 223-9.

Lefebvre, D.D., Glass, A.D.M. 1982. Regulation of phosphate influx in barley roots: Effects of phosphate deprivation and reduction of influx with provision of orthophosphate. Physiologia Planta, 54, 199-206.

Lefebvre, J., Vincent, J.-C. 1995. Diffusion-reaction-growth coupling in gel-immobilized cell systems: Model and experiment. Enzyme and Microbial Technology, 17, 276-84.

Lindsey, K., Yeoman, M.M. 1983. The relationship between growth rate, differentiation and alkaloid accumulation in cell cultures. Journal of Experimental Botany, 34, 145, 1055-65.

Lockwood, G.B. 1984. Alkaloids of cell suspensions of *Papaver*. Z.Pflanzenphysiol. Bd., 114, 361-3.

Lockwood, G.B. 1981. Orientalidine and isothebaine from cell cultures of *Papaver bracteatum*. Phytochemistry, 20, 6, 1463-4.

Lund, P. 1986. L-Glutamine and L-Glutamate: UV-Method with glutaminase and glutamate dehydrogenase Methods of enzymatic analysis. H.U. Bergmeyer ed. Volume 8. Verlagsgesellschaft, Weinheim: p 357-63.

MacCarthy, J.J., Ratcliffe, D. et Street, H.E. 1980. The effect of nutrient medium composition on the growth cycle of *Catharanthus roseus* G.Don cells grown on batch culture. Journal of Experimental Botany, 31, 124, 1315-25.

MacFarlane, J.J., Raven, J.A. 1990. C, N and P nutrition of *Lemanea mamillosa* Kütz. (Batrachospermales, Rhodophyta) in the Dighty Burn, Angus, U.K. Plant, Cell and Environment, 13, 1-13.

Marigo, G., Delorme, Y.-M., Lüttge, U. et Boudet, A.M. 1983. Rôle de l'acide malique dans la régulation du pH vacuolaire dans les cellules de *Catharanthus roseus* cultivées *in vitro*. Physiologie Végétale, 21, 6, 1135-44.

Marschner, H.M., Haüssling, H.M. et George, E. 1991. Ammonium and nitrate uptake rates and rhizosphere-pH in non-mycorrhizal roots of norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst). Trees, 5, 14-21.

Martens, D.E., Spikema, E.M., Gooijer, C.D.d., Beuvery, E.C. et Tramper, J. 1995. A Combined Cell-Cycle and Metabolic Model for the Growth of Hybridoma Cells in Steady-State Continuous Culture. Biotechnology and Bioengineering, 48, 49-65.

Martin, S.M., Rose, D. 1976. Growth of plant cell (*Ipomoea*) suspension cultures at controlled pH levels. Canadian Journal of Botany, 54, 1264-70.

McLean, B.G., Hempel, F.D. et Zambryski, P.C. 1997. Plant Intercellular Communication via Plasmodesmata. The Plant Cell, 9, July, 1043-54.

Meijer, J.J., Hoopen H.J.G. ten, Luyben, K.Ch.A.M. et Libbenga, K.R. 1993. Effects of hydrodynamic stress on cultured plant cells: A literature survey. Enzyme Microb. Technol., 15, 234-8.

Micheal E. Horn, Barry A Martin et Jack M. Widholm. 1992. Photoautotrophic Growth of Soybean Cells in Suspension Culture. II. Optimizion of culture medium and conditions. Plant Cell. Tissue and Organ Culture, 30, 85-91.

Micheal E. Horn, Jack M. Widholm. 1994. Photoautotrophic Growth of Soybean Cells in Suspension Culture. III. Characterization of carbon fixation products under high and low CO2 levels. Plant Cell. Tissue and Organ Culture, 39, 239-44.

Micheal Wink. 1994. The Cell Culture Medium - a functional extracellular compartment of suspension-cultured cells. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 38, 307-19.

Miller, A.J., Smith, S.J. 1996. Nitrate transport and compartmentation in cereal root cells. Journal of Experimental Botany , 47, 843-54.

Mirjalili, N., Linden, J.C. 1996. Methyl jasmonate induced production of taxol in suspension cultures of *Taxus cuspidata*: Ethylene interaction and induction models. Biotechnol. Prog., 12, 110-8.

Montes, F.J., Catalán, J. et Galán, M.A. 1998. A metabolic model describing growth and substrate uptake of *Trigonopsis variabilis*. Enzyme and Microbial Technology, 22, 329-34.

Moorby, J., R.T. Besford. 1983. The Supply of Mineral Nutrients and Their Concentration in Plants Encyclopedia of plant physiology. Inorganic plant nutrion. Laüchi, A. and Bieleski, R.L. ed. Springer.

Moore, A.L., Leach, G., Whitehouse, D.G., van den Bergen, C.W.M., Wagner, A.M. et Krab, K. 1994. Control of oxidative phosphorylation in plant mitochondria: the role of non-phosphorylating pathways. Biochimica Et Biophysica Acta, 1187, 145-51.

Morard, P., Henry, M. 1998. Optimization of mineral composition of in vitro culture media. Journal of Plant Nutrition, 21, 8, 1565-76.

Mori, T., Sakurai, M. Production of Anthocyanin from Strawberry Cell Suspension Cultures; Effects of Sugar and Nitrogen. Journal of Food Science, 59, 3, 588-93.

Muller, A.J., Grafe, R. 1978. Isolation and characterization of cell lines of *Nicotiana tabacum* lacking nitrate reductase. Mol Gen Genet, 161, 67-76.

Muller, B., Touraine, B. 1992. Inhibition of NO_3^- uptake by various phloem-translocated amino acids in soybean seedlings. Journal of Experimental Botany, 43, 617-23.

Nieman, R.H., Clark, R.A. 1976. Interactive effects of salinity and phosphorus nutrition on the concentrations of phosphate and phosphate esters in mature photosynthesizing corn leaves. Plant Physiology, 57, 157-61.

Nyholm, N. 1976. A Mathematical Model for Microbial Growth under Limitation by Conservative Substrates18, 1043-56.

O'Connor, G., Sanchez-Riera, F. et Cooney, C.L. 1992. Design and evaluation of control strategies for high cell density fermentations. Biotechnology and Bioengineering, 39, 293-304.

Oeggerli, A., Eyer, K. et Heinzle, E. 1995. On-Line Gas Analysis in Animal Cell Cultivation: I Control of dissolved oxygen and pH. Biotechnology and Bioengineering, 45, 42-53.

Ohmori, M. Effect of Ammonia on Dark CO2 Fixation by Anabaena Cells Treated with Methionine Sulfoximine. Plant and Cell Phuysiology, 22, 4, 709-16.

Oksman-Caldentey, K.-M., Sevon, N., Vanhala, L. et Hiltunen, R. 1994. Effects of nitrogen and sucrose on the primary and secondary metabolism of transformed root cultures of *hyoscyamus muticus*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 38, 263-72.

Oldshue, J.Y. 1983. Transport phenomena, reactor design and scale-up. Biotech Advc, 1, 17-30.

Panda, A.K., Mishra, S. et Bisaria, V.S. 1992. Alkaloid Production by Plant Cell Suspension Cultures of *Holarrhena antidysenterica*: 1. Effect of Major Nutrients. Biotechnology and Bioengineering, 39, 10, 1043-51.

Pareilleux, A., Vinas, R. 1983. Influence of the aeration rate on the growth yeild in suspension cultures of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. Lournal of Fermentation Technology, 61, 4, 429-33.

Park, J.M., Yoon, S.Y., Giles, K.L., Songstad, D.D., Eppstein, D., Novakovski, D., Friesen, L. et Roewer, I. 1992. Production of sanguinarine by suspension culture of *Papaver somniferum* in bioreactors. Journal of Fermentation and Bioengineering, 72, 5, 292-6.

Park J., K.L. Giles et D.D. Songstad. 1990. Industrial production of sanguinarine from the cell suspension culture of *Papaver somniferum*. APBioChFC'90; 1990 Apr 22-1990 Apr 25; Kvungju, Korea.

Park, S.M., Klapa, M.I., Sinskey, A.J. et Stephanopoulos, G. 1999. Metabolite and isotopomer balancing in the analysis of metabolic cycles: II. Aplications. Biotechnology and Bioengineering, 62, 4, 392-401.

Payne G, Bringi V, Prince C, Shuler M. 1991. Plant cell and tissue culture in liquid systems. New-York: Hanser Publishers.

Pazoutova, S., Votruba, J. et Rehacek, Z. 1981. A mathematical model of growth and alkaloid production in the submerged culture of *Claviceps purpurea*. Biotechnology and Bioengineering, 28, 2837-49.

Pennell, R.I., Lamb, C. 1997. Programmed Cell Death in Plants. The Plant Cell, 9, 1157-68.

Penning de Vries, F.W.T., Brunsting, A.H.M. et van Laar, H.H. 1974. Products, requirements and efficiency of biosynthesis: A quantitative approach. Journal of Theoretical Biology, 45, 339-77.

Peoples, M. B., R.M. Gifford. 1990. Long-distance transport of nitrogen and carbon from sources to sinks in higher plants Plant Physiology, Biochemistry and Molecular Biology. Bennis, D.T.and Turpin, D.H. ed. Longman scientific and technical.

Pépin, M.-F., Archambault, J., Chavarie, C. et Cormier, F. 1995. Growth kinetics of *Vitis vinifera* cell suspension cultures. I. Shake flask cultures. Biotechnology and Bioengineering, 47, 131-8.

Pestchanker, L.J., Roberts, S.C. et Shuler, M.L. 1996. Kinetics of taxol production and nutrient use in suspension cultures of *Taxus cuspidata* in shake flasks and a Wilson-type bioreactor. Enzyme and Microbial Technology, 19, 256-60.

Peter Brodelius, Henrik Pedersen. 1993. Increasing Secondary Metabolite Production in Plant-Cell Culture by Redirecting Transport. Tibtech, 11, 30-6.

Pilbeam, D. J., E.A. Kirkby. 1992. Some aspects of the utilization of nitrate and ammonium by plants Nitrogen metabolism of plants. Mengel, K. and Pilbeam, D.J. ed. Volume 33. Oxford: Clarendon press. p 55-70.

Pintado, J., Torrado, A., Gonzalez, M.P. et Murado, M.A. 1998. Optimisation of nutrient concentration for citric acid production by solid-state culture of *Aspergillus niger* on polyurathane foams. Enzyme and Microbial Technology, 23, 149-56.

Plas, L.H.W.v.d., Eijkelboom, C. et Hagendoorn, M.J.M. 1995. Relation between primary and secondary metabolism in plant cell suspension. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 43, 111-6.

Pontryagin LS, Boltyanskii VG, Gamkrelidze RV, Mishchenco EF. 1962. The mathematical theory of optimal processes. New York: Wiley Interscience.

Poole, R. J. 1982. Electrogenic transport at the plasma membrane of plant cells Membrane and Transport. Manonesi ed. Volume 2. Plenum Publishing Corporation.

Prat, R., Parésys, G. 1995. High resolution study of plant cell growth kinetics. Plant Physiology and Biochemistry, 33, 6, 709-16.

Preiss, J., C. Levi. 1980. Starch biosynthesis and degradation The biochemistry of plants. J. Preiss ed. Volume 3. New York: Academic Press. p 371-423.

Pugh, G.G. 1988. The role of oxygen consumption rate in bioreactor process control. Bio/Technology, 6, 524-6.

Quinlan, A.V. 1986. A Semicontinuous Culture Model that Links Cell Growth to Extracellular Nutrient Concentration. Biotechnology and Bioengineering, 28, 1455-61.

Rawn JD. 1990. Traité de biochimie. Belgique: Éditions Universitaires.

Rho, D., André, G. 1991. Growth and stochiometry of a Catharanthus roseus cell suspension culture grown under nitrogen-limiting conditions. Biotechnology and Bioenginneering, 38, 579-87.

Rose, D., Martin, S.M. 1975. Effect of ammonium on growth of plant cells (*pomoea sp.*) in suspension cultures. Canadian Journal of Botany, 53, 1942-9.

Royce, P.N. 1992. Effects of changes in the pH and carbon dioxide evolution rate on the measured respiratory quotient of fermentations. Biotechnology and Bioengineering, 40, 1129-38.

Royce, P.N.C., Thornhill, N.F. 1991. Estimation of dissolved carbon dioxide concentrations in aerobic fermentations. AIChE Journal, 37, 11, 16801686.

Rufty, T.W., Mac Kown, C.T., Lazof, D.B. et Carter, T.E. 1995. Effects of aluminium on nitrate uptake and assimilation. Plant Cell and Environnement, 18, 1325-31.

Rufty, T.W., Thomas, R.B., Cure, J.D. et Cure, W.W. 1994. Growth response of cotton to CO_2 enrichment in differing light environments. Physiologia Plantarum, 91, 503-9.

Rush, M.D., Kutchan, T.M. et Coscia, C.J. 1985. Correlation of the appearance of morphinan alkaloids and laticifier cells in germinating *Papaver bracteatum* seedling. Plant Cell Reports, 4, 237-40.

Ryu, D.D.Y., Lee, S.O. et Romani, R.J. 1989. Determination of growth rate for plant cell cultures: comparative studies. Biotechnology and Bioengineering, 35, 305-11.

Sadunishvili, T., Gvarliani, N., Nutsubidze, N. et Kvesitadze, G. 1996. Effect of methionine sulfoximine on nitrogen metabolism and externally supplied ammonium assimilation in kidney bean. Ecotoxicology and Environmental Safety, 34, 70-5.

Sahai, D.P., Shuler, M.L. 1984. Environmental parameters influencing phenolics production by batch cultures of *Nicotiana tabacum*. Biotechnology and Bioengineering, 26, 111-20.

Sakano, K. 1990. Proton/Phosphate Stokiometry in Uptake of Inorganic phosphate by Cultured Cells of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. Plant Physiology, 93, 479-83.

Sakano, K., Matsumoto, M., Yazaki, Y., Kiyota, S. et Okihara, K. 1995. Inorganic Phosphate as a Negative Conditionning Factor in Plant Cell Culture. Plant Science, 107, 117-24.

San, K.-Y., Stephanopoulos, G. 1984. Studies on On-Line Bioreactor Identification. II. Numerical and Experimental Results. Biotechnology and Bioengineering, 26, 1189-97.

San, K.-Y., Stephanopoulos, G. 1984. Studies on On-Line Bioreactor Identification. IV. Utilization of pH Measurment for Product Estimation. Biotechnology and Bioengineering, 26, 1209-18.

Sánchez-Guerrero, I., Caba, J.M., Lluch, C. et Ligero, F. 1998. Nitrate uptake by *Vicia faba* L. plants: A physiological approach. Journal of Plant Nutrition, 21, 12, 2589-99.

Santi, S., Locci, G., Pinton, R., Cesco, S. et Varanini, Z. 1995. Plasma membrane H^+-ATPase in maize roots induced for $NO3^-$ uptake. Plant Physiology, 109, 1277-83.

Sargent, P.A., King, J. 1974. Investigation of growth-promoting factors in conditioned soybean root cells and in the liquid medium in witch they grow: ammonium, glutamine, and amino acids. Can.J.Bot., 52, 1747-55.

Sato, H., Kobayashi, Y., Fukui, H. et Tabata, M. 1990. Specific differences in tolerence to exogenous berberine among plant cell cultures. Plant Cell Reports, 9, 133-6.

Sato, K., Nakayama, M. et Shigeta, J. 1996. Culturing conditions affecting the production of anthocyanin in suspended cell sultures of strawberry. Plant Science, 113, 91-8.

Schachtman, D.P., Tyermann, S.D. et Terry, B.R. 1991. The K+/Na+ selectivity of a cation channel in the plasma membrane of root cells does not diferre in salt-tolerant and salt-sensitive wheat species. Plant Physiology, 97, 598-605.

Schachtman, D.P., Reid, R.J. et Ayling, S.M. 1998. Phosphorus uptake by plants: from soil to cell. Plant Physiology, 116, 447-53.

Schlatmann, J.E., Moreno, P.R.H., Vinke, J.L., ten Hoopen, H.J.G., Verpoorte, R. et Heijnen, J.J. 1997. Gaseous metabolites and the ajmalicine production rate in high density cell cultures of *Catharanthus roseus*. Enzyme and Microbial Technology, 20, 107-15.

Schlatmann, J.E., Nuutila, A.M., van Gulik, W.M., ten Hoopen, H.J.G., Verpoorte, R. et Heijnen, J.J. 1993. Scaleup of amajilcine production plant cell cultures of *Cathanranthus roseus*. Biotechnology and Bioengineering, 41, 253-62.

Schmidt, C., Schroeder, J.I. 1994. Anion selectivity of slow anion channels in the plasma membrane of guard cells. Plant Physiology, 106, 383-91.

Schmidt, M.-E., Heim, S., Wylegalla, C., Helmbrecht, C. et Wagner, K.G. 1992. Characterization of Phosphate Uptake by Suspension Cultured *Catharanthus roseus* Cells. Journal of Plant Physiology, 140, 179-84.

Schnapp, S.R., Curtis, W.R., Bressan, R.A. et Hasegawa, P.M. 1991. Estimation of Growth Yeild and Maintenance Coefficient of Plant Cell Suspensions. Biotechnology and Bioengineering, 38, 1131-6.

Schobert, B. 1977. Is There an Osmotic Regulatory Mechanism in Algae and Higher Plants ? Journal of Theoritical Biology, 68, 17-26.

Schuchmann, R., Wellmann, E. 1983. Somatic embryogenesis of tissue cultures of *Papaver somniferum* and *Papaver oriantale* and its relationship to alkaloid and lipid metabolism. Plant Cell Reports, 2, 88-91.

Schulte, P.J., Costa, D.G. 1996. A mathematical description of water flow through plant tissues. Journal of Theoritical Biology, 180, 61-70.

Sekar, T., Francis, K. 1998. Short communication: Some plant species screened for energy, hydrocarbons and phytochemicals. Bioressource Technology, 65, 257-9.

Seki, M., Ohzora, C. et Furusaki, S. 1997. Taxol (paclitaxel) production using free and immobilized cells of *Taxus cuspidata* . Biotechnology and Bioengineering, 53, 2.

Sengar, R.S., Srivastava. 1995. Effect of ammonium salt on enzymes of ammonium assimilation in maize seedlings. Biologia Plantarum, 37, 4, 533-9.

Siddiqi, M.Y., Glass, A.D.M., Ruth, T.J. et Rufty, T.W. 1990. Studies on the uptake of nitrate in barley I. Kinetics of $^{13}NO_3^-$ influx. Plant Physiology, 93, 1426-32.

Siegrist, H., Brunner, I., Koch, G., Phan, L.C. et Le, V.C. 1999. Reduction of biomass decay rate under anoxic and anaerobic conditions. Wat. Sci. Tech., 39, 1, 129-37.

Singh, R.P., Al-Rubeai, M., Gregory, C.D. et Emery, A.N. 1994. Cell death in bioreactors: A role for apoptosis. Biotechnology and Bioengineering, 44, 720-6.

Sirois J., M. Perrier et J. ArchambaultA two-step structured model development for optimisation of plant cells growthElsevier Science. Proceedings of the 14th world congress of International Federation of Automatic Control; 1999 Jul 5-1999 Jul 9; Beijing, China. Pergamon.

Sirois J. 1997. Optimisation de la croissance de cellules d'*Eschscholtzia californica* en bioréacteur. Montréal: École Polytechnique de Montréal.

Sisler, E.C., Wood Carmen. Interaction of ethylene and CO2. Physiologia Plantarum, 73, 440-4.

Skerrett, M., Tyermann, S.D. 1994. A channel that allows inwardly directed fluxes of anions in protoplasts derived from wheat roots. Planta, 192, 295-305.

Skogestad S., I.J. Halvorsen, T. Larsson et M.S. GovatsmarkPlantwide control: the search for the self-optimizing control structureElsevier Science. Proceedings of the 14th world congress of International Federation of Automatic Control; 1999 Jul 5-1999 Jul 9; Beijing, China. Pergamon.

Smith, F.A. 1973. The internal control of nitrate uptake into excised barley roots with differing salt contents. New Phytol., 72, 769-82.

Steiner, H.-Y., Dougall, D.K. 1995. Ammonium uptake in carrot cell structures is influenced by pH-dependent cell aggregation. Physiologia Plantarum, 95, 415-22.

Stephanopoulos, G. 1994. Metabolic engineering. Current Opinion in Biotechnology, 5, 196-200.

Stephanopoulos, G. 1998. Metabolic engineering. Biotechnology and Bioengineering, 58, 119-20.

Su, W.W. 1995. Bioprocessing Technology for Plant Cell Suspension Cultures. Applied Biochemistry and Biotechnology, 50, 189-230.

Suzuki, T., Yamane, T. et Shimizu, S. 1986. Control of carbon source supply and dissolved oxygen by use of carbon dioxide concentration of exhaust gas in fed-batch culture. Journal of Fermentation Technology, 64, 4, 317-26.

Takayama, S., Misawa, M., Ko, K. et Misato, T. 1977. Effect of Cultural Conditions on the Growth of *Agrostemma githago* Cells in Suspension Culture and the Concomitant Production of an Anti-Plant Virus Substance. Physiology of Plant, 41, 313-20.

Takeda, T., Takeuchi, Y., Seki, M., Furusaki, S. et Matsuoka, H. 1998. Kinetic analysis of cell growth and vitamin E production in plant cell culture of *Carthamus tinctorius* using a structured model. Biochemical Engineering Journal, 1, 233-42.

Tal, B., Gressel, J. et Goldberg, I. 1982. The effect of medium constituents on growth and diosgenin production by Dioscorea deltoida cells grown in batch cultures. Planta Med., 44, 111-5.

Tammisola, J., Ojamo, H. et Kauppinen, V. 1993. Multigradient Method for Optimization of Slow Biotechnological Processes. Biotechnology and Bioengineering, 42, 1301-10.

Tanahashi, T., Zenk, M.H. 1990. New hydroxylated benzo[c]phenanthridine alkaloids from eschscholtzia californica cell suspension cultures. Journal of Natural Products, 53, 3, 579-86.

Tao, W., Verbelen, J.-P. 1996. Switching on and off cell division and cell expansion in cultured mesophyll protoplast of tobacco. Plant Science, 116, 107-15.

Taticek, R.A., Moo-Young, M. et Legge, R.L. 1990. Effect of bioreactor configuration on substrate uptake by cell suspension cultures of the plan *Eschscholtzia californica*. Appplied Microbiology and Biotechnology, 33, 280-6.

Taylor, A.R., Bloom, A.J. 1998. Ammonium, nitrate, and proton fluxes along the maize root. Plant, Cell and Environment, 21, 1255-63.

Taylor, C.B. 1997. Plant Vegetative Development: From Seed and Embryo to Shoot and Root. The Plant Cell, 9, 981-8.

Taylor, M.W., Rees, T.A. 1999. Kinetics of ammonium assimilation in two seaweeds, *Enteromorpha* sp. (chlorophyceae) and *Osmundaria colensoi* (rhodophyceae). Journal of Phycology, 35, 740-6.

Tijhuis, L., van loosdrecht, M.C.M. et Heijnen, J.J. 1993. A Thermodynamically Based Correlation for Maintenance Gibbs Energy Requirements in Aerobic and Anaerobic Chemotrophic Growth. Biotechnology and Bioengineering, 42, 4, 509-19.

Ting, I.P. 1981. Towards a Model for Malate Accumulation in Plant Tissues. Plant Science Letters, 21, 215-21.

Topa, M.A., Sisak, C.L. 1997. Characterization of phosphorus uptake in slow- and fast-growing southern pine seedlings grown in solution culture. Plant and Soil, 190, 317-29.

Turpin, D. H., H.G. Weger. 1990. Interactions between photosynthesis, respiration and nitrogen assimilation Plant Physiology, Biochemistry and Molecular Biology. Bennis, D.T.and Turpin, D.H. ed. Longman scientific and technical.

Tyerman, S.D., Skerrett, I.M. 1999. Root ion channels and salinity. Scientia Hortuculturae, 78, 175-235.

Ullrich-Eberius, C., Novacky, A. et van Bel A. 1984. Phosphate uptake in Lemna gibba G1: energetics and kinetics. Planta, 161, 46-52.

Ullrich, W. R. 1992. Transport of nitrate and ammonium through plant membranes Nitrogen metabolism of plants. Mengel, K. and Pilbeam, D.J. ed. Volume 33. Oxford: Clarendon press. p 121-37.

Ullrich, W.R., Novacky, A. 1981. Nitrate-dependent membrane potential changes and their induction in *Lemna gibba* G 1. Plant Science Letters, 22, 211-7.

Ulrich, A. 1941. Metabolism of non-volatile organic acids in exised barley roots as related to cation-anion, balance during salt accumulation. American Journal of Botany, 28, 526-37.

van der Plas, L.H.W., Eijkelboom, C. et Hagendoorn, M.J.M. 1995. Relation between primary and secondary matabolism in plant cell suspensions. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 43, 111-6.

van der Werf, A., Kooijman, A., Welschen, R. et Lambers, H. 1988. Respiratory energy costs for maintenance of biomass, for growth and for ion uptake in roots of *Carex diandra* and *Carex acutiformis*. Physiologia Plantarum, 72, 483-91.

van Gulik WM. 1993. Growth and respiration in chemostat cultures of *Petunia hybrida* cell suspension. Hollande.

van Gulik, W.M., Meijer, J.J., ten Hoopen, H.J.G., Luyben, K.Ch.A.M. et Libbenga, K.R. 1989. Growth of a Catharanthus roseus cell suspension culture in a modified chemostat under glucose-limiting conditions. Applied Microbiology and Biotechnology, 30, 270-5.

van Gulik, W.M., ten Hoopen, H.J.G. et Heijnen, J.J. 1992. Kinetics and Stoichiometry of Growth of Plant Cell Cultures of *Catharanthus roseus* and *Nicotiana tabacum* in Batch and Continous Fermentors. Biotechnology and Bioengineerind , 40, 863-74.

van Gulik, W.M., ten Hoopen, H.J.G. et Heijnen, J.J. 1993. A Structured Model Describing Carbon and Phosphate Limited Growth of *Catharanthus roseus* Plan Cell Suspensions in Batch and Chemostat Culture. Biotechnology and Bioengineering, 41, 8, 771-80.

van Impe J.F., G. Bastin. 1993. Optimal adaptive control of fed-batch fermentation processes with multiple substrates. Second IEEE Conference on Control Applications; 1993 Sep 13-1993 Sep 16; Vancouver, B.C.

Vance, C. P., S.M. Griffith. 1990. The molecular biology of N metabolism Plant Physiology, Biochemistry and Molecular Biology. Bennis, D.T.and Turpin, D.H. ed. Longman scientific and technical.

Varner, J., Ramkrishna, D. 1998. Application of cybernetic models to metabolic engineering: investigation of storage pathways. Biotechnology and Bioengineering, 58, 2&3, 282-91.

Varner, J., Ramkrishna, D. 1999. Mathematical models of metabolic pathways. Current Opinion in Biotechnology, 10, 146-50.

Varner, J., Ramkrishna, D. 1999. Metabolic engineering from a cybernetic perspective. 1. theoritical preliminairies. Biotechnology-Progress, 15, 3, 407-25.

Varner, J., Ramkrishna, D. 1998. The non-linear analysis of cybernetic models. Guidelines for model formulation. Journal of Biotechnology, 71, 67-103.

Veith, R., Komor, E. 1993. Regulation of growth, sucrose storage and ion content in sugarcane cells, measured with suspension cells in continuous culture grown under nitrogen, phosphorus or carbon limitation. J. Plant Physiol., 142, 414-24.

Veith, R., Komor, E. 1991. Nutrient requirement for optimal growth of sugarcane suspension cells: nicotinic acid is an essential growth factor. Journal of Plant Physiology, 139, 175-81.

Veliki, I.A., Rose, D. 1973. Nitrate and ammonium as nitrogen nutrients for plant cell cultures. Can.J.Bot., 51, 1837-44.

Videnšek, N., Lim, P., Campbell, A. et Carlson, C. 1990. Taxol content in bark, wood, leaf, twig, and seedling from several *taxus* species. Journal of Natural Products, 53, 6, 1609-10.

Vijayaraghavan, J.S., Gupta, A., Guha-Mukherjee, S., Sopory, S.K. et Sopory, S. 1982. Stimulation of nitrate reductase by light and ammonium in *Spirodela oligorrhiza*. Journal of Experimental Botany, 33, 135, 707-16.

Vits, H. 1992. A note on plant cell growth modelling. Enzyme Microb. Technol., 14, september, 767-8.

Vogelein, D. L., D.K. Dougall. 1989. On the nature of the variation in yields of phytochemicals observed within plant cell cultures Primary and secondary metabolism of plant cell cultures II. Kurz, Wolfgang G.W. ed. New York: Springer Verlag. p 53-.

von Wiren, N., Gazzarrini, S. et Frommer, W.B. 1997. Regulation of mineral nitrogen uptake in plants. Plant and Soil, 196, 191-9.

Voué, M., Gillet, C. 1994. Site-specific counterion binding: Application of the standard Poisson-Boltzmann cell model to ionic polysaccharides of the plant cell wall. Biophysical Chemistry, 51, 9-19.

Wagner, A.M., Krab, K. 1995. The alternative respiration pathway in plants: Role and regulation. Physiol. Plant, 95, 318-25.

Wanake, M., Ciereszko, I., Podbielkowska, M. et Rychter, A.M. 1998. Response to phosphate defiency in Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) roots. Respiratory metabolism, sugar localization and changes in ultrastructures of bean root cells. Annals of Botany, 82, 809-19.

Wang H.H., M. Krstic et G. BastinOptimum seeking by feedback for bioreactor modelsElsevier Science. Proceedings of the 14th world congress of International Federation of Automatic Control; 1999 Jul 5-1999 Jul 9; Beijing, China. Pergamon.

Wendler, S., Zimmermann, U. et Bentrup, F.-W. 1983. Relationship between Cell Turgor Pressure, Electrical Membrane Potential, and Chloride Efflux in *Acetabularia mediterranea*. Journal of Membrane Biology, 72, 75-84.

Westgate, P.J., Curtis, W.R., Emery, A.H., Hasegawa, P.M. et Heinstein, P.F. 1991. Approximation of Continuous Growth of *Cephalotaxus harringtonia* Plant Cell Cultures Using Fed-Batch Operation. Biotechnology and Bioengineering, 38, 241-6.

Williams, D. 1987. On-line estimation of variables and adaptive control Modelling and control of fermentation processes. J.R. Leigh ed. London: P. Peregrinus Ltd. p 232-53.

Wilson, G. 1980. Continuous Culture of Plant Cells Using the Chemostat Principle Advances in Biochemical Engineering. Fiechter, A. ed. Volume 16. New York: Springer. p 1-25.

Wilson, G. 1976. A Simple and Inexpensive Design of Chemostat Enabling Steady-state Growth of *Acer pseudoplatanus* L. Cells under Phosphate-limiting Condition. Ann. Bot, 40, 919-32.

Wilson, P.D.G. 1987. On-Line Estimation of biomass Using Dynamic Oxygen Balancing. Biotechnology Techniques, 1, 3, 151-6.

Wink, M. 1997. Special Nitrogen Metabolism Plant Biochemistry. Dey, P.M.//Harborne, J.B. ed. San Diego: Academic Press Limited. p 439-85.

Yamakawa, T., Kato, S., Ishida, K., Kodama, T. et Minota, Y. 1983. Production of anthocyanins by Vitis cells in suspension cultures. Agricultural and Biological Chemistry, 47, 2185-91.

Yamamoto, O., Yamada, Y. Production of reserpine and its optimization in cultured *Rauwolfia serpentina* Benth. cells. Plant Cell Reports, 5, 50-3.

Yang, J.-D., Wang Nam Sun. 1992. Cell Inactivation in the Presence of Sparging and mechanical Agitation. Biotechnology and Bioengineering, 40, 7, 806-16.

Yang, S.F. 1985. Biosynthesis and action of ethylene. HoriScience, 20, 1, 41-5.

Yoshida, F. 1982. Aeration and mixing in fermentation Annual repports on fermentation processes. Volume 5. New York: Academic Press Inc. p 1-34.

Yuan J.Q., P.A. Vanrolleghem, Y.Q. Shen et K.-H. BellgardtCombined age and segregated kinetic model for penicillin fed-batch cultivationElsevier Science. Proceedings of the 14th world congress of International Federation of Automatic Control; 1999 Jul 5-1999 Jul 9; Beijing, China. Pergamon.

Zeng, A.P., Byun, T.G., Posten, C. et Deckwer, W.D. 1994. Use of Respiratory Quotient as a Control Parameter for Optimum Oxygen Supply and Scale-up of 2,3-Butanediol Production under Microaerobic Conditions. Biotechnology and Bioengineering, 44, 9, 1107-14.

Zenk, M.H., Rueffer, M., Amann, M. et Deus-Neumann, B. 1985. Benzylisoquinoline biosynthesis by cultivates plant cells and isolated enzymes. Journal of Natural Products, 48, 5, 725-38.

Zhang, F.S., Ma, J. et Cao, Y.P. 1997. Phosphorus defiency enhences root exudation of low-molecular weight arganic acids and utilisation of sparingly soluble inorganic phosphates by radish (*Raghanus satiuvs* L.) and rape (*Brassica napus* L.). Plant and Soil, 196, 261-4.

Zhang, W., Seki, M., Furusaki, S. et Middleberg, A.P.J. 1998. Anthocyanin synthesis, growth and nutrient uptake in suspension cultures of strawberry cells. Journal of Fermentation and Bioengineering, 86, 1, 72-8.

Zhang, Y.-H., Zhong, J.-J. Hyperproduction of ginseng saponin and polysaccharide by high density cultivation of *Panax notoginseng* cells. Enzyme and Microbial Technology, 21, 59-63.

Zhong, J.-J., Konstantinov, K.B. et Yoshida, T. 1994. Computer-aided on-line monitoring of physiological variables in suspended cell cultures of Perilla frutescens in a bioreactor. Journal of Fermentation and Bioengineering, 77, 4, 445-7.

Zhong, J.-J., Xu, G.-R. et Yoshida, T. 1994. Effects of initial sucrose concentration on excretion of anthocyanin pigments in suspended cultures of *Perilla frutescens* cells. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 10, 590-2.

Zhong, J.-J., Yoshida, T. 1993. Effects of temperature on cell growth and anthocyanin production in suspension cultures of *Perilla frutescens*. Journal of Fermentation and Bioengineering, 76, 6, 530-1.

Zhong, J.-J., Yoshida, T. 1995. High-density cultivation of *Perilla frutescens* cell suspensions for anthocyanin production: Effects of sucrose concentration and inoculum size. Enzyme and Microbial Technology, 17, 1073-9.

Zhong, J.-J., Fujiyama, K., Seki, T. et Yoshida, T. 1994. A Quantitative Analysis of Shear Effects on Cell Suspension and Cell Culture of *Perilla frutescens* in Bioreactors. Biotechnology and Bioengineering, 44, 5, 649-54.

Zhong, J.-J., Seki, T., Kinoshita, S.-I. et Yoshida, T. 1992. Rheological Characteristics of Cell Suspension and Cell Culture of *Perilla frutescens*. Biotechnology and Bioengineering, 40, 10, 1256-62.

Zimmerman, J.L. 1993. Somatic embryogenesis: A model for early development in higher plants. The Plant Cell, 5, 1411-23.

Zimmermann, U. 1978. Physics of turgor- and osmoregulation Annual Review Plant Physiology. Volume 29. Annual Reviews Inc. p 121-48.

Annexes

Annexe A

Composition du milieu de culture B5 modifié

Tableau A.1 : Composition du milieu B5 modifié

	Quantité	
Macronutriments	mg L^{-1}	mmol L^{-1}
KNO_3	2 500	25
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	150	1.0
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	250	1.0
$(NH_4)_2HC_6H_5O_7$	452	2.0
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	150	1.1
Micronutriments	mg L^{-1}	mmol L^{-1}
KI	0.75	4.5
H_3BO_3	3.0	50
$MnSO_4 \cdot H_2O$	10	60
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	2.0	7.0
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.25	1.0
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.025	0.1
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.025	0.1

Annexe B

Mesure de la concentration cellulaire

B1. MESURE DE LA CONCENTRATION CELLULAIRE

B1.1. Solution tampon

- 2.1 g d'acide citrique
- 2 g d'EDTA ferrique
- 200 ml d'eau distillée
- 342 g de NaCl
- citrate de sodium

Dissoudre l'acide citrique dans l'eau distillée tout en agitant. Ajuster le pH à 4.5 avec le citrate de sodium. Ajouter l'EDTA ferrique ainsi que le NaCl à la solution tampon et agiter jusqu'à dissolution complète. Conserver au réfrigérateur.

B1.2. Solution enzymatique

- 50 ml de tampon citrate
- 800 μl de pectinase
- 250 mg de cellulase

Prélever la partie requise du tampon citrate. Y dissoudre complètement la cellulase et la pectinase en agitant. Conserver au réfrigérateur.

B1.3. Séparation cellulaire

- 2 ml de suspension cellulaire
- 8 ml de tampon citrate
- 4 ml de solution enzymatique

Prélever la suspension cellulaire. Laisser sédimenter 30 minutes. Retirer délicatement le surnageant et ajouter vigoureusement 4 ml de tampon citrate de manière à soulever l'ensemble des cellules. Répéter l'étape précédente. Ces deux dernières étapes permettent de rincer la suspension cellulaire afin de la préparer pour la réaction enzymatique. Retirer le surnageant du second rinçage. Ajouter vigoureusement la solution enzymatique aux cellules sédimentées jusqu'à un volume total de 4 ml. Verser dans un bécher de 50 ml. Agiter à 120 rpm pendant 6 heures.

B1.4. Compte cellulaire

- 100 μl de solution cellulaire enzymatique
- 100 μl de fuschine liquéfiée (Kao, 1982)

Prélever une partie de la solution cellulaire enzymatique. Y ajouter la fuschine liquéfiée. Cette dernière sert à colorer les cellules facilitant ainsi leur compte et l'évaluation de leur viabilité. Mélanger par aspiration. Laisser reposer pendant 2 minutes. Mélanger par aspiration. Prélever une goutte de cette suspension et placer sur un hémacytomètre. Recouvrir d'une lamelle à microscopie. Compter les cellules

pour 9 séries (n=9) de carreaux ayant un volume unitaire de 0.1 mm^3 à un grossissement de 100.

La concentration cellulaire moyenne correspondant à l'échantillon (c) est calculée selon l'équation B.1 en considérant le compte cellulaire moyen ($\overline{cc}$), le volume correspondant à chaque compte (V_C, 0.1 mm^3 dans ce cas-ci) ainsi que la dilution (D) qui se situe entre 4 et 20.

$$c = \overline{cc} \times D \times \frac{1}{V_C} \times 10^6 \frac{mm^3}{L} [=] 10^9 \frac{¢}{L} \qquad \text{B.1}$$

Annexe C

Mesures des concentrations intracellulaires en glutamine et en glutamate

C1. PROTOCOLE DE DÉTERMINATION

Le protocole utilisé est fourni par Sigma lors de l'achat du *Glutamine/Glutamate determination kit* (GLN-1) et consiste en une légère modification du protocole développé par Lund (1986). Le protocole se divise en deux étapes, soient la déamination de la L-glutamine en L-glutamate (réaction A) suivie de la déshydrogénation du L-glutamate en α-kétoglutarate accompagnée par la réduction d'un NAD^+ en NADH (réaction B):

Réaction A: Déamination de la glutamine

$$\text{L-glutamine} + H_2O \xrightarrow[H^+]{\text{glutaminase}} \text{L-glutamate} + NH_4^+$$

Réaction B: Déhydrogénation du glutamate et réduction du NAD

$$\text{L-glutamate} + NAD^+ + H_2O \xrightarrow{\text{glutamique déshydrogénase}} \alpha\text{-kétoglutarate} + NH_4^+ + NADH$$

C'est la conversion du NAD+ en NADH qui est mesurée par spectrométrie et qui est proportionnelle à l'oxidation du L-glutamate.

Les produits utilisés sont les suivants:

- Tampon Acétate, pH 5, 0.5M
- Adénosine 5'-Diphosphate (ADP), 100mM
- L-Glutamine, 2mM
- L-Glutamate, 1mM
- Glutamique Déhydrogénase (L-GLDH), 1200 U/ml
- Glutaminase, 10 U/ml
- Hydrazine Hydrate (64 % Hydrazyne)
- β-Nicotinamide Adénine Dinucléotide (NAD), 30 mM
- Tampon Tris (0.1 M)-EDTA (0.002 M)

C1.1. Réaction A: Déamination de la glutamine

C1.1.1. Courbe standard de glutamine

Le volume total de chaque échantillon doit être de 1 ml. Les échantillons doivent être préparés comme indiqué au Tableau C.1.

Tableau C.1: Courbe standard de concentration en glutamine

μM	Glutamine (ml)	Eau (ml)	Tampon acétate (ml)	Glutaminase (ml)
0	0	0.7	0.2	0.1
0.2	0.1	0.6	0.2	0.1
0.4	0.2	0.5	0.2	0.1
0.6	0.3	0.4	0.2	0.1
0.8	0.4	0.3	0.2	0.1
1.0	0.5	0.2	0.2	0.1

Incuber à 37 °C pendant 1 h.

C1.1.2. Préparation des échantillons expérimentaux

Les échantillons à analyser doivent être préparés comme indiqué au Tableau C.2.

Tableau C.2: Préparation des échantillons pour fins d'analyse

	Type d'analyse	
	Glutamine et Glutamate	Glutamate
Tampon Acétate (ml)	0.20	0.20
Glutaminase (ml)	0.10	
Échantillon expérimental (ml)	0.25	0.25
Eau (ml)	0.45	0.55

Incuber à 37 °C pendant 1 h.

C1.1.3. Réaction B: Déhydrogénation du glutamate et réduction du NAD

Suite à l'incubation appropriée, une partie des échantillons préparés à l'étape précédente est utilisée pour mesurer la réduction du NAD^+ en NADH. Les solutions finales à analyser doivent être préparées comme indiqué au Tableau C.3.

Tableau C.3: Solutions finales à analyser

		Type d'analyse	
	Standards	Glutamine et Glutamate	Glutamate
Tampon Tris-EDTA Hydrazine (ml)	1.00	1.00	1.00
NAD (ml)	0.10	0.10	0.10
ADP (ml)	0.01	0.01	0.01
Préparation des standards (ml)	0.50		
Préparation glutamine et glutamate (ml)		0.50	
Préparation glutamate (ml)			0.50
Eau (ml)	0.39	0.39	0.39

1. Mélanger par inversion ou aspiration;

2. Prendre une lecture d'absorbance à 340 nm pour obtenir le signal de fond;

3. Ajouter 0.02 ml de L-GLDH et mélanger par inversion ou aspiration;

4. Laisser reposer à la température de la pièce pendant 40 minutes;

5. Mesurer l'absorbance après 40 minutes ou jusqu'à ce que celle-ci demeure constante;

6. Soustraire l'absorbance de fond de celle obtenue;

7. Utiliser la courbe de référence obtenue des standards de glutamine pour déterminer les concentrations de glutamate et glutamine, et de glutamate dans les échantillons expérimentaux;

8. Diviser la concentration obtenue par 0.25 (dilution de 0.25 ml / 1 ml);

9. Pour obtenir la concentration de glutamine, soustraire la concentration de glutamate obtenue dans les échantillons sans glutaminase de la concentration totale en glutamine et glutamate.

Annexe D

Formules utilisées lors de l'expérience statistique de dénombrement cellulaire

D1. FORMULES STATISTIQUES

Les formules utilisées sont tirées de Sirois (1999) et apparaissent dans l'ordre utilisé dans le chapitre 3.

Moyenne arithmétique

$$\bar{y} = \frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n} y_i \qquad \text{D.1}$$

Écart-type

$$s = \left[\frac{1}{n-1}\sum_{i=1}^{n}\left(y_i - \bar{y}\right)^2\right]^{\frac{1}{2}} \qquad \text{D.2}$$

Étendue

$$R = y_{max} - y_{min} \qquad \text{D.3}$$

Contraste

$$C = \sum_{i=1}^{k_1}\sum_{j=1}^{k_2}\alpha_{ij,p}\,\bar{y}_{ij}\Bigg|^{p=1\cdots(k_1k_2-1)} \qquad \text{D.4}$$

Taux d'ajustement

$$TA = \frac{1}{n}\sum_{i=1}^{k}\alpha_i^2 \qquad \text{D.5}$$

Somme des carrés

contraste

$$SC_{contraste} = \frac{C^2}{TA} = \frac{n}{\sum_{i=1}^{k} \alpha_i^2} C^2 \qquad D.6$$

intragroupe

$$SC_{intra} = \sum_{i=1}^{k} \sum_{j=1}^{n} \left(y_{ij} - \bar{y}\right)^2 = (n-1) \sum_{i=1}^{k} s_i^2 \qquad D.7$$

totale

$$SC_{tot} = \sum_{i=1}^{k} \sum_{j=1}^{n} \left(y_{ij} - \bar{\bar{y}}\right)^2 = (nk-1) s^2 \qquad D.8$$

Degré de liberté

intragroupe

$$DL_{intra} = k(n-1) \qquad D.9$$

totale

$$DL_{tot} = nk - 1 \qquad D.10$$

Carrés moyens

contraste

$$CM_{contraste} = \frac{SC_{contraste}}{DL_{contraste}} = SC_{contraste}\Big|_{DL_{contraste}=1} \qquad D.11$$

intragroupe

$$CM_{intra} = \frac{SC_{intra}}{k(n-1)} \qquad D.12$$

Effet

$$E = \frac{C}{\sum_{j=1}^{k} \alpha_j^{>0}}\Bigg|^{i=1,\ldots,(k_1 k_2 - 1)} \qquad D.13$$

Paramètre statistique F

$$F = \frac{CM_{contraste}}{CM_{intra}} = \frac{SC_{contraste}}{SC_{intra}} DL_{intra}\Big|_{DL_{contraste}=1} \qquad D.14$$

où k représente le nombre d'essais effectués, n, le nombre de lecture faites à chaque test et α, la modalité (+1 ou –1).

Annexe E

Démonstrations mathématiques

E1. REPRÉSENTATION DE LINEWEAVER-BURK

La représentation de Lineweaver-Burk (Rawn, 1990) permet de déterminer les paramètres d'une cinétique de Michaelis-Menten par régression linéaire.

Sachant qu'une telle cinétique a la forme suivante,

$$\mu = \mu^* \left(\frac{n}{K + n} \right) \qquad \text{E.1a}$$

son inversion

$$\frac{1}{\mu} = \left(\frac{K}{\mu^*} \right) \frac{1}{n} + \frac{1}{\mu^*} \qquad \text{E.1b}$$

permet de déterminer le taux de croissance maximum (inverse de l'ordonnée à l'origine) et la constante d'inhibition (la pente multipliée par l'inverse de l'ordonnée à l'origine) à partir d'un graphique de l'inverse du taux de croissance en fonction de l'inverse de la concentration du nutriment.

E2. MODIFICATION DE LA FORME GÉNÉRALE DES MODÈLES DE BIOPROCÉDÉS

Comme mentionné au chapitre 5, la forme générale des modèles de bioprocédé (Bastin et Dochain, 1990) doit être modifiée lorsque les variables impliquées sont relatives au volume de culture et que celui-ci varie significativement en fonction de facteurs tels l'échantillonnage et l'évaporation.

Le modèle général ayant la forme:

$$\frac{d\Xi}{dt} = K\varphi(\Xi) - \left(\frac{Q_{éch}}{V}\right)\Xi - Q(\Xi) + F(\Xi) \qquad \text{E.2a}$$

où Ξ représente des variables absolues. Le changement de variable permettant d'obtenir le suivi des concentrations des variables d'état s'effectue comme suit:

$$\frac{d(V\xi)}{dt} = VK\varphi(\xi) - Q_{éch}\xi - Vq(\xi) + Vf(\xi) \qquad \text{E.2b}$$

$$\frac{d(\xi)}{dt} = K\varphi(\xi) - \frac{1}{V}\left(Q_{éch} + \frac{dV}{dt}\right)\xi - q(\xi) + f(\xi) \qquad \text{E.2c}$$

où la variation de volume est aussi obtenue par bilan massique à masses volumiques quasi-égales:

$$\frac{dV}{dt} = V\sum_{m=1}^{i}\frac{f(\xi_m)}{\xi_{f,m}} - Q_{évap} - Q_{éch} \qquad \text{E.3}$$

Le modèle final comprend donc les équations E.2c et E.3.

E3. DÉTERMINATION DES CONSTANTES DE JERUSALIWSKI ET ENGAMBERVEDIEV

Une représentation similaire à celle de Lineweaver-Burk est utilisée pour déterminer les paramètres d'une cinétique de Jerusaliwski et Engambervediev par régression linéaire.

Sachant que cette cinétique a la forme suivante,

$$\mu = \mu^* \left(\frac{K}{K+n} \right) \qquad \text{E.4a}$$

son inversion

$$\frac{1}{\mu} = \left(\frac{1}{K\mu^*} \right) n + \frac{1}{\mu^*} \qquad \text{E.4b}$$

permet de déterminer le taux de croissance maximum (inverse de l'ordonnée à l'origine) et la constante d'inhibition (l'inverse de la pente multipliée par l'ordonnée à l'origine) à partir d'un graphique de l'inverse du taux de croissance en fonction de la concentration du nutriment.

E4. DÉTERMINATION DES TAUX DE CONSOMMATION NUTRITIONNELLE

L'équation de base décrivant la consommation nutritionnelle est la suivante:

$$\frac{dn}{dt} = -Q_n \qquad \text{E.5a}$$

Selon les articles rescencés dans la revue de littérature, la consommation nutritionnelle est régulée par différents mécanismes à la surface membranaire ce qui laisse croire à une consommation proportionnelle à l'aire de la membrane cellulaire. De manière générale, les taux de consommation (et de production) spécifiques sont associés à la biomasse en supposant qu'une augmentation de l'air de transfert implique une augmentation de celle-ci:

$$\frac{dn}{dt} = -q_n x \qquad \text{E.5b}$$

Dans les dernières équations, Q_n et q_n sont les taux de consommation net et spécifique respectivement. L'objectif du calcul est de déterminer le taux de consommation moyen entre deux échantillons. L'expression de la biomasse (x) est obtenue à partir de l'équation de croissance:

$$\frac{dx}{dt} = \mu_x x \qquad \text{E.6a}$$

Celle-ci est intégrée entre les deux échantillons:

$$\ln\left(\frac{x_2}{x_1}\right) = \mu_x (t_2 - t_1) \qquad \text{E.6b}$$

de laquelle l'expression du taux de croissance est extraite et insérée dans l'équation E.6a:

$$\frac{dx}{dt} = \frac{1}{(t_2 - t_1)} \ln\left(\frac{x_2}{x_1}\right) x \qquad \text{E.6c}$$

L'expression de la biomasse (x) tirée de cette dernière équation est rapportée dans l'équation E.5b:

$$\frac{dn}{dt} = -q_n (t_2 - t_1) \left[\ln\left(\frac{x_2}{x_1}\right) \right]^{-1} \frac{dx}{dt} \qquad \text{E.5c}$$

où les dérivées sont approximées par une discrétisation explicite selon Euler:

$$q_n = \frac{(n_1 - n_2)}{(t_2 - t_1)} \frac{1}{(x_2 - x_1)} \ln\left(\frac{x_2}{x_1}\right) \qquad \text{E.5d}$$

Le terme logaritmique de l'équation E.5d représente une correction à une discrétisation explicite directe de l'équation E.5b afin de tenir compte de la non-linéarité de la croissance de la biomasse.

E5. EFFET THÉORIQUE DE LA CONCENTRATION CELLULAIRE SUR LE TAUX DE CONSOMMATION NUTRITIONNELLE

Comme mentionné, la consommation nutritionnelle est décrite par un taux spécifique selon l'équation suivante:

$$\frac{dn}{dt} = -q_n x \qquad \text{E.5b}$$

Ceci suppose que le taux de consommation net n'est fonction que de la biomasse. Or, lorsqu'il y a division cellulaire, la masse demeure constante, mais la superficie de transfert s'accroît suite au scindement de la cellule (considérée sphérique) en deux plus petites.

Les fonctions géométriques décrivant l'air et le volume d'une sphère:

$$A = 4\pi r^2 \qquad \text{E.7}$$

$$V = \frac{4}{3}\pi r^3 \qquad \text{E.8}$$

où r est le rayon de la sphère, servant de base à la démonstration. En identifiant les propriétés cellulaires pré(-) et post(-) division par 1 et 2 respectivement, une relation entre les concentrations cellulaires et les rayons est obtenue en considérant que le volume global demeure constant:

$$c_1 \frac{4}{3}\pi r_1^3 = c_2 \frac{4}{3}\pi r_2^3 \qquad \text{E.9a}$$

$$\frac{c_2}{c_1} = \left(\frac{r_1}{r_2}\right)^3 \qquad \text{E.9b}$$

En isolant l'expression de l'aire de part et d'autre de l'équation E.9a, une relation entre les aires de transfert et les rayons cellulaires est obtenue comme suit:

$$A_1 \frac{r_1}{3} = A_2 \frac{r_2}{3} \qquad \text{E.10a}$$

$$\frac{A_2}{A_1} = \frac{r_1}{r_2} \qquad \text{E.10b}$$

La relation caractérisant l'augmentation de l'aire de transfert en fonction de la division cellulaire s'obtient en combinant les équations E.9b et E.10b:

$$\frac{A_2}{A_1} = \left(\frac{c_2}{c_1}\right)^{1/3} \qquad \text{E.11a}$$

Selon l'hypothèse posant le taux de consommation comme étant proportionnel à l'aire de transfert, celui-ci varie donc avec la concentration cellulaire:

$$\frac{q_{n,2}}{q_{n,1}} = \left(\frac{c_2}{c_1}\right)^{1/3} \qquad \text{E.11b}$$

En définissant la concentration cellulaire c_R comme concentration de référence, le taux de consommation spécifique à la biomasse (q_n) est ainsi lié au taux de consommation de référence (q_R) selon:

$$q_n = q_{R,n}\left(\frac{c}{c_R}\right)^{1/3} \qquad \text{E.11c}$$

Cette expression est utilisée pour substituer le taux de consommation spécifique à la biomasse dans l'équation originale E.5b:

$$\frac{dn}{dt} = -q_{R,n}\left(\frac{c}{c_R}\right)^{1/3} x \qquad \text{E.12a}$$

La démonstration regroupant les équations E.6a à E.6d est reprise pour remplacer x dans l'équation E.12a et la même démarche utilisée pour la concentration cellualire c:

$$\frac{dn}{dt} = -q_{R,n}\frac{1}{c_R^{1/3}}\left[(t_2 - t_1)\left[\ln\left(\frac{c_2}{c_1}\right)\right]^{-1}\frac{dc}{dt}\right]^{1/3}(t_2 - t_1)\left[\ln\left(\frac{x_2}{x_1}\right)\right]^{-1}\frac{dx}{dt} \qquad \text{E.12b}$$

En utilisant la discrétisation explicite d'Euler, l'équation suivante permet de calculer le taux de consommation de référence à partir des données de deux échantillons:

$$q_{R,n} = \frac{(n_1 - n_2)}{(t_2 - t_1)}\left[\frac{c_R}{(c_2 - c_1)}\ln\left(\frac{c_2}{c_1}\right)\right]^{1/3}\frac{1}{(x_2 - x_1)}\ln\left(\frac{x_2}{x_1}\right) \qquad \text{E.12c}$$

En choisissant la concentration de référence à une unité cellulaire (e.g. 1 x 10^9 L^{-1}), le modèle décrivant la consommation nutritionnelle devient:

$$\frac{dn}{dt} = -q_{R,n}c^{1/3}x \qquad \text{E.13a}$$

et le taux de consommation spécifique de référence ($q_{R,n}$) est évalué expérimentalement selon:

$$q_{R,n} = \frac{(n_1 - n_2)}{(t_2 - t_1)}\left[\frac{1}{(c_2 - c_1)}\ln\left(\frac{c_2}{c_1}\right)\right]^{1/3}\frac{1}{(x_2 - x_1)}\ln\left(\frac{x_2}{x_1}\right) \qquad \text{E.13b}$$

E6. EFFETS DE FAVORISATION ET D'INHIBITION ASSOCIÉES À LA CINÉTIQUE DE SIROIS (1997)

Sirois (1997) présente une nouvelle forme de cinétique de croissance associée au nutriments:

$$\mu_n = \frac{K_{n,1}}{K_{n,1} + n^{K_{n,2}}} \qquad \text{E.14a}$$

Malgré sa représentation décrivant une inhibition nutritionnelle, cette cinétique peut aussi décrire une cinétique de favorisation nutritionnelle. En effet, dans le cas où l'exposant de la concentration en nutriments est négatif:

$$\mu_n = \frac{K_{n,1}}{K_{n,1} + n^{-K_{n,2}}} \qquad \text{E.15a}$$

l'équation peut être manipulée comme suit:

$$\mu_n = \frac{K_{n,1}}{K_{n,1} + n^{-K_{n,2}}} * \frac{n^{K_{n,2}}}{n^{K_{n,2}}} \qquad \text{E.15b}$$

$$\mu_n = \frac{K_{n,1} n^{K_{n,2}}}{K_{n,1} n^{K_{n,2}} + 1} * \frac{1/K_{n,1}}{1/K_{n,1}} \qquad \text{E.15c}$$

pour obtenir une expression de favorisation nutritionnelle:

$$\mu_n = \frac{n^{K_{n,2}}}{n^{K_{n,2}} + 1/K_{n,1}} \qquad \text{E.15d}$$

Annexe F

Démonstration biochimique par bilan protonique de l'effet de la source d'azote et de l'utilisation de citrate sur le pH et le gradient protonique

La Figure F.1 illustre les métabolismes reliant les sources d'azote aux sources carbonées. Les protons, leur transporteurs et les transporteurs énergétiques (ATP) y sont aussi indiqués.

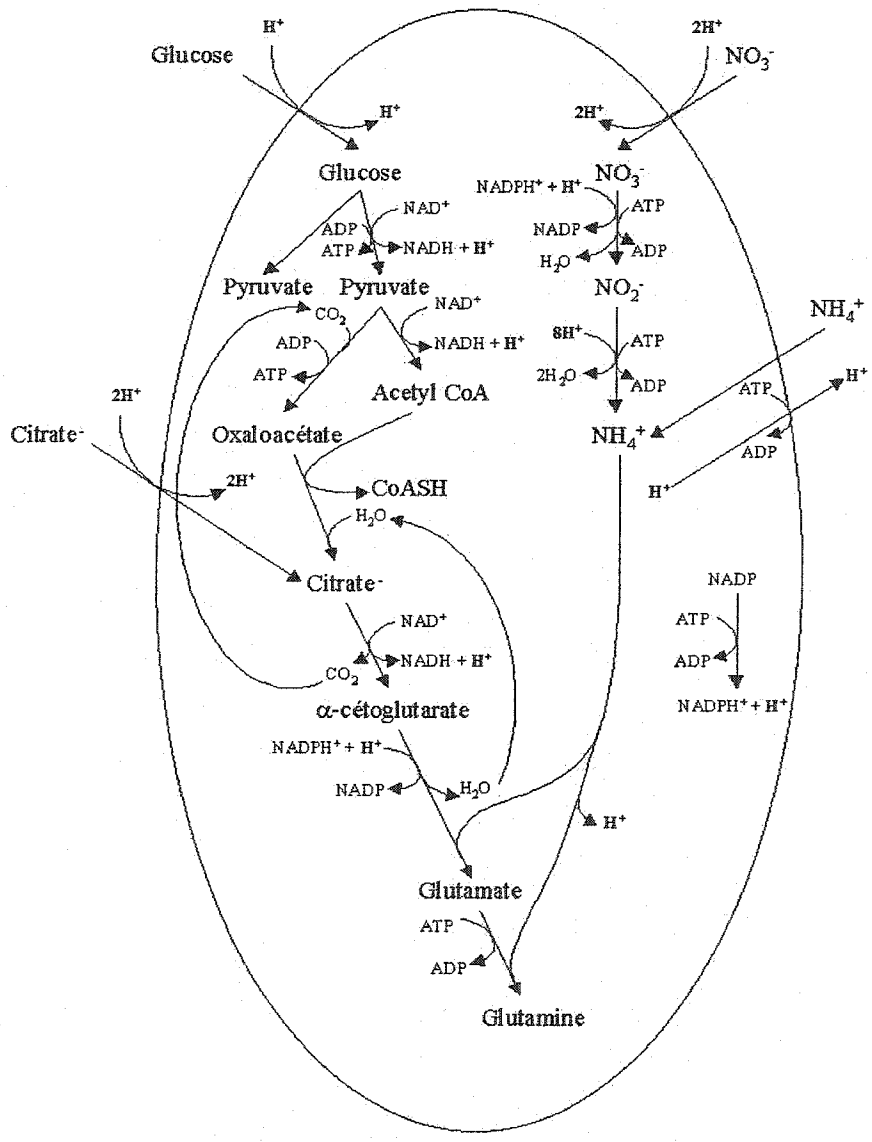


Figure F.1: Métabolismes des sources azotées et carbonée de l'absorption à la fixation de l'azote sur un squelette carboné

Comme mentionné à la section 4.4.3, l'utilisation de citrate d'ammonium a un effet significatif bénéfique sur la croissance en biomasse sèche et en prolifération cellulaire. Il permet d'éliminer l'effet pH provoqué par le ratio des sources d'azote utilisées (ammonium:nitrate). La Figure F.2 présente un résumé des métabolismes de la source carbonée et de l'azote présentés à la figure précédente.

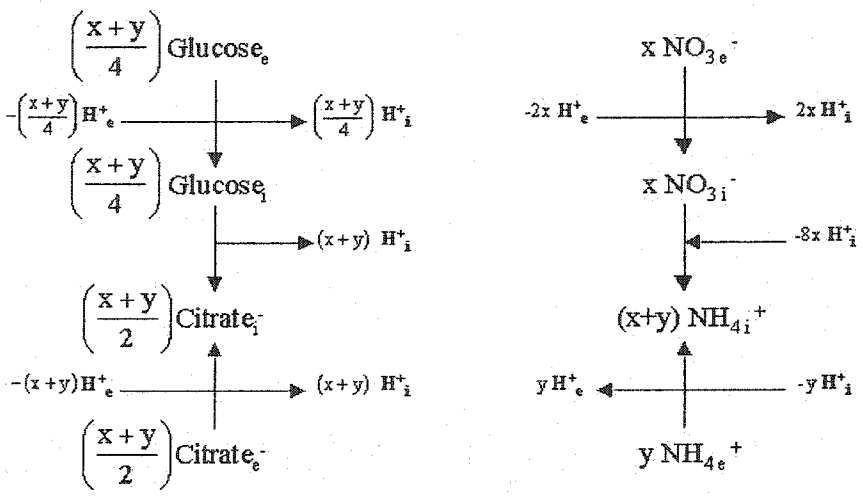


Figure F.2: Synthèse et comparaison des métabolismes de la source carbonée et de l'azote

L'analyse est basée sur la source azotée, sachant qu'une molécule de citrate fixe ultimement deux molécules d'azote et qu'une molécule de glucose forme deux molécules de citrate. En somme, une mole de protons entre dans les cellules pour chaque mole de glucose absorbée. Sa dégradation en citrate génère ensuite quatre moles de protons par mole initiale de glucose. Quant au citrate, son absorption se fait parallèlement à deux moles de protons. Toutefois, aucune génération n'en découle.

Dans le cas de l'azote, l'absorption du nitrate entraîne l'entrée de deux protons alors que sa réduction en ammonium consomme huit protons. D'autre part, la consommation d'ammonium provoque l'expulsion de protons selon un ratio 1:1.

À partir de ces connaissances, des bilans protoniques sont effectués pour différentes situations où le ratio ammonium:nitrate est changé, de même que le contre-ion de l'ammonium (citrate vs sulfate). Dans chaque cas, la quantité d'azote disponible (et considérée utilisée) est constante à 20mM.

Cas #1:	Milieu B5 (2:25)	x=18.5 mmol y=1.5 mmol

Variation extracellulaire:

$$\Delta H_e = (-2x + y) - \frac{1}{4}(x + y) \qquad \text{F.1a}$$

$$\Delta H_e = (-2(18.5) + 1.5) - \frac{1}{4}(18.5 + 1.5) \qquad \text{F.1b}$$

$$\Delta H_e = -40.5\text{mmol} \qquad \text{F.1c}$$

Variation intracellulaire:

$$\Delta H_i = (-6x - y) + \frac{5}{4}(x + y) \qquad \text{F.2a}$$

$$\Delta H_i = (-6(18.5) - 1.5) + \frac{5}{4}(18.5 + 1.5) \qquad \text{F.2b}$$

$$\Delta H_i = -87.5\text{mmol} \qquad \text{F.2c}$$

Ces résultats représentent les différentiels normalement générés par l'assimilation de l'azote dans les cellules cultivées dans le milieu B5. Les flux nets de protons sont aussi fonction de l'ensemble des autres métabolismes, raison pour laquelle ces valeurs ne sont utilisées qu'à titre de comparaison.

Cas #2:	Nitrate comme seule source azotée	x=20 mmol y=0 mmol

Variation extracellulaire:

$$\Delta H_e = (-2x + y) - \frac{1}{4}(x + y) \qquad \text{F.1a}$$

$$\Delta H_e = -45.0\text{mmol} \qquad \text{F.1d}$$

Variation intracellulaire:

$$\Delta H_i = (-6x - y) + \frac{5}{4}(x + y) \qquad \text{F.2a}$$

$$\Delta H_i = -95.0\text{mmol} \qquad \text{F.2d}$$

Selon ces calculs, la diminution de la concentration de protons extracellulaires serait plus prononcée dans ce dernier cas que dans le cas de référence, ce qui va dans le même sens que les résultats de pH présentés à la figure 4.20. Au surplus, les différentiels de concentration protonique sont semblables (11% et 9% plus élevés) au cas standard ce qui laisse croire que la croissance ne devrait pas être affectée outre mesure. Ceci est confirmé par les résultats présentés à la figure 4.22 (diminution du

taux de croissance de 14 ± 12% et de prolifération de 33 ± 37% par rapport à un ratio de 5:15 ammonium:nitrate).

Cas #3:	Ammonium comme seule source azotée	x=0 mmol y=20 mmol

Variation extracellulaire:

$$\Delta H_e = (-2x + y) - \frac{1}{4}(x + y) \qquad \text{F.1a}$$

$$\Delta H_e = +15.0\text{mmol} \qquad \text{F.1e}$$

Variation intracellulaire:

$$\Delta H_i = (-6x - y) + \frac{5}{4}(x + y) \qquad \text{F.2a}$$

$$\Delta H_i = +5.0\text{mmol} \qquad \text{F.2e}$$

Dans ce cas, les différentiels sont complètement à l'opposé de ceux conventionnels. Plutôt que de consommer des protons intracellulaires, ce qui est bénéfique pour les cellules puisque cela diminuent l'utilisation des pompes à protons, l'utilisation unique d'ammonium génère une accumulation protonique intracellulaire. De plus, la concentration extracellulaire est aussi accrue, comme le confirment les résultats présentés à la figure 4.20, augmentant ainsi le gradient protonique et favorisant les entrées anionique par symport protonique. Ces nouveaux protons doivent être expulsés eux-aussi. Ces deux effets combinés provoquent donc une accumulation de protons

dans la cellule, ce qui perturbe grandement la croissance dans son ensemble. Ces résultats sont confirmés par les résultats présentés à la figure 4.22.

Cas #4:	Ammonium comme seule source azotée, combinée à du citrate	x=0 mmol y=20 mmol

Variation extracellulaire:

$$\Delta H_e = (-2x + y) - (x + y) \qquad \text{F.3a}$$

$$\Delta H_e = 0.0\text{mmol} \qquad \text{F.3b}$$

Variation intracellulaire:

$$\Delta H_i = (-6x - y) + (x + y) \qquad \text{F.4a}$$

$$\Delta H_i = 0.0\text{mmol} \qquad \text{F.4b}$$

Les différentiels nuls obtenus suggèrent que l'utilisation conjointe de citrate et de l'ammonium provoque un effet de neutralisation des bilans protoniques, i.e. la consommation et l'utilisation du citrate par la cellule annule l'effet de l'utilisation seule de l'ammonium sur la distribution protonique. En outre, la réduction du nitrate demandant 3 moles d'ATP par mole de nitrate (2 directement et 1 lors de la reformation du $NADPH^+$ à partir d'un NADP), cette énergie (90 mmol sur une base de 20 mmol d'ions azotés) est maintenant disponible pour l'expulsion de protons par les pompes à protons. Théoriquement, cette énergie disponible suffit à recréer le différentiel protonique intracellulaire du cas de base (-87.5 mmol).

Annexe G

Publication tirée du chapitre 5. Modélisation.

DEVELOPMENT OF A TWO-STEP SEGREGATED MODEL FOR THE OPTIMIZATION OF PLANT CELL GROWTH

Joël Sirois†*, Michel Perrier†‡ and Jean Archambault*

†Department of Chemical Engineering,École Polytechnique de Montréal,
P.O.Box 6079, Suc. "Centre-Ville", Montréal, Québec (Canada), H3C 3A7

*Department of Chemical Engineering, School of Engineering, Université du Québec à Trois-Rivières, P.O. Box 500, Trois-Rivières, Québec (Canada), G9A 5H7

‡to whom correspondence shall be addressed: Michel.Perrier@mail.polymtl.ca
fax.: 1-514-340-4130

ABSTRACT

A two-step approach was used to develop a segragated model of the growth of *Eschscholtzia californica* plant cell cultures. In a first step, a non-segregated model was developed. Its parameters were estimated using conventional methods. The exponential phase of biomass growth was adequately estimated using a first set of parameters obtained using 14 bioreactor cultures. The exponential growth phase was well predicted while the model was unable to predict the decline phase. The model predicts the biomass growth with an overall error of 17 % ± 9 % (r^2=0.85).

In the second step, a segregated model was developed to increase the understanding of the biomass state in the bioreactor. The biomass was divided into three components based on the hypothesis of different activities: small cell *type a* biomass, large cell *type b* biomass and large inactive cell *type c* biomass. To represent cells death, a mortality constant was associated with each type of biomass in the equation system. The model predicts the biomass growth phase with an overall error of 14 % ± 7 % (r^2=0.89). The estimation of total biomass growth was improved over the non-segregated model since the segregated model well-predicted all the growth phases.

The non-segregated model was successfully used to optimize the growth of *E. californica* cell suspension culture in bioreactor resulting in a 100% increase in dried biomass concentration and a 300% increase in biomass growth rate over a conventional batch culture.

Keywords: biotechnology, process models, optimization.

1. INTRODUCTION

A wide range of secondary metabolites can be obtained by the culture of plant cells in vitro. This technique allows better control over production and recovery, and the possibility of optimizing the entire process. In spite of this, the mathematical description of the kinetics of the global metabolism remain deficient. Models are developed to improve the understanding of the growth phase by their ability to describe the behavior of the process. This ability is directly related to the structure of the model and its kinetics forms.

A plethora of models have been developed to describe and predict the behavior of plant cell cultures under different conditions. These models can be broadly classified in two categories, i.e. segregated and non-segregated models [1]. Evaluating the efficiency and utility of models must be based on their ability to describe, inform and predict the phenomenology of plant cell cultures. Published models of plant cell cultures usually include the growth and production phases of the bioprocess. A good description of the growth phase is obviously required to accurately describe the production phase.

Selection of growth variables for non-segregated models is generally based on nutrient limitation [2-5], or combined with the Fencl logistic equation [6-8], or associated with a leak from the cell to the medium of this nutrient [9]. In these cases, the model describes the growth kinetics as a function of a specific nutrient while the remaining nutrients are assumed non-limiting. This type of model can be used to study the effect of a specific nutrient on the growth process but cannot generally predict the whole growth phase adequately.

Bailey and Nicholson [10] presented a segregated model which predicts the concentration of viable, non-viable and total biomass. Hooker and Lee [11] and van Gulik *et al.* [12], on the other hand, included the description of nutrient uptake and internal use with change in biomass composition. The segregated model of Grm and Mele [13] describes the growth of four types of biomass together with the production of secondary metabolites. Despite its structure, this model cannot be used to predict the growth phase since its kinetics does not include the major aspects of the culture phenomenology. Consequently the model is dependent on the experimentation. Those segregated models improve our understanding about the whole growth process.

These models show the difficulty of modeling a bioprocess with good robustness to describe and predict the entire growth phase of any culture. The present paper presents a different approach to develop a segregated model for the prediction of the growth of plant cell culture. The models were developed to optimize the growth phase.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Cell line

Eschscholtzia californica cell line EC6 was generated 12 years ago at BIOPRO laboratories of École Polytechnique de Montréal. Suspension cultures of this cell line were maintained in Gamborg's basal growth medium [14] supplemented with 0.2 mg L^{-1} 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 0.1 mg L^{-1} kinetin and 30 g L^{-1} sucrose. The pH of this medium was adjusted to 5.5 prior sterilization (121°C, 1 bar, 20 min) with KOH. Subcultures were carried out weekly by transferring 20 to 30 % of suspension to fresh medium. Cell suspensions (200 ml) were maintained in 500 ml flasks agigated at 120 rpm and 26°C.

2.2 Bioreactor cultures

Low shear helical-ribbon impeller bioreactor of 6-L and 2-L equipped with surface baffles [15] were used for growth studies. They were assembled, fitted with accessories (sampling and nutrients addition ports, sterile air filter, and temperature, conductivity, Ingold dissolved oxygen (DO) polarographic and precalibrated pH probes) and steam sterilized (121°C, 1 bar, 1h). The DO concentration was maintained at 60% air saturation using an adaptive DO controller [16]. The medium was added after bioreactor sterilization. Additional nutrient solutions were added at different times in several cultures for various nutrient studies and to increase the robustness of the model.

The cultures were sampled daily or every other. Samples were filtered (Glass fiber filter, Gelman Science). Biomass was dried (oven 80°C, 24h) to obtain the dry-weight concentration. Nutrients (carbohydrates, anions and cations) were analyzed by HPLC (High Performance Liquid Chromatography) from filtered medium. Nutrient concentrations were corrected with the packed cells volume (PCV) as suggested by van Gulik *et al.* [5]. Measurement errors were assessed using ten samples of the same culture sampled at the same time and treated independently.

2.3 Models implementation

The models were implemented in the Excel© tabulator by explicit Euler approximation of the derivatives to instantly view the simultaneous effects of parameter variations on all the cultures simulated.

3. DEVELOPMENT OF THE NON-SEGREGATED MODEL

3.1 Development of equations

The development of the non-segregated growth model equations was based on the following hypotheses.

1. The growth of the plant cell culture is characterized by dried biomass concentration.

2. Growth limitation occurs by nutrients concentration.

3. Nutrients uptake and utilization are proportional to biomass growth.

4. Nutrients can be either rapidly absorbed from the medium, stored and used intracellularly over a certain period of time or immediately used as they are taken up from the medium.

The following reaction scheme [16] results from these hypotheses to represent the phenomenology of the growing biomass:

$$n_{1e} \rightarrow n_{1i} \quad (1)$$

$$n_{2e} \rightarrow n_{2i} \quad (2)$$

$$n_{1i} + n_{2i} + n_{3e} + n_{4e} \rightarrow x \quad (3)$$

where Equations (1) and (2) describe the uptake of extracellular nutrients (n_{1e}, n_{2e}) and Equation (3) represents total biomass (x) growth on immediately used nutrients (n_{3e}, n_{4e}) and stored intracellular nutrients (n_{1i}, n_{2i}). The following Equations are directly obtained from this reaction scheme.

$$\frac{d\varepsilon}{dt} = \mathbf{K}\varphi(\varepsilon, t) + f(\varepsilon) \tag{4}$$

where

$$\varepsilon^T = [x \;\; n_{1e} \;\; n_{1i} \;\; n_{2e} \;\; n_{2i} \;\; n_{3e} \;\; n_{4e}] \tag{5}$$

$$\varphi^T = [\phi_1 x \;\; \phi_2 x \;\; \mu x] \tag{6}$$

$$f^T = [0 \;\; f_{n1} \;\; 0 \;\; f_{n2} \;\; 0 \;\; f_{n3} \;\; f_{n4}] \tag{7}$$

$$\mathbf{K} = \begin{bmatrix} 0 & 0 & k_x \\ -1 & 0 & 0 \\ 1 & 0 & -k_{n1i} \\ 0 & -1 & 0 \\ 0 & 1 & -k_{n2i} \\ 0 & 0 & -k_{n3e} \\ 0 & 0 & -k_{n4e} \end{bmatrix} \tag{8}$$

The constants (k) of the invert yield matrix **K** and uptake rates (ϕ_1, ϕ_2) of the reaction rate vector φ must be measured. Uptake rate values are chosen to fit the experimental nutrient concentrations as shown for the uptake of phosphate by EC6 plant cells line (Figure 1). The result obtained from those measurements was 0.004 ± 0.002 mmol PO_4 h^{-1} (g biomass)$^{-1}$. The apparent yields (k^{-1}) of immediately used nutrients (n_{3e}, n_{4e}) are measured from bioreactor experiments with the slope method as shown for the consumption of sugars by EC6 cell cultures (Figure 2). The calculated yield was 0.36 ± 0.13 g biomass (g sugars)$^{-1}$. To determine the yield (k^{-1}) of accumulated nutrients (n_{1i}, n_{2i}) a series of experiments were performed at different initial concentrations of the extracellular nutrients to obtain a limitation effect. The results for the phosphate with EC6 cell cultures was 4.9 ± 1.6 g biomass (mmol PO4)$^{-1}$.

Thereafter the form of the growth rate must be determined. Its time-dependent value depends on nutrients concentration and various constants associated with the chosen specific growth equation. Various form of the specific growth rate have been published [17-19 and others] according to the dynamic of the plant cell line of interest. The biomass growth on sugars follows a Monod kinetic [17] with a growth constant near zero to represent the trigger effect of this major nutrient. The kinetic of the biomass growth on phosphate has the second form of Sokol and Howell [20] with the constant values of 0.67 for K1, 0.002 for K2 and 1.05 for K3.

The parameters are adjusted to minimize the biomass overall estimation error [11] following the objective equation.

$$\min \sum (x_m - x)^2 \tag{9}$$

where x_m is the measured dried biomass concentration and x is the model estimated dried biomass concentration. The estimation of nutrients concentration were carried out with the measured consumption rates and yields. Those estimations were verified to satisfy the measured nutrients concentration according with the experimental error. Corrections were made to the parameters if necessary to increase the accuracy of prediction.

3.2 Results

The objective function (Eq. 9) was evaluated by simultaneous simulations of the system equations of the non-segregated model (Eqs. 4-8) for 14 different EC6 cultures. As shown in Figure 3 and 4 the model predicts the biomass growth with an error of 15 % ± 8 % (r^2=0.87) on the exponential growth phase and an overall error of 17 % ± 9 % (r^2=0.85) for all the growth phases. The exponential growth phase was well predicted while the model was unable to predict the decline phase. The prediction of an immediately used nutrient (sugars) is presented in Figure 5.

4. DEVELOPMENT OF THE SEGREGATED MODEL

4.1 Development of equations

To increase the accuracy of the prediction, the biomass was divided into three components based on the hypothesis of different activities. First, small cells (denoted here as *type a* biomass) expand using nutrients to build bio-structures (cell wall, organelles, nucleus, etc.) and become larger (*type b*). Subsequently a part of *type b* biomass form *type a* biomass. Another part of *type b* biomass remains large to form *type c* biomass which is inactive. To represent cells death, a mortality constant was associated with each type of biomass in the equation system.

The growth of the three types of biomass is based on the uptake and consumption of nutrients as previously described. The uptake of nutrients is based on total biomass concentration since all biomass is assumed to exchange molecules with the medium. The consumption of nutrients is based on the growth rate of *type b* biomass if nutrients are strongly used for bio-component formation, or based on the growth rate of *type a* biomass if they are used in other metabolic pathways.

The influence of each nutrient on the growth rate is represented as described previously except for this model, we used three different biomass growth rates describing each type of biomass (μ_a, μ_b, μ_c). The yield coefficients obtained from the previous non-segregated model were assumed to be the same for the segregated model since it is the same biomass. These values must only be applied on the appropriate type of biomass (*type a* or *b*) according to the main utility of the nutrient. As a first approximation, sugars and nitrate are associated with *type b* biomass as the growth stops if they disappear from the medium while phosphate and ammonium uptake are associated with *type a* biomass as they disappear from the medium few hours after inoculation. The following reaction scheme results from this phenomenology.

$$n_{1e} \rightarrow n_{1i} \tag{10}$$

$$n_{2e} \rightarrow n_{2i} \tag{11}$$

$$n_{1i} + n_{3e} + x_b \rightarrow x_a \tag{12}$$

$$n_{2i} + n_{4e} + x_a \rightarrow x_b \tag{13}$$

$$x_b \rightarrow x_c \tag{14}$$

$$x_a + x_b + x_c \rightarrow \text{(death biomass)} \tag{15}$$

Equations (1) and (2) represents the uptake of extracellular nutrients (n_{1e}, n_{2e}). Equations (12) to (14) describe the *types a, b* and *c* biomasses growth. The death of biomass is described by equation (15). A new system of equations is then obtained from this reaction scheme.

$$\frac{d\varepsilon}{dt} = K\varphi(\varepsilon,t) + f(\varepsilon) \tag{4}$$

where

$$\varepsilon^T=[x_a\ x_b\ x_c\ n_{1e}\ n_{1i}\ n_{2e}\ n_{2i}\ n_{3e}\ n_{4e}] \tag{16}$$

$$\varphi^T=[\phi_1 x\ \ \phi_2 x\ \mu_a x_b\ \mu_b x_a\ \mu_c x_b\ \mu_{death} x] \tag{17}$$

$$f^T=[0\ 0\ 0\ f_{n1}\ 0\ f_{n2}\ 0\ f_{n3}\ f_{n4}] \tag{18}$$

$$K = \begin{bmatrix} 0 & 0 & k_{1,xa} & 0 & 0 & -k_{2,xa} \\ 0 & 0 & 0 & k_{1,xb} & 0 & -k_{2,xb} \\ 0 & 0 & 0 & 0 & k_{1,xc} & -k_{2,xc} \\ -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 1 & 0 & -k_{n1i} & 0 & 0 & 0 \\ 0 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & -k_{n2i} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & -k_{n3e} & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & -k_{n3e} & 0 & 0 \end{bmatrix} \quad (19)$$

The nutrient constants (k_n) and uptake rates (ϕ_1, ϕ_2) are determined as mentioned above. The major difficulty for this model is the specification of death constants in addition to the determination of the biomass growth rate constants. An approximation of death constants can be made by estimating the decay rate of the biomass at the end of the culture whereas the growth rates are approximately zero. The growth rates constants are used to minimize the total biomass overall estimation error via the objective function defined before. Thereafter, total decay rate is distributed for each type of biomass by a shooting method when the culture is simulated in order to reproduce the plateau and decay phases of all the cultures with a minimum error.

4.2 Results

The objective equation (9) was used to minimize the estimation error of the segregated model (Equation 4 with Equations 16-19) for the same 14 cultures. The prediction of sugars concentration is shown in Figure 5. As shown in Figure 6 and Figure 7 the model predicts the biomass growth phase with an overall error of 14 % (r^2=0.89). The adequately prediction of the whole growth process of the plant cells cultures is the major improvement of the segregated model over the non-segregated one. A part of the mismatch is produced for the same reasons mentioned for the non-segregated model and also by the large number of growth constants since there are three growth rates in the segregated model instead of one in the non-segregated. It is possible to reduce the number of constants in the growth rates equations with only a minor loss in estimation accuracy (results not shown).

5. GROWTH OPTIMIZATION

The non-segregated model was used to optimize the growth of *E. californica* cell culture in bioreactor. It was used everyday to determine the required nutrients concentration needed to allow optimal growth for the next 24 hours based on the predicted nutrients consumption. The optimization problem was to maintain phosphate concentration at low levels to maximize biomass growth as shown by kinetic studies as well as sugars concentration to minimize osmotic pressure. However the nutrients were added once a day and they should be in sufficient quantity to allow biomass growth until the next addition. The nutrient feeds were the decision variables for the optimization procedure.

As shown in Figure 8A the whole culture could be predicted at the beginning of the experiment. Thereafter, the model was used and corrected online to get better prediction and optimization. The model got its feedback from the total dried biomass measurement witch is only available 24 hours after the sampling time. The example of the sample taken at 210 hours is shown at figure 8B. The nutrients requirement and biomass growth are predicted with the model corrected by the past samples. The next day the resulted dried biomass concentration was used to correct the model (Figure 8C) and the nutrient requirement. Biomass growth was predict after this correction and so on (Figure 8D). A growth limitation occurred at 320 hours of culture resulting of an oxygen transfer limitation of the bioreactor. Figure 9 shows biomass growth of a conventional batch culture and the optimal culture. With the model used for growth optimization the final dried biomass concentration was doubled while the time needed to reach 10 g L^{-1} was approximately reduced by one-third (three times the standard biomass growth rate). This result confirms the nutrient concentration limitation in addition of starvation. Figure 10 shows the periodic nutrient feeds for the optimal culture while no nutrient addition were done for the conventional culture.

6. DISCUSSION

Comparing the estimated biomass profile from the non-segregated model with the experimental data (Figure 3 and Figure 4) it appears that the exponential growth phase is well-predicted until substrates are exhausted (≈300 h). At that time growth ceases and the model assumed the biomass concentration to remain constant. The major improvement of the segregated model over the non-segregated model is its ability to predict all phases of cells suspension growth pattern. As

shown in Figure 6 and Figure 7 the estimated profile follows the same trend as the experimental data during whole culture. This characteristic of the segregated model improves the description of the culture which reduces the estimation error at the expense of the increase in model complexity. However the low number of experimental points in the decline phase reduce the observed decrease of the overall error of the segregated model (14 %) over the non-segregated one (17 %).

Moreover the capacity of the segregated model to predict the pattern of the total biomass concentration by the estimation of the three specific biomass reinforces the hypothesis of different biomass states. Furthermore, the estimated concentration of *type c* biomass is an indication of the performance of the bioreactor system. In the culture shown in Figure 6, the estimation of *type c* biomass is always close to zero. This means that the process generate low amount of inactive biomass according to the hypothesis of the segregated model development. Accurate predictions allows one to use the model to predict the culture behavior following changes in the culture process with minimal experimentation. The model also help to monitor on-line unmeasured variables as the process evolves.

As shown in Figure 9 the use of the model allow a fastest growth than the conventional culture when used to optimize the growth phase. The model could be used to reach higher biomass concentration or reduce the culture time. The segregated model gives good results for the biomass growth estimation but a major problem persist: it is very difficult to validate the hypothesis of the three types of biomasses. Further experiments will be done to counteract this question.

7.CONCLUSION

A two-step approach was used for the development of a segregated model for plant cell cultures with good accuracy (estimation error less than 15%) considering the natural variability of plant cells culture. Each growth phase was estimated with only a small number of biochemical reactions (biomasses growth and uptake rates) while thousands of biochemical reactions simultaneously occurs in plant cells. Finally, twice the final dried biomass was reach when the model was used to optimize growth.

NOMENCLATURE

f_j feed of the nutrient j (mmol L^{-1} h^{-1})

k positive constant, inverse of apparent yield (mmol (g biomass)$^{-1}$)

n nutrient concentration (mM)

t time (h)

x biomass concentration (g L^{-1})

ϕ_j uptake rate of nutrient j (mmol (g biomass)$^{-1}$ h^{-1})

μ_x biomass growth rate (h^{-1})

vector and matrix

f nutrient feed vector

K inverse yield constant matrix

ε estimated variables vector

φ rates vector

subscripts

a	refer to *type a* biomass
b	refer to *type b* biomass
c	refer to *type c* biomass
e	extracellular
i	intracellular
m	measured variable
1,...,j	identify a specific constant when more than one are referred to the same nutrient

REFERENCES

1. J.P. Barford and R.J. Hall, An evaluation of the approach to the mathematical modeling of microbial growth. Process Biochemistry (1978) 22-29.

2. W.R. Curtis, P.M. Hasegawa and A.H. Emery, Modeling release and variable growth in phosphate limited suspension cultures of *Opium puppy*. Biotechnology Progress 38 (1991) 371-379.

3. J. Gardiola, J.L. Iborra and M. Cánovas, A model that links growth and secondary metabolite production in plant cell suspension cultures. Biotechnology and Bioengineering 46 (1995) 291-297.

4. S. Pazoutová, J. Votruba and Z. Rehacek, A mathematical model of growth and alkaloid production in the submerged culture of *Claviceps purpurea*, Biotechnology and Bioengineering 23 (1981) 2837-2849.

5. W.M. van Gulik, H.J.G. ten Hoopen and J.J. Heijnen, Kinetics and stoichiometry of growth of plant cell cultures of *Catharanthus roseus* and *Nicotiana tabacum* in batch and continuous fermentors. Biotechnology and Bioengineering 40 (1992) 863-874.

6. Z. Fencl, Theoretical and methodological basis of continuous culture I,. I. Málek and Z. Fencl (Ed.) Academy, New York, 1966, pp. 79-88

7. A.V. Quinlan, A semicontinous culture model that links cell growth to extracellular nutrient concentration. Biotechnology and Bioengineering 28 (1986) 1455-1461.

8. R.A. Taticek, M. Moo-Young and R.L. Legge. Effect of bioreactor configuration on substrate uptake by cell suspension cultures of plant *Eschscholtzia californica*. Applied Microbiology and Biotechnology 33 (1990) 280-286.

9. G.C. Frazier, A simple, leaky cell growth model for plant cell aggregates. Biotechnology and Bioengineering 33 (1989) 313-320.

10. C.M. Bailey and H. Nicholson, A new structured model for plant cell culture. Biotechnology and Bioengineering 34 (1989) 1331-1336.

11. B.S. Hooker and J.M. Lee, Application of a new structured model to tobacco cell cultures. Biotechnology and Bioengineering, 39 (1992) 765-774.

12. W.M. van Gulik, H.J.G. ten Hoopen and J.J. Heijnen, A structured model describing carbon and phosphate limited growth of *Catharanthus roseus* plant cell suspension in batch and chemostat culture. Biotechnology and Bioengineering 41 (1993) 771-780.

13. B. Grm, and M. Mele. Model of growth and ergot alkaloid production by *Claviceps purpurea*. Biotechnology and Bioengineering 22 (1980) 225-270.

14. O.L. Gamborg, R.A. Miller and K. Ojima, Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Experimental Cell Research 50 (1968) 151-158.

15. M. Jolicoeur, C. Chavarie, P.J. Carreau and J. Archambault. Development of a helical-ribbon impeller bioreactor for high-density plant cell suspension culture. Biotechnology and Bioengineering 39 (1992) 511-521.

16. G. Bastin and D. Dochain, On-line estimation and adaptive control of bioreactors, Elsevier (Ed.), New York. 1990

17. J. Monod, Recherches sur la croissance des cultures Bactériennes, Hermann (Ed.), Paris, 1942.

18. J.F. Andrew, A mathematical model for the continuous culture of microorganisms utilizing inhibiting substrates. Biotechnology and Bioengineering 10 (1968) 707-723.

19. C.M. Bailey and D.F. Ollis, Biochemical engineering fundamentals, McGraw-Hill (Ed.), New York. 1986

20. W. Sokol and J.A. Howell, Kinetics of phenol oxidation by washed cells. Biotechnology and Bioengineering 23 (1981) 2039-2049.

FIGURE CAPTION

Figure 1 - Nutrient uptake rate determination.

□ : measured concentration.

— : modeled concentration.

An addition of phosphate was done at 65 hours.

Figure 2 - Calculation of nutrient apparent yield.

□ : measured concentration.

— : linear fit.

The yield is the slope of the line.

Figure 3 - Biomass concentration estimation using the non-segregated model for culture 1.

□ : measured concentration.

— : model prediction.

Figure 4 - Biomass concentration estimation using the non-segregated model for culture 2.

O : measured concentration.

— : model prediction.

Figure 5 - Sugar concentrations.

□ : measured concentration.

— : non-segregated model prediction.

--- : segregated model prediction.

Figure 6 - Biomass concentration estimation using the segregated model for culture 1.

□ : measured concentration.

— : total biomass prediction.

--- : type a biomass.

···· : type b biomass.

-·-·- : type c biomass.

Figure 7 - Biomass concentration estimation using the segregated model for culture 2.

O : measured concentration.

— : total biomass prediction.

--- : type a biomass.

···· : type b biomass.

-·-·-: type c biomass.

Figure 8 - Growth optimization steps.

■ : measured concentration.

— : total biomass prediction.

A : Whole culture prediction before experimentation.

B : Growth simulation after 200 hours of culture.

C : Model's feedback from experiment.

D : Whole culture simulation after experimentation.

Figure 9 - Optimal culture and conventional culture growth comparison.

■ : optimal culture measured biomass concentration.

● : standard culture measured biomass concentration.

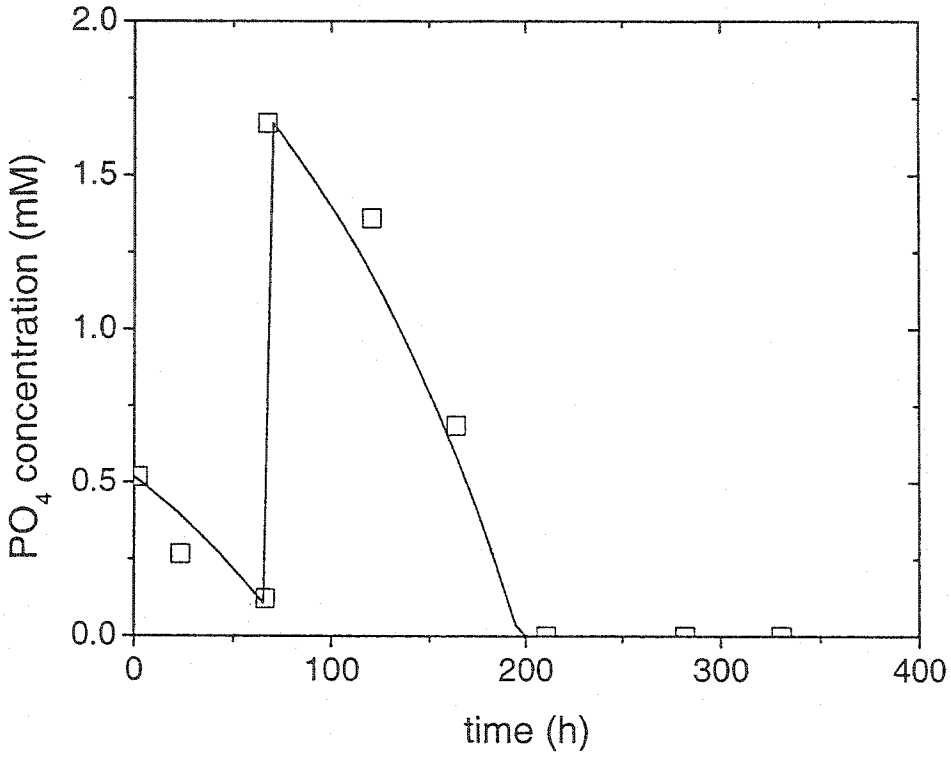
— : optimal culture total biomass prediction.

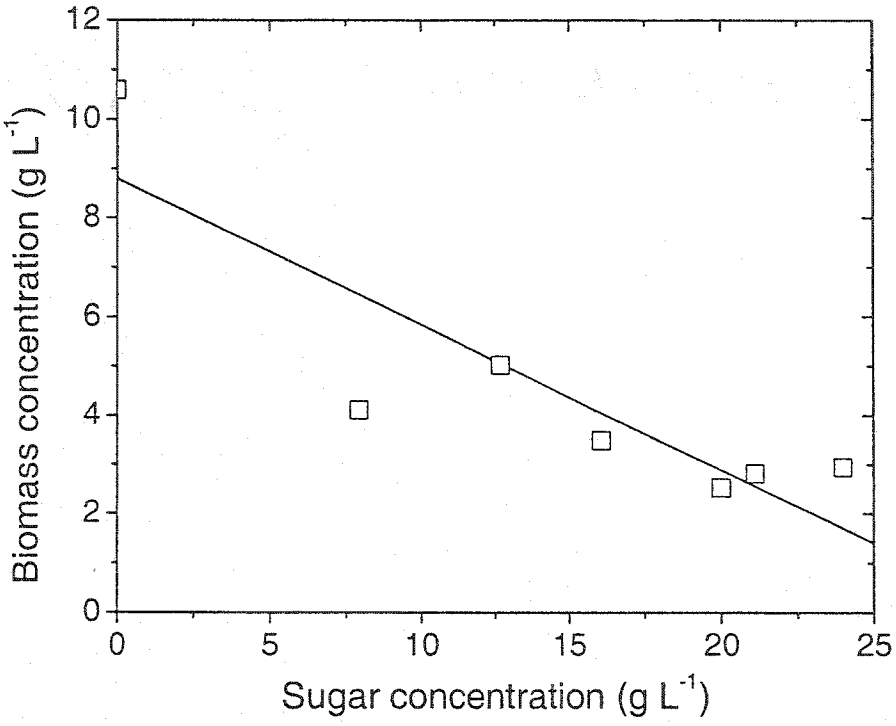
----: conventional culture total biomass prediction.

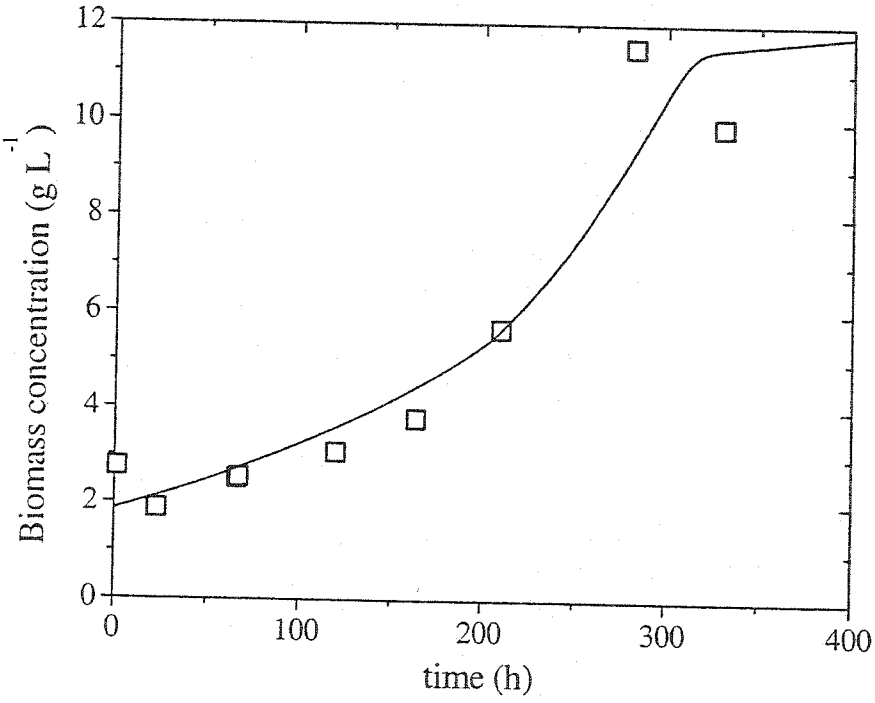
Figure 10 - Periodic nutrient feeds for the optimal culture.

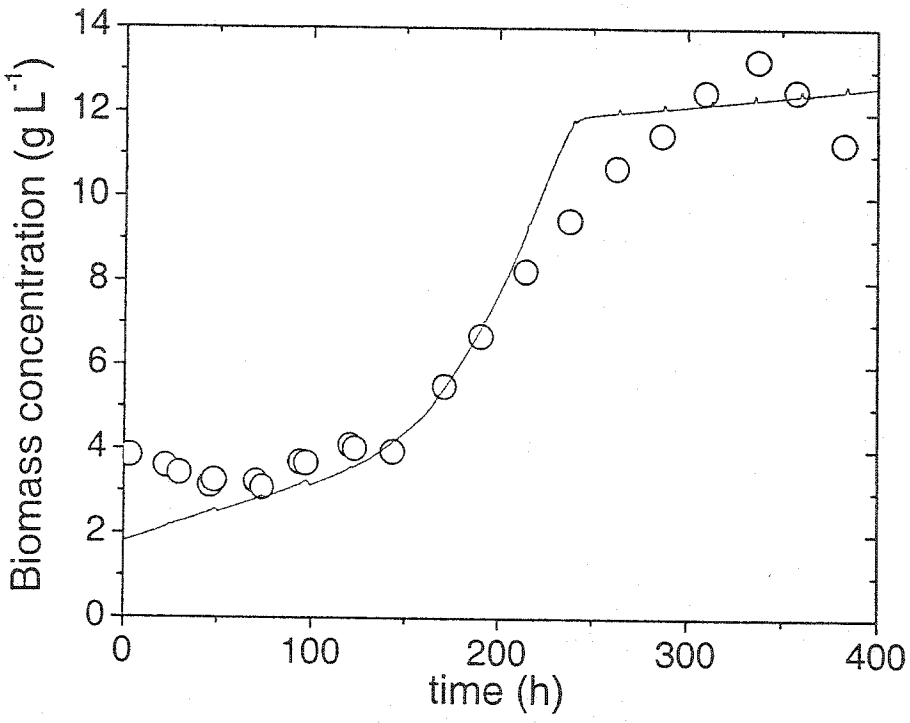
■ : sugars feed.

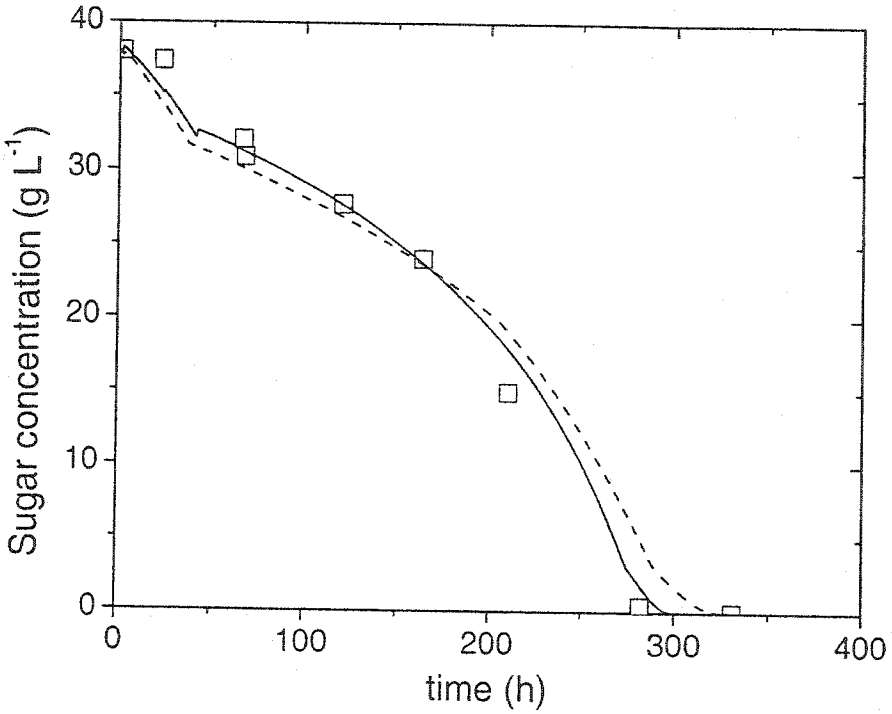
O : phosphate feed.

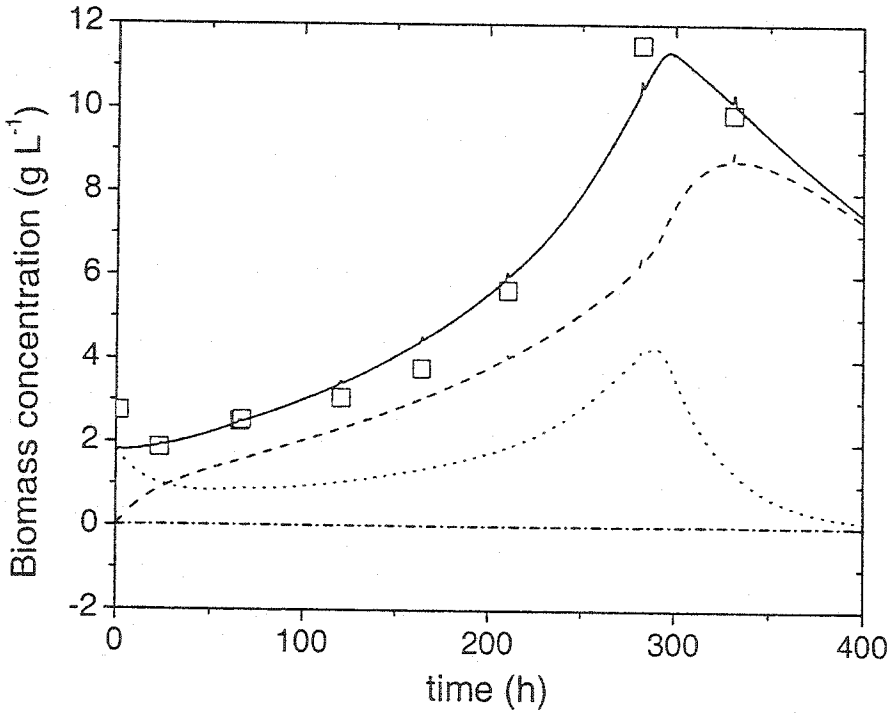

2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
PO_4 concentration (mM)
0
100
200
300
400
time (h)

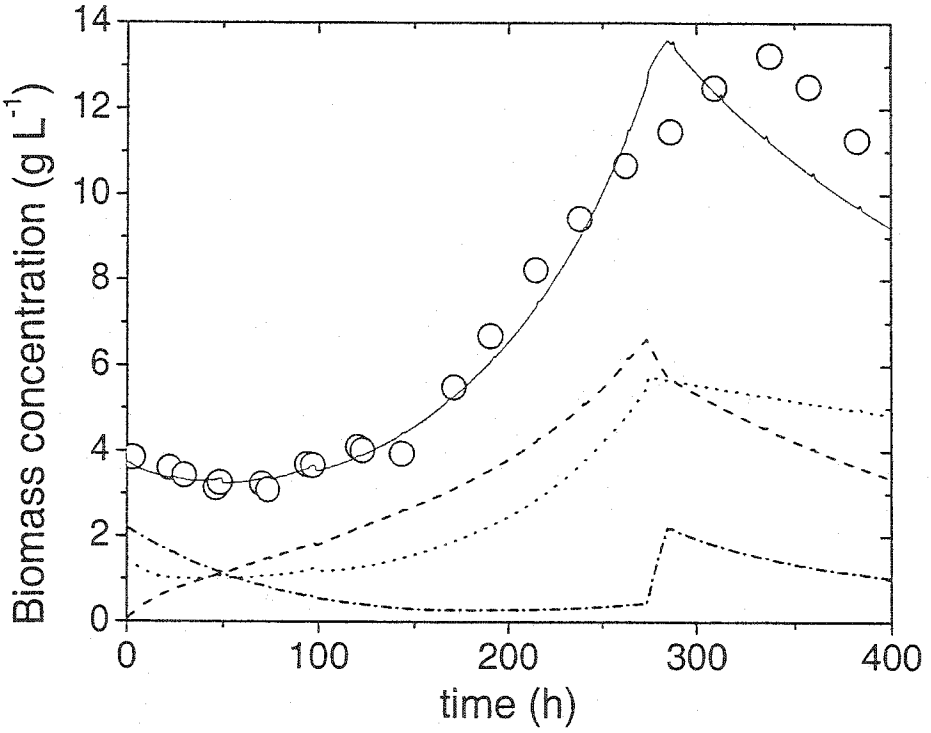

Biomass concentration (g L-1)
Sugar concentration (g L-1)
0
2
4
6
8
10
12
0
5
10
15
20
25

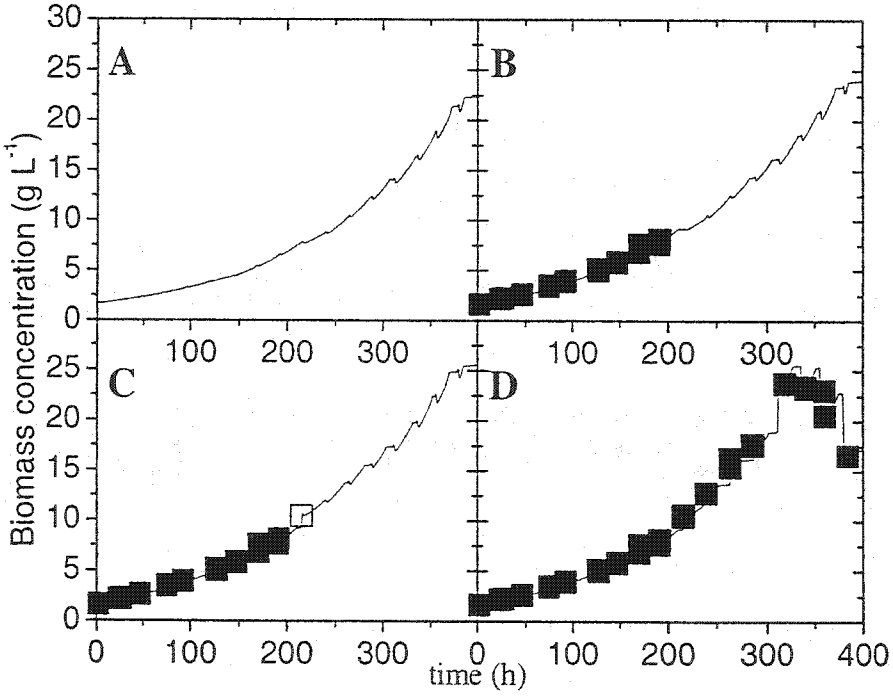

Biomass concentration (g L-1)
time (h)
0
2
4
6
8
10
12
0
100
200
300
400

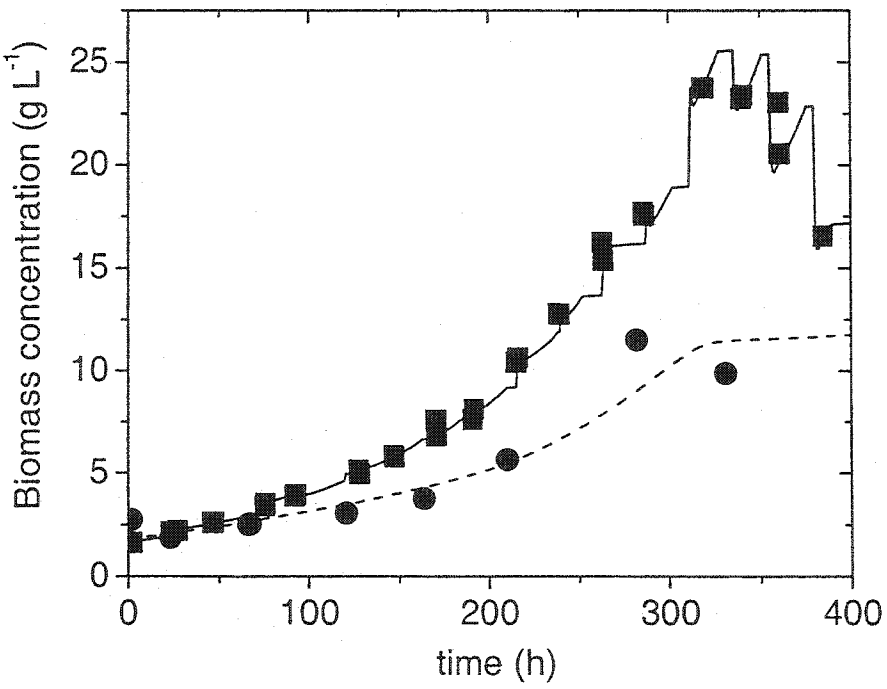

Biomass concentration (g L-1)
14
12
10
8
6
4
2
0
0
100
200
300
400
time (h)

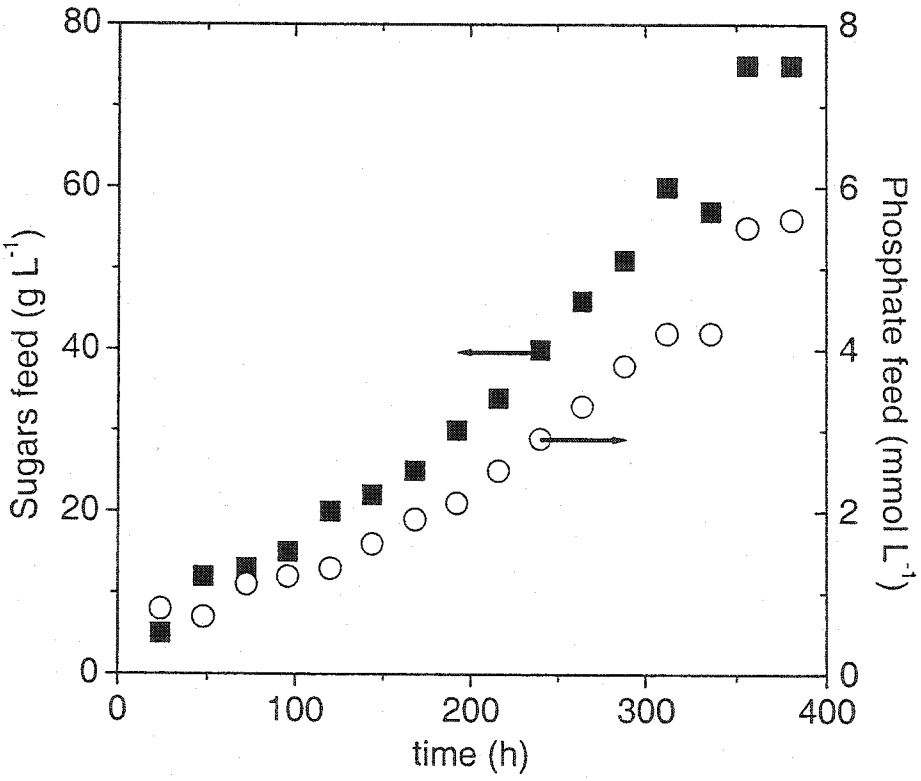

Sugar concentration (g L-1)
time (h)
0
10
20
30
40
0
100
200
300
400


Biomass concentration (g L-1)
time (h)
12
10
8
6
4
2
0
-2
0
100
200
300
400


Biomass concentration (g L-1)
time (h)
0
2
4
6
8
10
12
14
0
100
200
300
400


A
B
C
D
Biomass concentration (g L-1)
time (h)
0
5
10
15
20
25
30
100
200
300
400


Biomass concentration (g L-1)
25
20
15
10
5
0
0
100
200
300
400
time (h)


80
60
40
20
0
0
100
200
300
400
time (h)
Sugars feed (g L-1)
8
6
4
2
0
Phosphate feed (mmol L-1)

Annexe H

Estimations de la croissance de cultures de cellules végétales développées lors de la détermination des constantes de cinétique du modèle non ségrégué

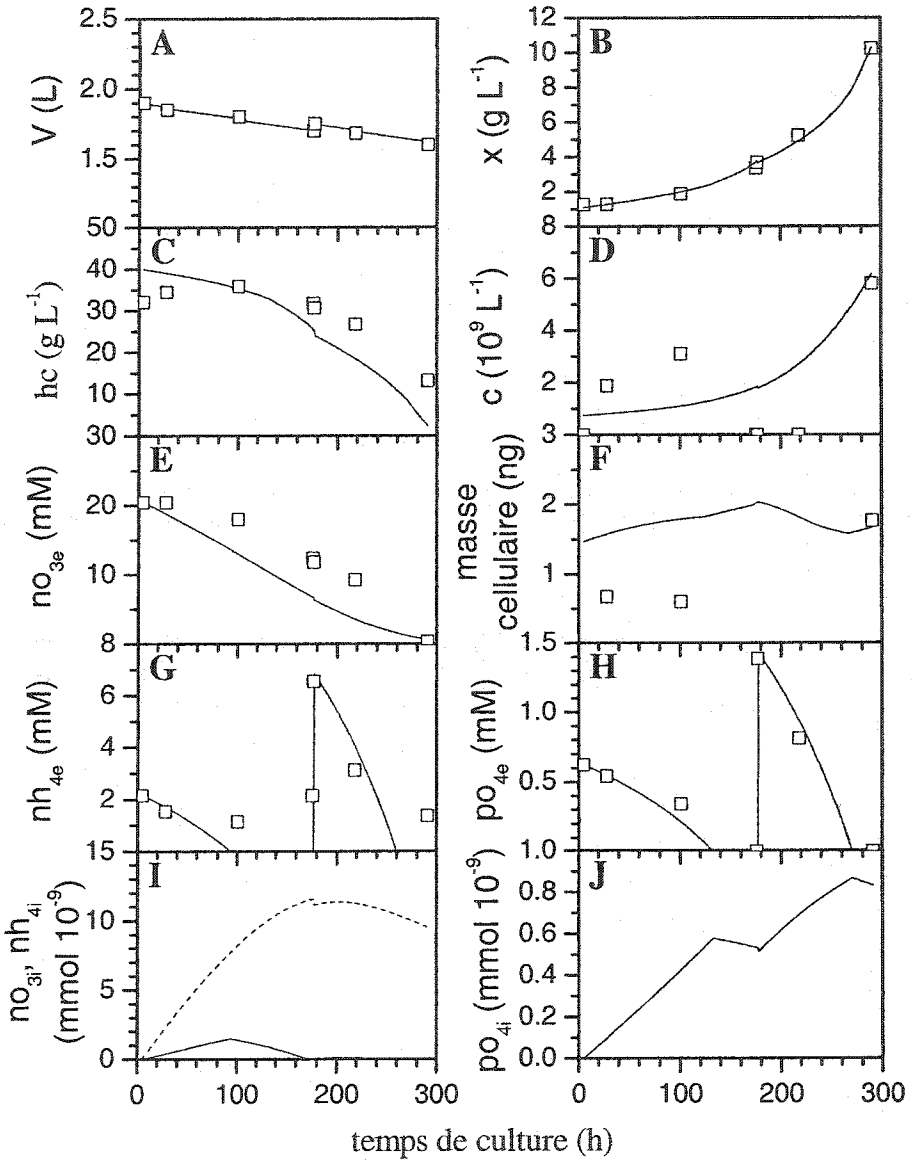


Figure H.1: **Estimations de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture 2SH8 par le modèle de croissance non ségrégué. ☐ mesure expérimentale, — estimation. I. ----- Nitrate intracellulaire, — Ammonium intracellulaire.**

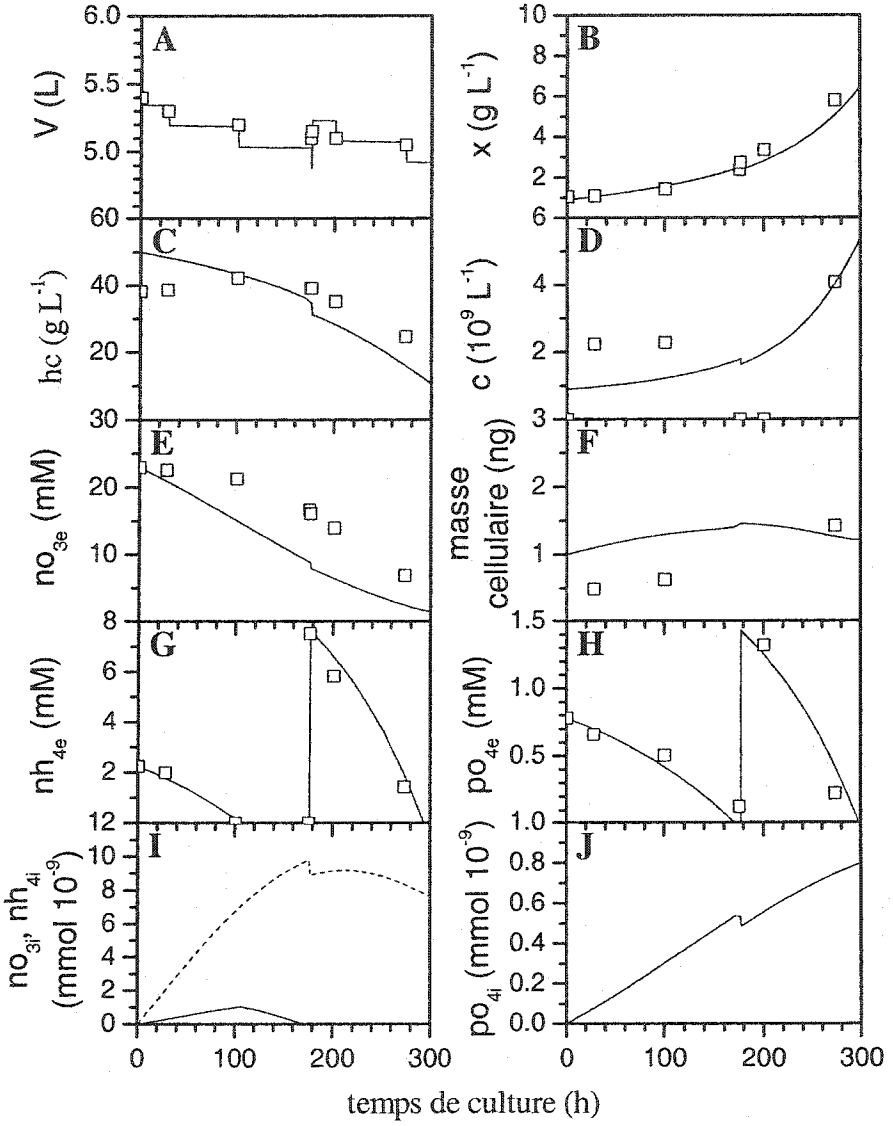


Figure H.2: **Estimations de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture 5SH9 par le modèle de croissance non ségrégué. ☐ mesure expérimentale, — estimation. I. ----- Nitrate intracellulaire, — Ammonium intracellulaire.**

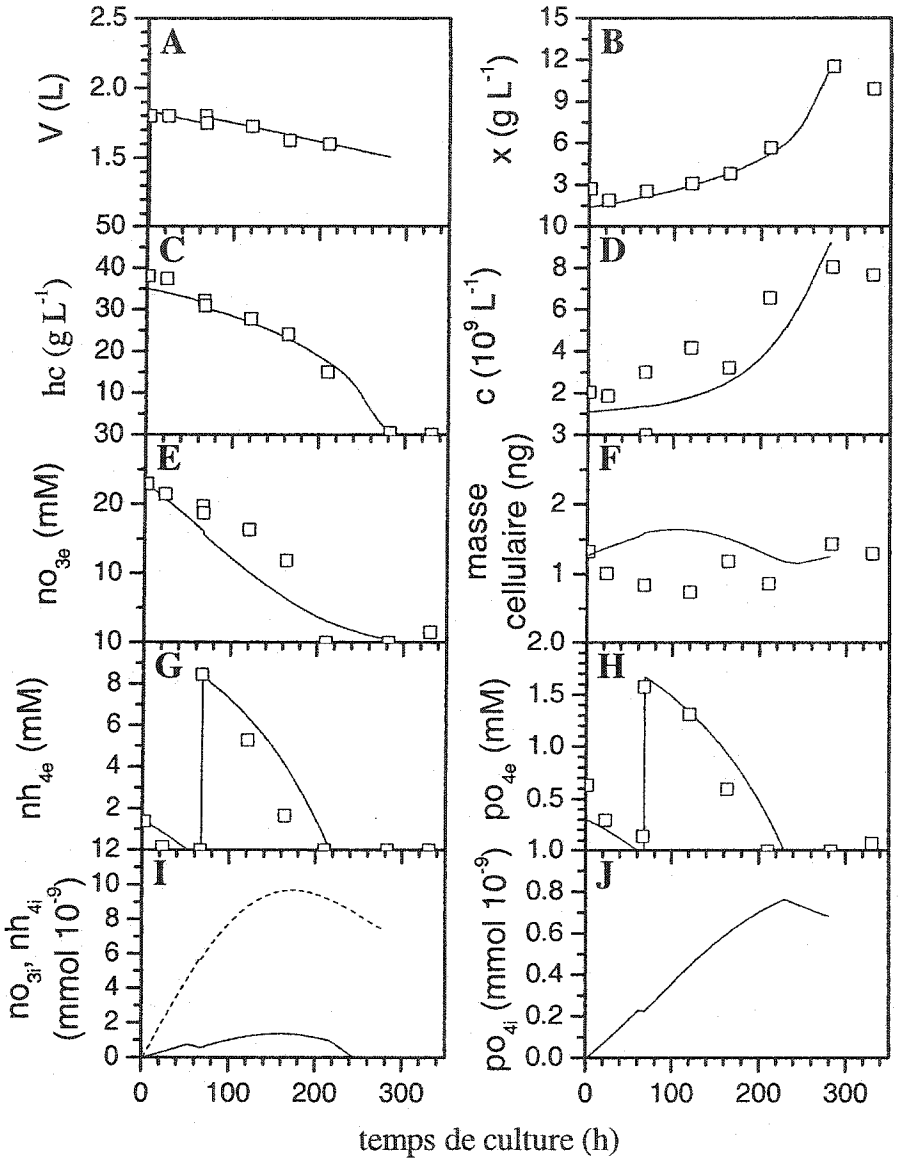


Figure H.3: **Estimations de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture 2SH10 par le modèle de croissance non ségrégué. ☐ mesure expérimentale, — estimation. I. ----- Nitrate intracellulaire, — Ammonium intracellulaire.**

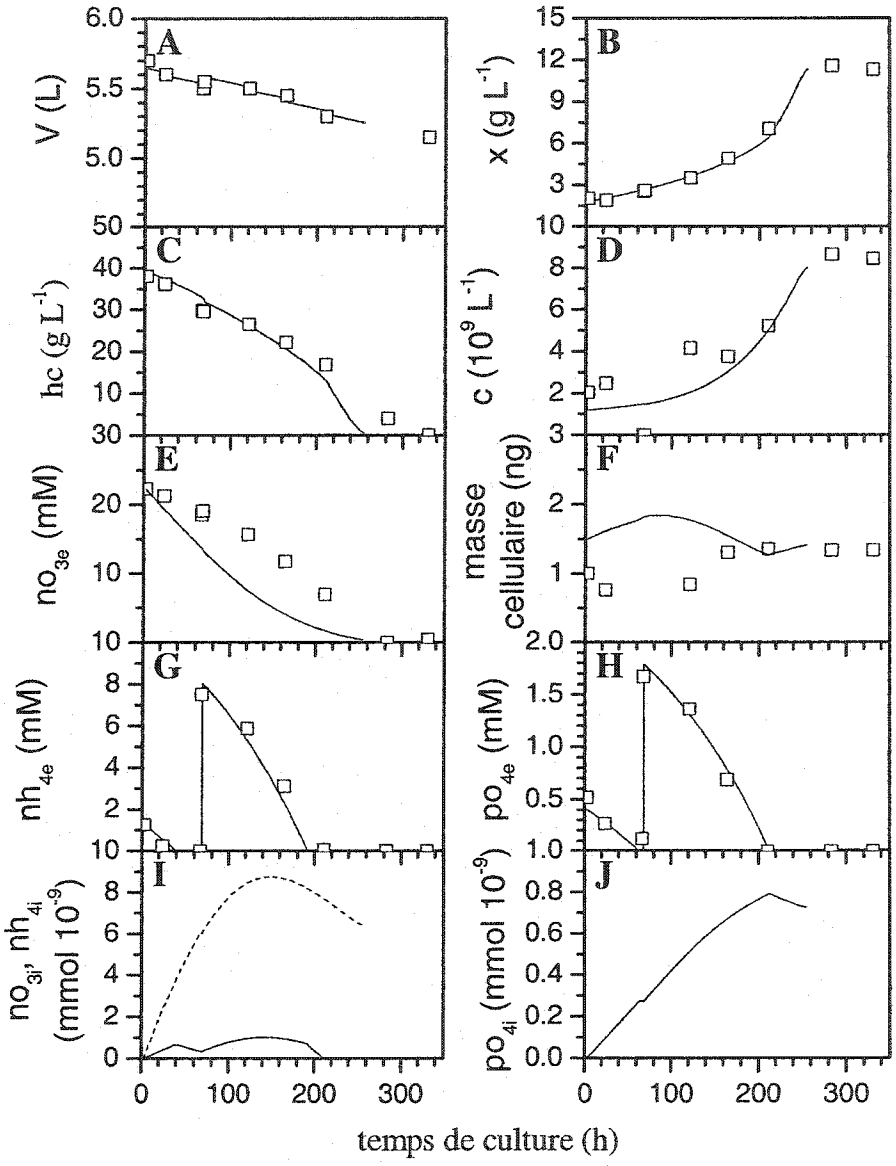


Figure H.4: **Estimations de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture 5SH11 par le modèle de croissance non ségrégué. ☐ mesure expérimentale, — estimation. I. ----- Nitrate intracellulaire, — Ammonium intracellulaire.**

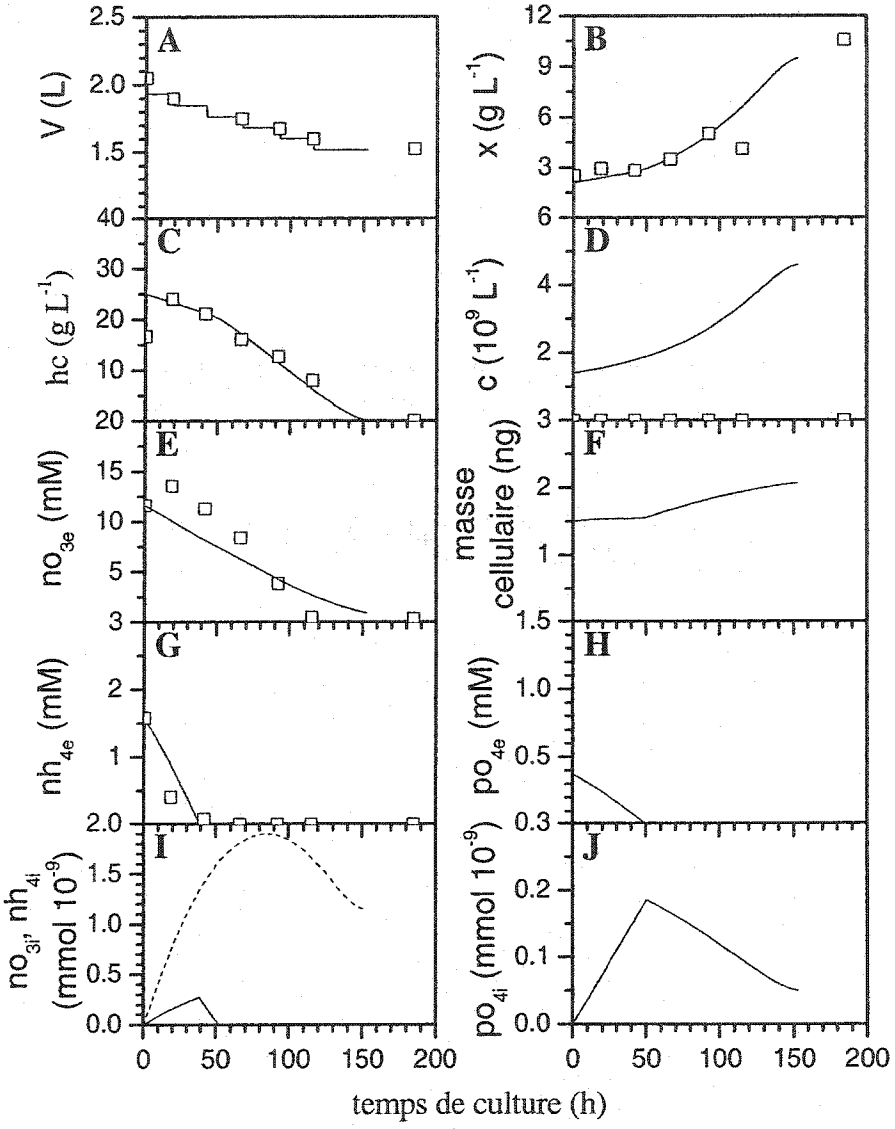


Figure H.5: **Estimations de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture 2SH12 par le modèle de croissance non ségrégué. ☐ mesure expérimentale, — estimation. I. ----- Nitrate intracellulaire, — Ammonium intracellulaire.**

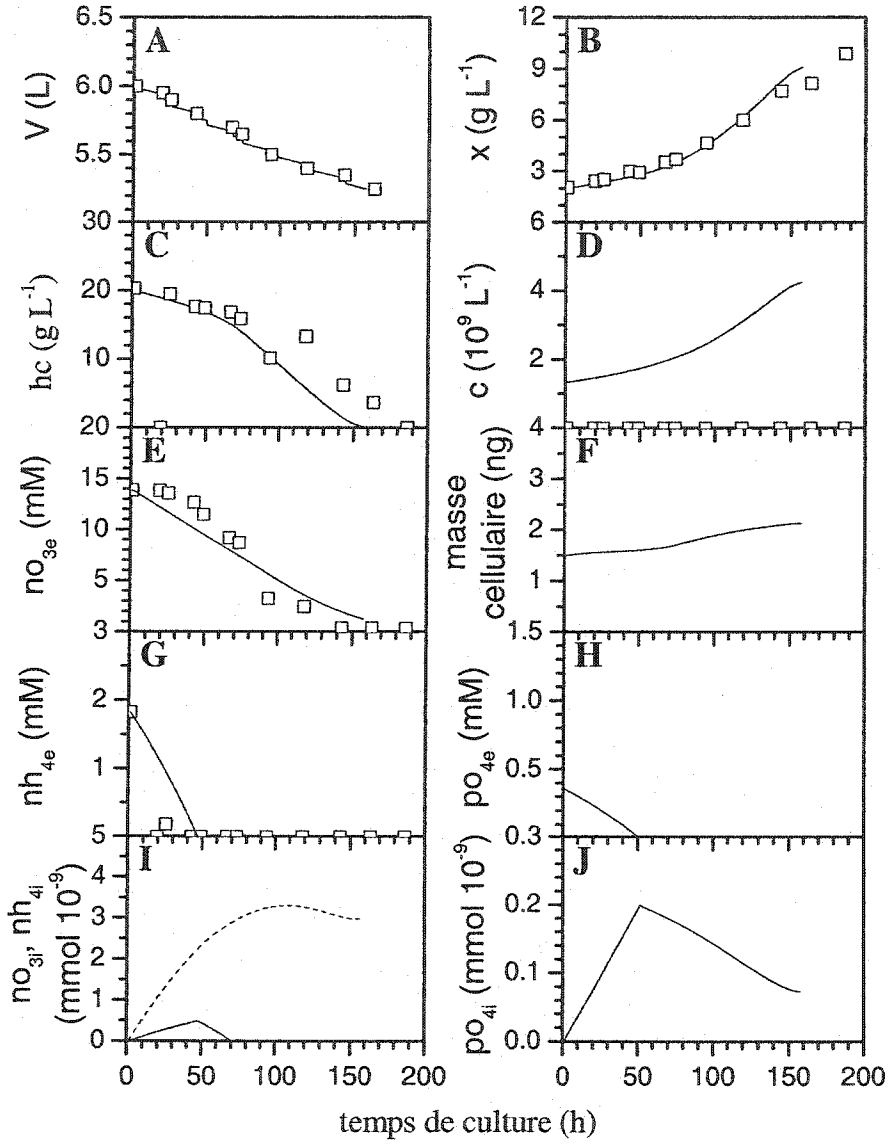


Figure H.6: **Estimations de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture 5SH13 par le modèle de croissance non ségrégué. ☐ mesure expérimentale, — estimation. I. ----- Nitrate intracellulaire, — Ammonium intracellulaire.**

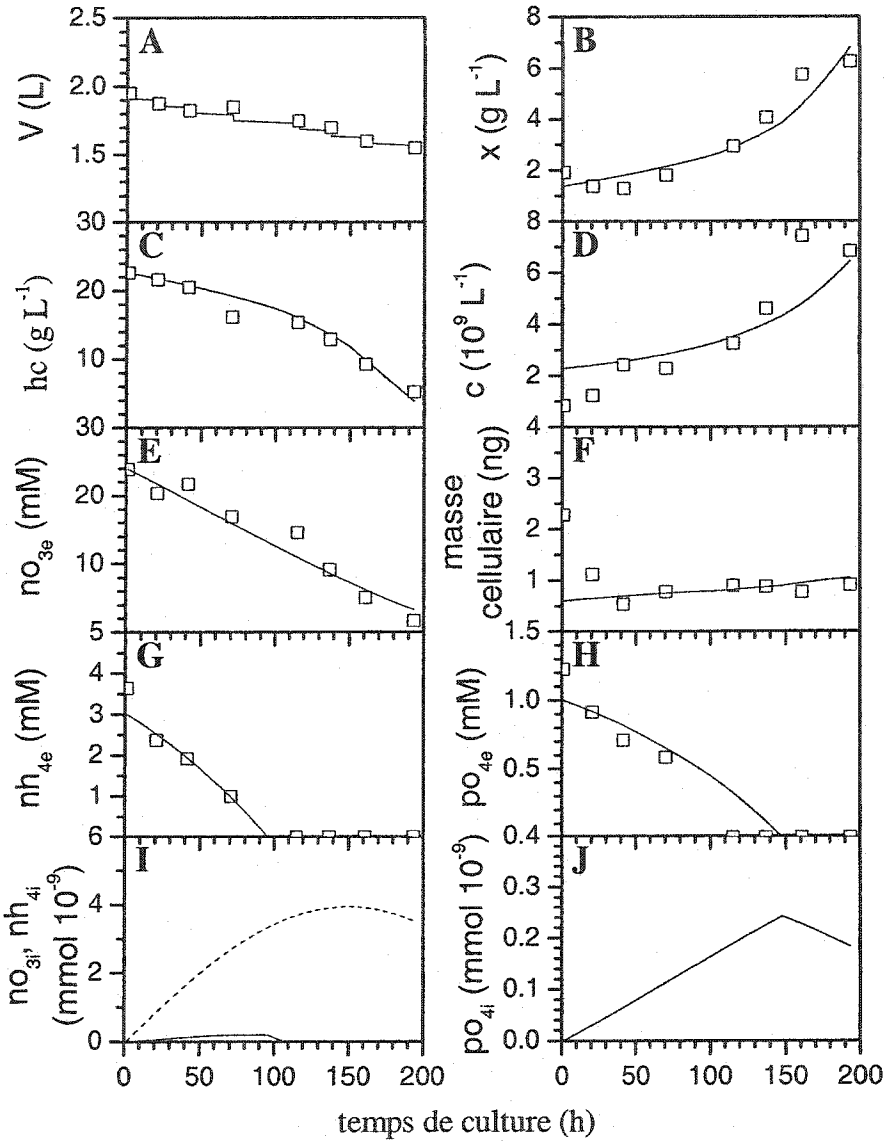


Figure H.7: **Estimations de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture 2SH16 par le modèle de croissance non ségrégué. ☐ mesure expérimentale, — estimation. I. ----- Nitrate intracellulaire, — Ammonium intracellulaire.**

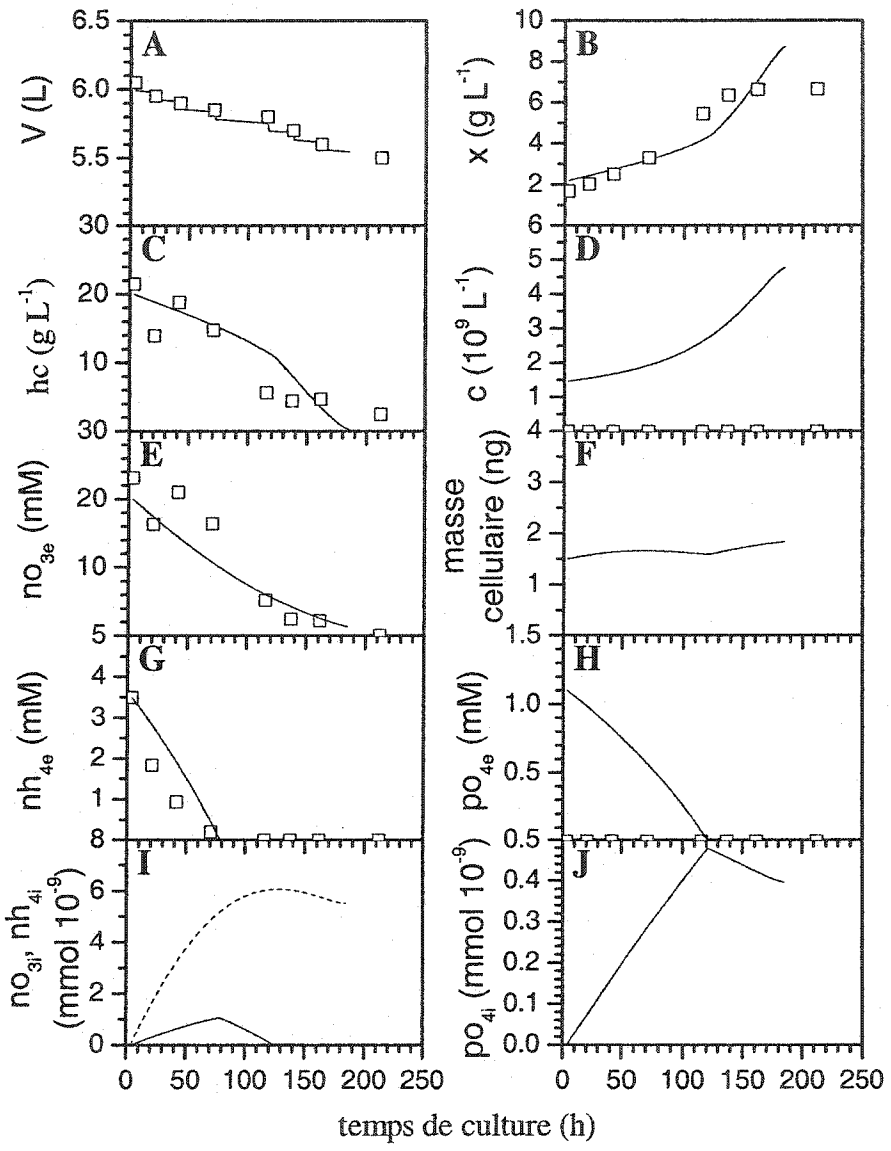


Figure H.8: **Estimations de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture 5SH17 par le modèle de croissance non ségrégué. mesure expérimentale, — estimation. I. ----- Nitrate intracellulaire, — Ammonium intracellulaire.**

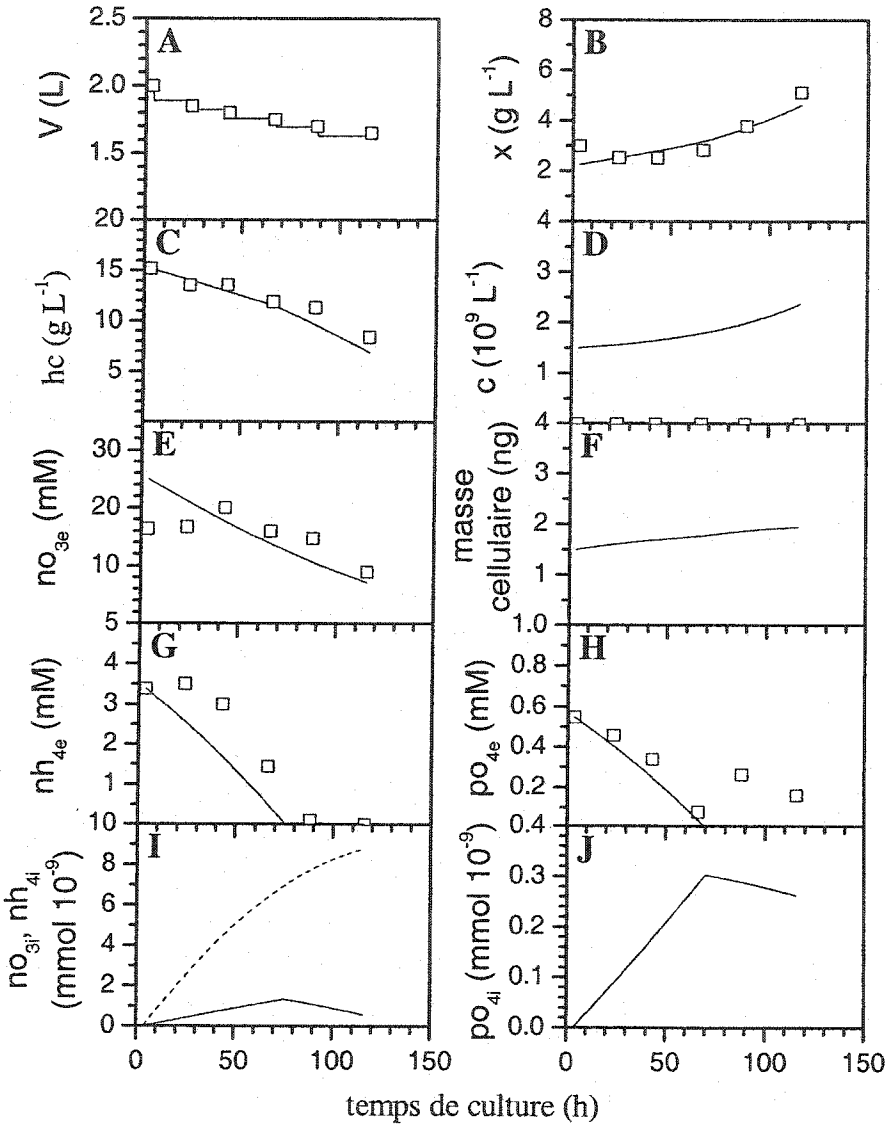


Figure H.9: **Estimations de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture 2SH20 par le modèle de croissance non ségrégué. □ mesure expérimentale, — estimation. I. ----- Nitrate intracellulaire, — Ammonium intracellulaire.**

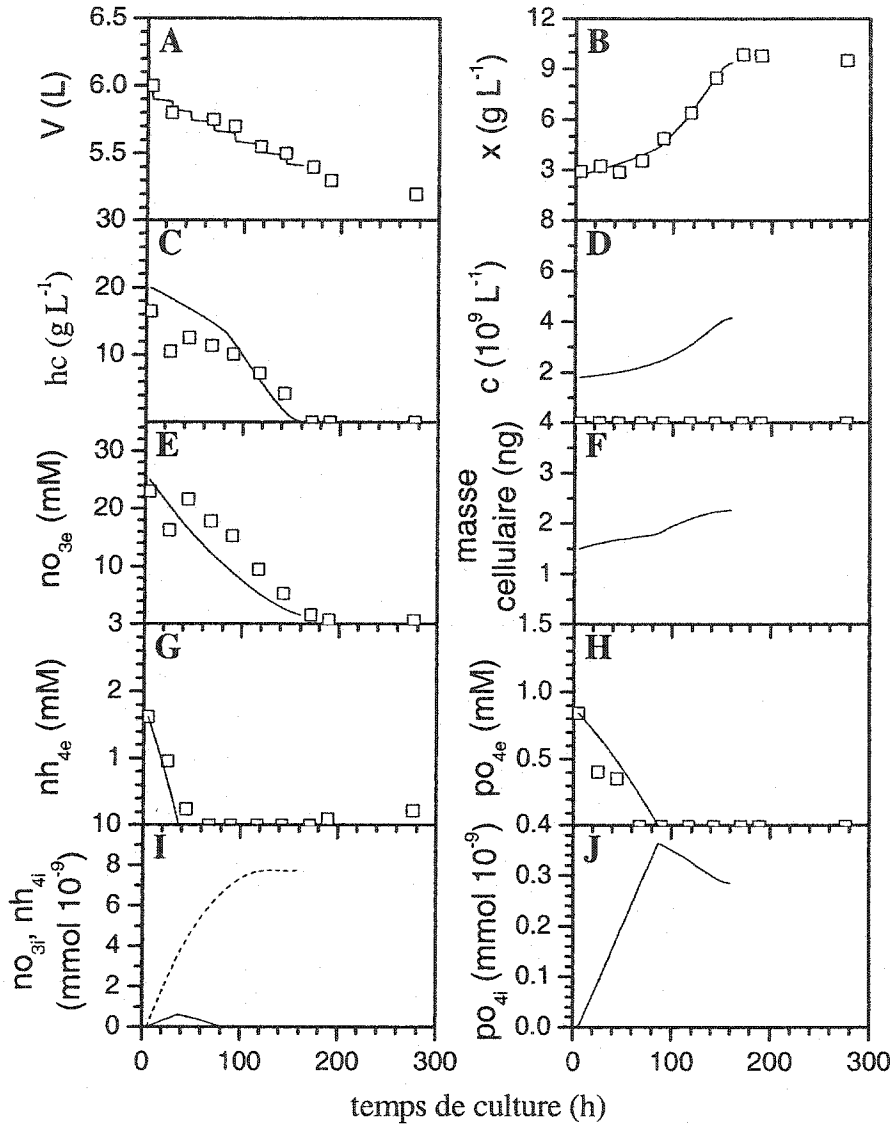


Figure H.10: **Estimations de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture 5SH21 par le modèle de croissance non ségrégué. ☐ mesure expérimentale, — estimation. I. ----- Nitrate intracellulaire, — Ammonium intracellulaire.**

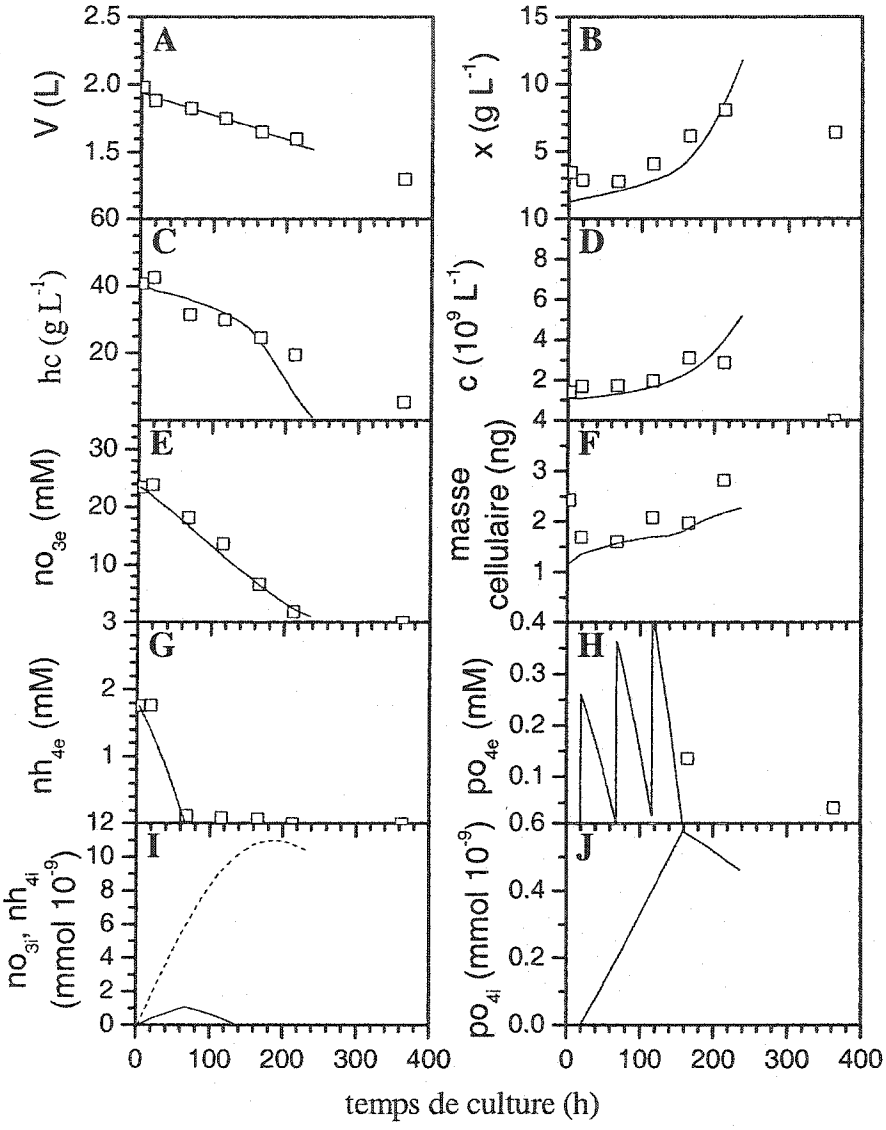


Figure H.11: **Estimations de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture 2SH22 par le modèle de croissance non ségrégué. □ mesure expérimentale, — estimation. I. ----- Nitrate intracellulaire, — Ammonium intracellulaire.**

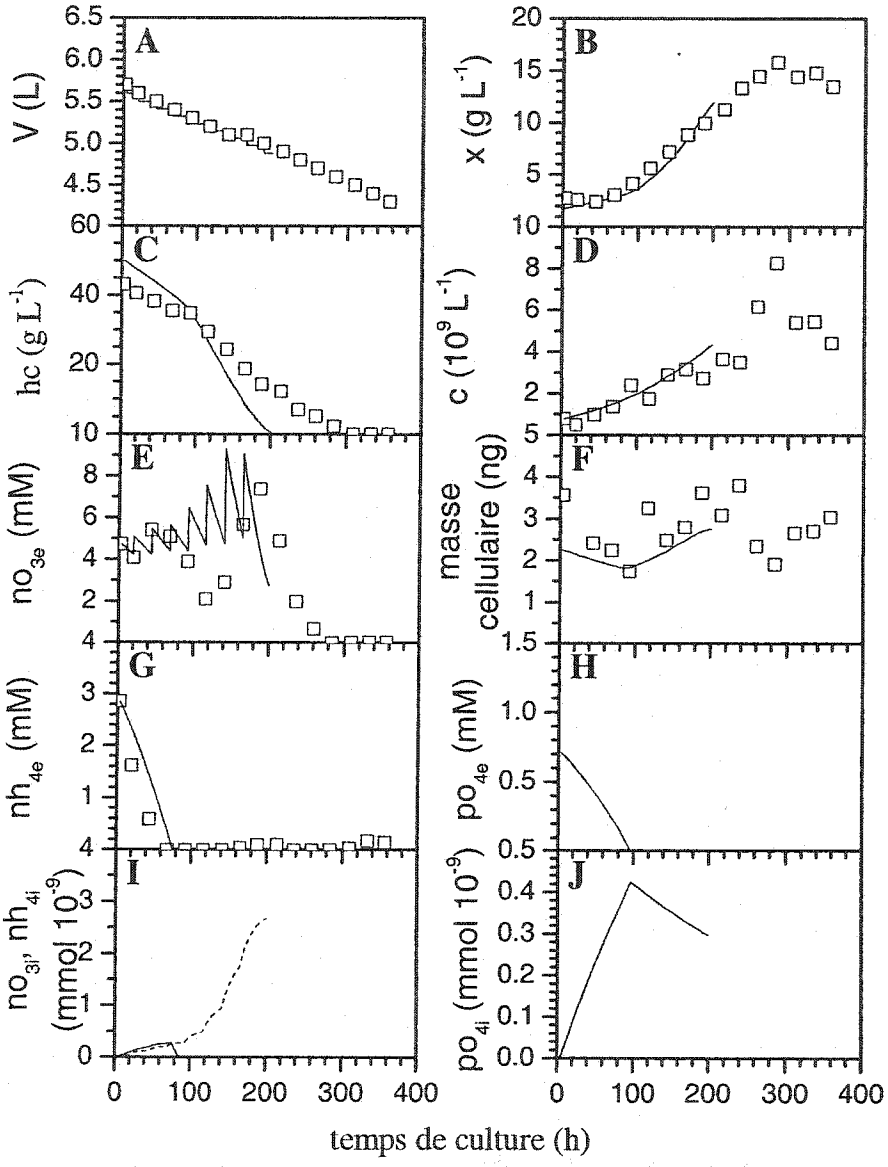


Figure H.12: **Estimations de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture 5SH23 par le modèle de croissance non ségrégué. ☐ mesure expérimentale, — estimation. I. ----- Nitrate intracellulaire, — Ammonium intracellulaire.**

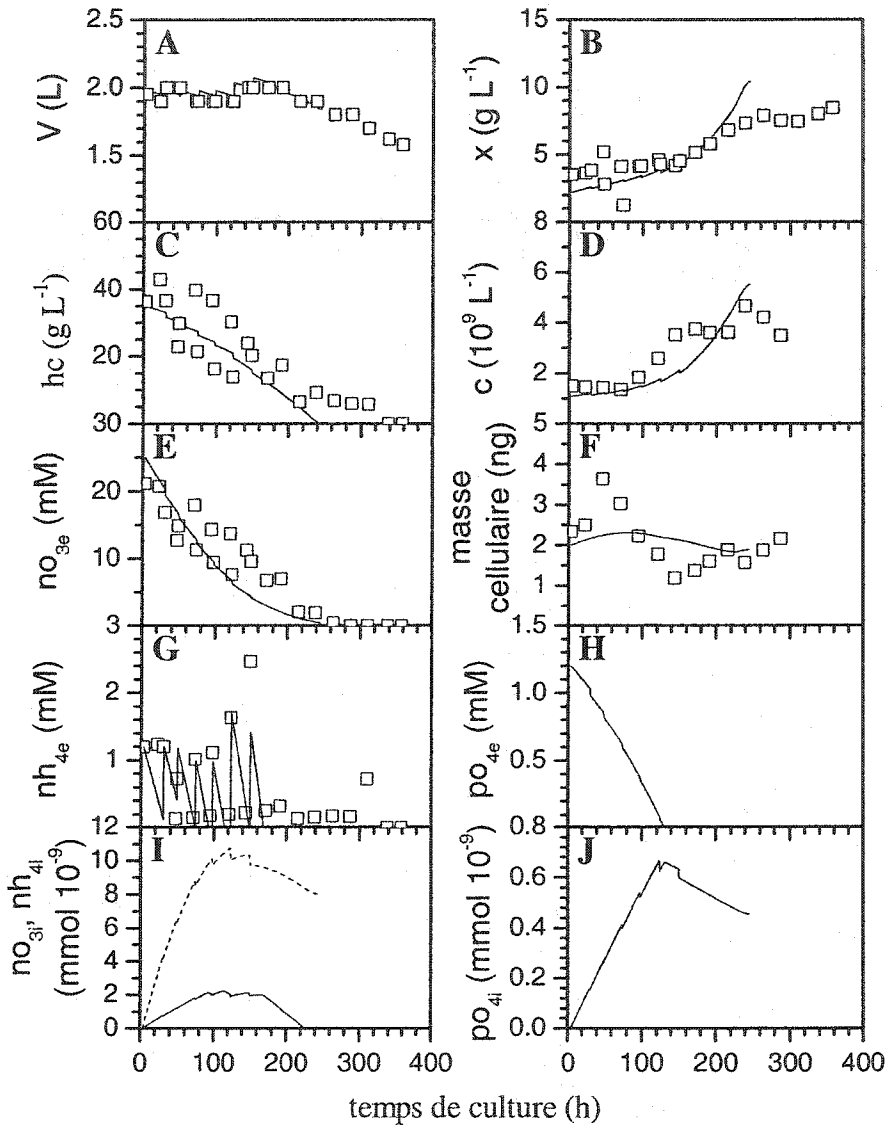


Figure H.13: **Estimations de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture 2SH24 par le modèle de croissance non ségrégué. ☐ mesure expérimentale, — estimation. I. ----- Nitrate intracellulaire, — Ammonium intracellulaire.**

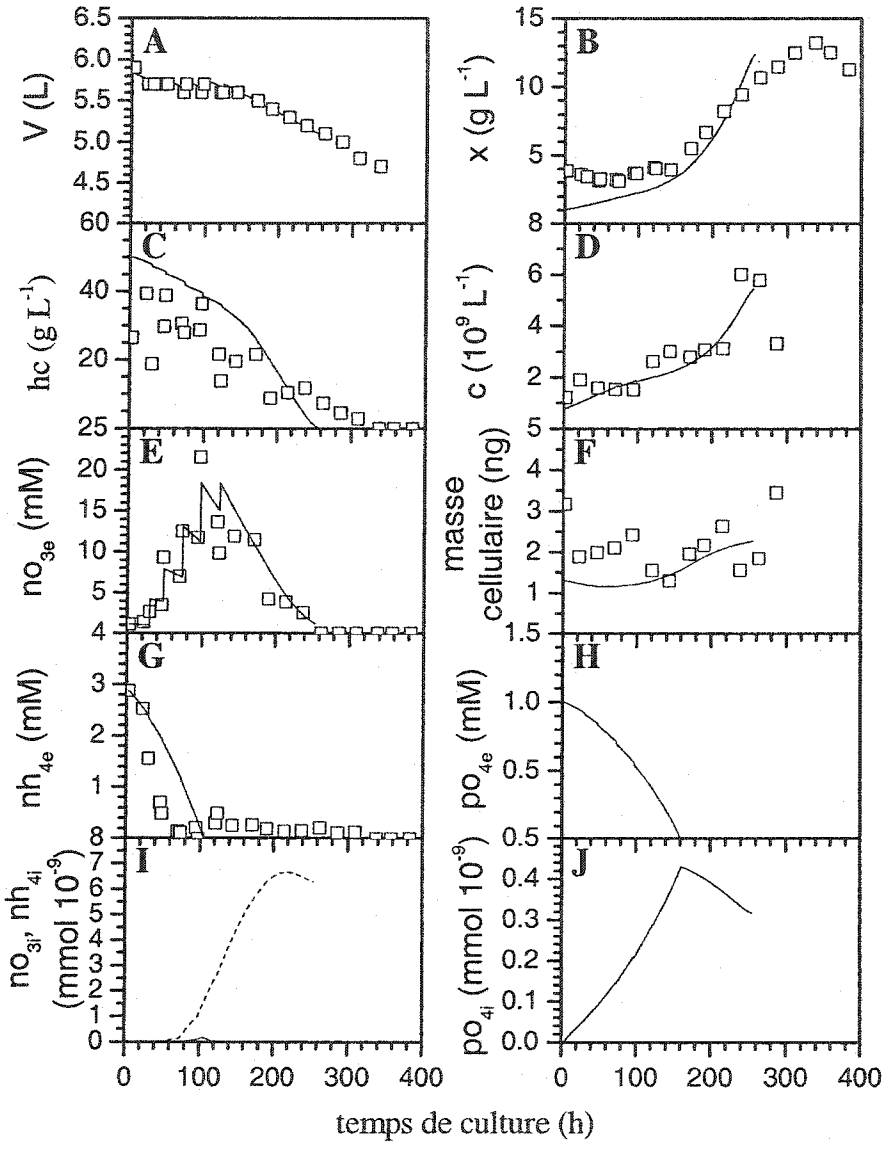


Figure H.14: **Estimations de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture 5SH25 par le modèle de croissance non ségrégué. ☐ mesure expérimentale, — estimation. I. ----- Nitrate intracellulaire, — Ammonium intracellulaire.**

Annexe I

Estimations de la croissance de cultures de cellules végétales post-développement à l'aide du modèle non ségrégué

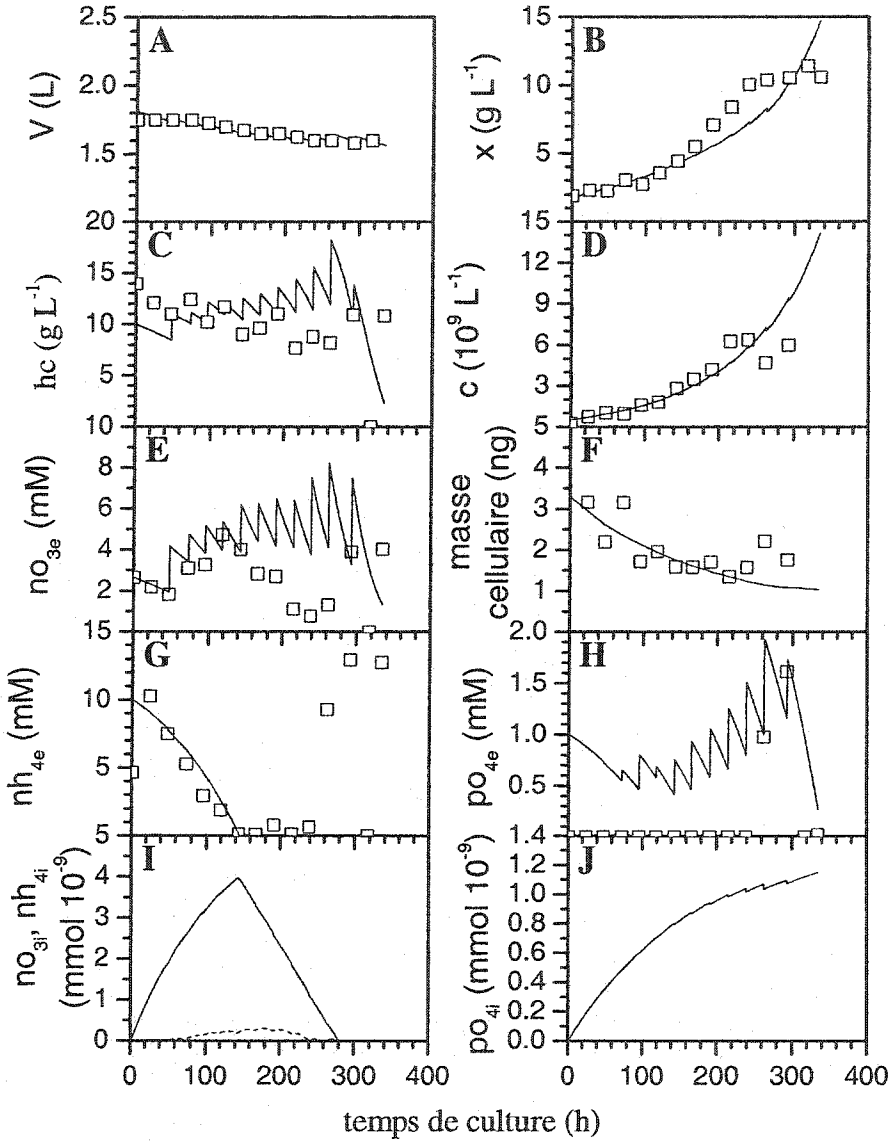


Figure I.1: **Estimations de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture 2SH35 par le modèle de croissance non ségrégué. ☐ mesure expérimentale, — estimation. I. ----- Nitrate intracellulaire, — Ammonium intracellulaire.**

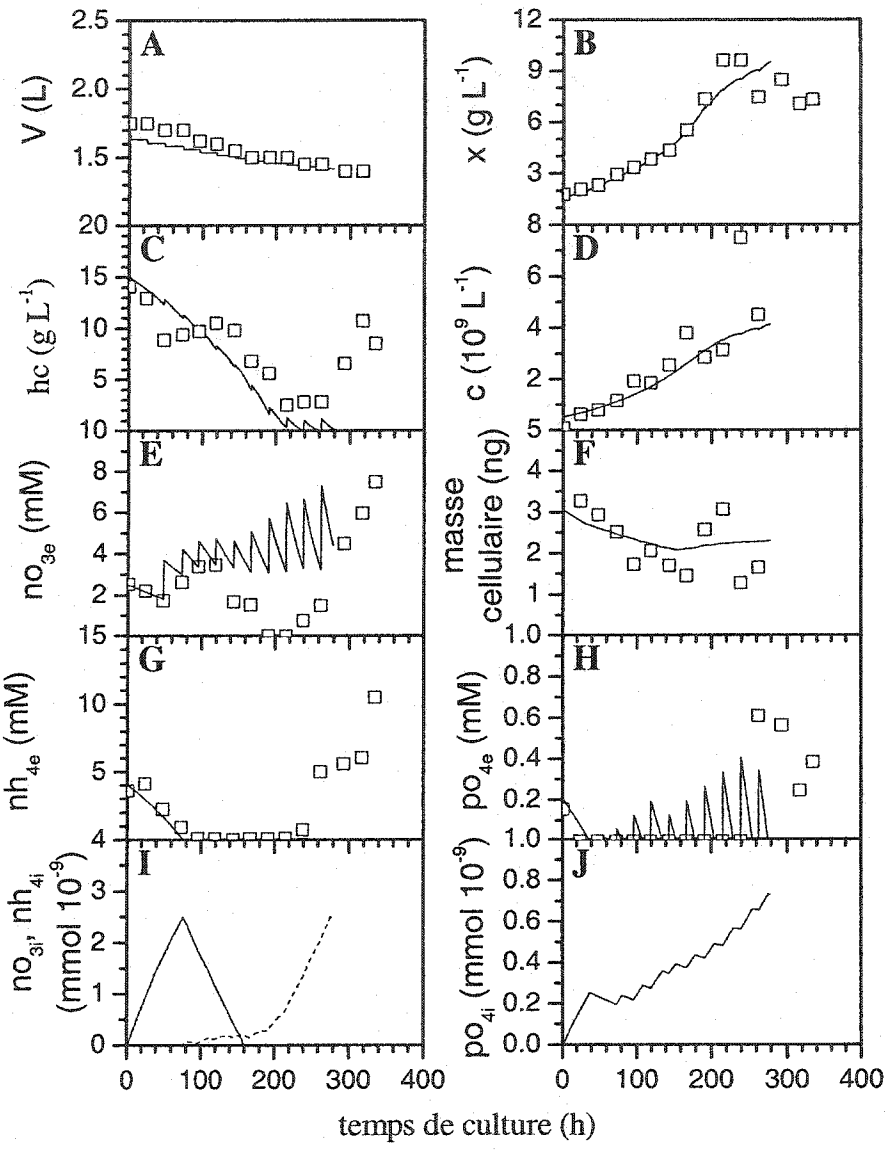


Figure I.2: **Estimations de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture 2SH37 par le modèle de croissance non ségrégué. □ mesure expérimentale, — estimation. I. ----- Nitrate intracellulaire, — Ammonium intracellulaire.**

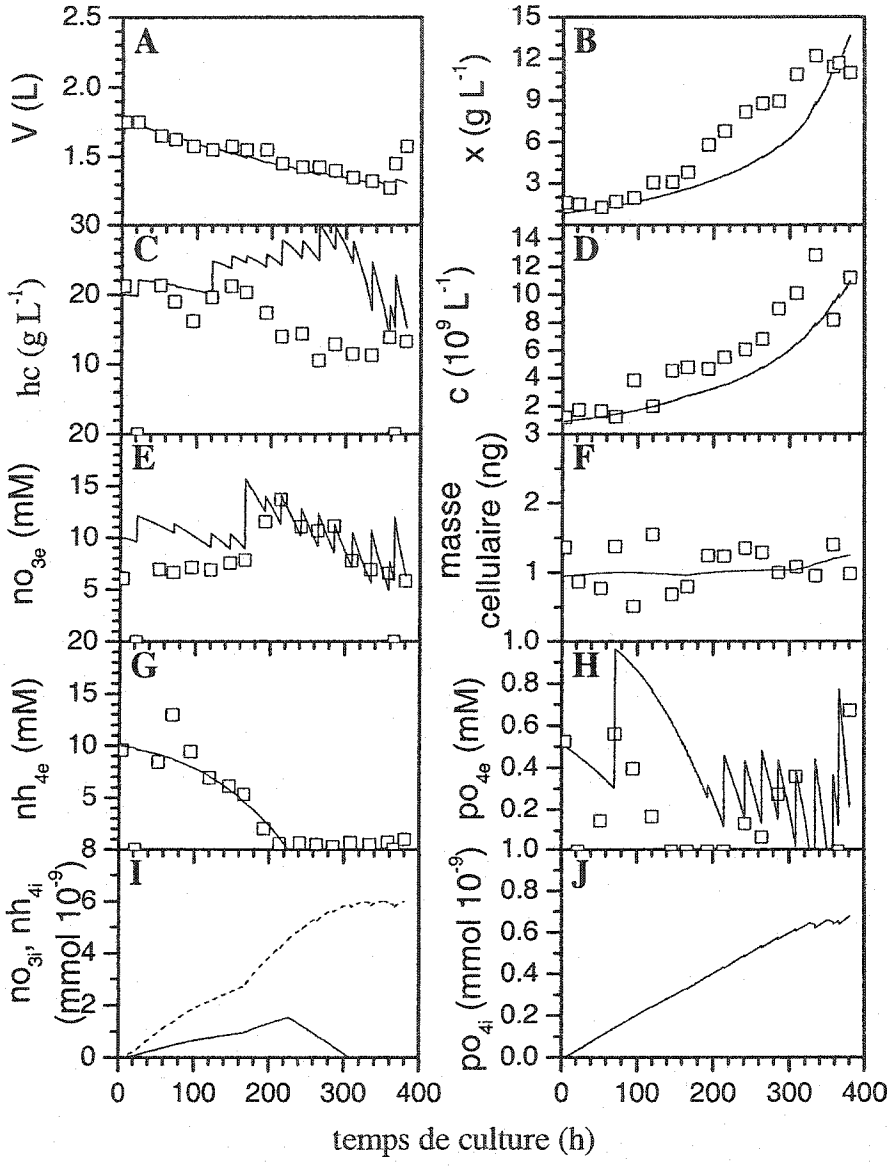


Figure I.3: **Estimations de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture 2SH40 par le modèle de croissance non ségrégué. □ mesure expérimentale, — estimation. I. ----- Nitrate intracellulaire, — Ammonium intracellulaire.**

Annexe J

Estimations de la croissance de cultures de cellules végétales développées lors de la détermination des constantes de cinétique du modèle physiologique massique

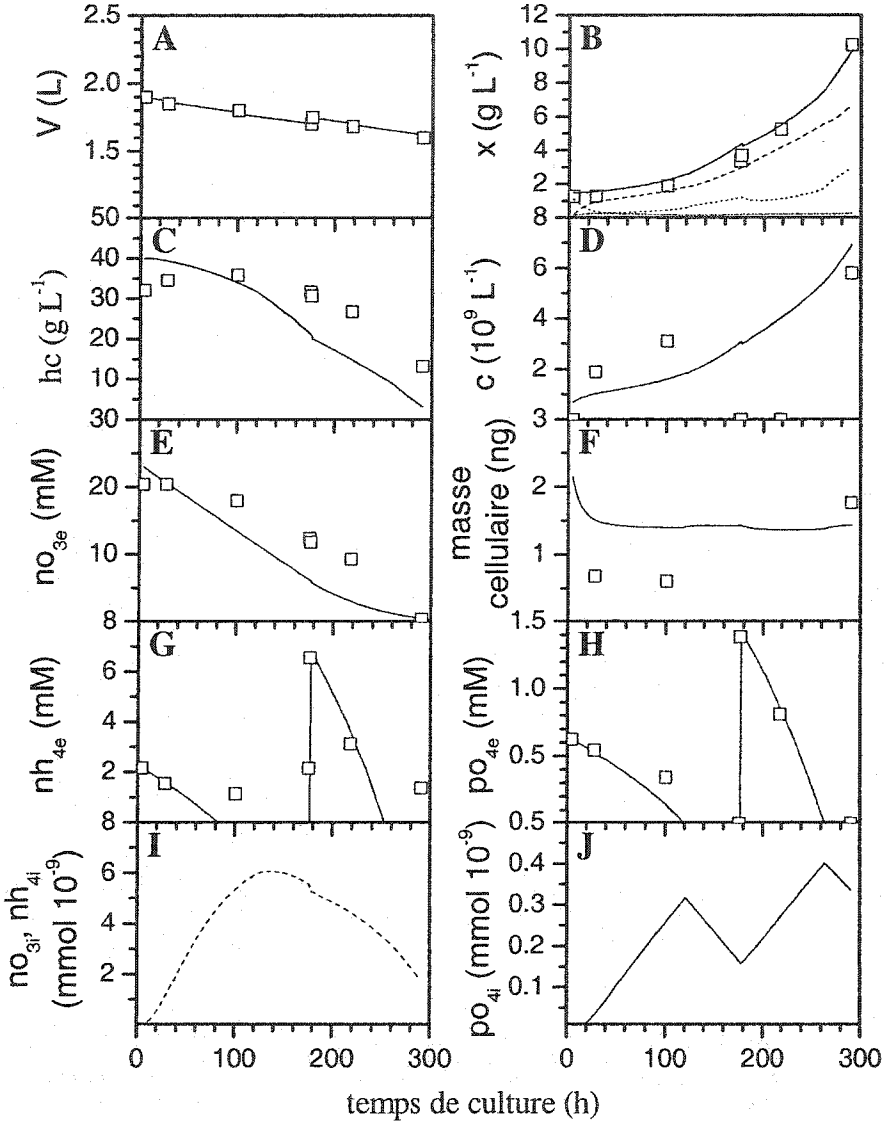


Figure J.1: **Estimations de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture 2SH8 par le modèle de croissance physiologique massique. □ mesure expérimentale, — estimation. B. — Biomasse totale. ----- Biomasse a ····· Biomasse bb. ----- Biomasse cc. I. -----Nitrate intracellulaire, — Ammonium intracellulaire.**

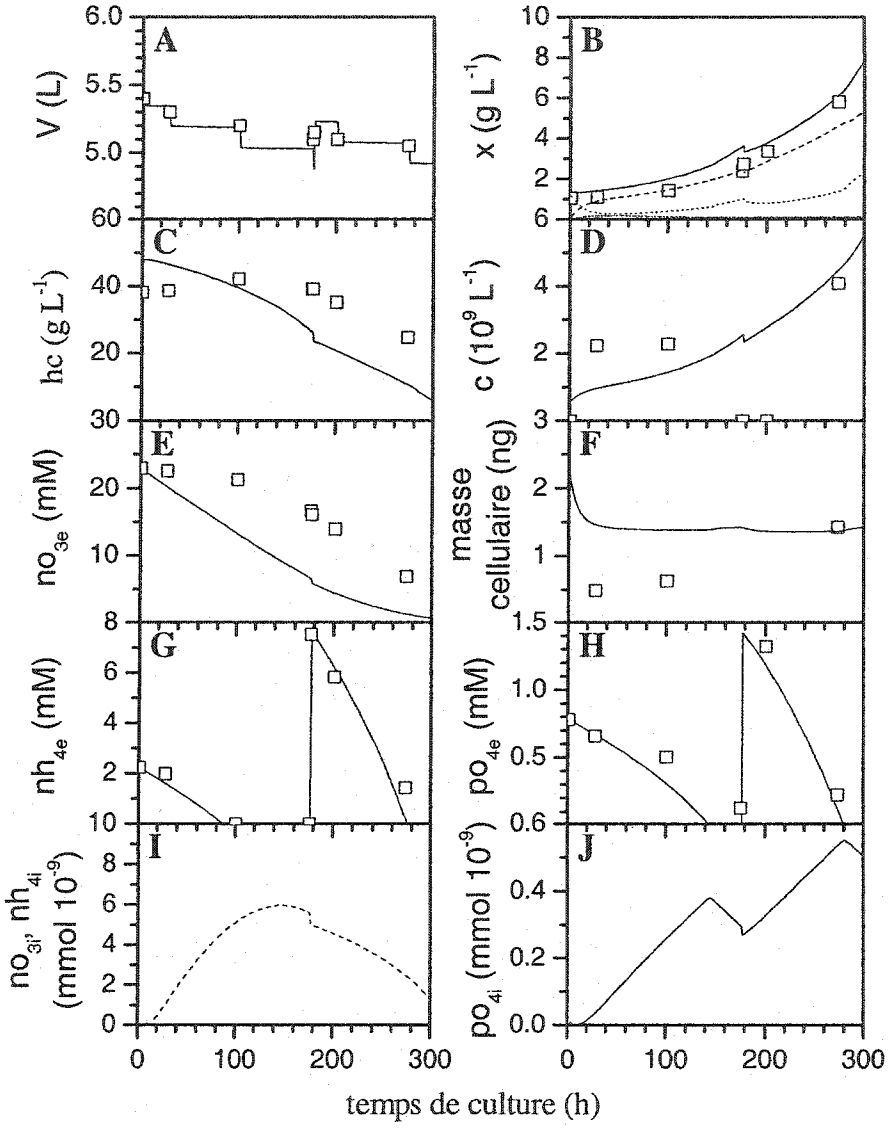


Figure J.2: **Estimations de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture 5SH9 par le modèle de croissance physiologique massique.** □ **mesure expérimentale, — estimation. B. — Biomasse totale. ----- Biomasse a ····· Biomasse bb. ----- Biomasse cc. I. -----Nitrate intracellulaire, — Ammonium intracellulaire.**

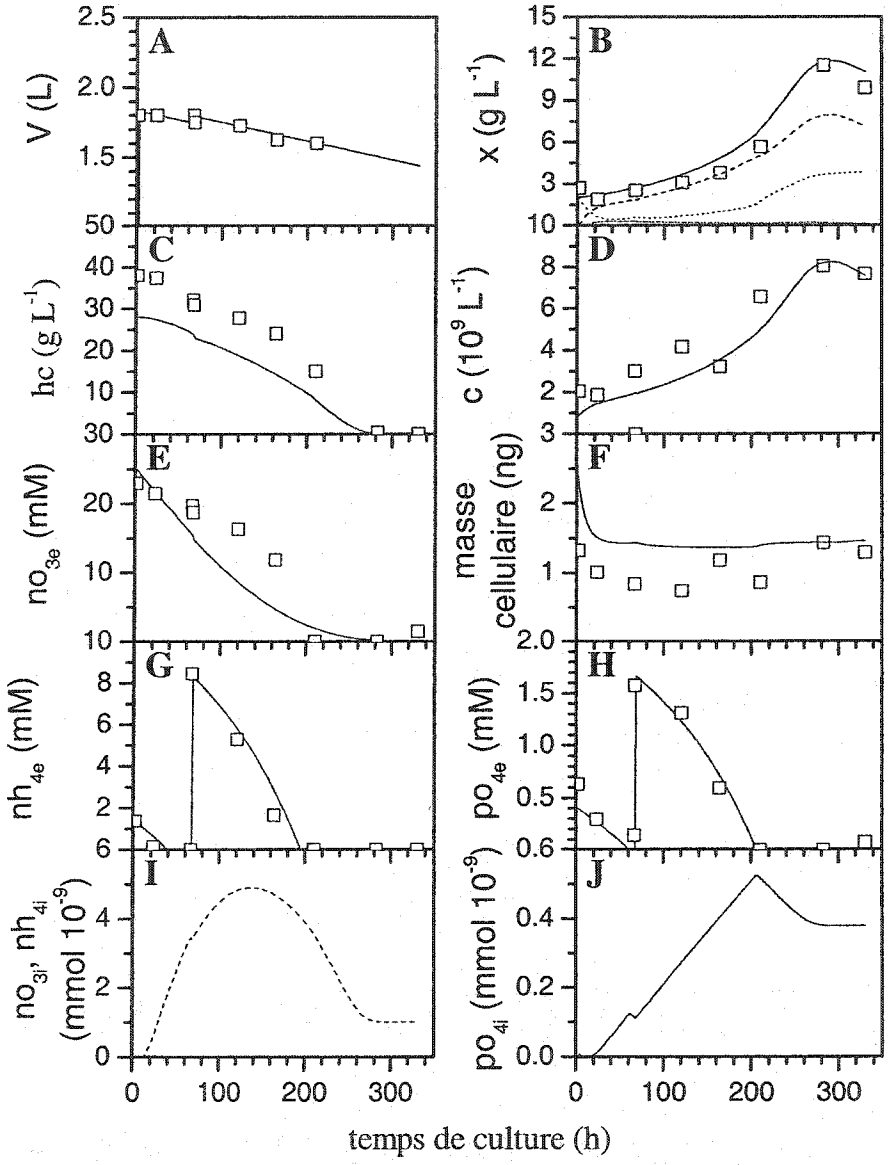


Figure J.3: **Estimations de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture 2SH10 par le modèle de croissance physiologique massique. □ mesure expérimentale, — estimation. B. — Biomasse totale. ----- Biomasse a ····· Biomasse bb. ----- Biomasse cc. I. -----Nitrate intracellulaire, — Ammonium intracellulaire.**

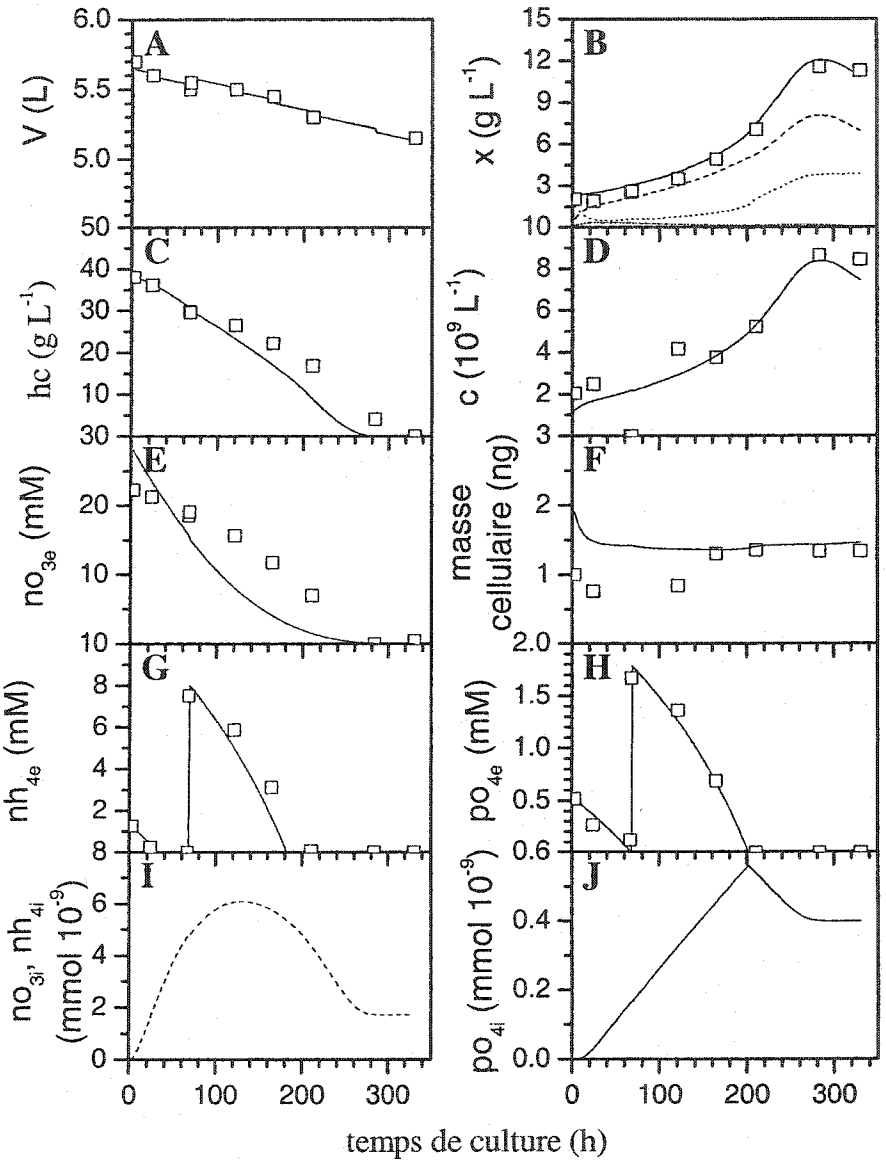


Figure J.4: **Estimations de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture 5SH11 par le modèle de croissance physiologique massique.** □ **mesure expérimentale, — estimation. B. — Biomasse totale. ----- Biomasse a ····· Biomasse bb. ----- Biomasse cc. I. -----Nitrate intracellulaire, — Ammonium intracellulaire.**

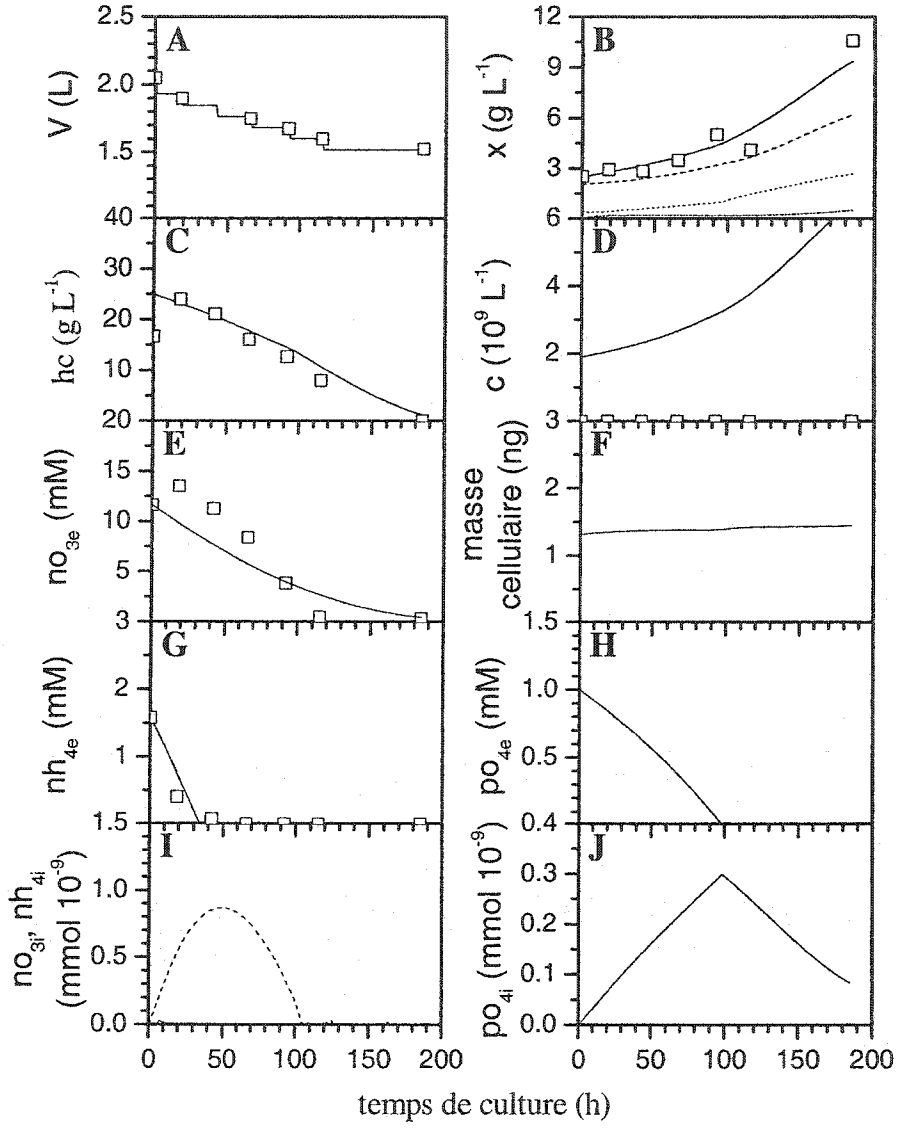


Figure J.5: **Estimations de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture 2SH12 par le modèle de croissance physiologique massique. □ mesure expérimentale, — estimation. B. — Biomasse totale. ----- Biomasse a ····· Biomasse bb. ----- Biomasse cc. I. -----Nitrate intracellulaire, — Ammonium intracellulaire.**

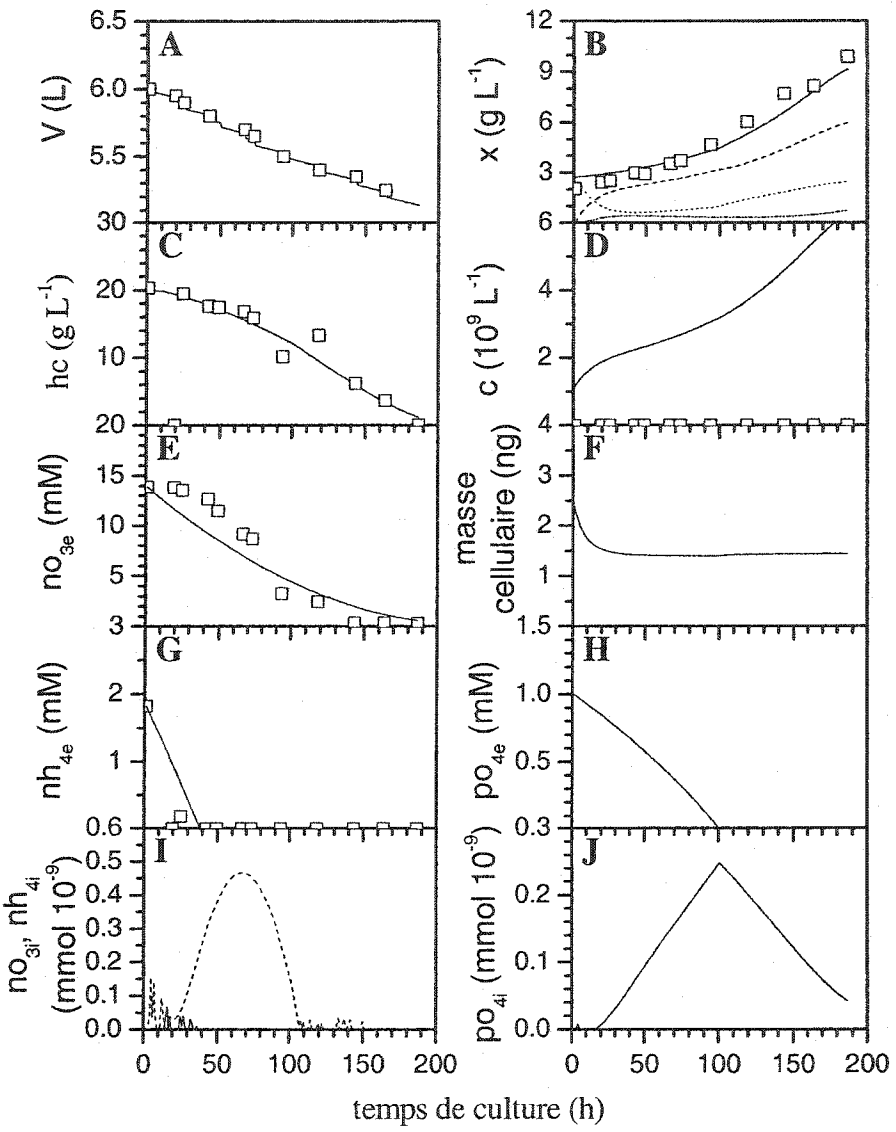


Figure J.6: **Estimations de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture 5SH13 par le modèle de croissance physiologique massique.** □ **mesure expérimentale, — estimation. B. — Biomasse totale. ----- Biomasse a ····· Biomasse bb. ----- Biomasse cc. I. -----Nitrate intracellulaire, — Ammonium intracellulaire.**

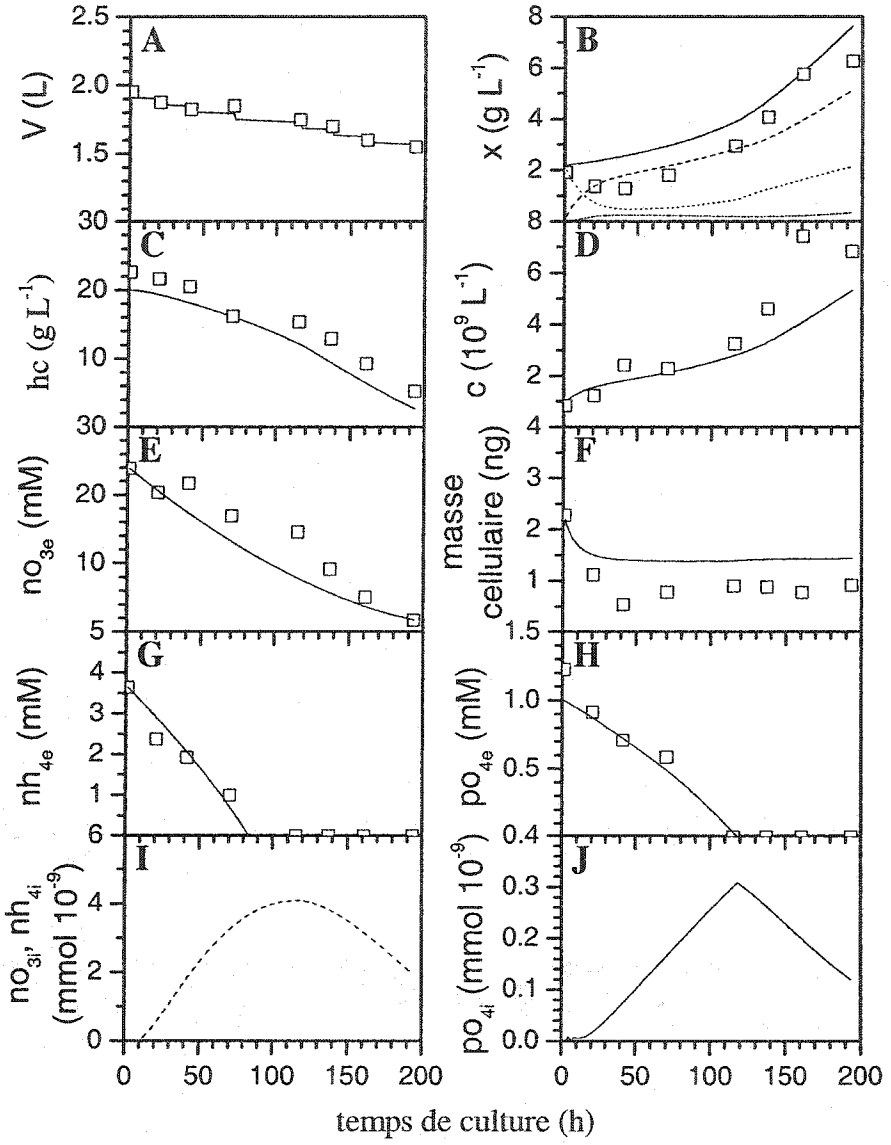


Figure J.7: **Estimations de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture 2SH16 par le modèle de croissance physiologique massique.**

□ mesure expérimentale, — estimation. B. — Biomasse totale. ----- Biomasse a ····· Biomasse bb. ----- Biomasse cc. I. -----Nitrate intracellulaire, — Ammonium intracellulaire.

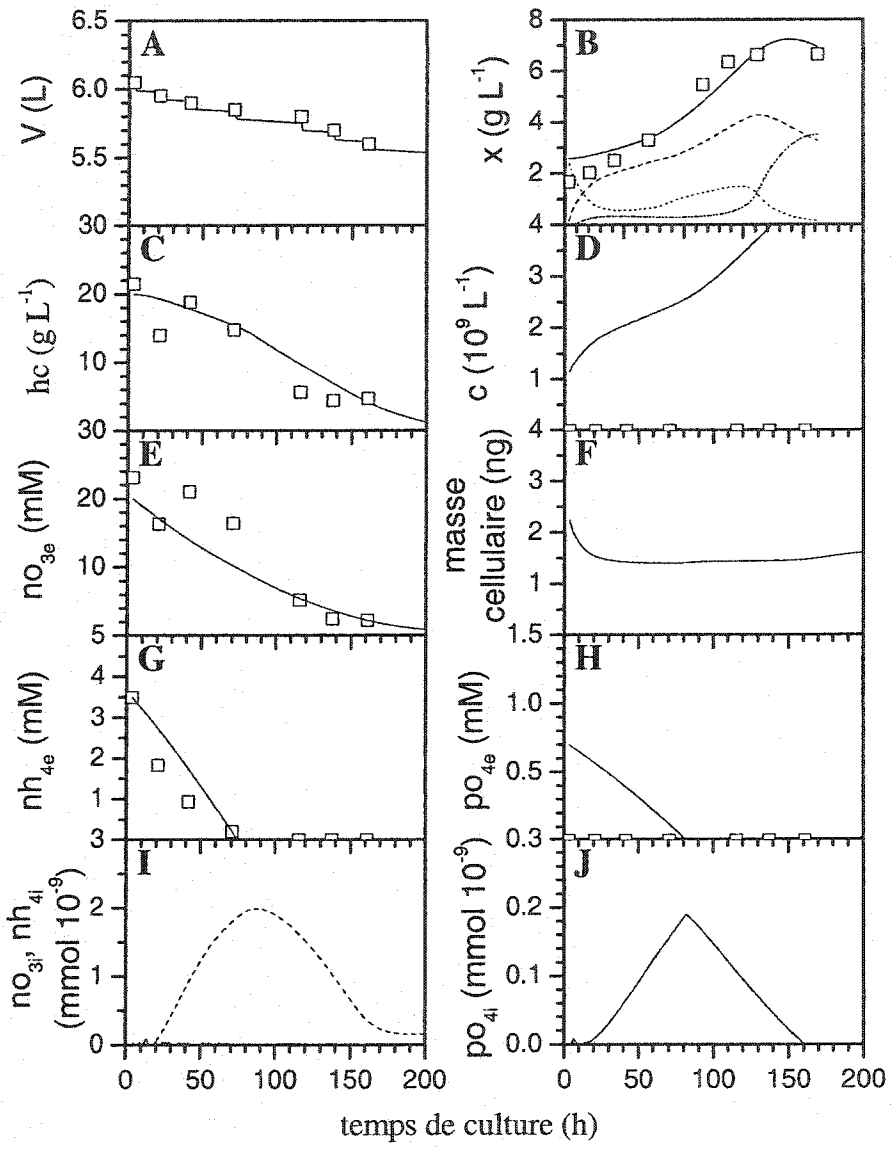


Figure J.8: **Estimations de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture 5SH17 par le modèle de croissance physiologique massique. □ mesure expérimentale, — estimation. B. — Biomasse totale. ----- Biomasse a ····· Biomasse bb. ----- Biomasse cc. I. -----Nitrate intracellulaire, — Ammonium intracellulaire.**

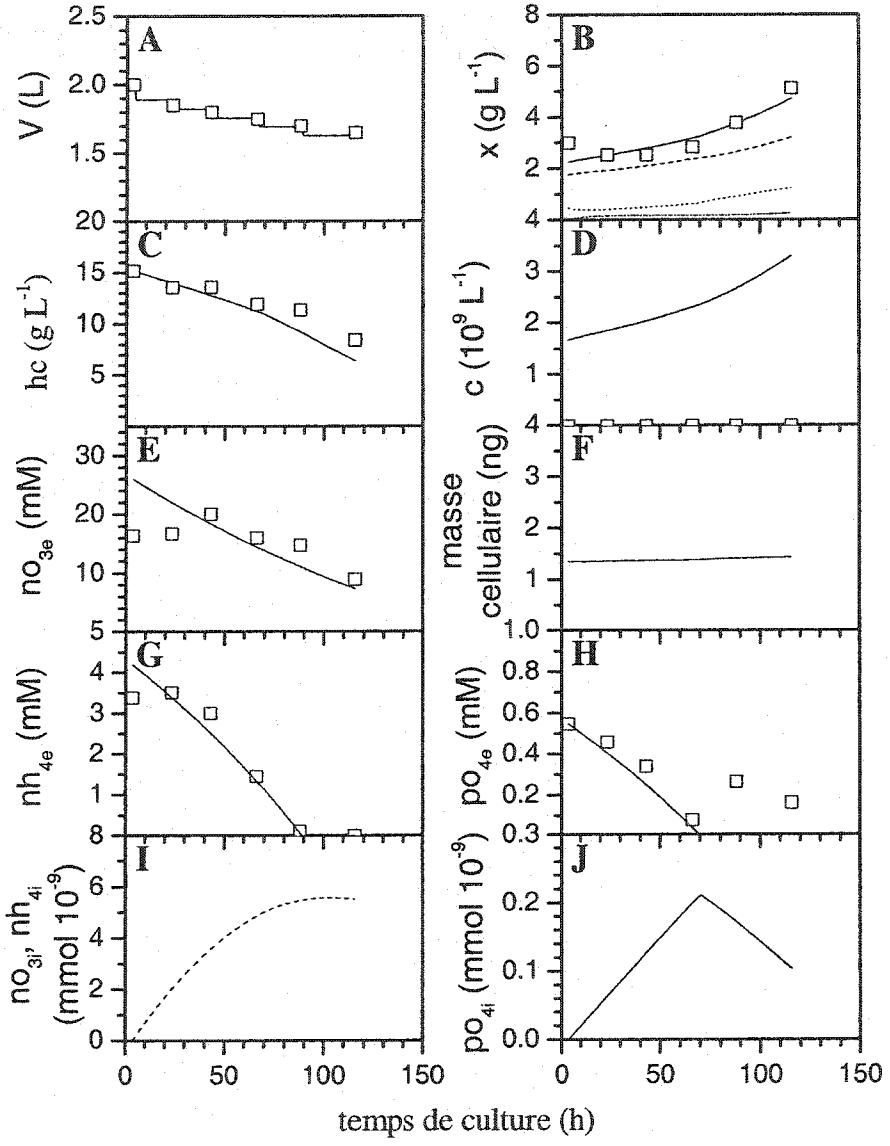


Figure J.9: **Estimations de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture 2SH20 par le modèle de croissance physiologique massique. ☐ mesure expérimentale, — estimation. B. — Biomasse totale. ----- Biomasse a ····· Biomasse bb. ----- Biomasse cc. I. -----Nitrate intracellulaire, — Ammonium intracellulaire.**

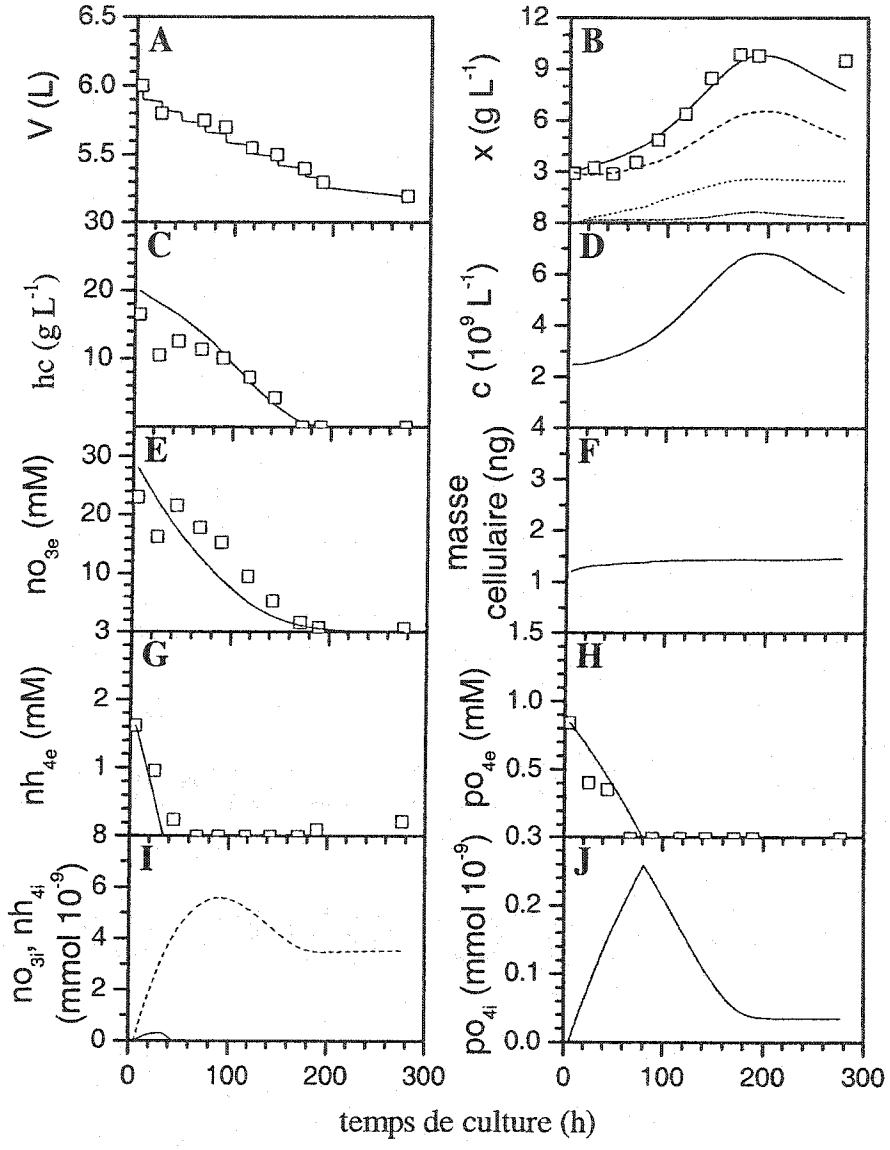


Figure J.10: **Estimations de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture 5SH21 par le modèle de croissance physiologique massique. ☐ mesure expérimentale, — estimation. B. — Biomasse totale. ----- Biomasse a ····· Biomasse bb. ----- Biomasse cc. I. -----Nitrate intracellulaire, — Ammonium intracellulaire.**

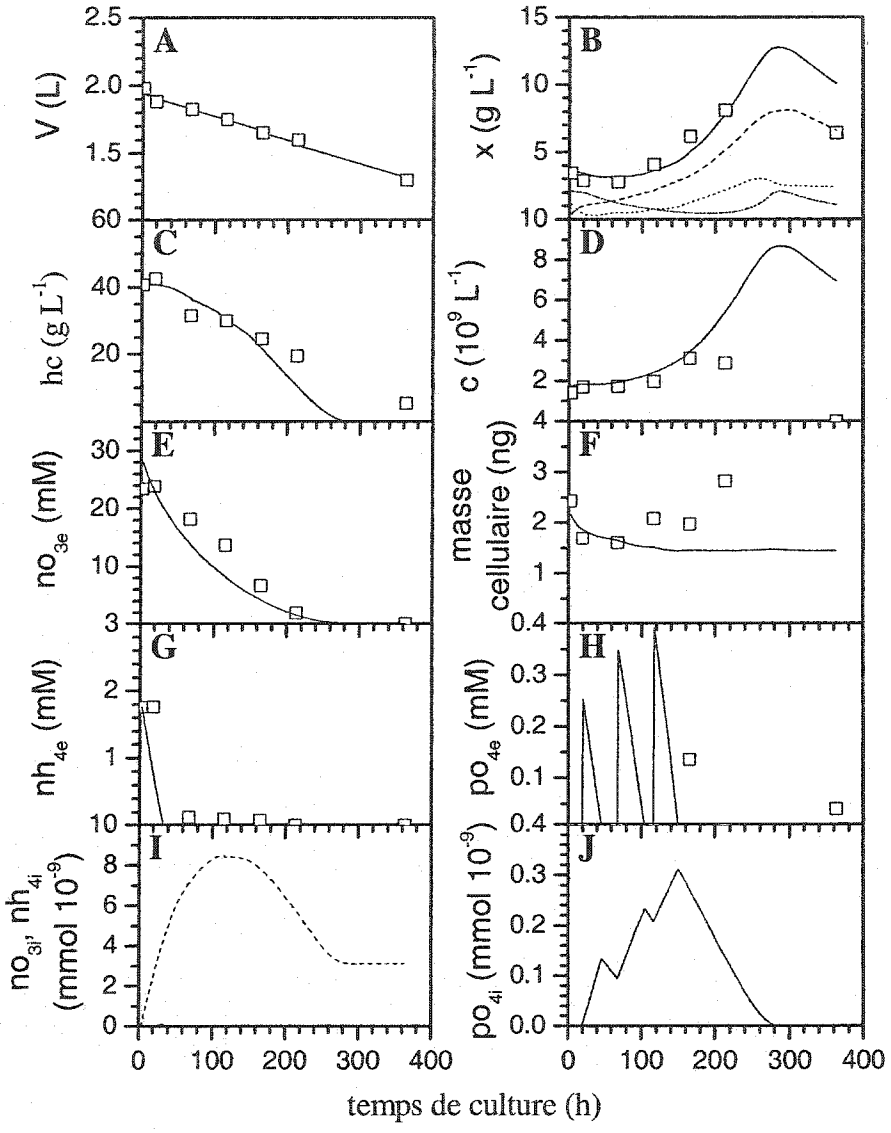


Figure J.11: **Estimations de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture 2SH22 par le modèle de croissance physiologique massique. □ mesure expérimentale, — estimation. B. — Biomasse totale. ----- Biomasse a ····· Biomasse bb. ----- Biomasse cc. I. -----Nitrate intracellulaire, — Ammonium intracellulaire.**

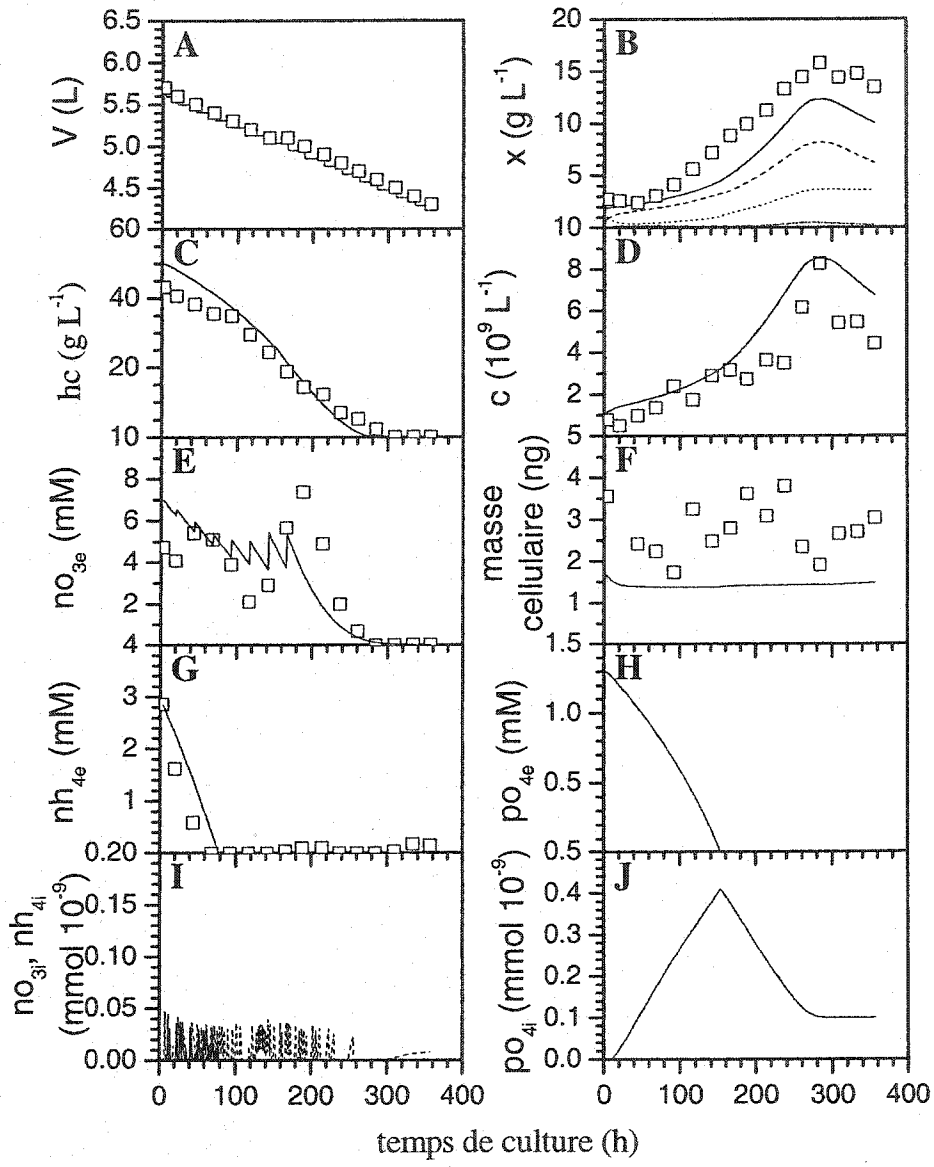


Figure J.12: **Estimations de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture 5SH23 par le modèle de croissance physiologique massique. ☐ mesure expérimentale, — estimation. B. — Biomasse totale. ----- Biomasse a ····· Biomasse bb. ----- Biomasse cc. I. -----Nitrate intracellulaire, — Ammonium intracellulaire.**

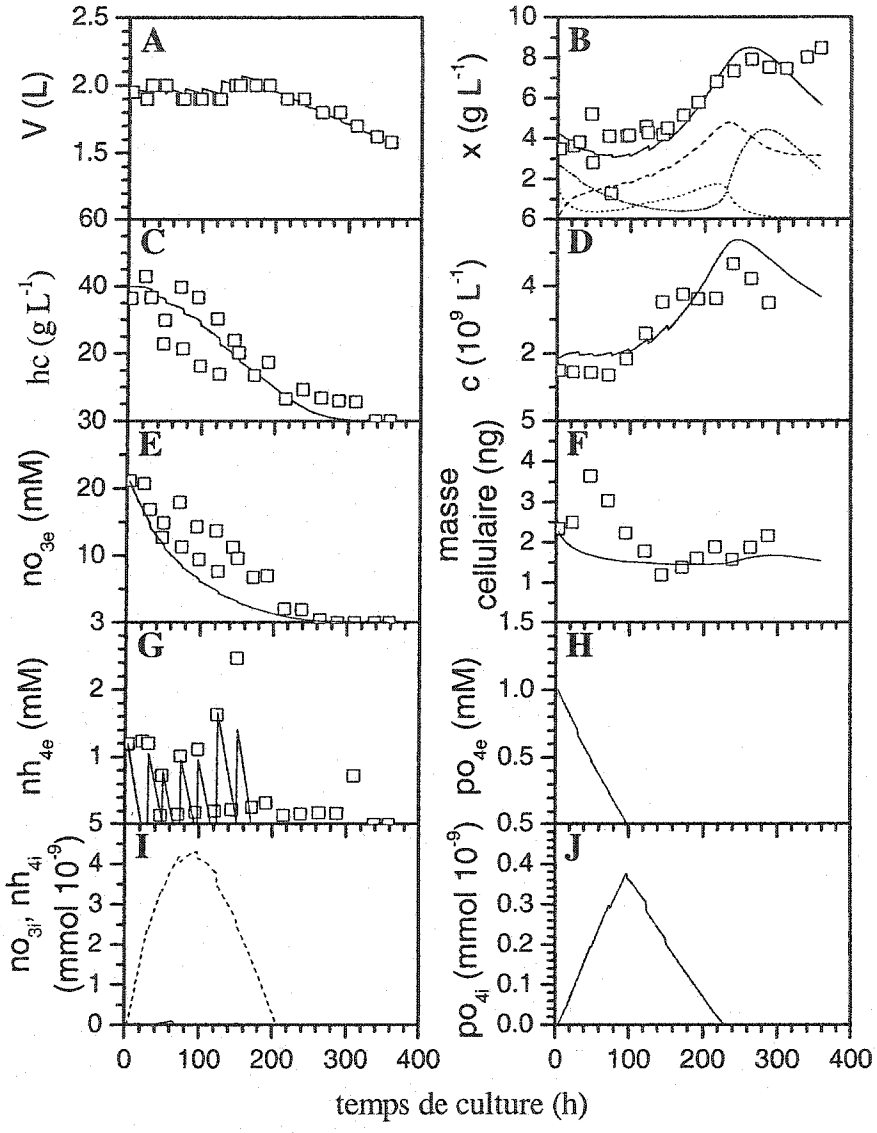


Figure J.13: **Estimations de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture 2SH24 par le modèle de croissance physiologique massique. ☐ mesure expérimentale, — estimation. B. — Biomasse totale. ----- Biomasse a ····· Biomasse bb. ----- Biomasse cc. I. -----Nitrate intracellulaire, — Ammonium intracellulaire.**

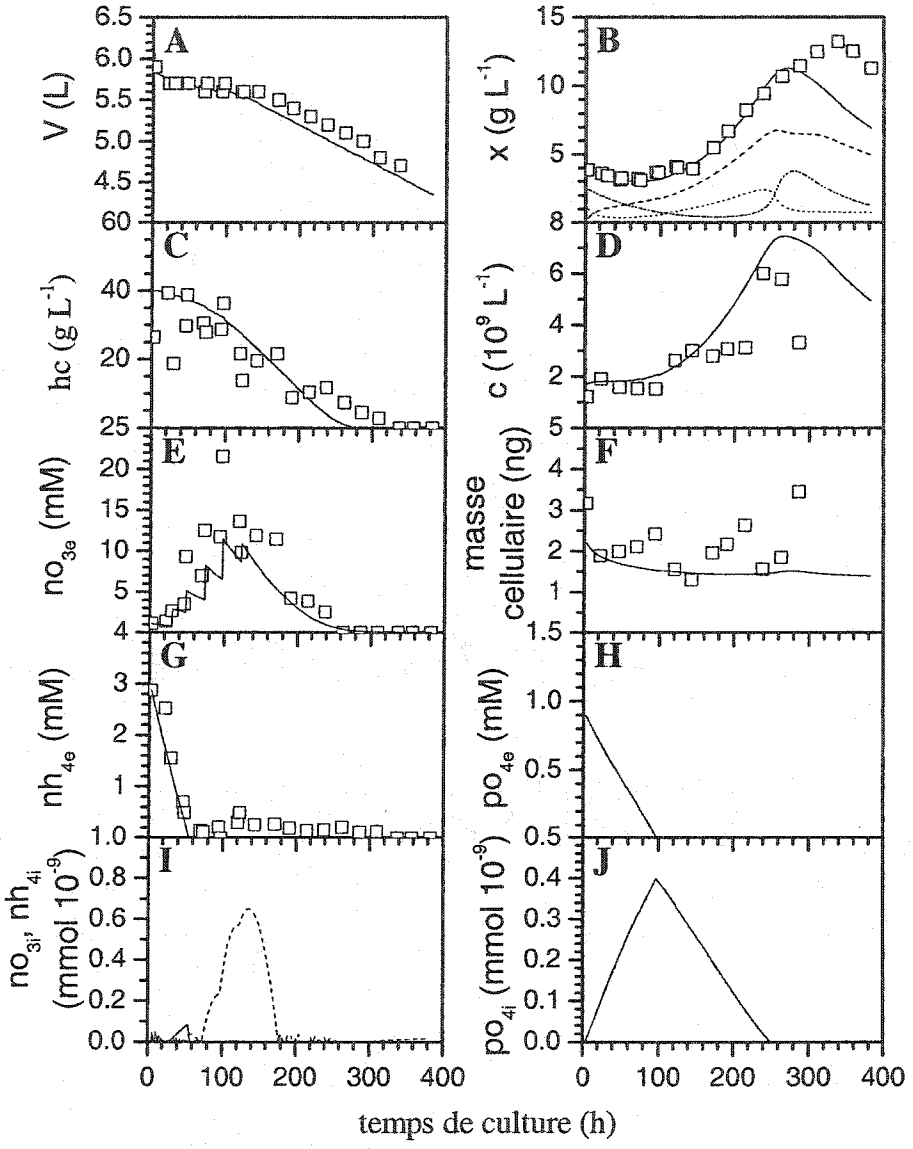


Figure J.14: **Estimations de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture 5SH25 par le modèle de croissance physiologique massique. □ mesure expérimentale, — estimation. B. — Biomasse totale. ----- Biomasse a ····· Biomasse bb. ----- Biomasse cc. I. -----Nitrate intracellulaire, — Ammonium intracellulaire.**

Annexe K

Estimations de la croissance de cultures de cellules végétales post-développement à l'aide du modèle physiologique massique

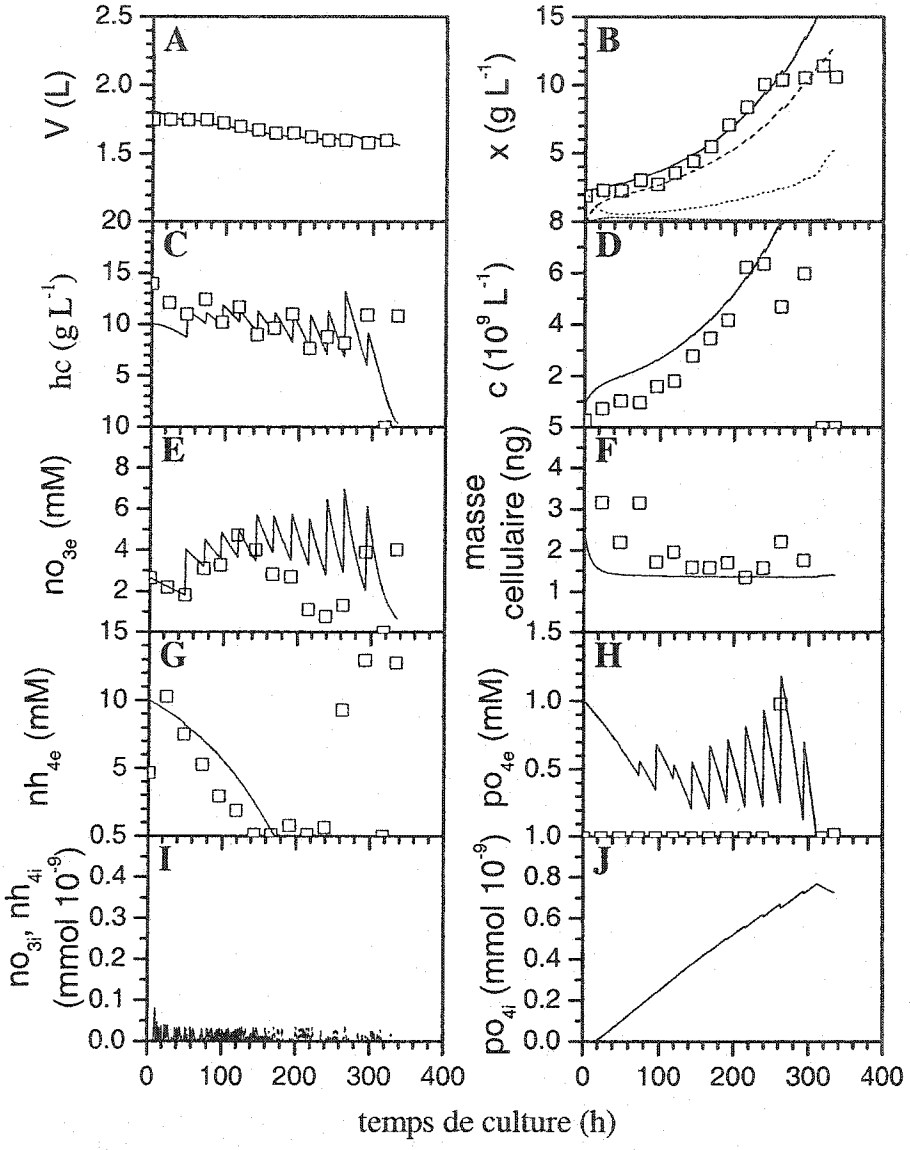


Figure K.1: **Estimations de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture 2SH35 par le modèle de croissance physiologique massique. □ mesure expérimentale, — estimation. B. — Biomasse totale. ----- Biomasse a ····· Biomasse bb. ---- Biomasse cc. I. -----Nitrate intracellulaire, — Ammonium intracellulaire.**

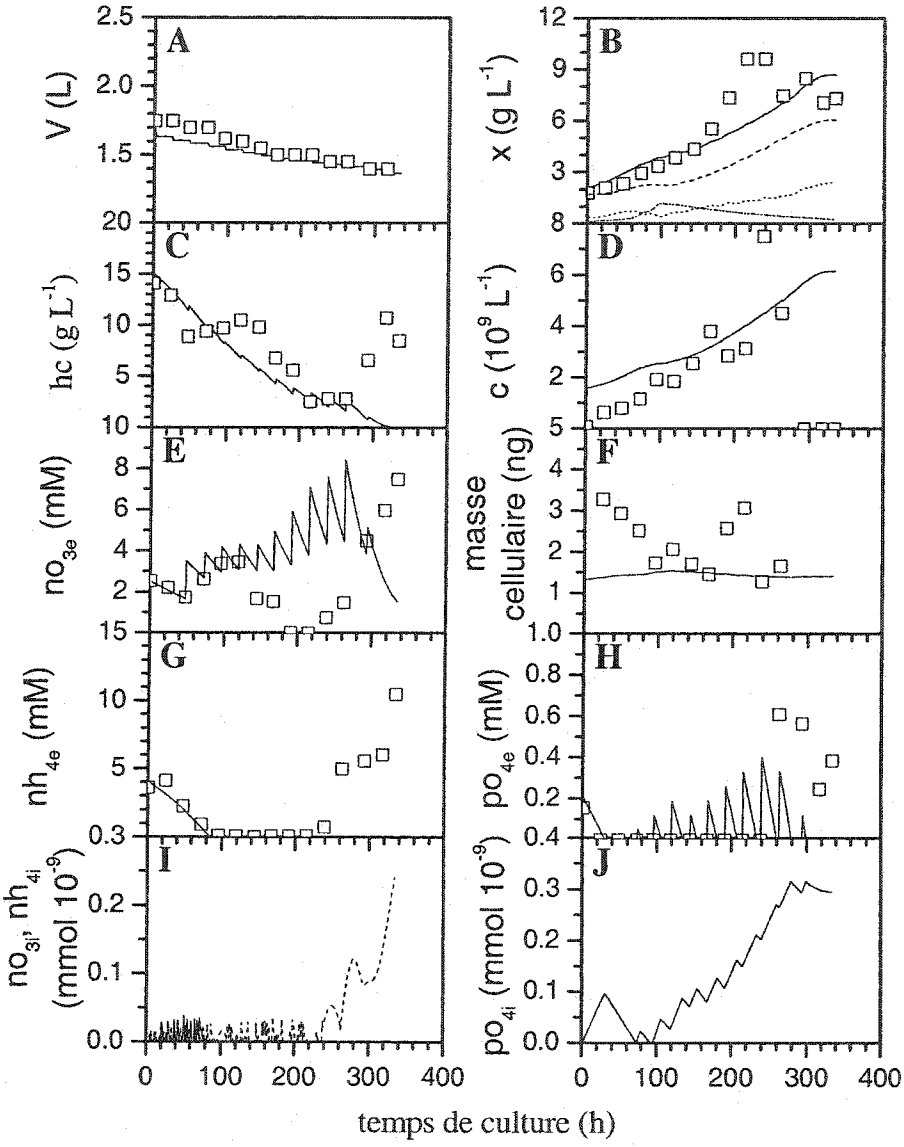


Figure K.2: **Estimations de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture 2SH37 par le modèle de croissance physiologique massique.**

□ mesure expérimentale, — estimation. B. — Biomasse totale. ----- Biomasse a ····· Biomasse bb. ----- Biomasse cc. I. -----Nitrate intracellulaire, — Ammonium intracellulaire.

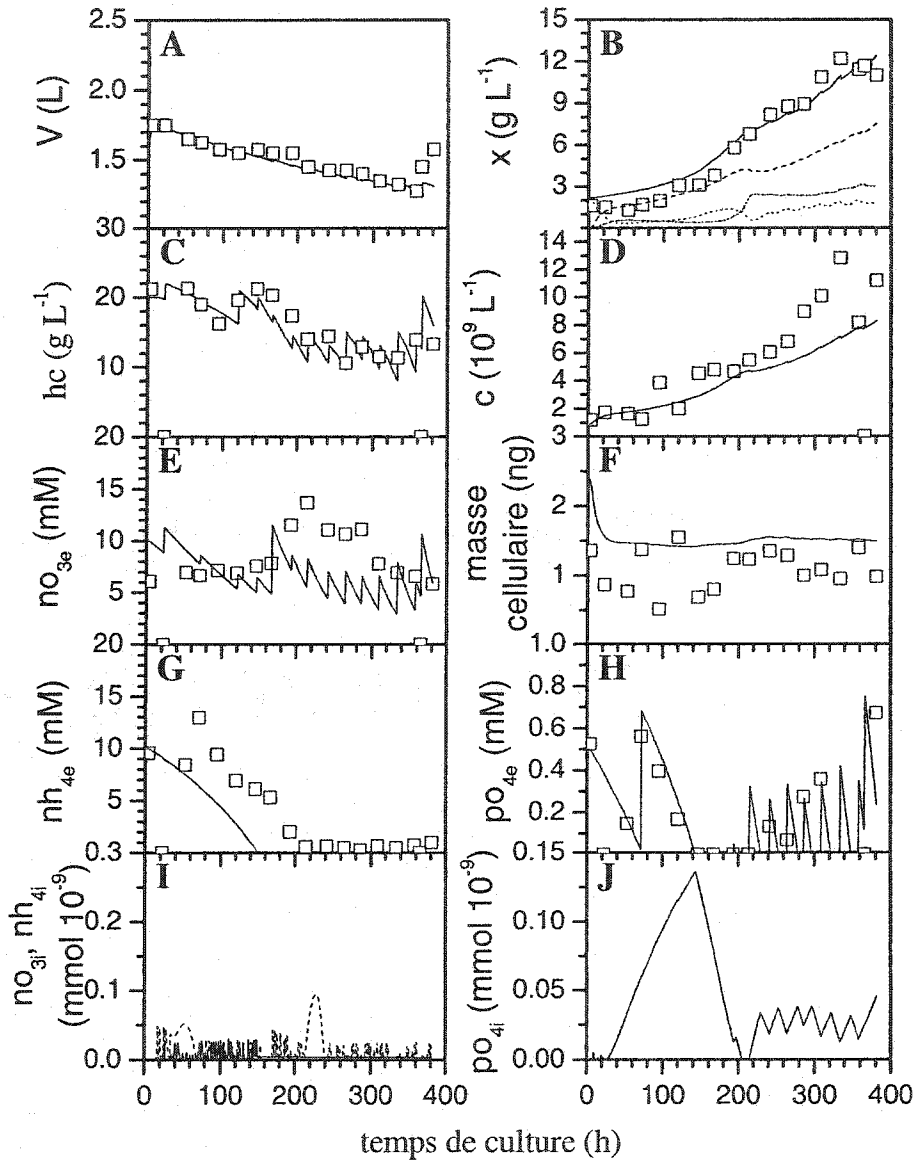


Figure K.3: **Estimations de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture 2SH40 par le modèle de croissance physiologique massique. □ mesure expérimentale, — estimation. B. — Biomasse totale. ----- Biomasse a ····· Biomasse bb. ----- Biomasse cc. I. -----Nitrate intracellulaire, — Ammonium intracellulaire.**

Annexe L

Estimations de la croissance de cultures de cellules végétales en flacons à l'aide du modèle physiologique massique

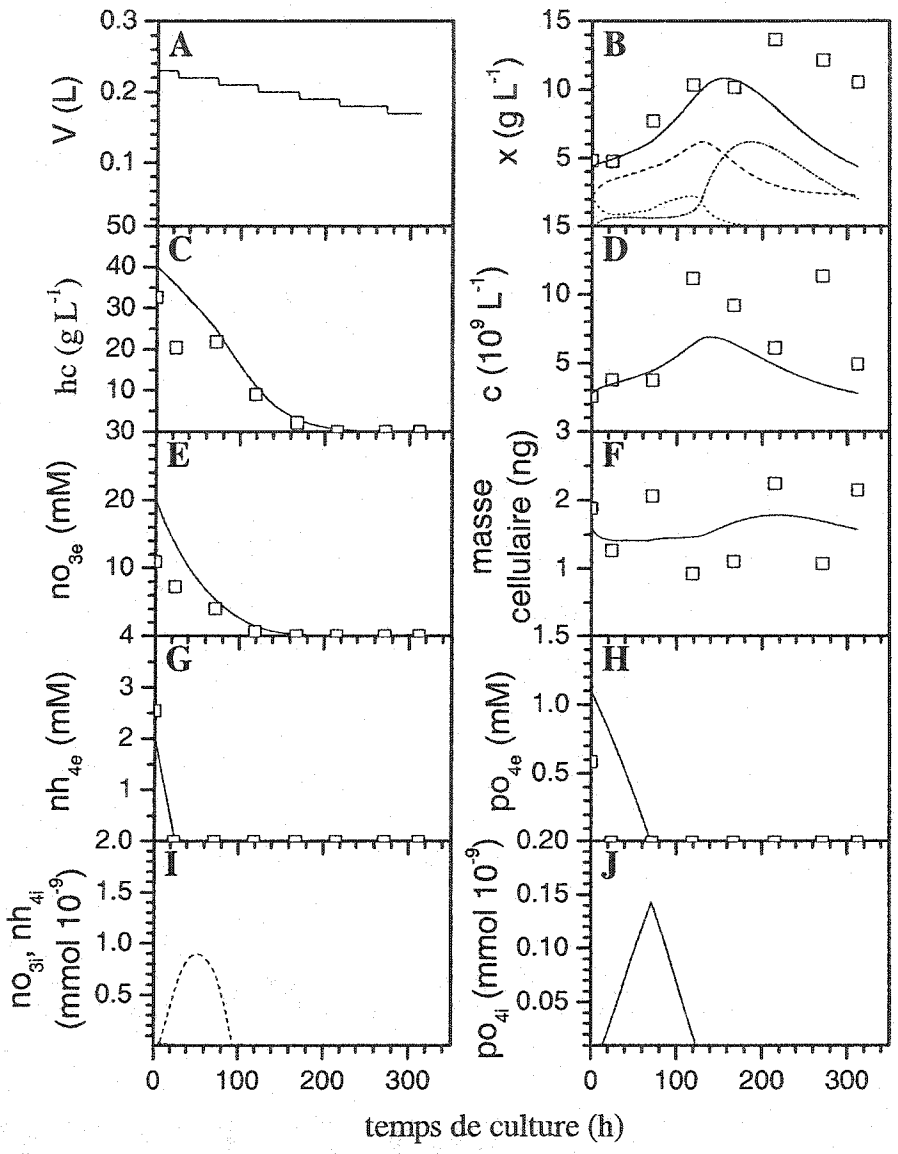


Figure L.1: **Estimations de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture-mère (J0) par le modèle de croissance physiologique massique. □ mesure expérimentale, — estimation. B. — Biomasse totale. ----- Biomasse a ····· Biomasse bb. ----- Biomasse cc. I. -----Nitrate intracellulaire, — Ammonium intracellulaire.**

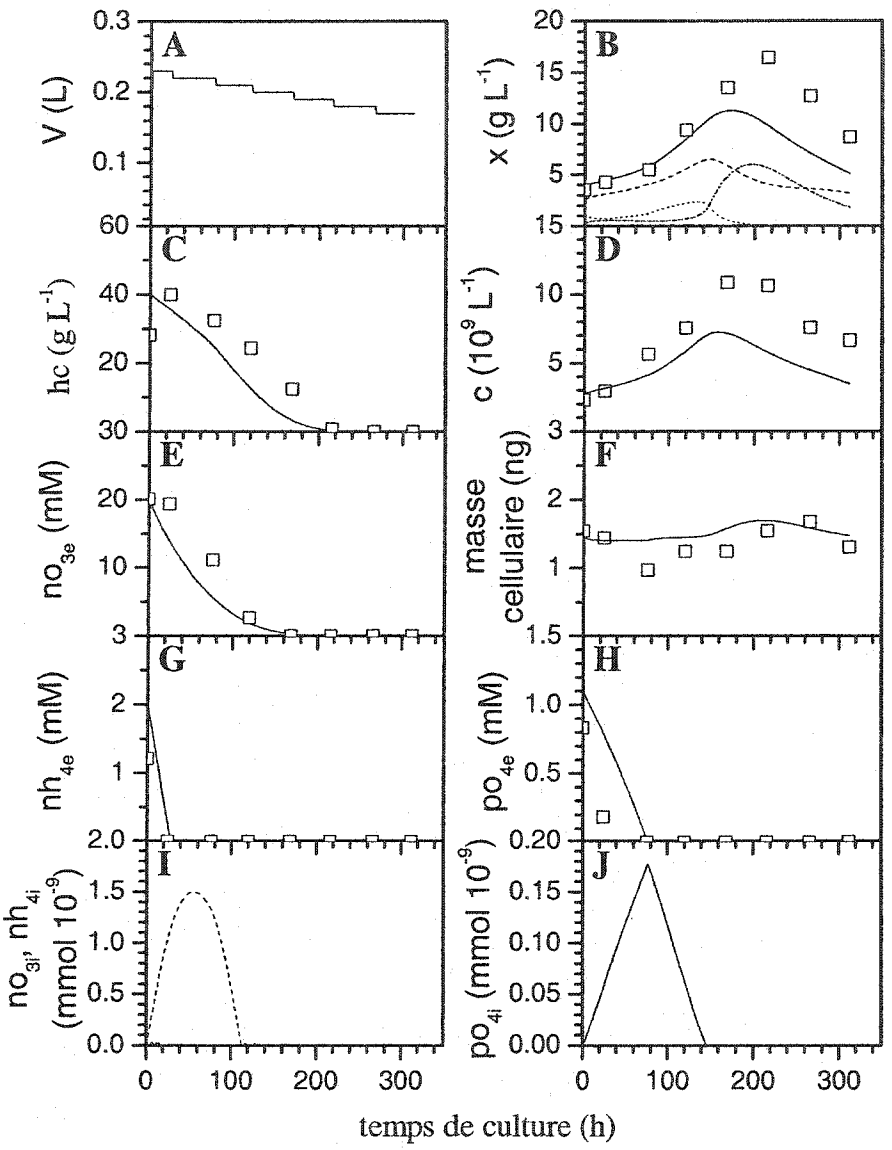


Figure L.2: **Estimations de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture-fille J1 par le modèle de croissance physiologique massique.** □ **mesure expérimentale, — estimation. B. — Biomasse totale. ----- Biomasse a ····· Biomasse bb. ---- Biomasse cc. I. -----Nitrate intracellulaire, — Ammonium intracellulaire.**

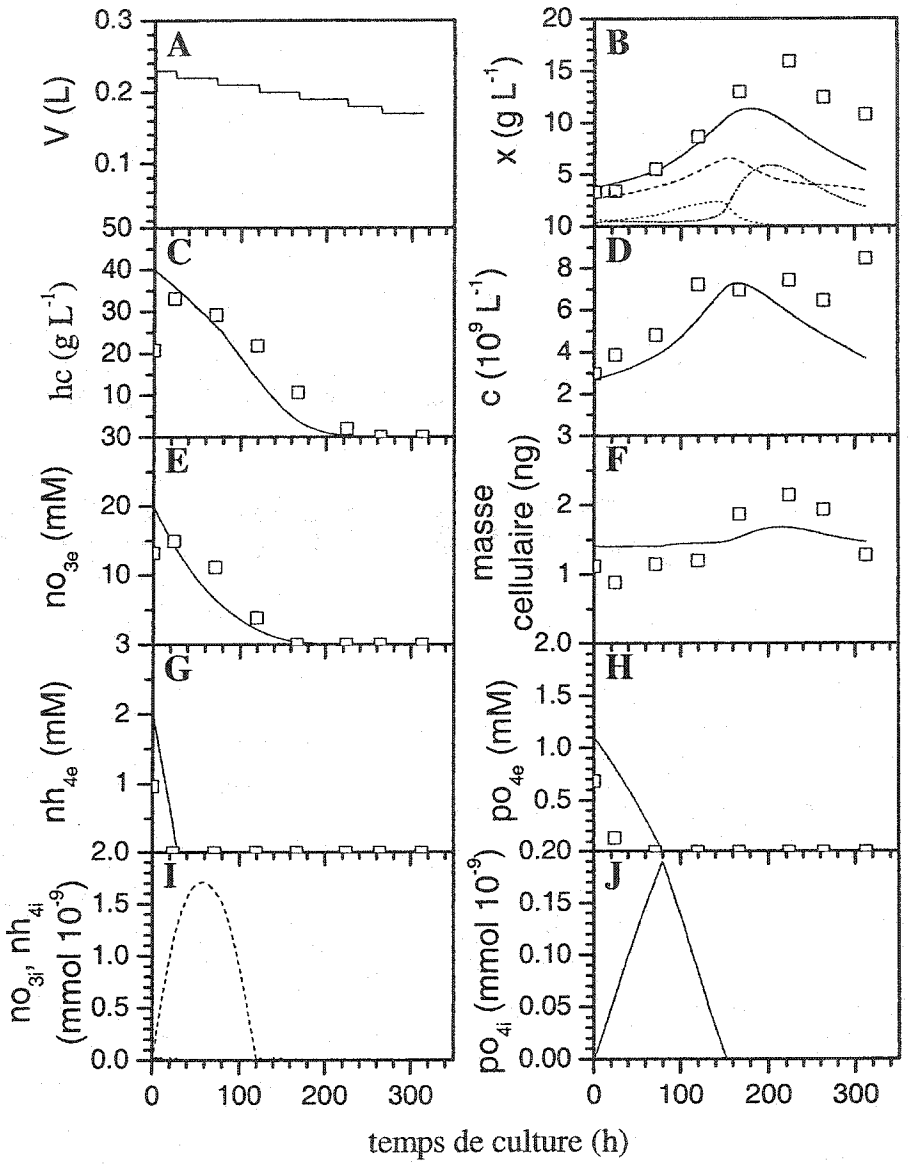


Figure L.3: **Estimations de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture-fille J2 par le modèle de croissance physiologique massique. □ mesure expérimentale, — estimation. B. — Biomasse totale. ----- Biomasse a ····· Biomasse bb. ----- Biomasse cc. I. -----Nitrate intracellulaire, — Ammonium intracellulaire.**

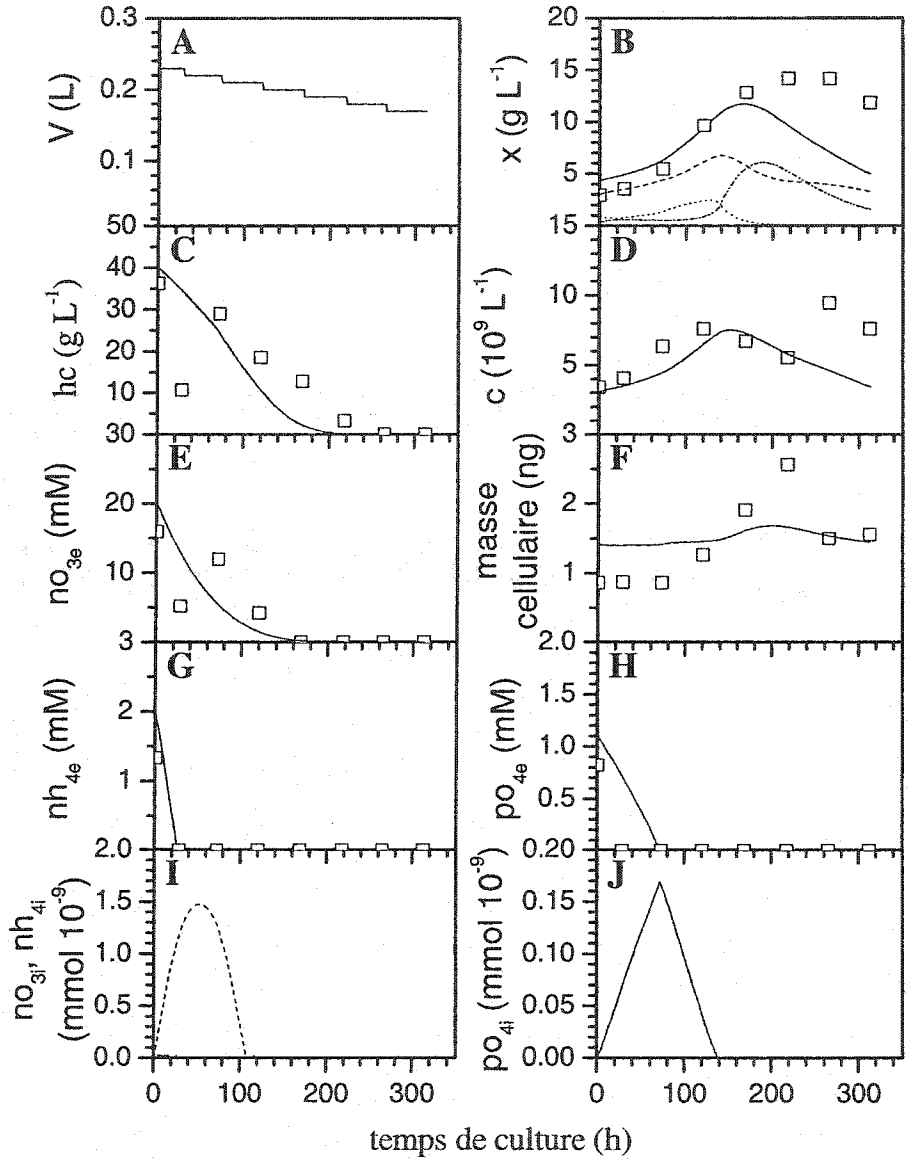


Figure L.4: **Estimations de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture-fille J3 par le modèle de croissance physiologique massique. □ mesure expérimentale, — estimation. B. — Biomasse totale. ----- Biomasse a ····· Biomasse bb. ----- Biomasse cc. I. -----Nitrate intracellulaire, — Ammonium intracellulaire.**

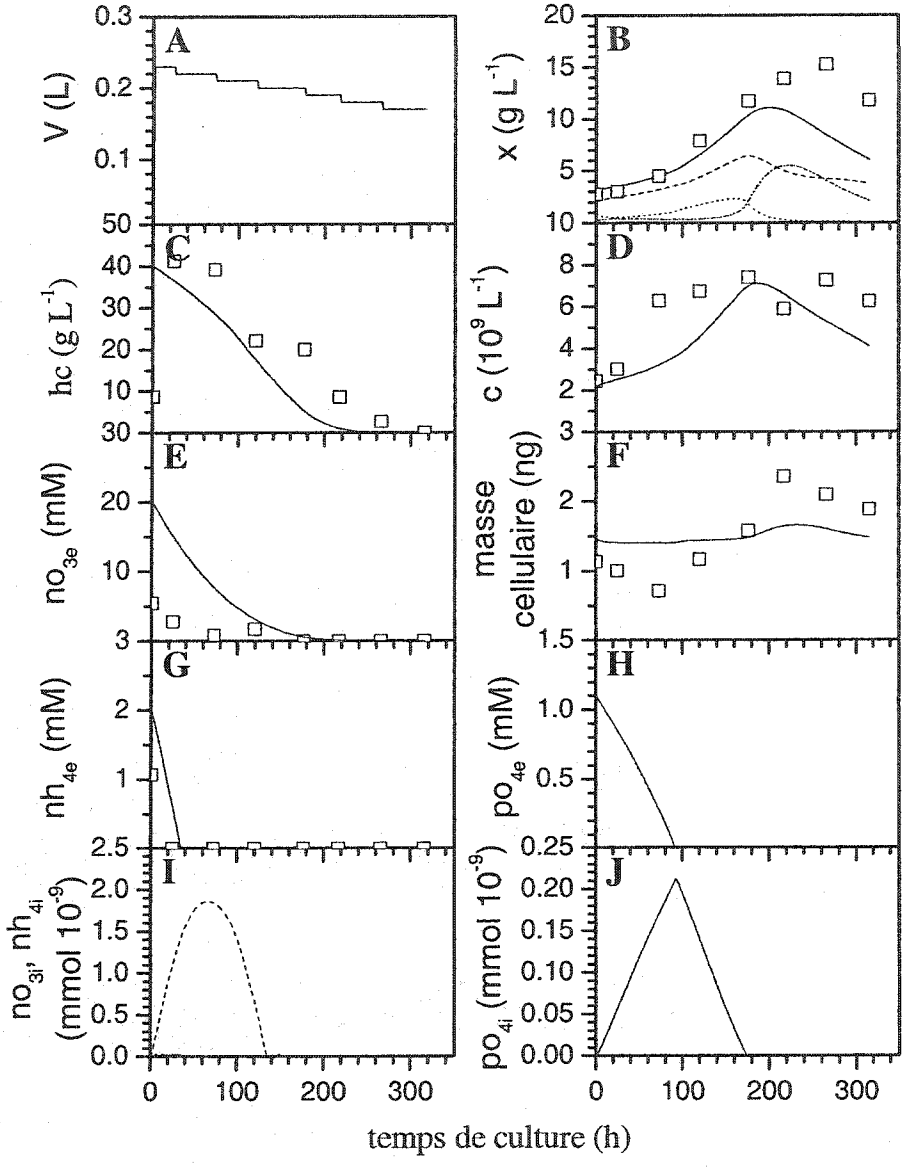


Figure L.5: **Estimations de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture-fille J4 par le modèle de croissance physiologique massique. □ mesure expérimentale, — estimation. B. — Biomasse totale. ----- Biomasse a ····· Biomasse bb. ----- Biomasse cc. I. -----Nitrate intracellulaire, — Ammonium intracellulaire.**

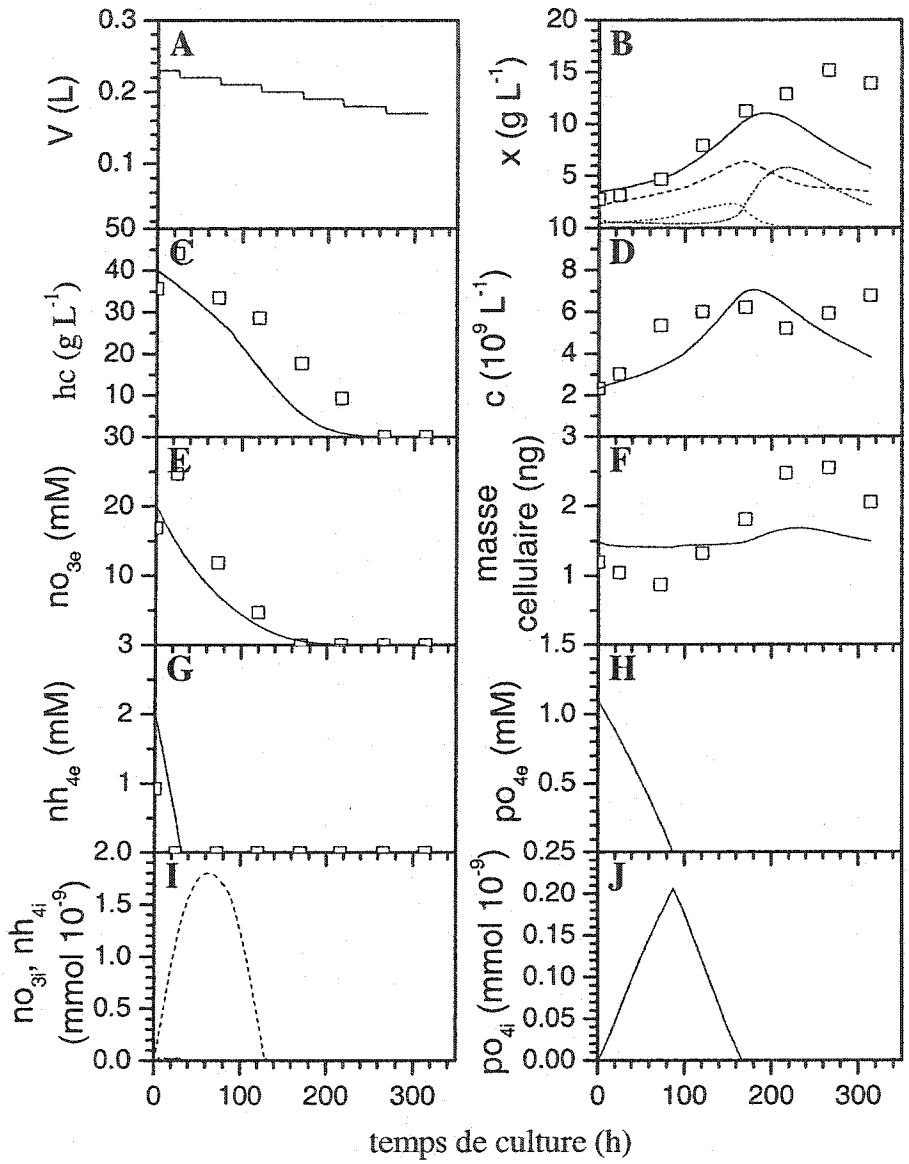


Figure L.6: **Estimations de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture-fille J5 par le modèle de croissance physiologique massique. □ mesure expérimentale, — estimation. B. — Biomasse totale. ----- Biomasse a ····· Biomasse bb. ----- Biomasse cc. I. -----Nitrate intracellulaire, — Ammonium intracellulaire.**

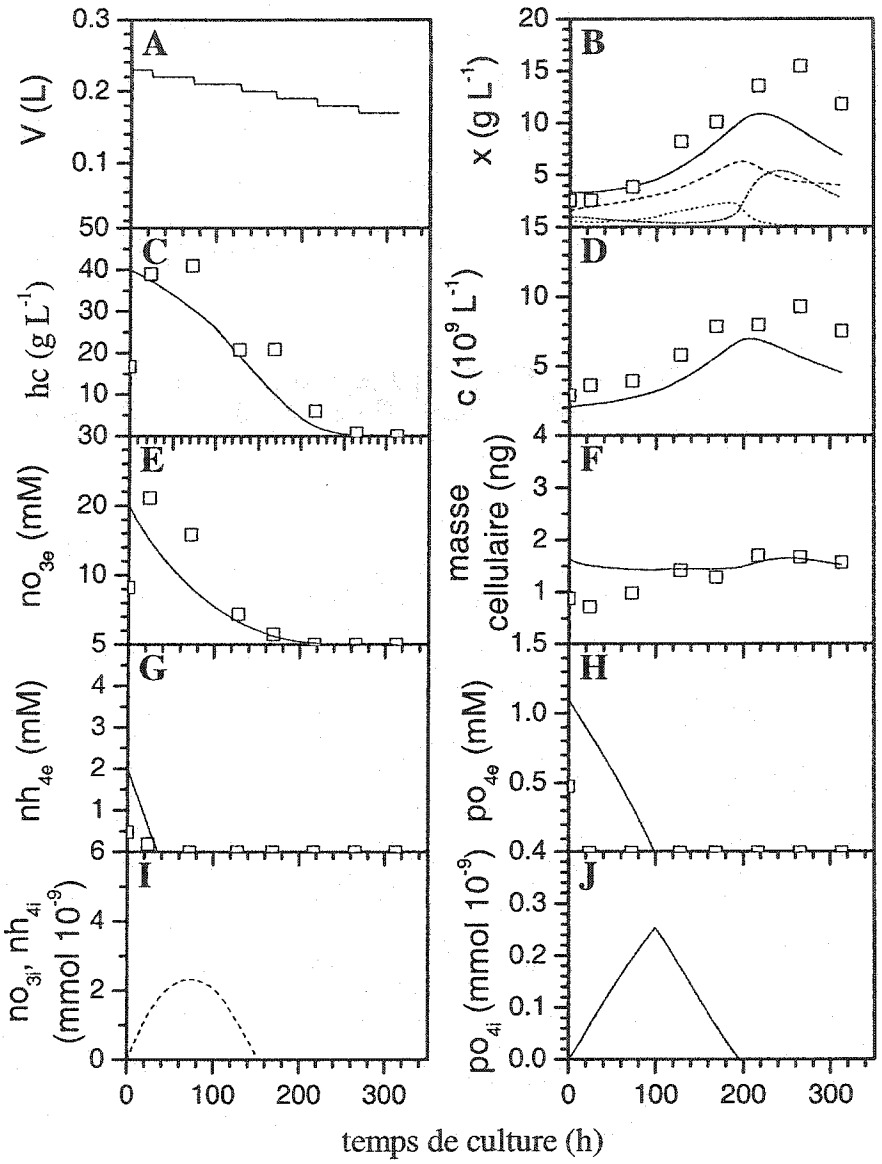


Figure L.7: **Estimations de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture-fille J6 par le modèle de croissance physiologique massique.** □ **mesure expérimentale, — estimation. B. — Biomasse totale. ----- Biomasse a ····· Biomasse bb. ----- Biomasse cc. I. -----Nitrate intracellulaire, — Ammonium intracellulaire.**

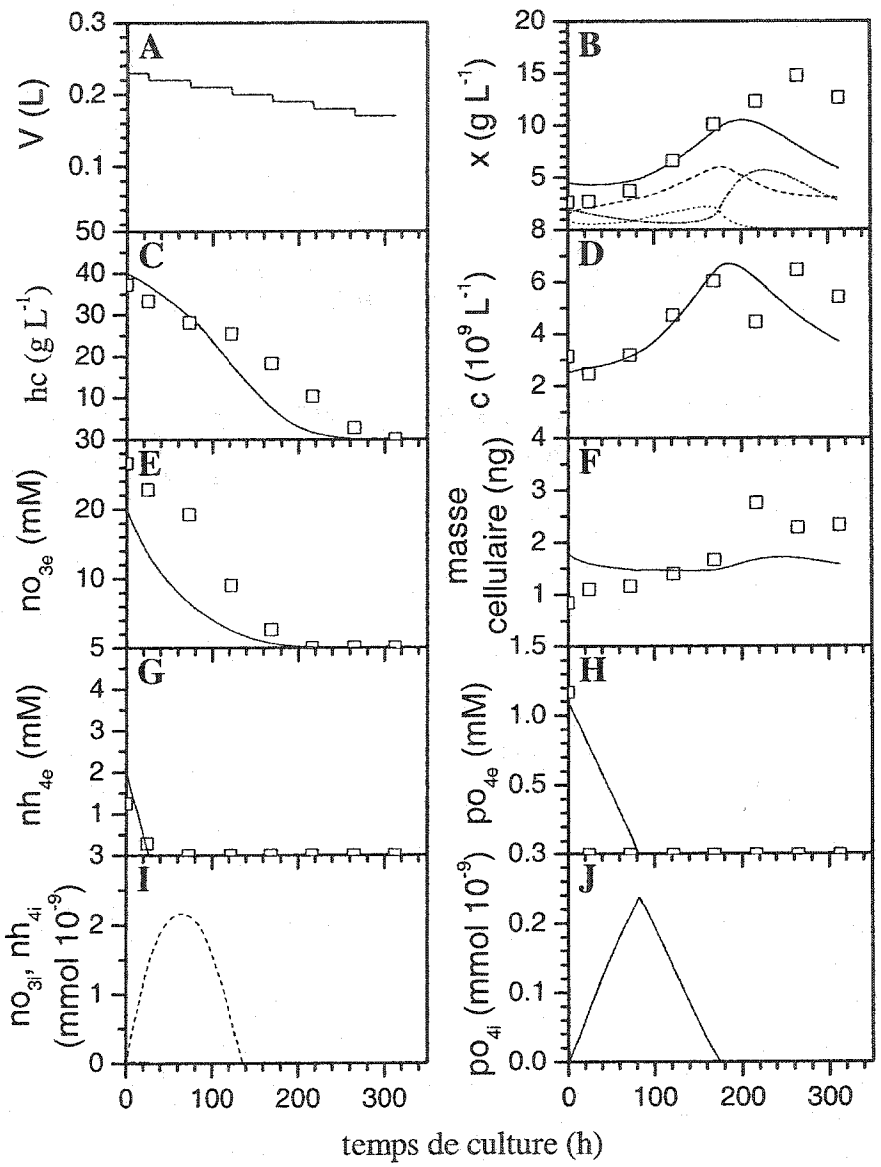


Figure L.8: **Estimations de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture-fille J7 par le modèle de croissance physiologique massique.** □ **mesure expérimentale, — estimation. B. — Biomasse totale. ----- Biomasse a ····· Biomasse bb. ----- Biomasse cc. I. -----Nitrate intracellulaire, — Ammonium intracellulaire.**

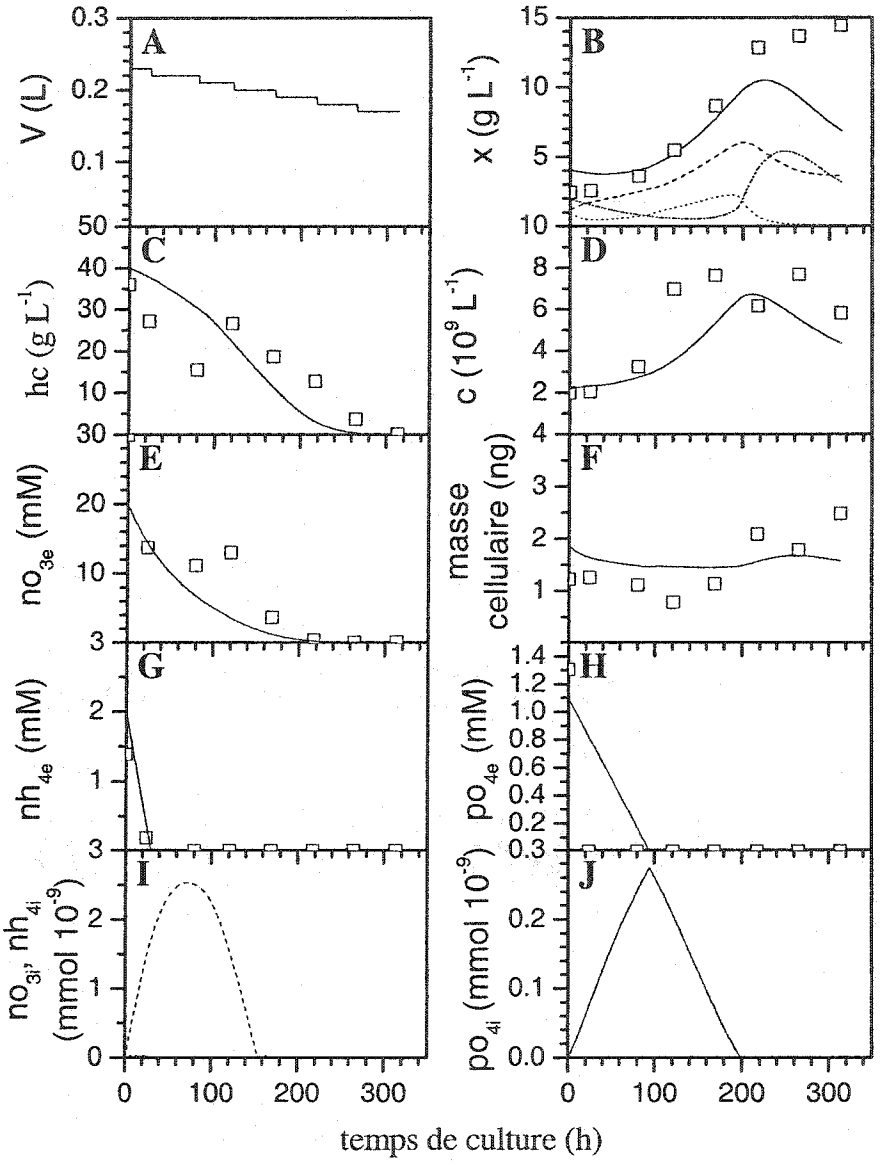


Figure L.9: **Estimations de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture-fille J8 par le modèle de croissance physiologique massique. □ mesure expérimentale, — estimation. B. — Biomasse totale. ----- Biomasse a ····· Biomasse bb. ----- Biomasse cc. I. -----Nitrate intracellulaire, — Ammonium intracellulaire.**

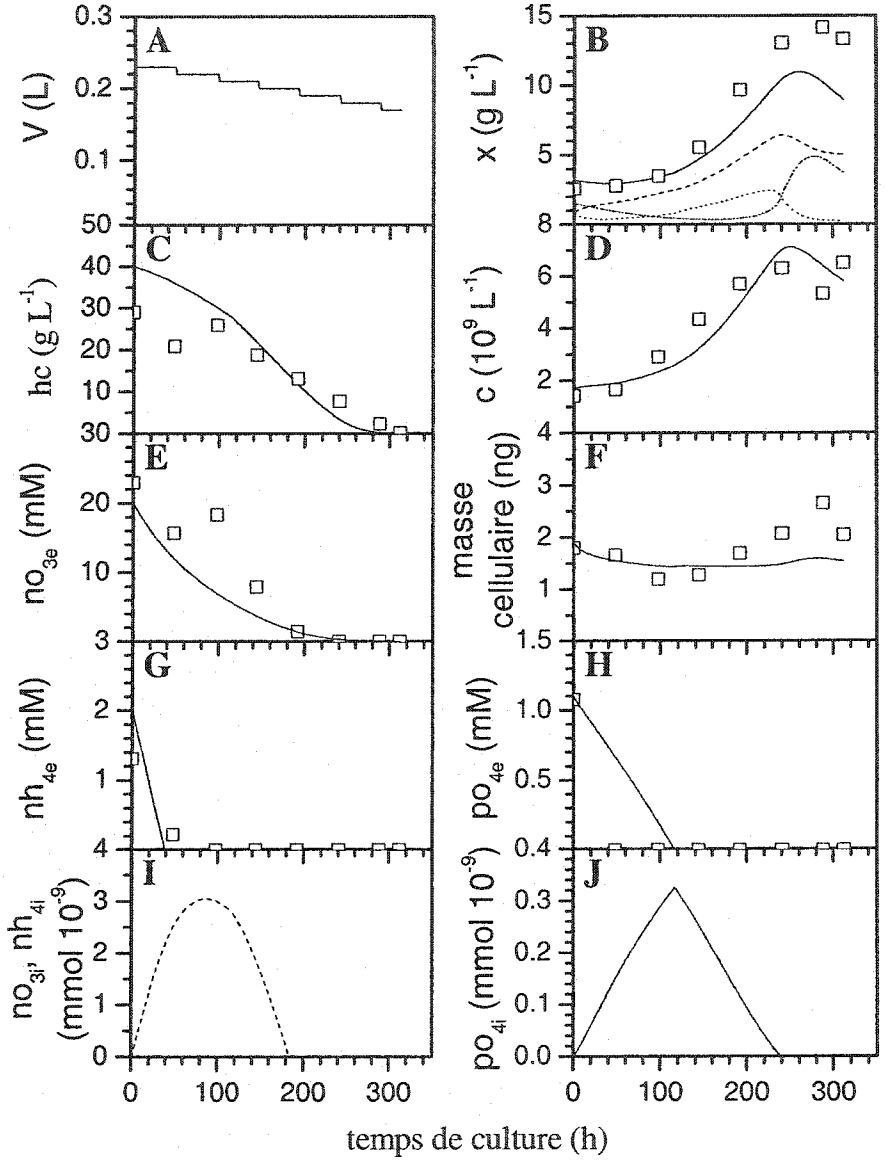


Figure L.10: **Estimations de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture-fille J9 par le modèle de croissance physiologique massique. □ mesure expérimentale, — estimation. B. — Biomasse totale. ----- Biomasse a ····· Biomasse bb. ----- Biomasse cc. I. -----Nitrate intracellulaire, — Ammonium intracellulaire.**

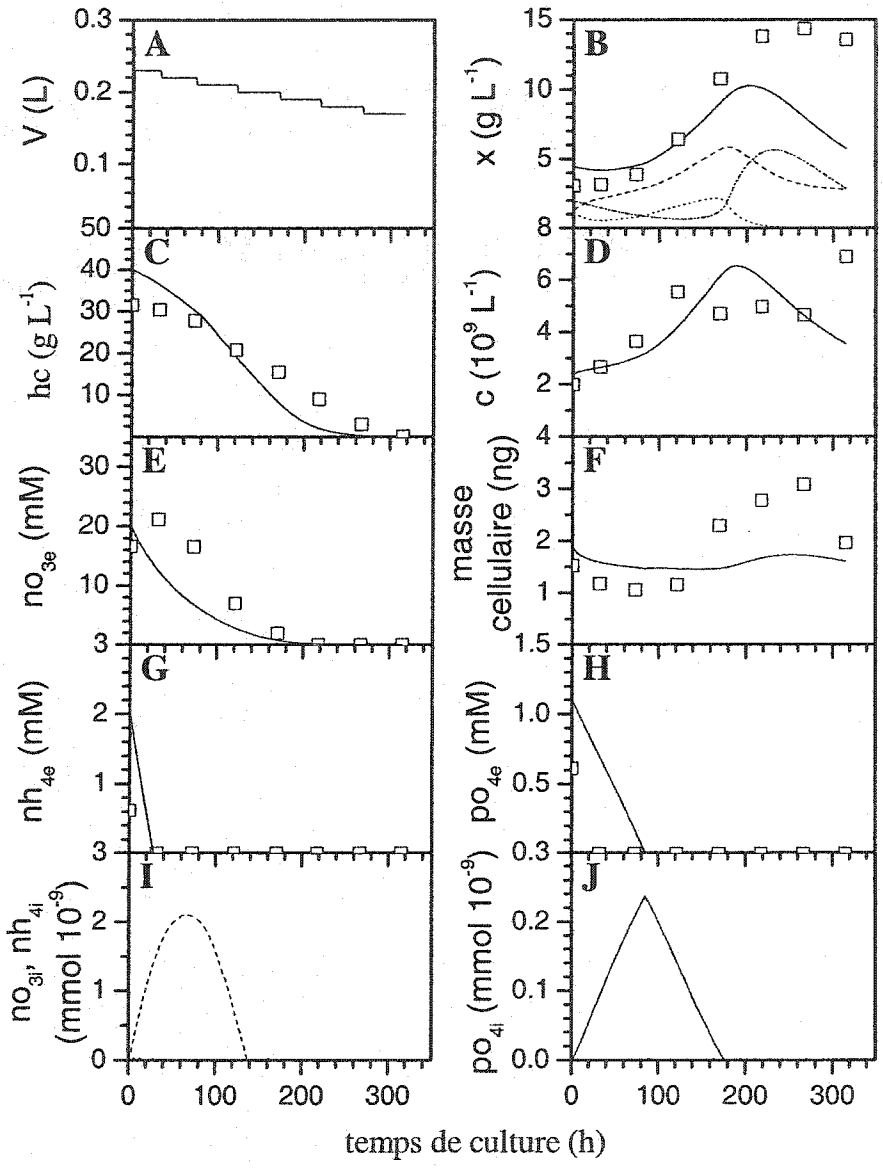


Figure L.11: **Estimations de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture-fille J10 par le modèle de croissance physiologique massique. □ mesure expérimentale, — estimation. B. — Biomasse totale. ----- Biomasse a ····· Biomasse bb. ----- Biomasse cc. I. -----Nitrate intracellulaire, — Ammonium intracellulaire.**

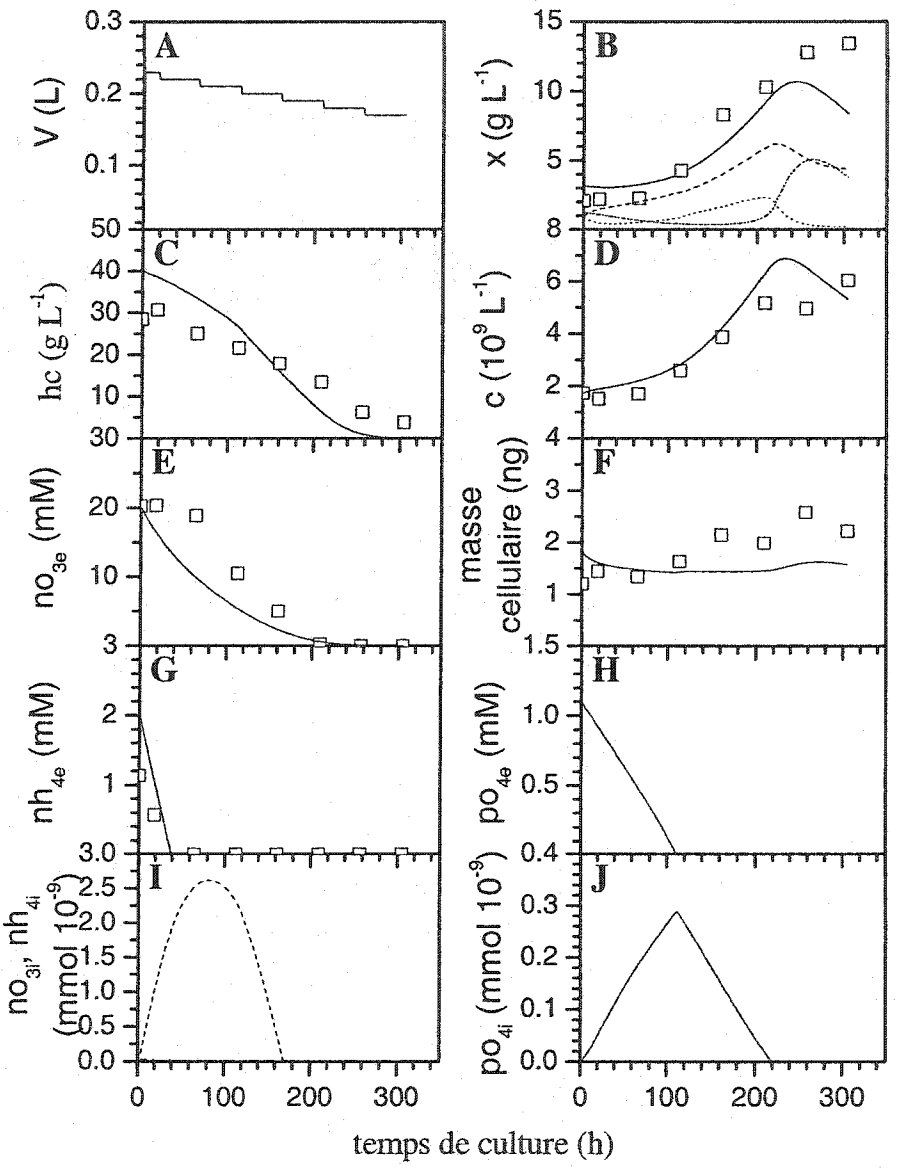


Figure L.12: **Estimations de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture-fille J11 par le modèle de croissance physiologique massique. □ mesure expérimentale, — estimation. B. — Biomasse totale. ----- Biomasse a ····· Biomasse bb. ----- Biomasse cc. I. -----Nitrate intracellulaire, — Ammonium intracellulaire.**

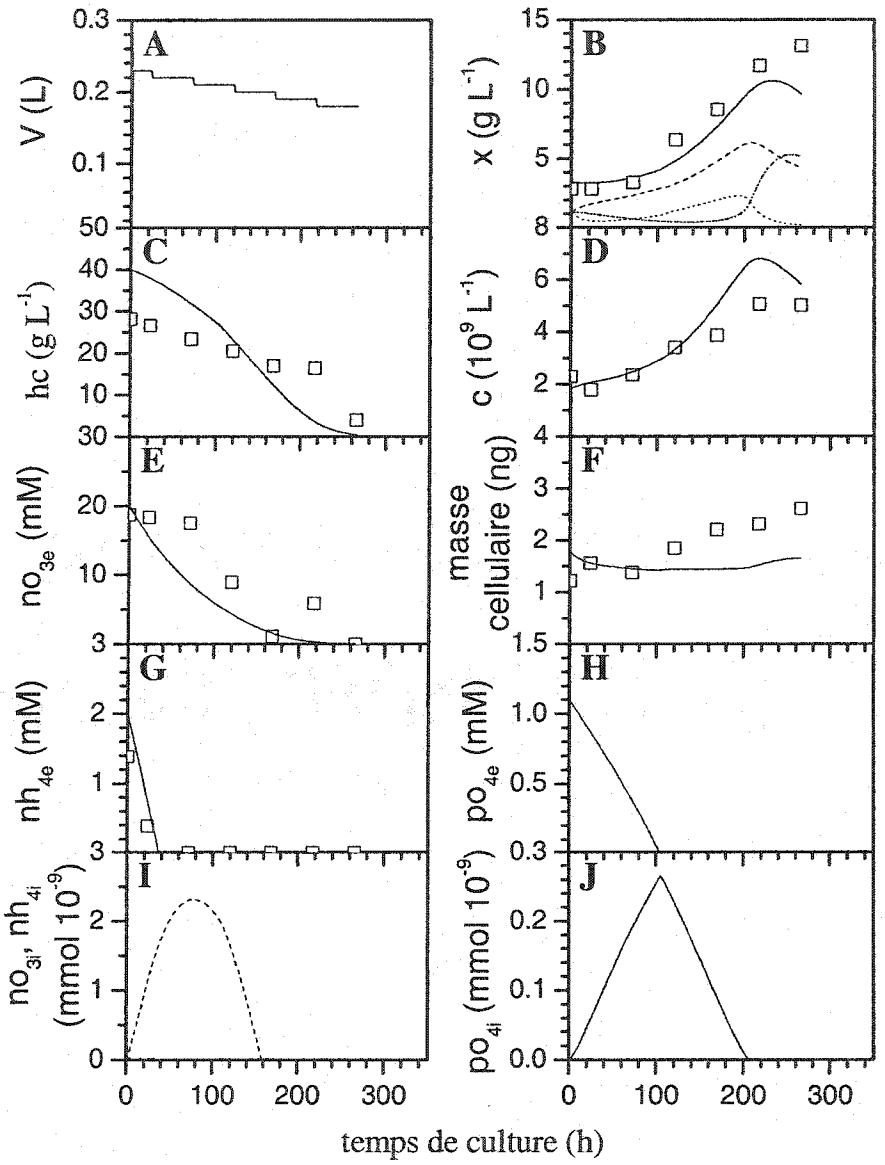


Figure L.13: **Estimations de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture-fille J12 par le modèle de croissance physiologique massique. □ mesure expérimentale, — estimation. B. — Biomasse totale. ----- Biomasse a ····· Biomasse bb. ----- Biomasse cc. I. -----Nitrate intracellulaire, — Ammonium intracellulaire.**

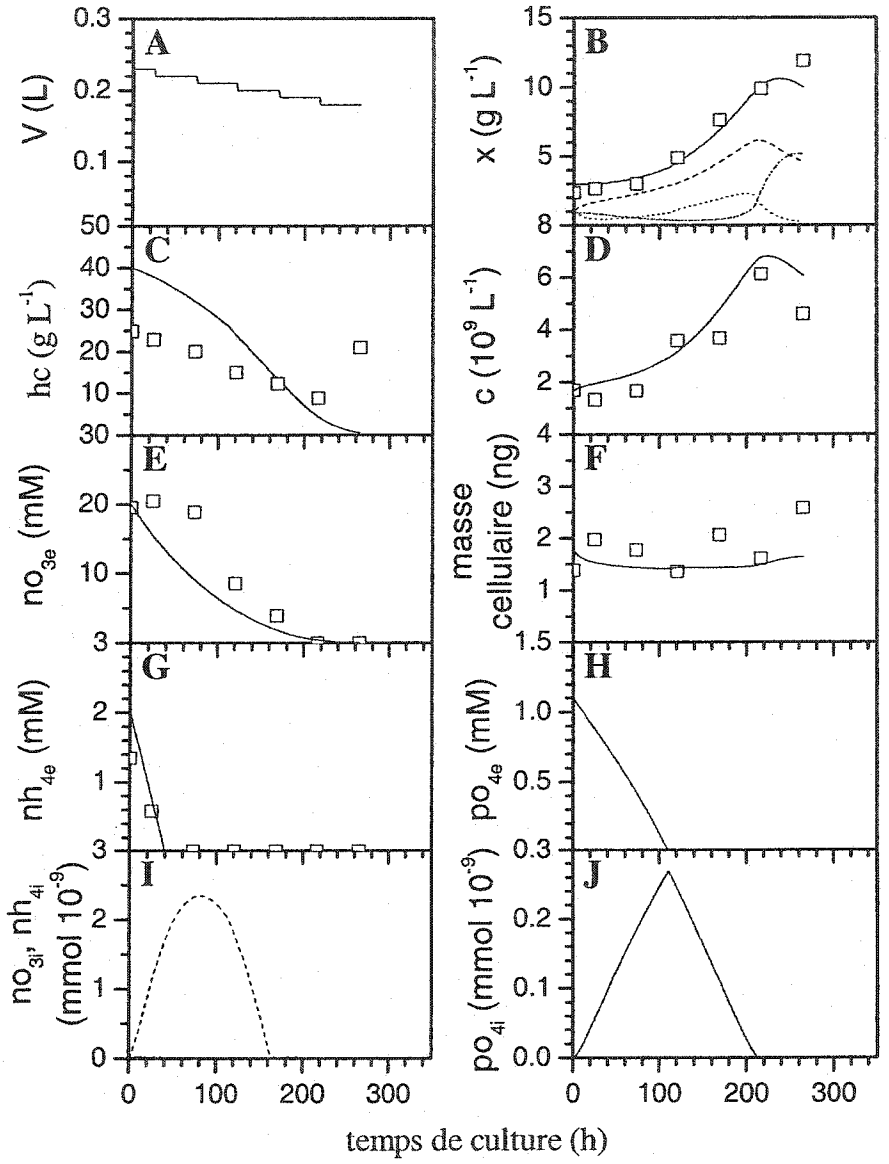


Figure L.14: **Estimations de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture-fille J13 par le modèle de croissance physiologique massique. □ mesure expérimentale, — estimation. B. — Biomasse totale. ----- Biomasse a ····· Biomasse bb. ----- Biomasse cc. I. -----Nitrate intracellulaire, — Ammonium intracellulaire.**

Annexe M

Estimations de la croissance de cultures de cellules végétales développées lors de la détermination des constantes de cinétique du modèle cellulaire

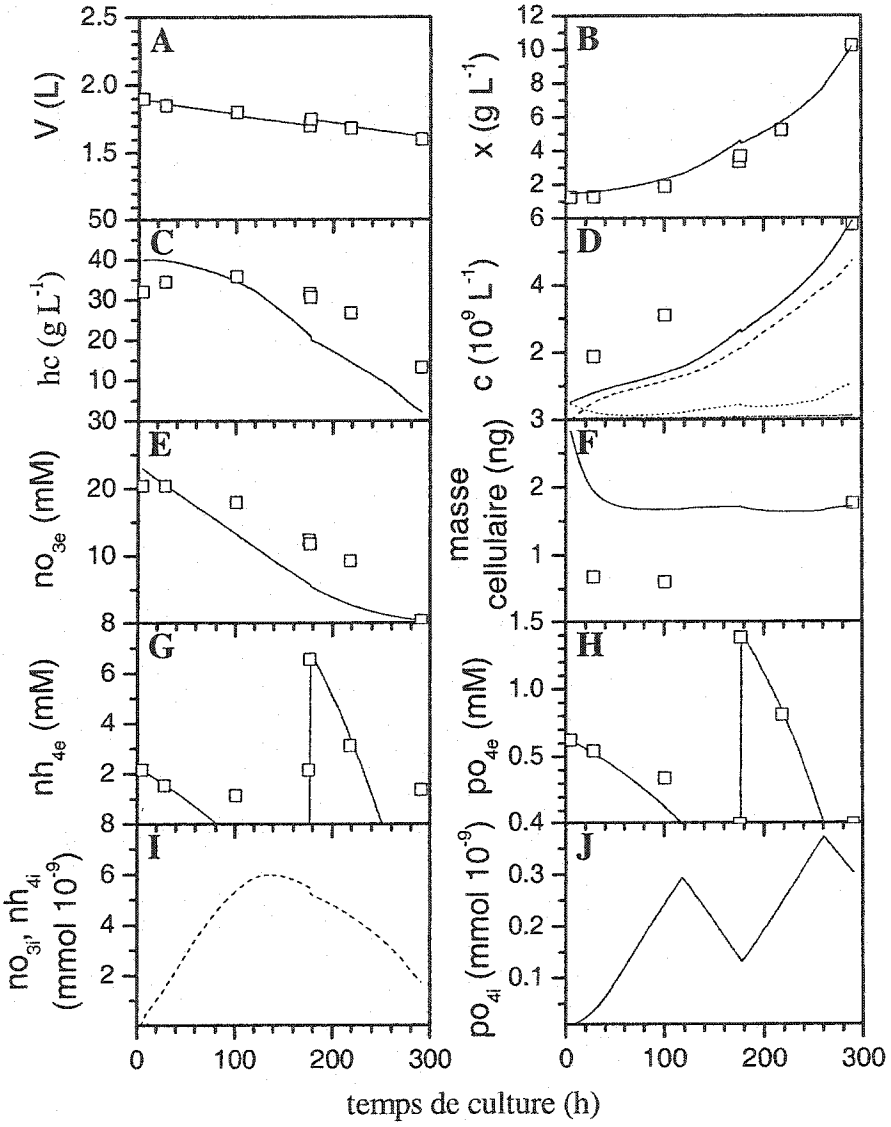


Figure M.1: **Estimations de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture 2SH8 par le modèle de croissance cellulaire. ☐ mesure expérimentale, — estimation. D. — Concentration cellulaire totale. ----- Cellules a····· Cellules bb. ----- Cellules cc. I. -----Nitrate intracellulaire, — Ammonium intracellulaire.**

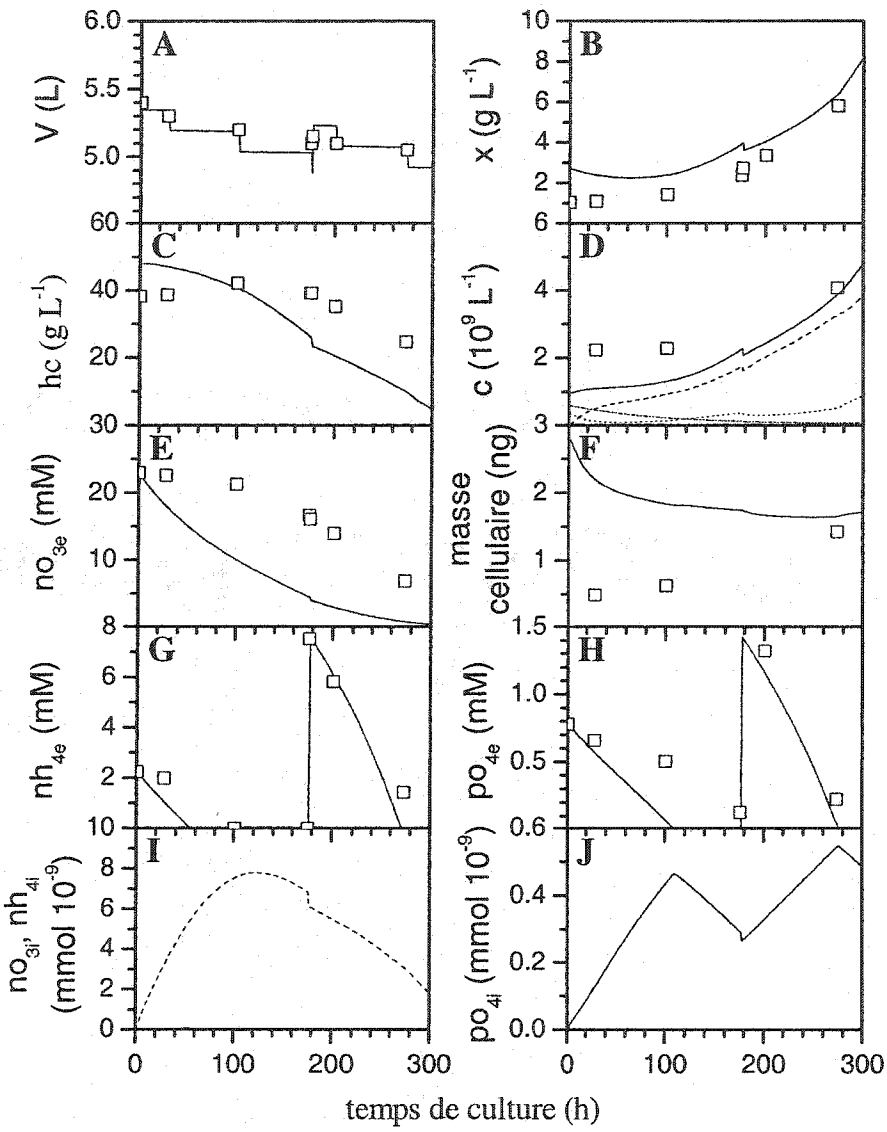


Figure M.2: **Estimations de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture 5SH9 par le modèle de croissance cellulaire. □ mesure expérimentale, — estimation. D. — Concentration cellulaire totale. ----- Cellules a····· Cellules bb. ····· Cellules cc. I. -----Nitrate intracellulaire, — Ammonium intracellulaire.**

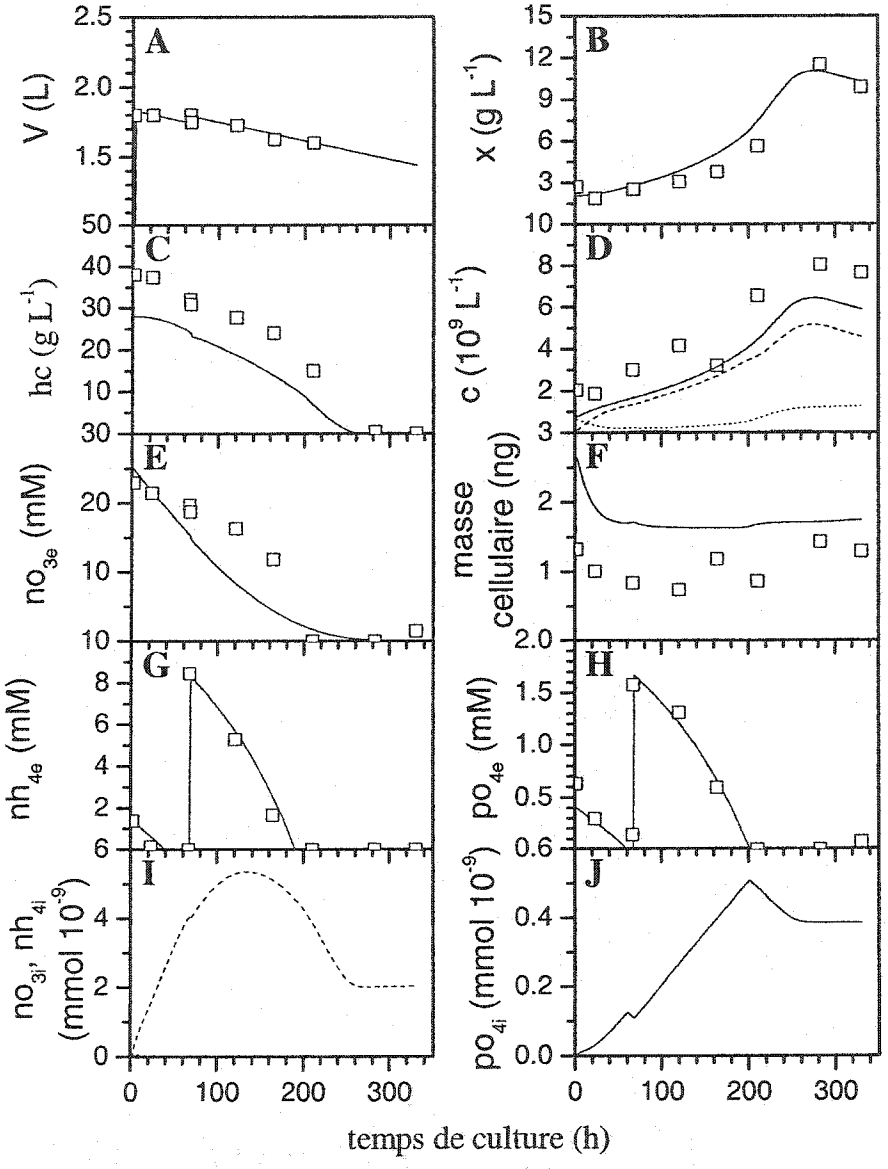


Figure M.3: **Estimations de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture 2SH10 par le modèle de croissance cellulaire. ☐ mesure expérimentale, — estimation. D. — Concentration cellulaire totale. ----- Cellules a····· Cellules bb. ----- Cellules cc. I. -----Nitrate intracellulaire, — Ammonium intracellulaire.**

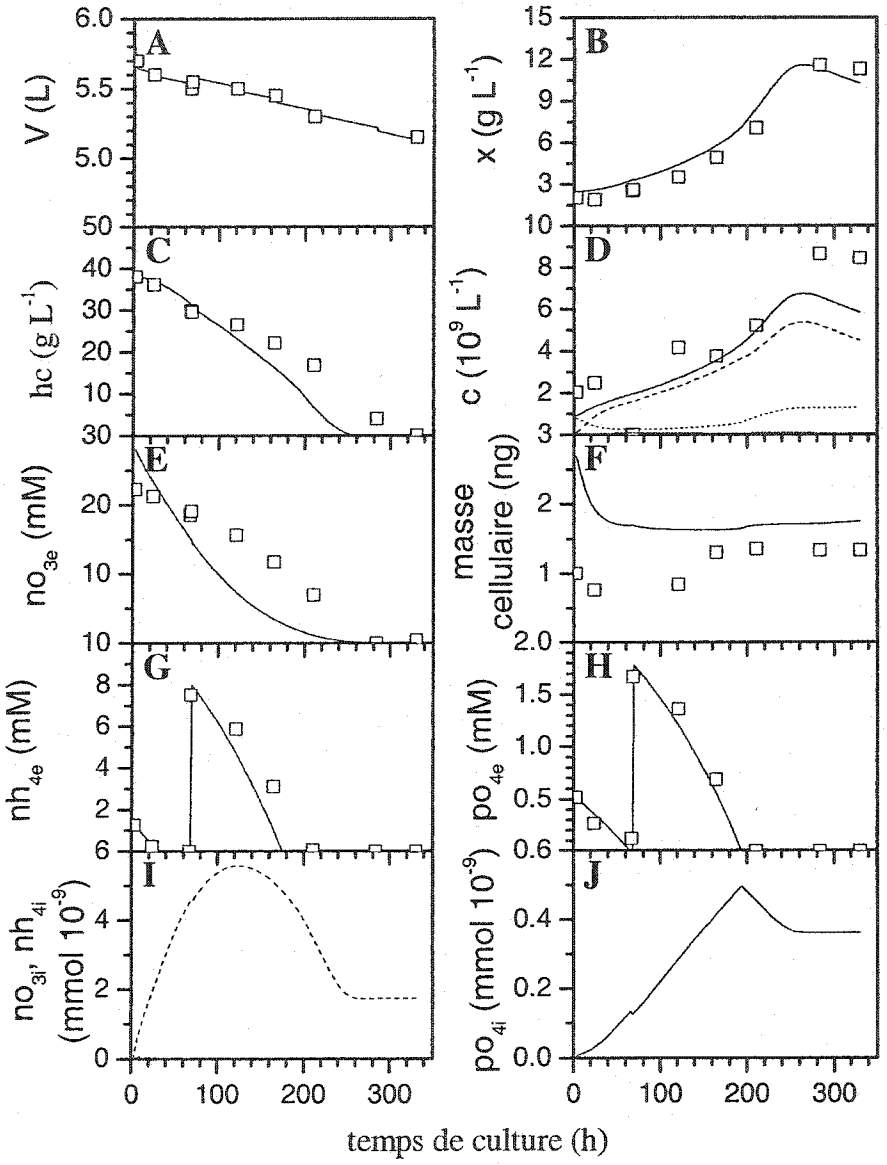


Figure M.4: **Estimations de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture 5SH11 par le modèle de croissance cellulaire. ☐ mesure expérimentale, — estimation. D. — Concentration cellulaire totale. ----- Cellules a····· Cellules bb. ----- Cellules cc. I. -----Nitrate intracellulaire, — Ammonium intracellulaire.**

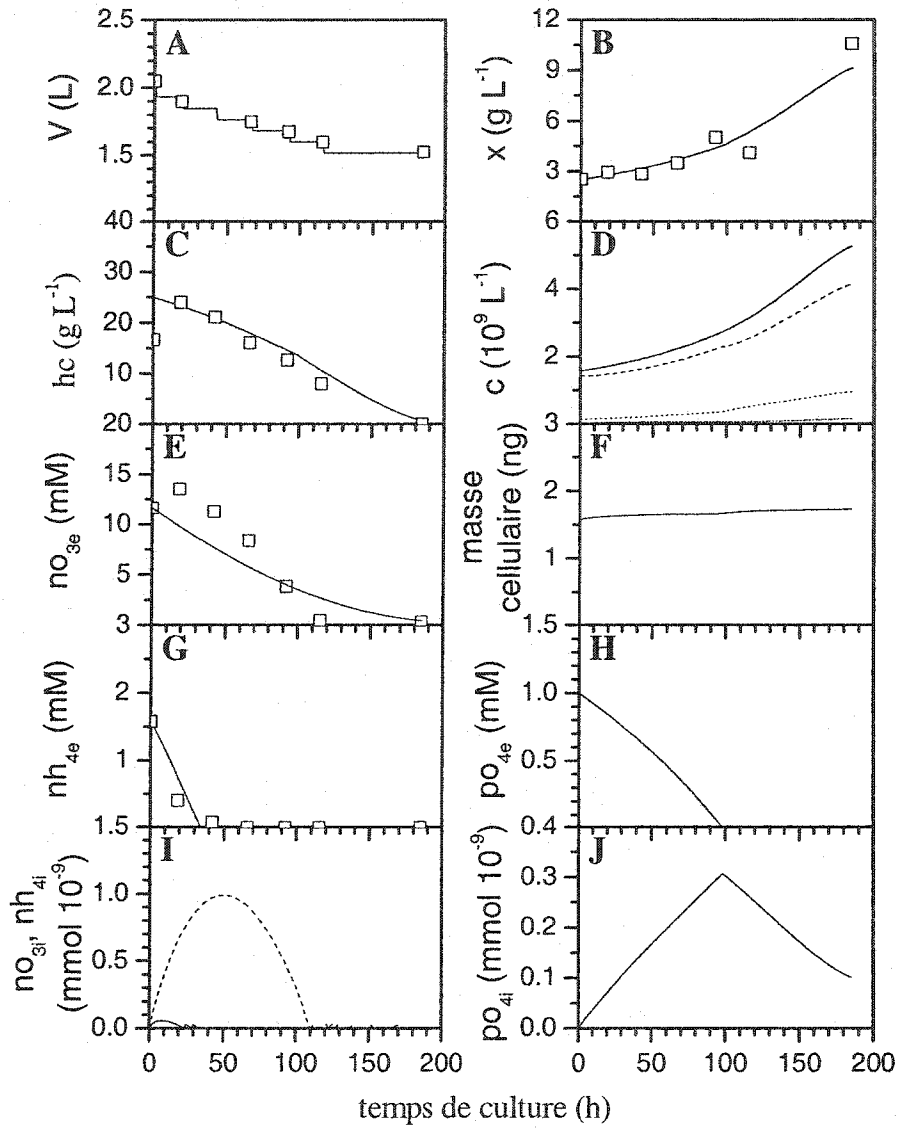


Figure M.5: **Estimations de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture 2SH12 par le modèle de croissance cellulaire. □ mesure expérimentale, — estimation. D. — Concentration cellulaire totale. ----- Cellules a····· Cellules bb. ----- Cellules cc. I. -----Nitrate intracellulaire, — Ammonium intracellulaire.**

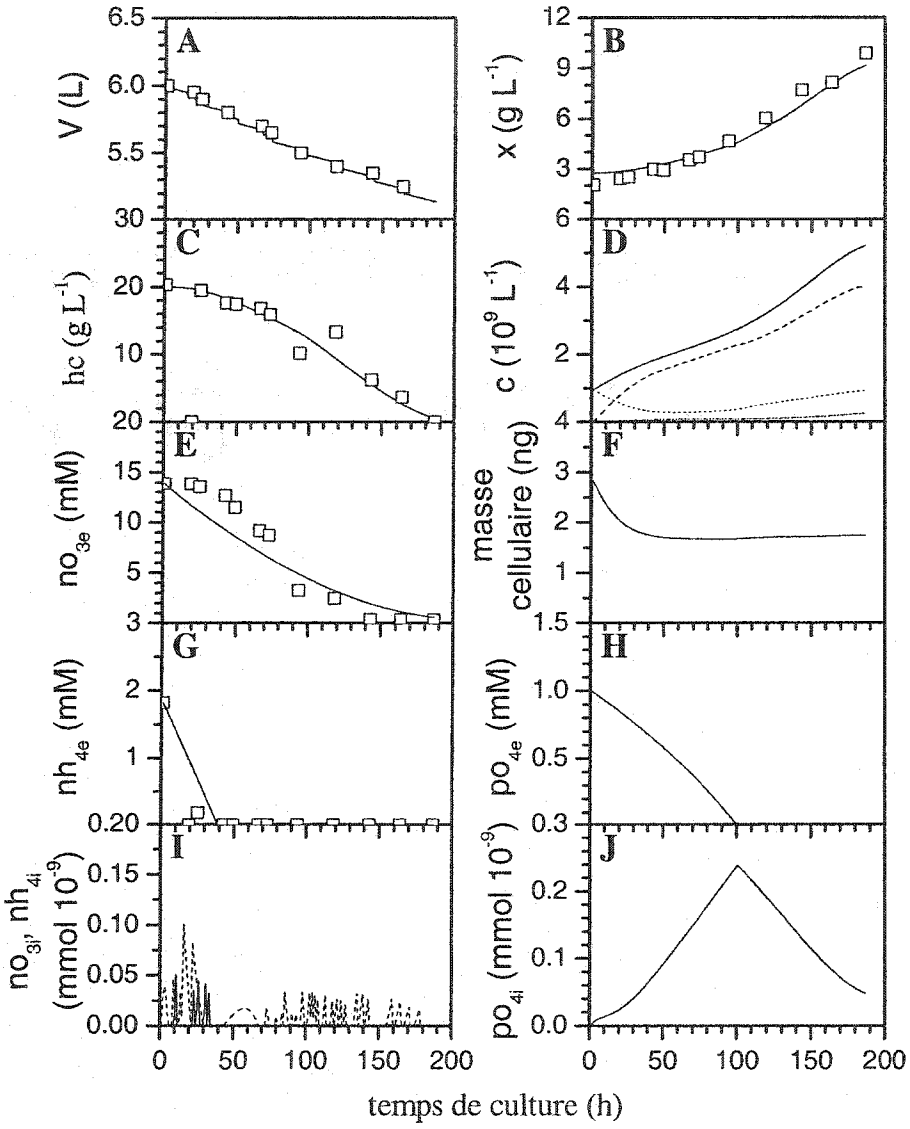


Figure M.6: **Estimations de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture 5SH13 par le modèle de croissance cellulaire. □ mesure expérimentale, — estimation. D. — Concentration cellulaire totale. ----- Cellules a····· Cellules bb. ····· Cellules cc. I. -----Nitrate intracellulaire, — Ammonium intracellulaire.**

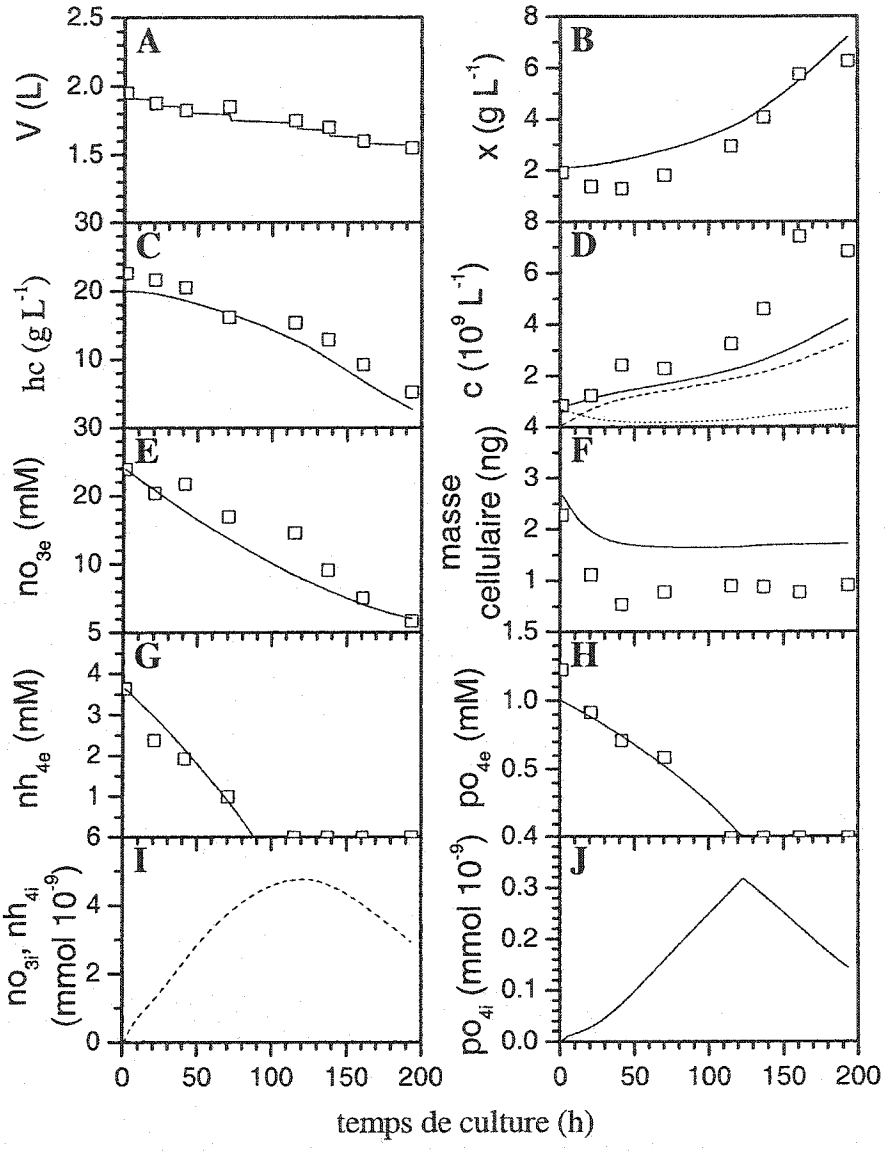


Figure M.7: **Estimations de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture 2SH16 par le modèle de croissance cellulaire. ☐ mesure expérimentale, — estimation. D. — Concentration cellulaire totale. ----- Cellules a····· Cellules bb. ----- Cellules cc. I. -----Nitrate intracellulaire, — Ammonium intracellulaire.**

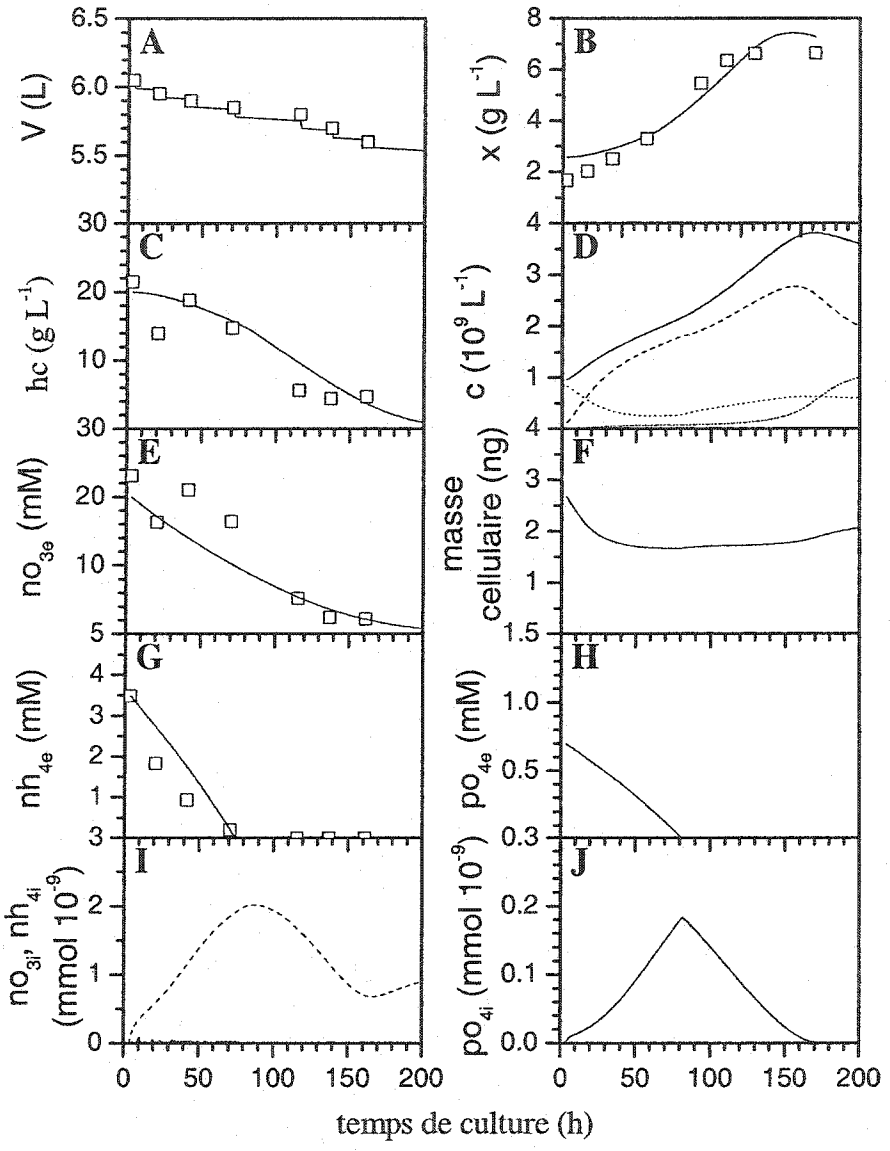


Figure M.8: **Estimations de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture 5SH17 par le modèle de croissance cellulaire. □ mesure expérimentale, — estimation. D. — Concentration cellulaire totale. ----- Cellules a····· Cellules bb. ----- Cellules cc. I. -----Nitrate intracellulaire, — Ammonium intracellulaire.**

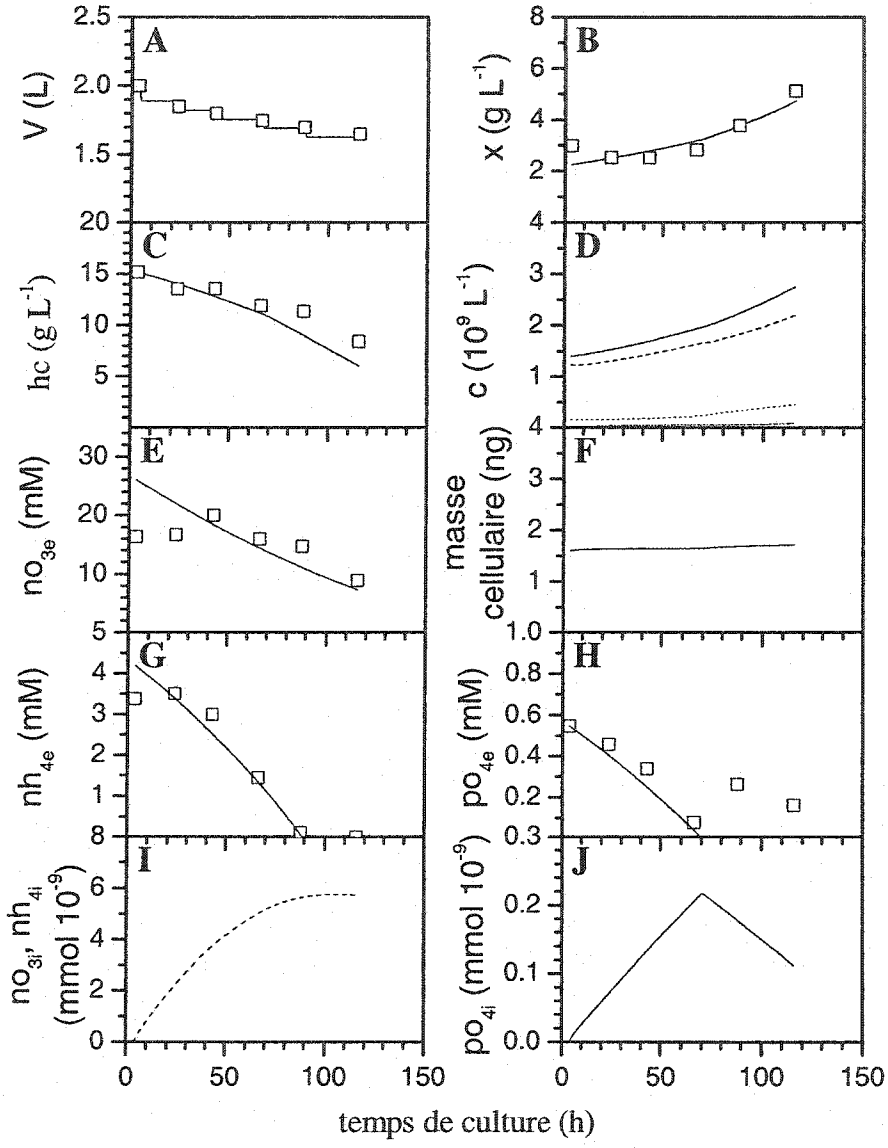


Figure M.9: **Estimations de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture 2SH20 par le modèle de croissance cellulaire. ☐ mesure expérimentale, — estimation. D. — Concentration cellulaire totale. ----- Cellules a····· Cellules bb. ----- Cellules cc. I. -----Nitrate intracellulaire, — Ammonium intracellulaire.**

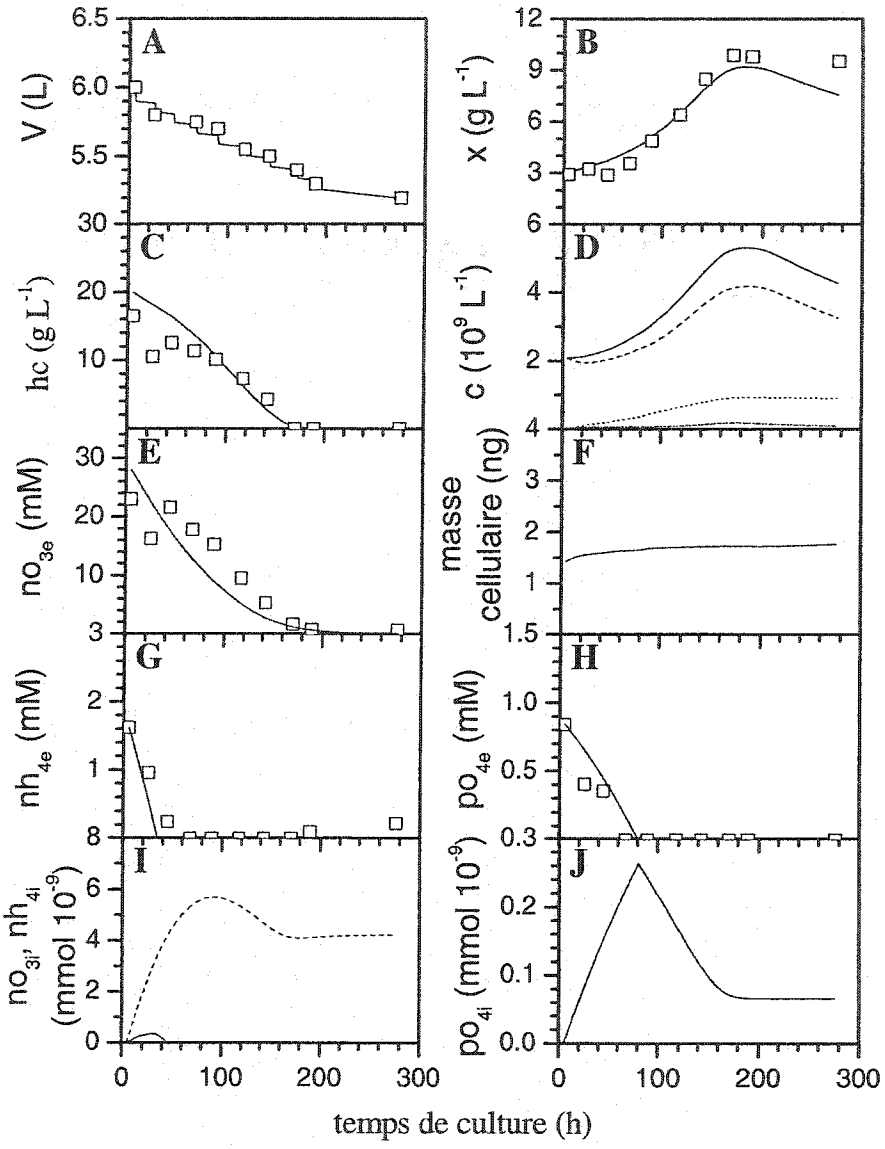


Figure M.10: **Estimations de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture 5SH21 par le modèle de croissance cellulaire. ☐ mesure expérimentale, — estimation. D. — Concentration cellulaire totale. ----- Cellules a····· Cellules bb. ----- Cellules cc. I. -----Nitrate intracellulaire, — Ammonium intracellulaire.**

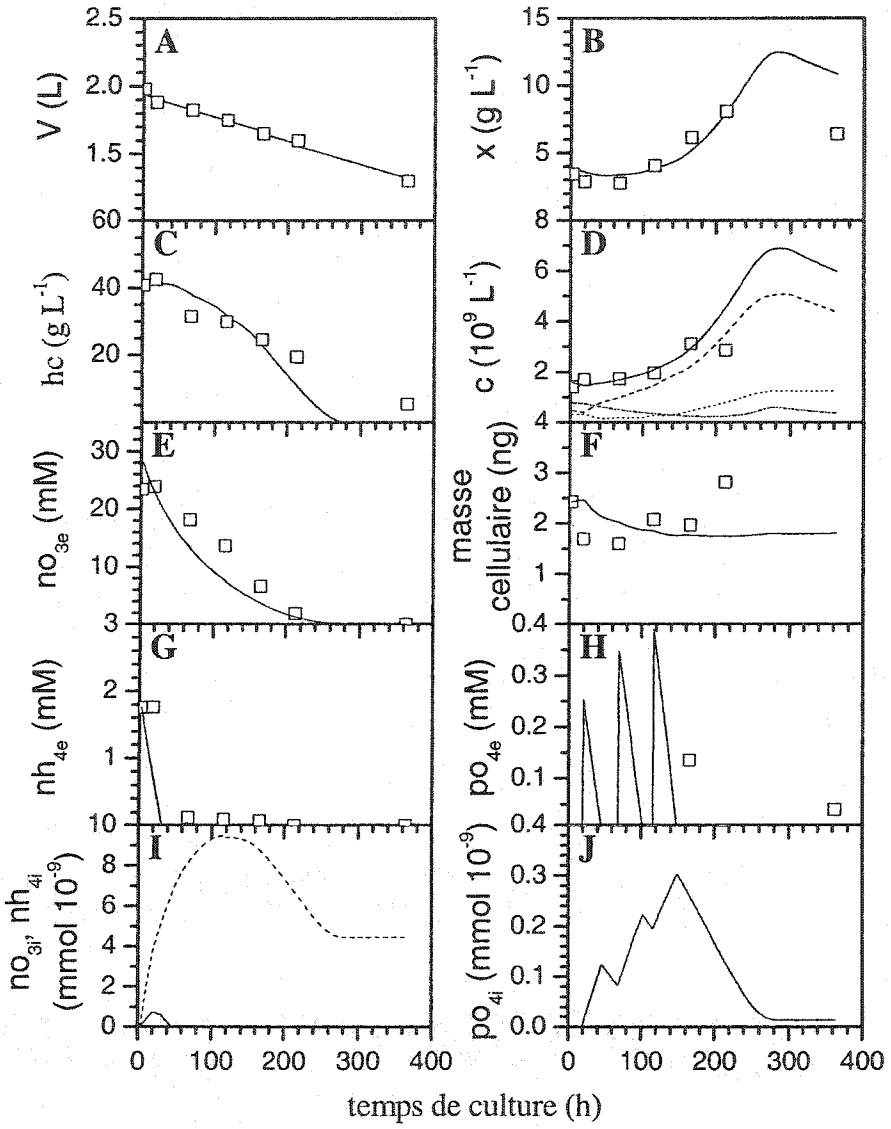


Figure M.11: **Estimations de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture 2SH22 par le modèle de croissance cellulaire. □ mesure expérimentale, — estimation. D. — Concentration cellulaire totale. ----- Cellules a····· Cellules bb. ----- Cellules cc. I. -----Nitrate intracellulaire, — Ammonium intracellulaire.**

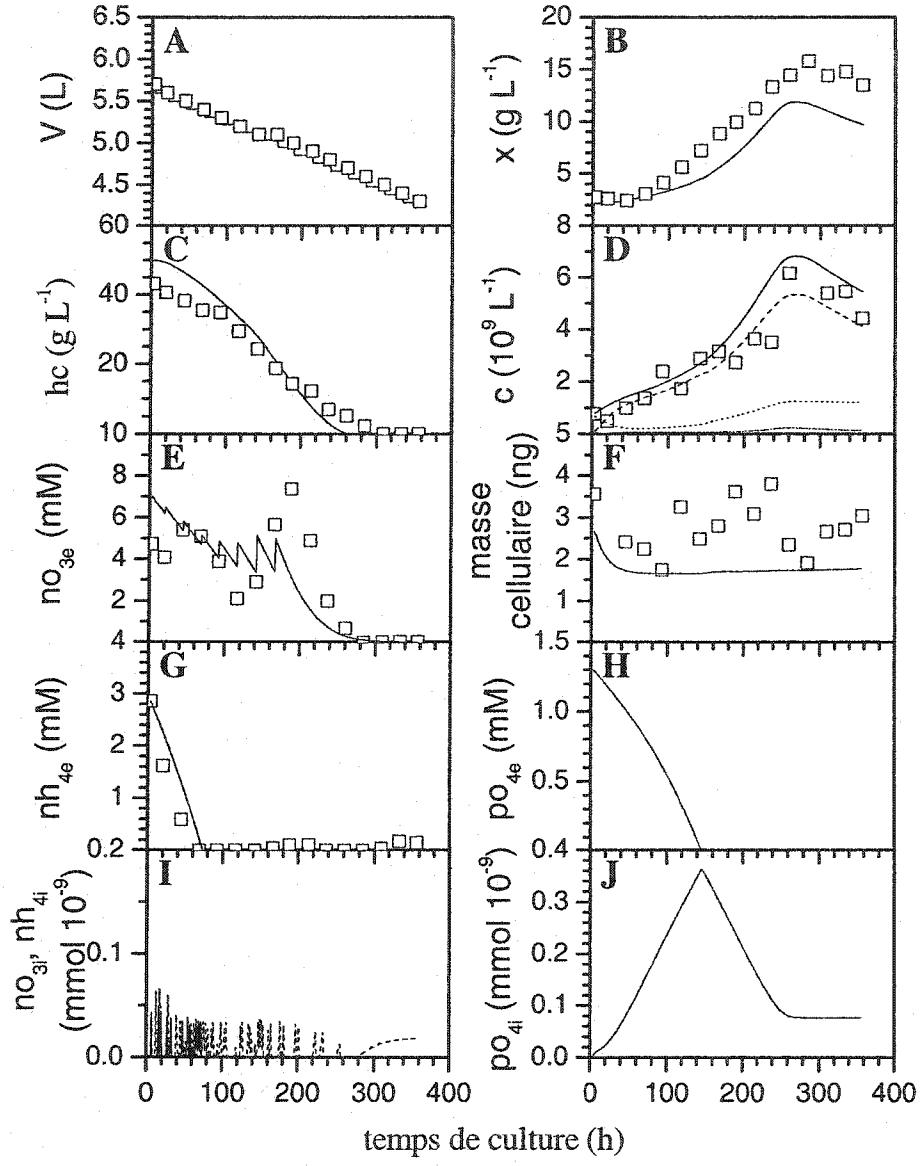


Figure M.12: **Estimations de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture 5SH23 par le modèle de croissance cellulaire. ☐ mesure expérimentale, — estimation. D. — Concentration cellulaire totale. ----- Cellules a····· Cellules bb. ----- Cellules cc. I. -----Nitrate intracellulaire, — Ammonium intracellulaire.**

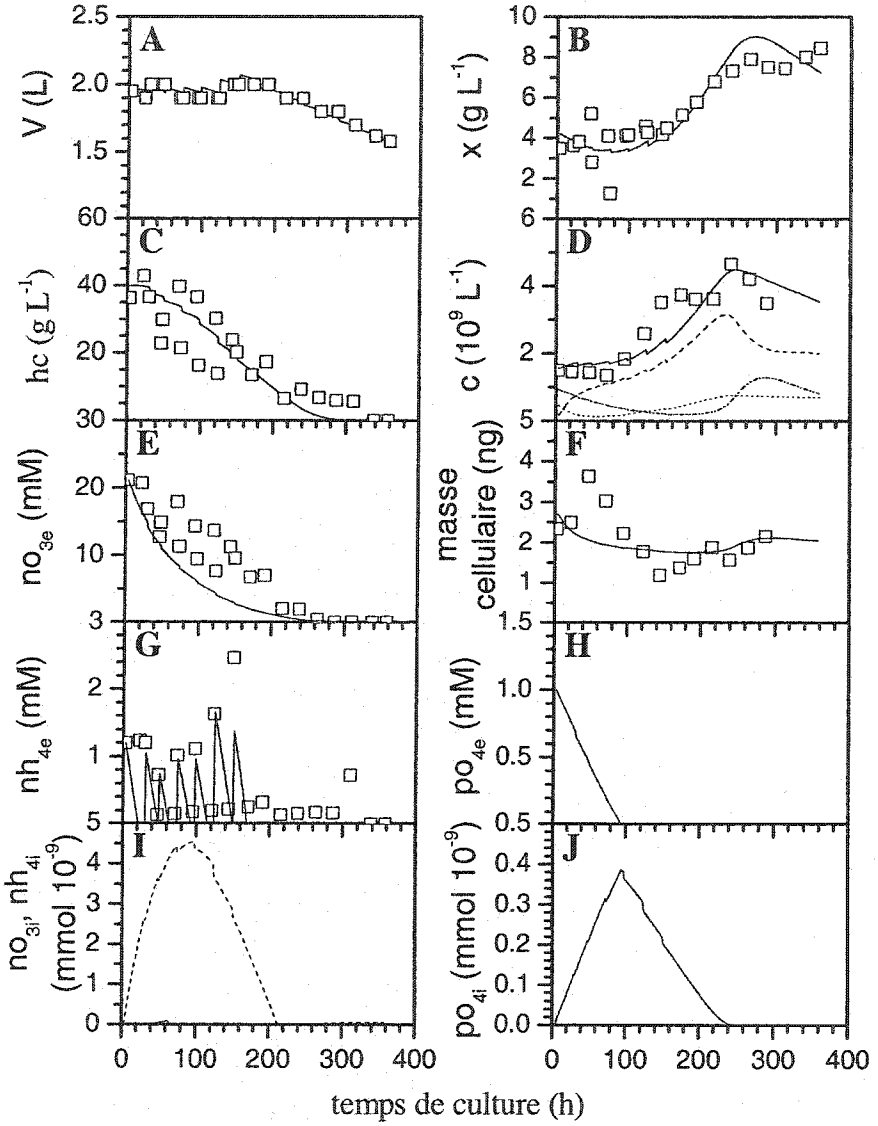


Figure M.13: **Estimations de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture 2SH24 par le modèle de croissance cellulaire. ☐ mesure expérimentale, — estimation. D. — Concentration cellulaire totale. ----- Cellules a····· Cellules bb. -·-·- Cellules cc. I. -----Nitrate intracellulaire, — Ammonium intracellulaire.**

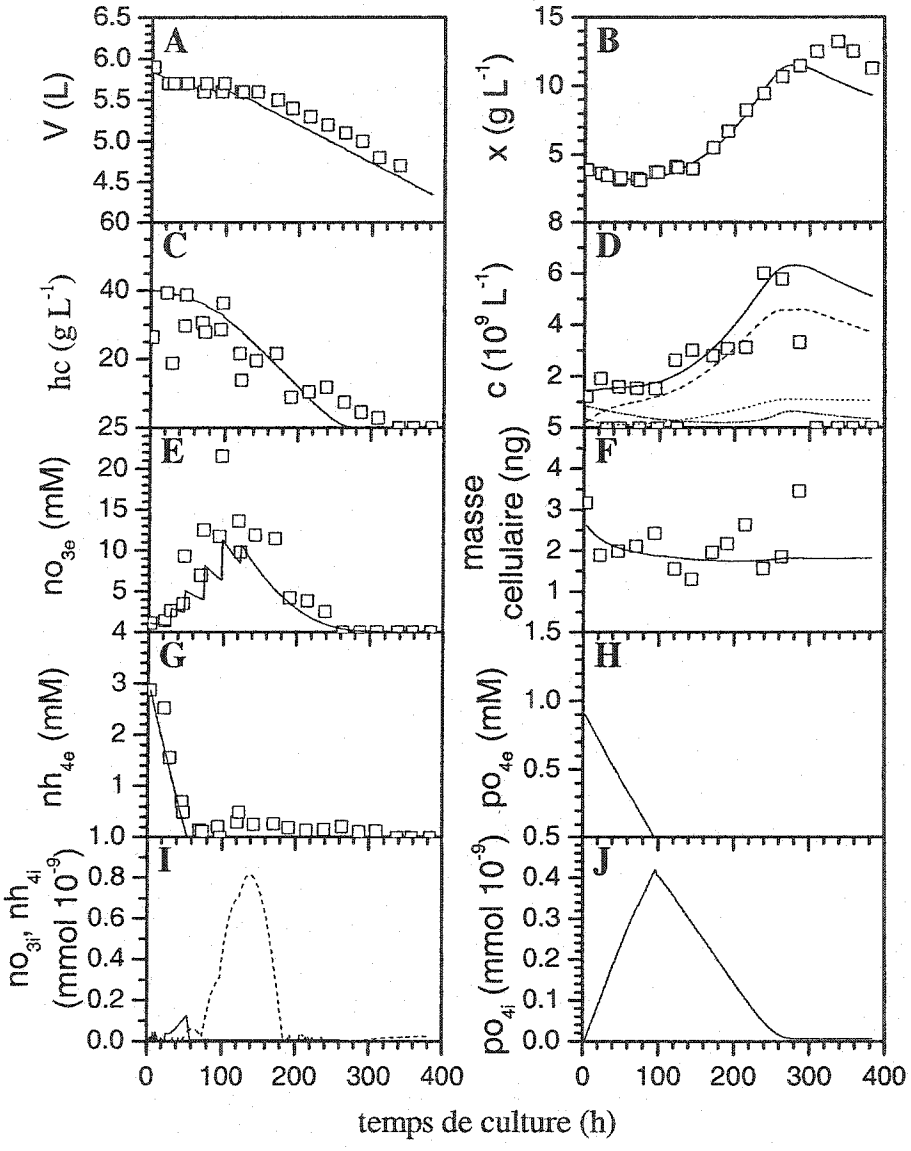


Figure M.14: **Estimations de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture 5SH25 par le modèle de croissance cellulaire. ☐ mesure expérimentale, — estimation. D. — Concentration cellulaire totale. ----- Cellules a····· Cellules bb. ----- Cellules cc. I. -----Nitrate intracellulaire, — Ammonium intracellulaire.**

Annexe N

Estimations de la croissance de cultures de cellules végétales post-développement à l'aide du modèle cellulaire

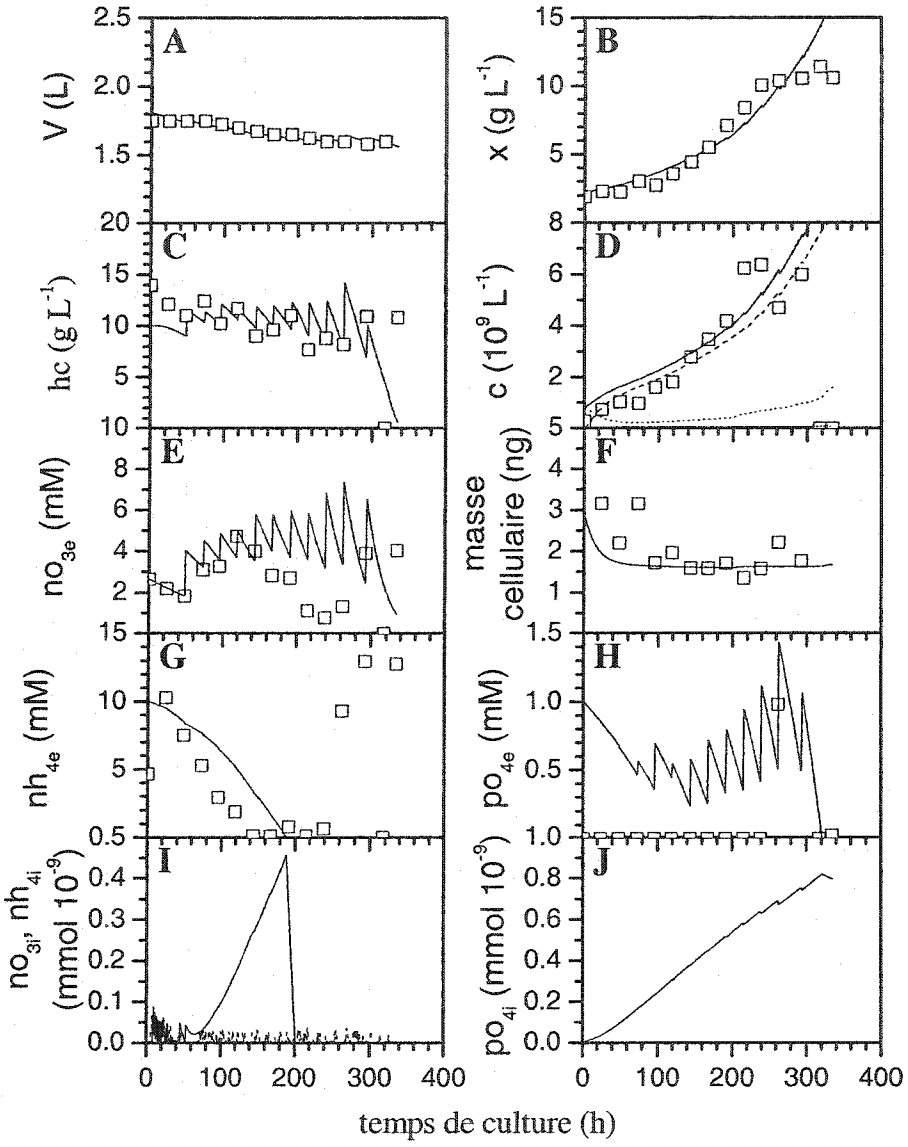


Figure N.1: **Estimations de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture 2SH35 par le modèle de croissance cellulaire. ☐ mesure expérimentale, — estimation. D. — Concentration cellulaire totale. ----- Cellules a····· Cellules bb. ----- Cellules cc. I. -----Nitrate intracellulaire, — Ammonium intracellulaire.**

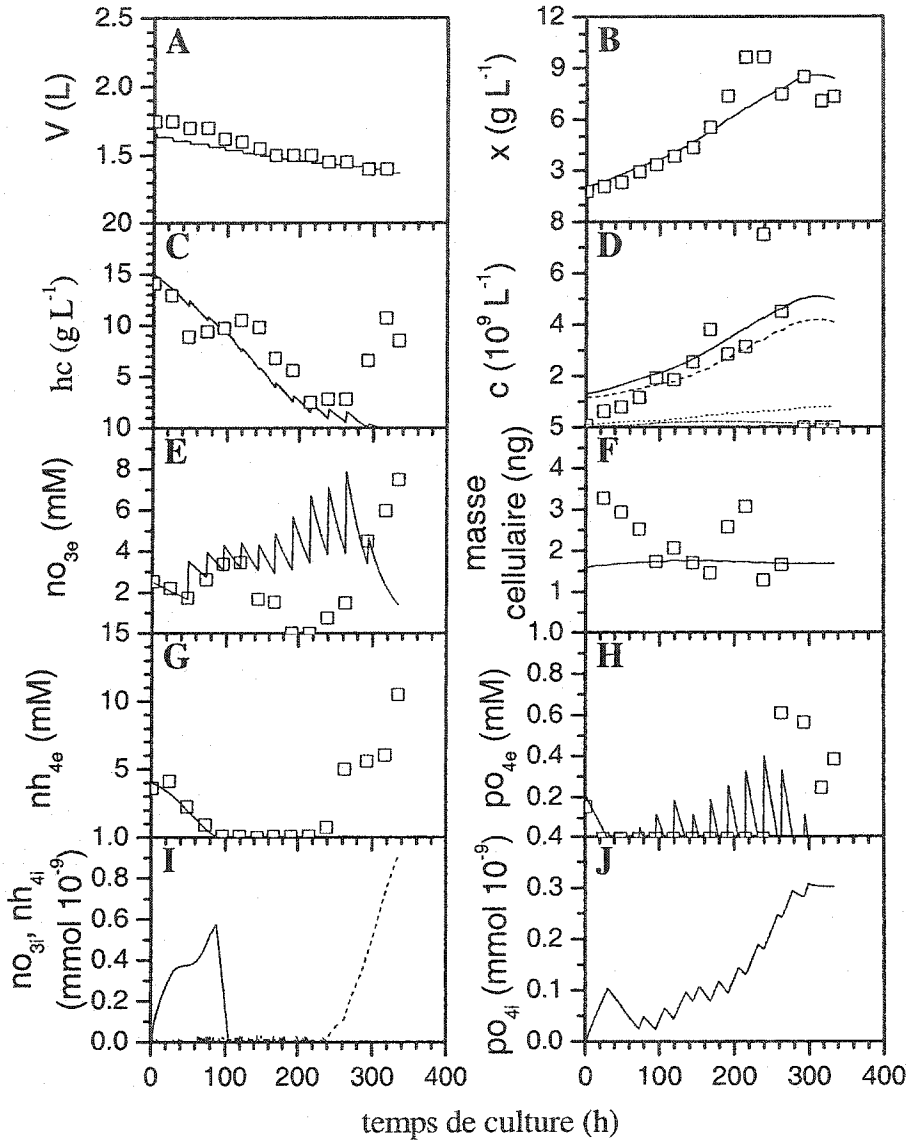


Figure N.2: **Estimations de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture 2SH37 par le modèle de croissance cellulaire. ☐ mesure expérimentale, — estimation. D. — Concentration cellulaire totale. ----- Cellules a····· Cellules bb. -·-·- Cellules cc. I. -----Nitrate intracellulaire, — Ammonium intracellulaire.**

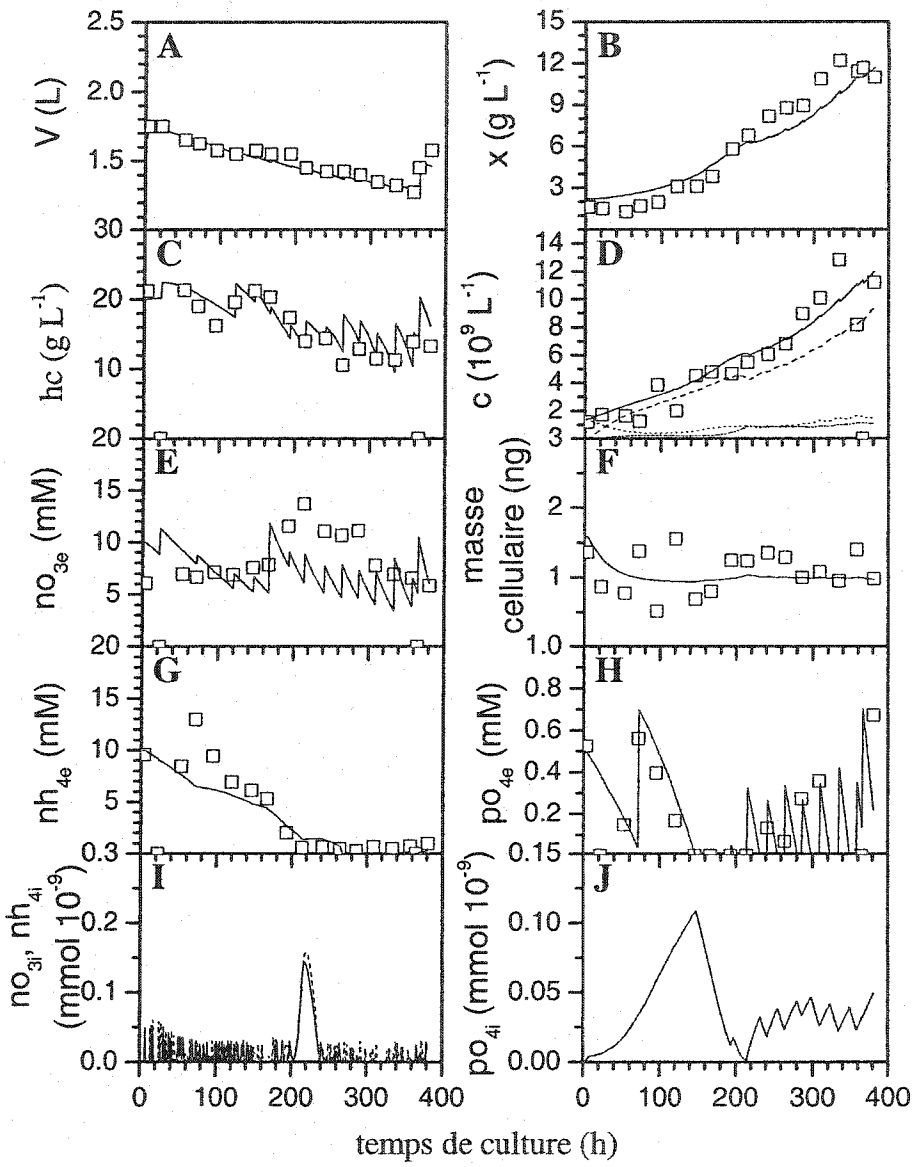


Figure N.3: **Estimations de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture 2SH40 par le modèle de croissance cellulaire. ☐ mesure expérimentale, — estimation. D. — Concentration cellulaire totale. ----- Cellules a····· Cellules bb. ----- Cellules cc. I. -----Nitrate intracellulaire, — Ammonium intracellulaire.**

Annexe O

Estimations de la croissance de cultures de cellules végétales en flacons à l'aide du modèle cellulaire

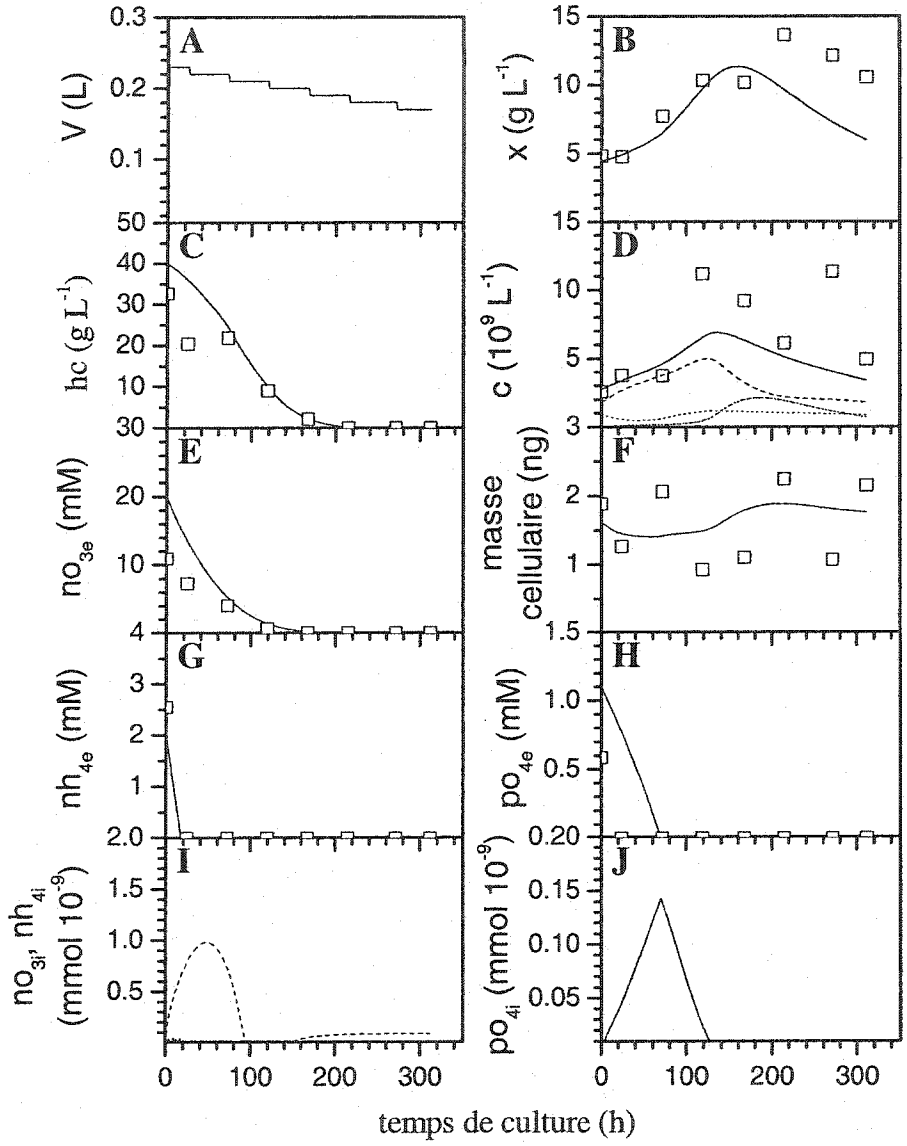


Figure O.1: **Estimations de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture-mère (J0) par le modèle de croissance cellulaire. ☐ mesure expérimentale, — estimation. D. — Concentration cellulaire totale. ----- Cellules a····· Cellules bb. ----- Cellules cc. I. -----Nitrate intracellulaire, — Ammonium intracellulaire.**

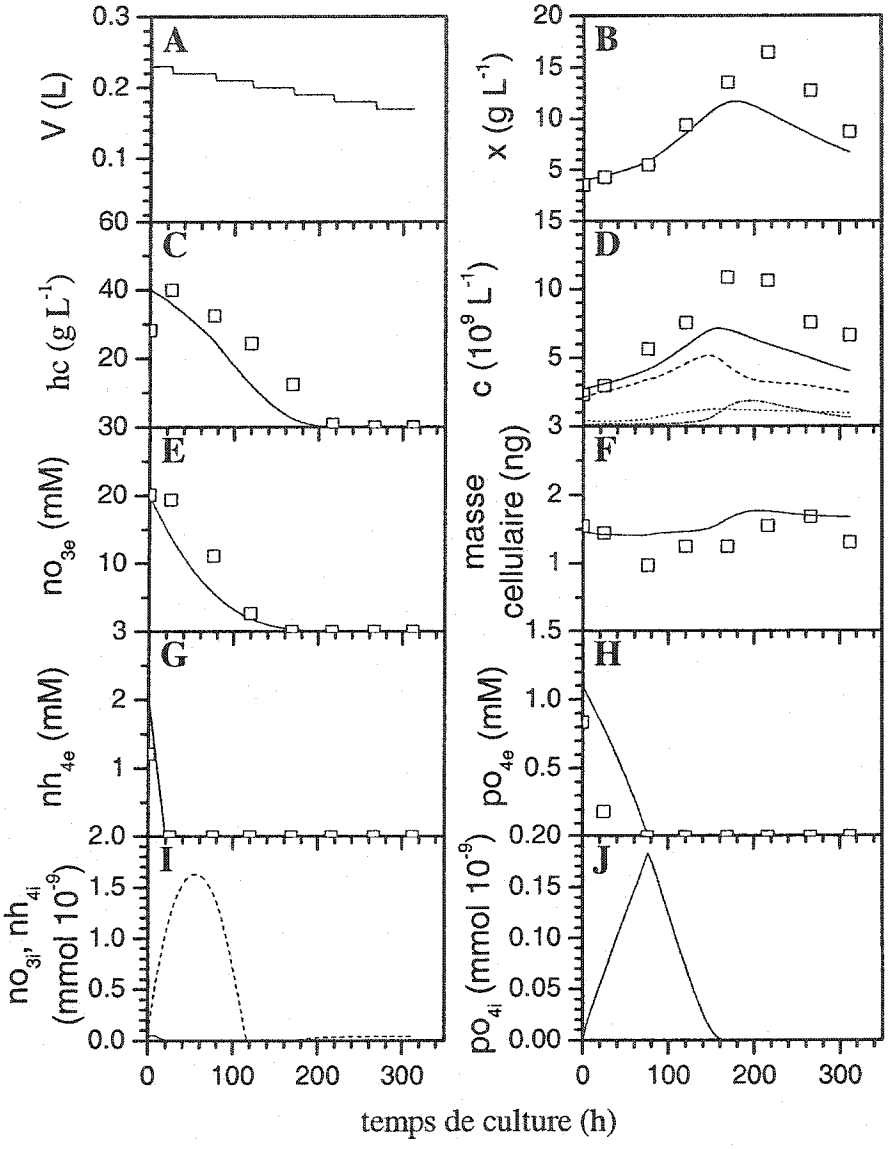


Figure O.2: **Estimations de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture-fille J1 par le modèle de croissance cellulaire. ☐ mesure expérimentale, — estimation. D. — Concentration cellulaire totale. ----- Cellules a····· Cellules bb. ·---· Cellules cc. I. -----Nitrate intracellulaire, — Ammonium intracellulaire.**

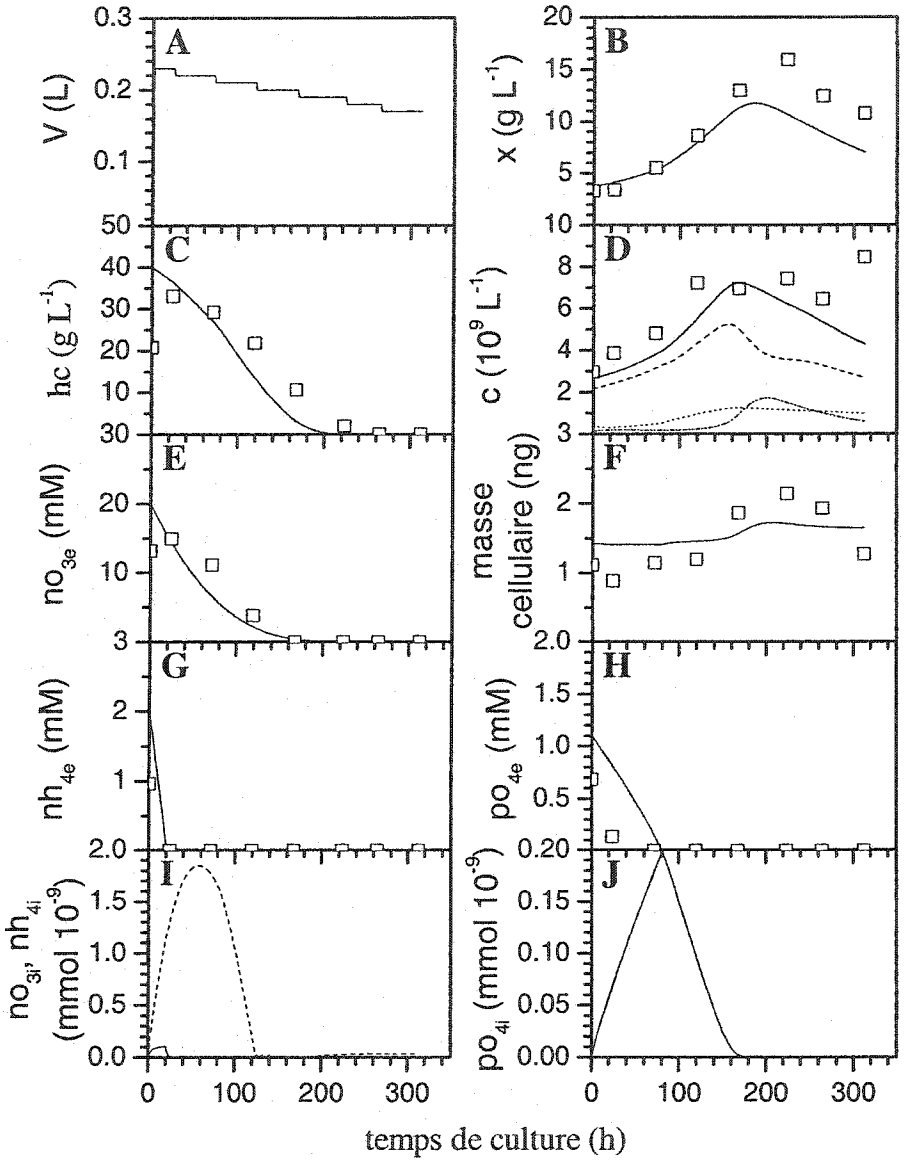


Figure O.3: **Estimations de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture-fille J2 par le modèle de croissance cellulaire. ☐ mesure expérimentale, — estimation. D. — Concentration cellulaire totale. ----- Cellules a····· Cellules bb. ----- Cellules cc. I. -----Nitrate intracellulaire, — Ammonium intracellulaire.**

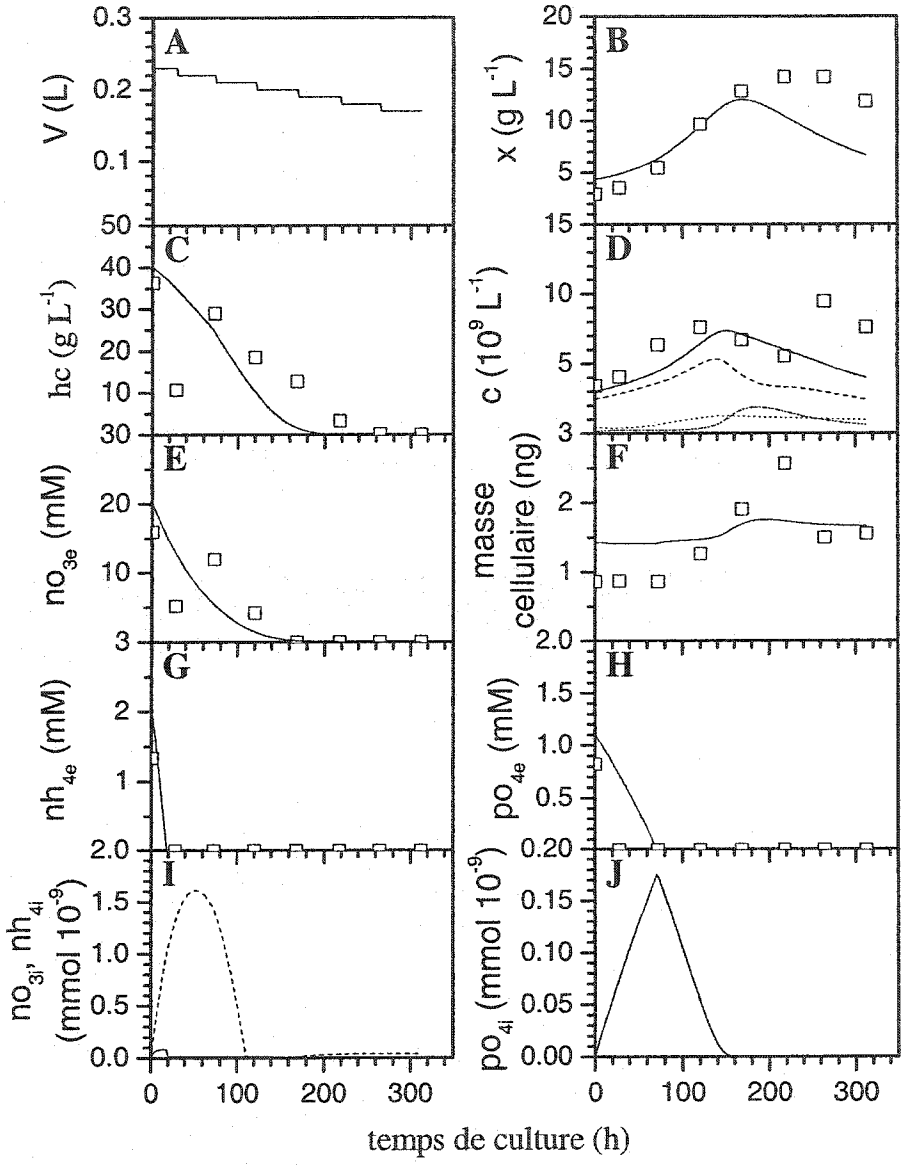


Figure O.4: **Estimations de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture-fille J3 par le modèle de croissance cellulaire. ☐ mesure expérimentale, — estimation. D. — Concentration cellulaire totale. ----- Cellules a····· Cellules bb. ····· Cellules cc. I. -----Nitrate intracellulaire, — Ammonium intracellulaire.**

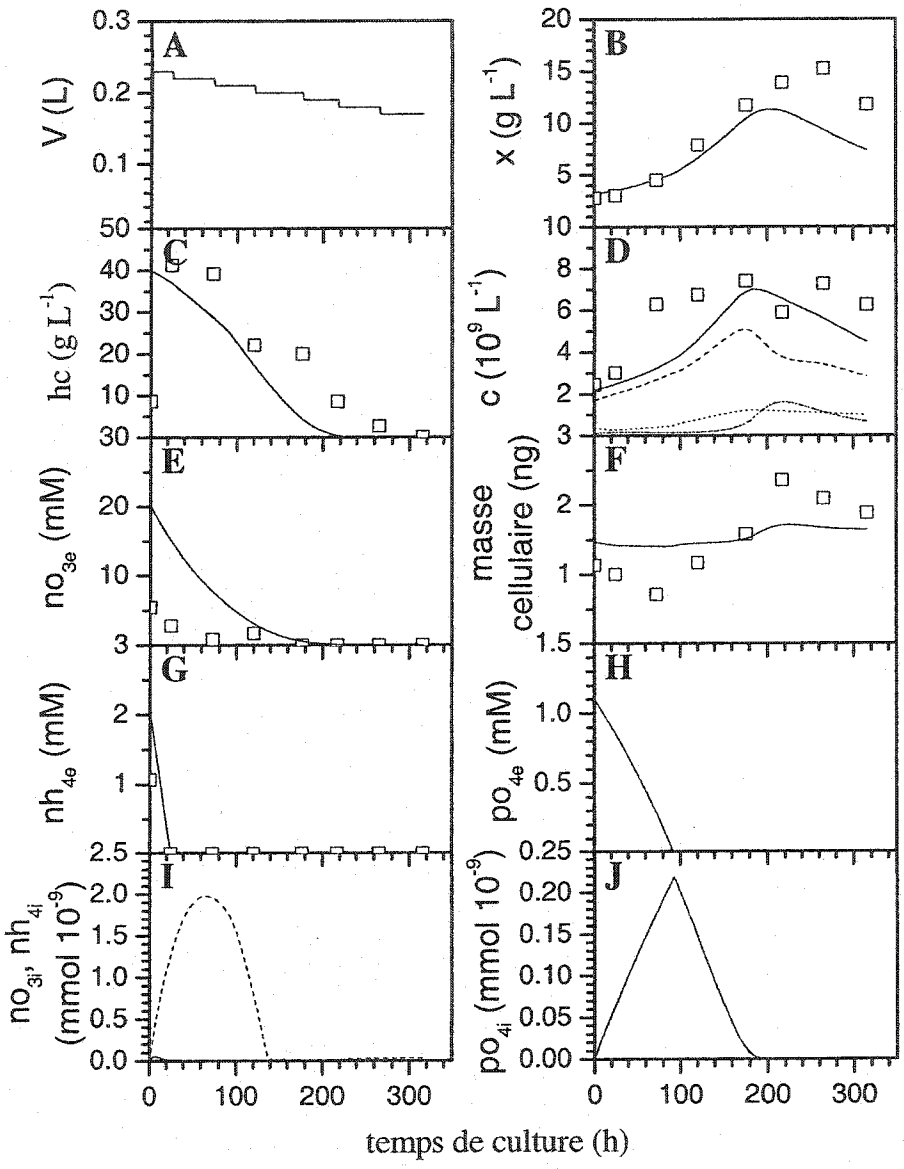


Figure O.5: **Estimations de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture-fille J4 par le modèle de croissance cellulaire. □ mesure expérimentale, — estimation. D. — Concentration cellulaire totale. ----- Cellules a····· Cellules bb. ····· Cellules cc. I. -----Nitrate intracellulaire, — Ammonium intracellulaire.**

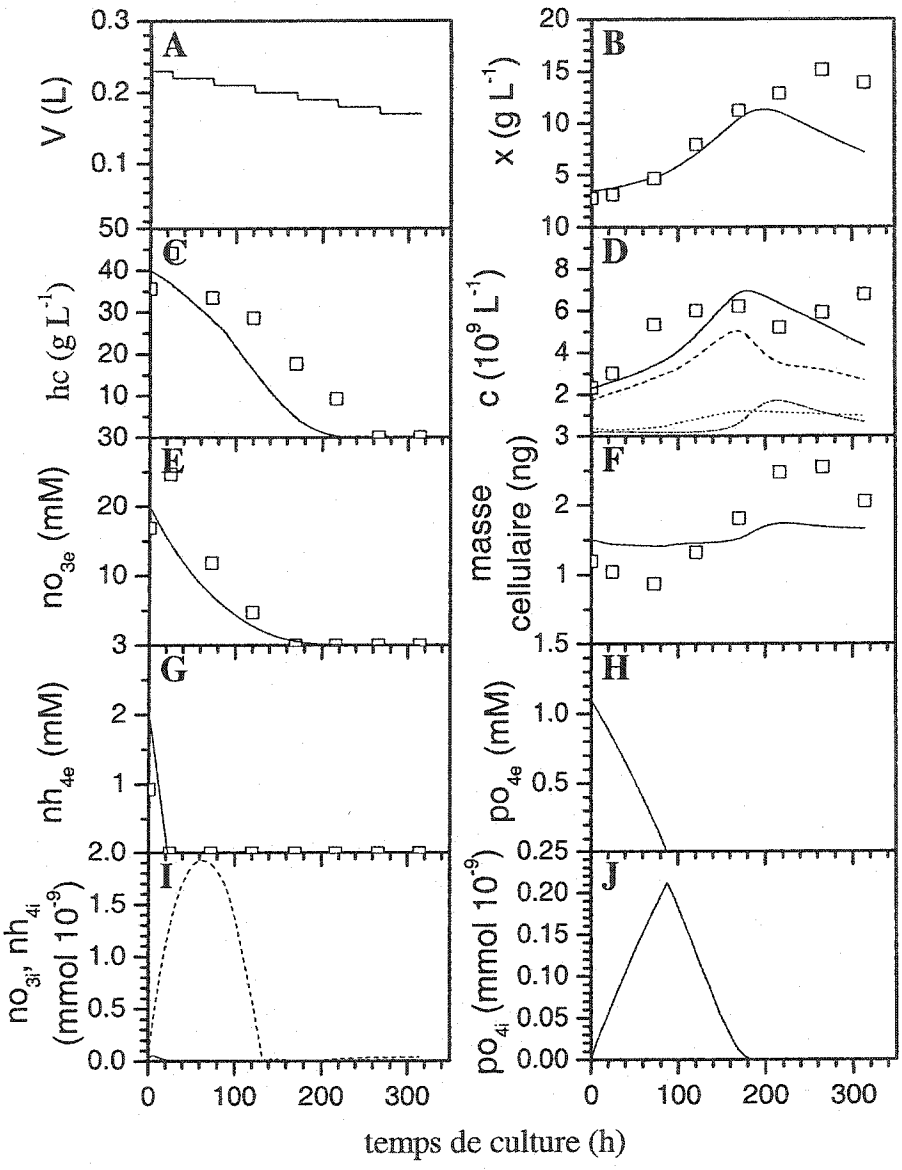


Figure O.6: **Estimations de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture-fille J5 par le modèle de croissance cellulaire. □ mesure expérimentale, — estimation. D. — Concentration cellulaire totale. ----- Cellules a····· Cellules bb. ····· Cellules cc. I. -----Nitrate intracellulaire, — Ammonium intracellulaire.**

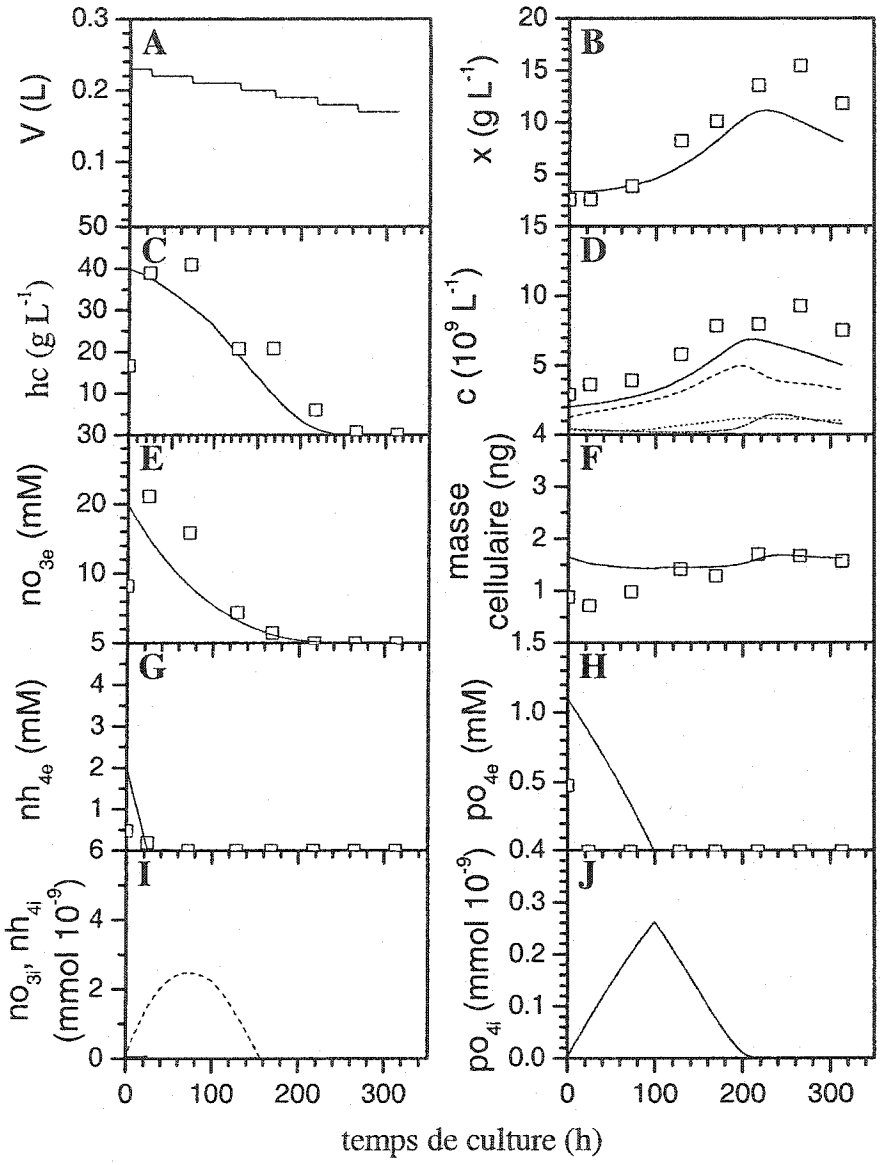


Figure O.7: **Estimations de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture-fille J6 par le modèle de croissance cellulaire. ☐ mesure expérimentale, — estimation. D. — Concentration cellulaire totale. ----- Cellules a····· Cellules bb. ----- Cellules cc. I. -----Nitrate intracellulaire, — Ammonium intracellulaire.**

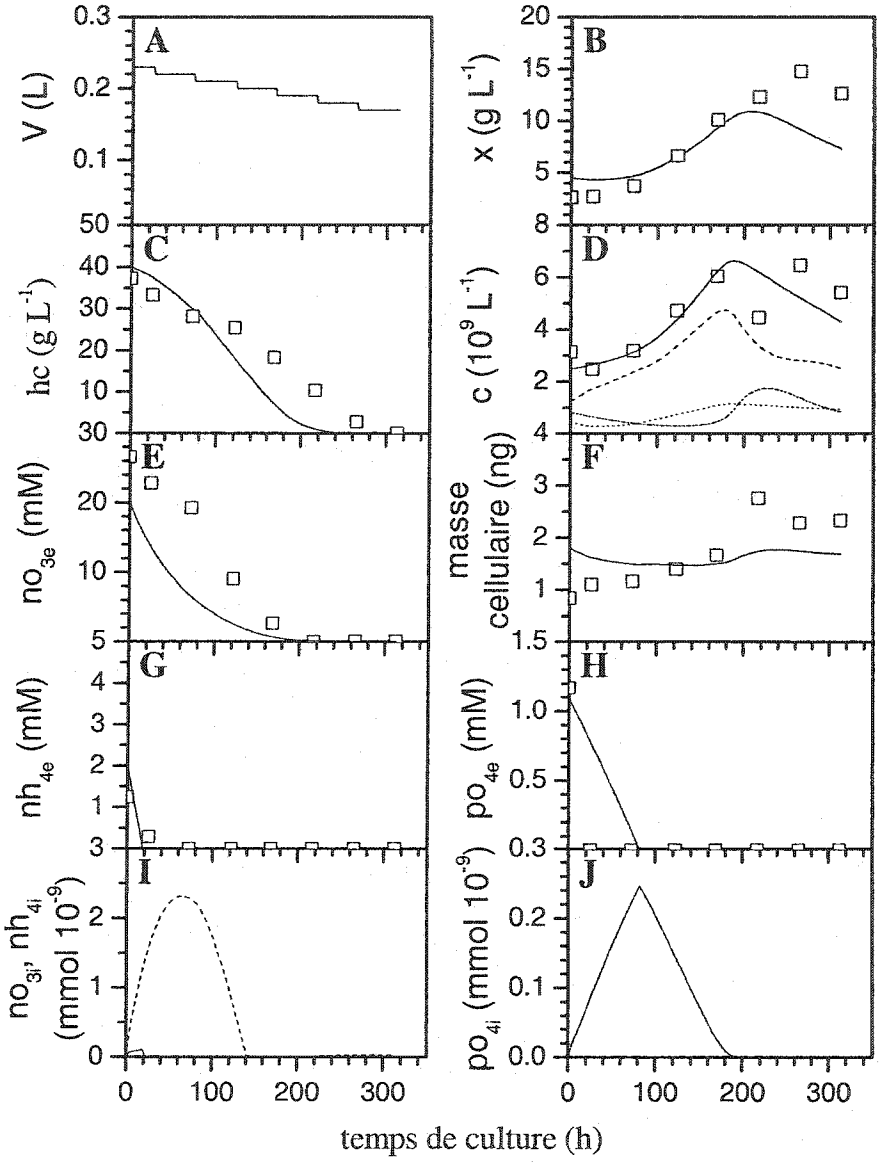


Figure O.8: **Estimations de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture-fille J7 par le modèle de croissance cellulaire. ☐ mesure expérimentale, — estimation. D. — Concentration cellulaire totale. ----- Cellules a····· Cellules bb. ----- Cellules cc. I. -----Nitrate intracellulaire, — Ammonium intracellulaire.**

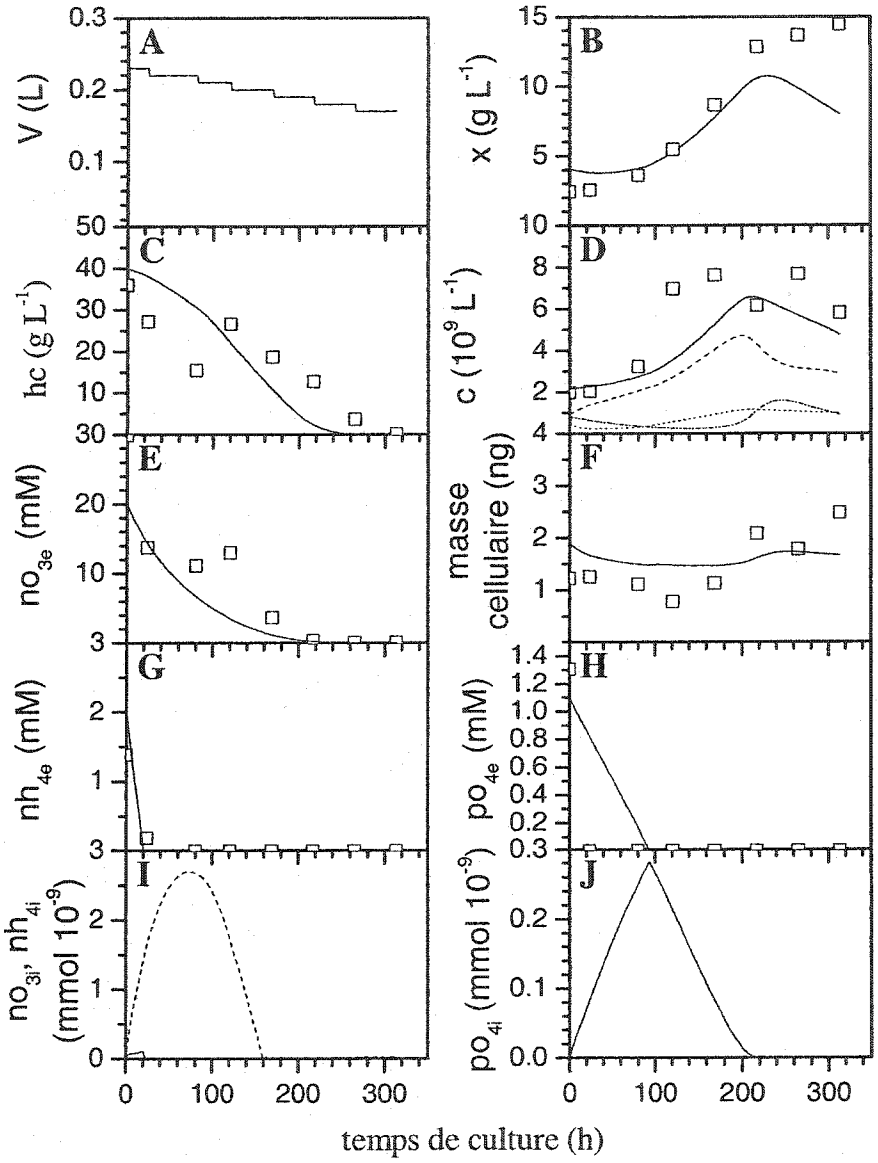


Figure O.9: **Estimations de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture-fille J8 par le modèle de croissance cellulaire. ☐ mesure expérimentale, — estimation. D. — Concentration cellulaire totale. ----- Cellules a····· Cellules bb. ----- Cellules cc. I. -----Nitrate intracellulaire, — Ammonium intracellulaire.**

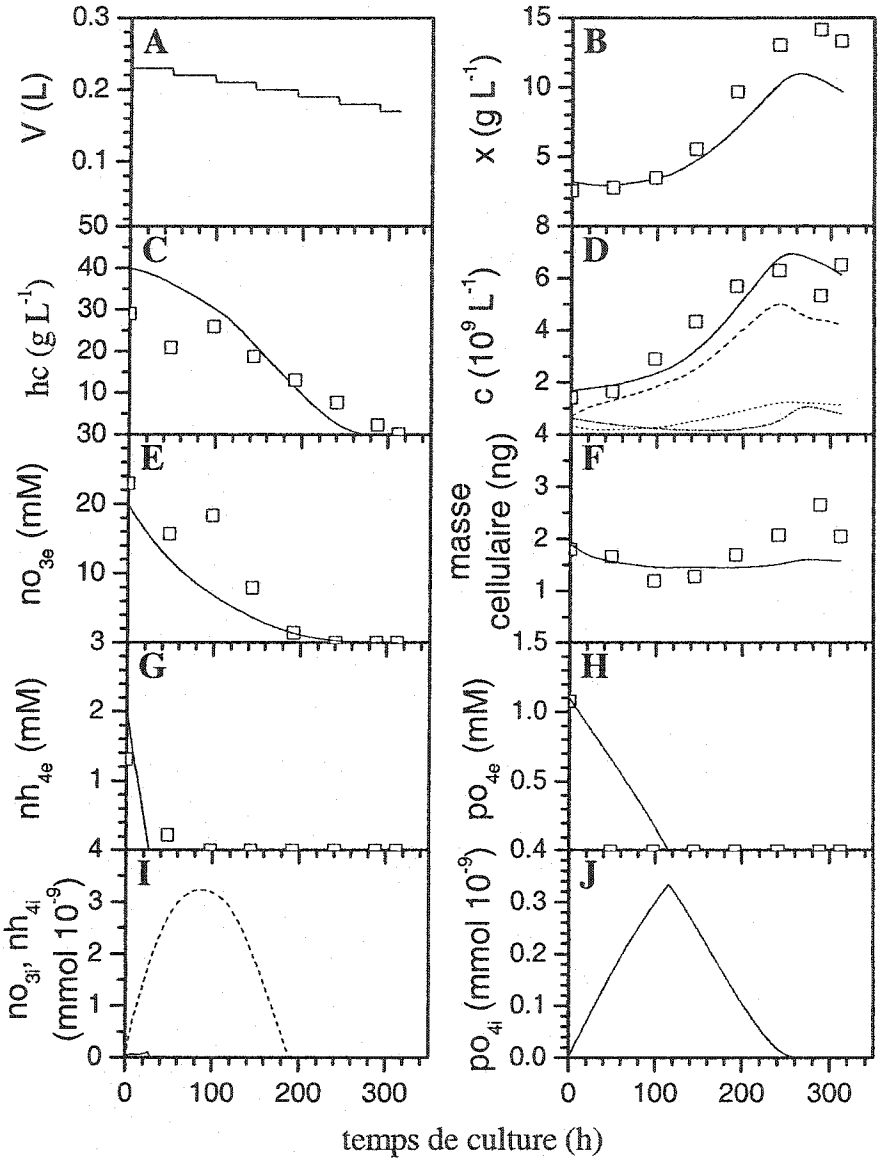


Figure O.10: **Estimations de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture-fille J9 par le modèle de croissance cellulaire. ☐ mesure expérimentale, — estimation. D. — Concentration cellulaire totale. ----- Cellules a····· Cellules bb. ····· Cellules cc. I. -----Nitrate intracellulaire, —Ammonium intracellulaire.**

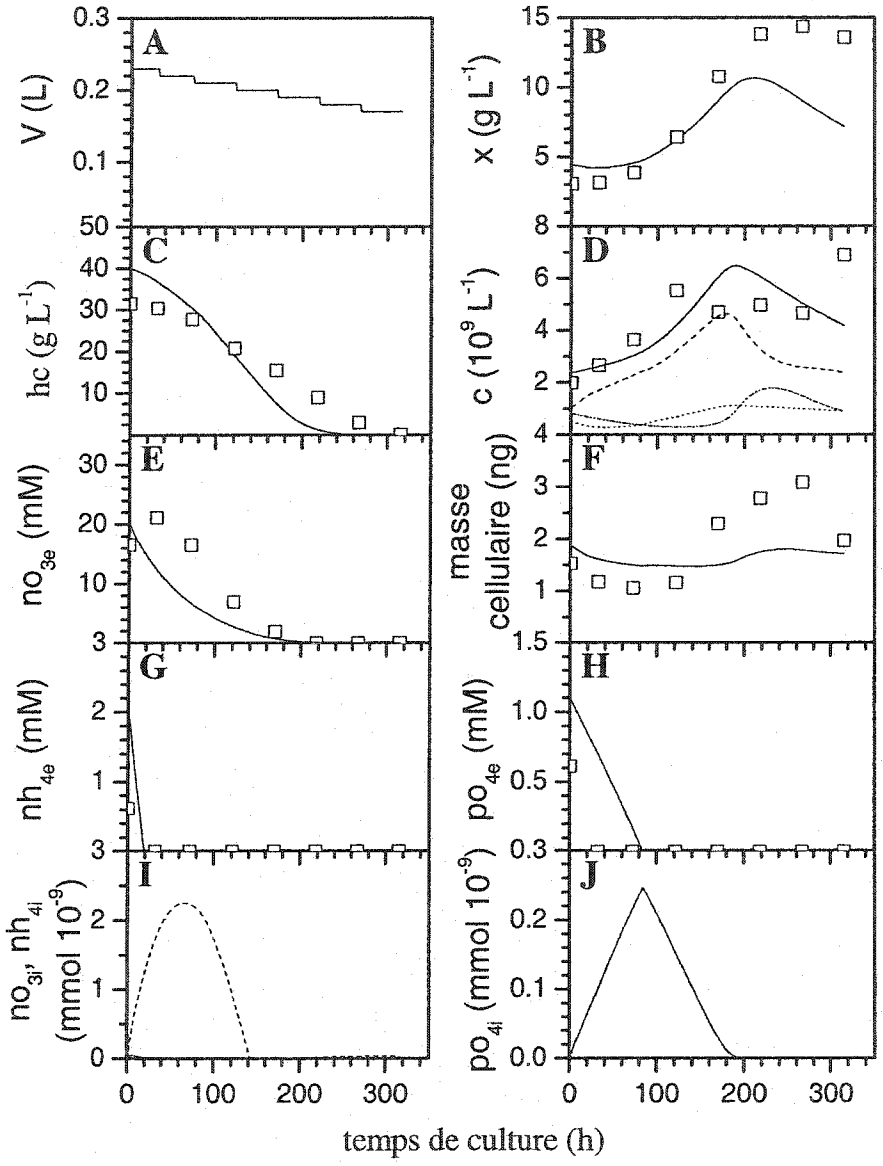


Figure O.11: **Estimations de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture-fille J10 par le modèle de croissance cellulaire. □ mesure expérimentale, — estimation. D. — Concentration cellulaire totale. ----- Cellules a····· Cellules bb. ····· Cellules cc. I. -----Nitrate intracellulaire, — Ammonium intracellulaire.**

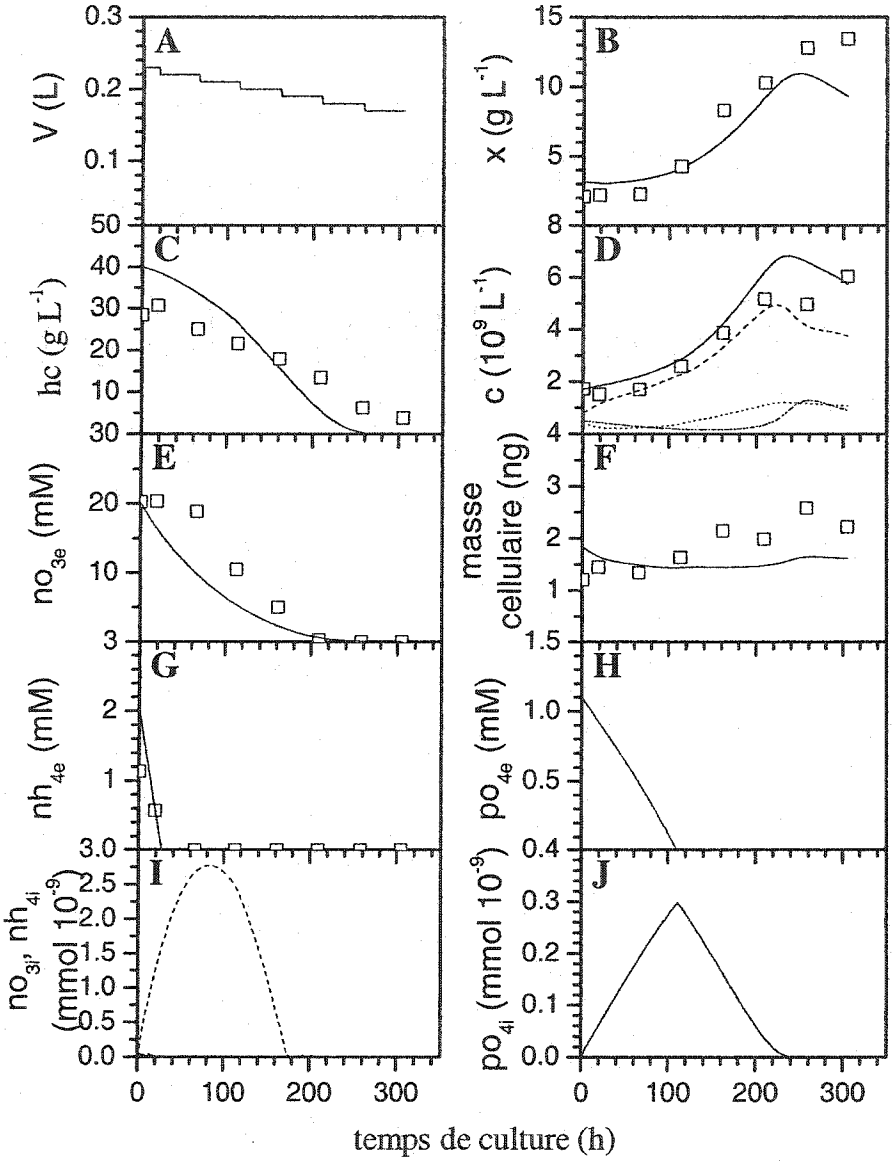


Figure O.12: **Estimations de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture-fille J11 par le modèle de croissance cellulaire. □ mesure expérimentale, — estimation. D. — Concentration cellulaire totale. ----- Cellules a····· Cellules bb. ----- Cellules cc. I. -----Nitrate intracellulaire, — Ammonium intracellulaire.**

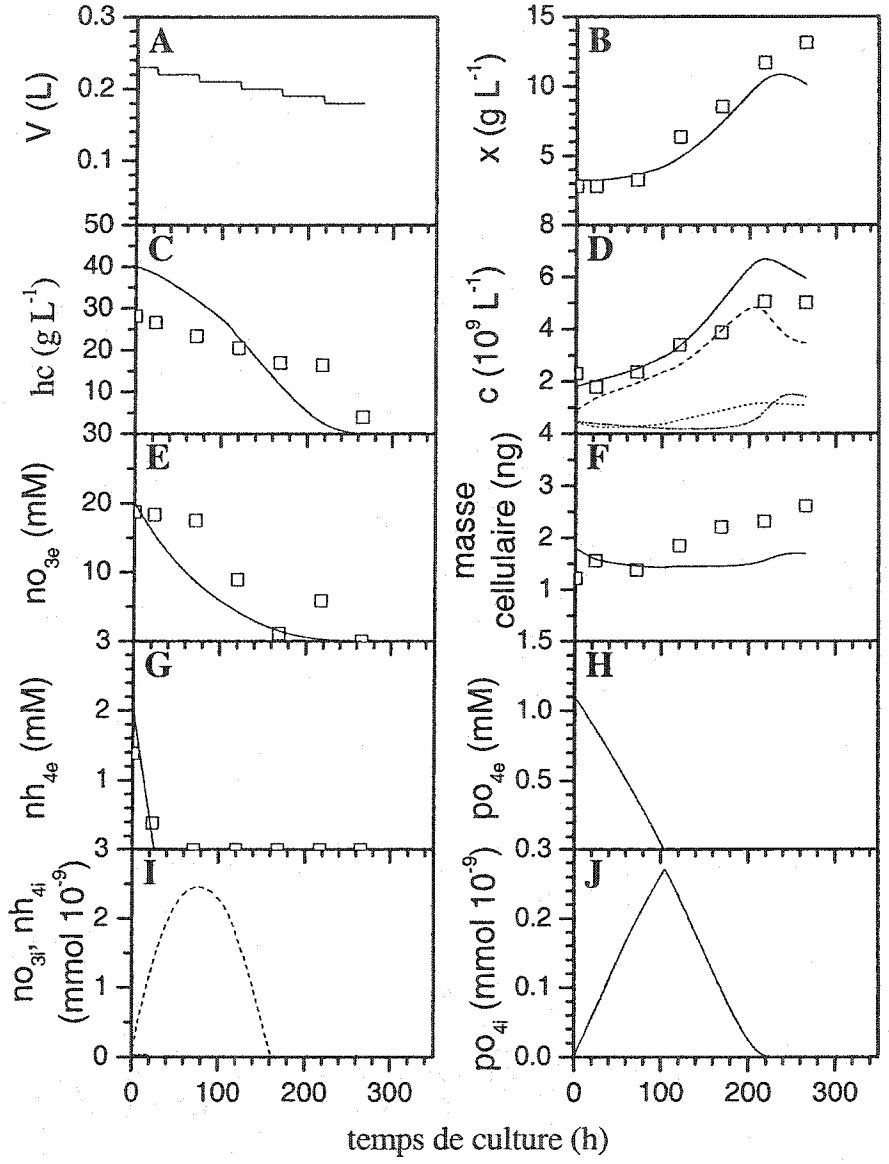


Figure O.13: **Estimations de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture-fille J12 par le modèle de croissance cellulaire. ☐ mesure expérimentale, — estimation. D. — Concentration cellulaire totale. ----- Cellules a····· Cellules bb. ····· Cellules cc. I. -----Nitrate intracellulaire, — Ammonium intracellulaire.**

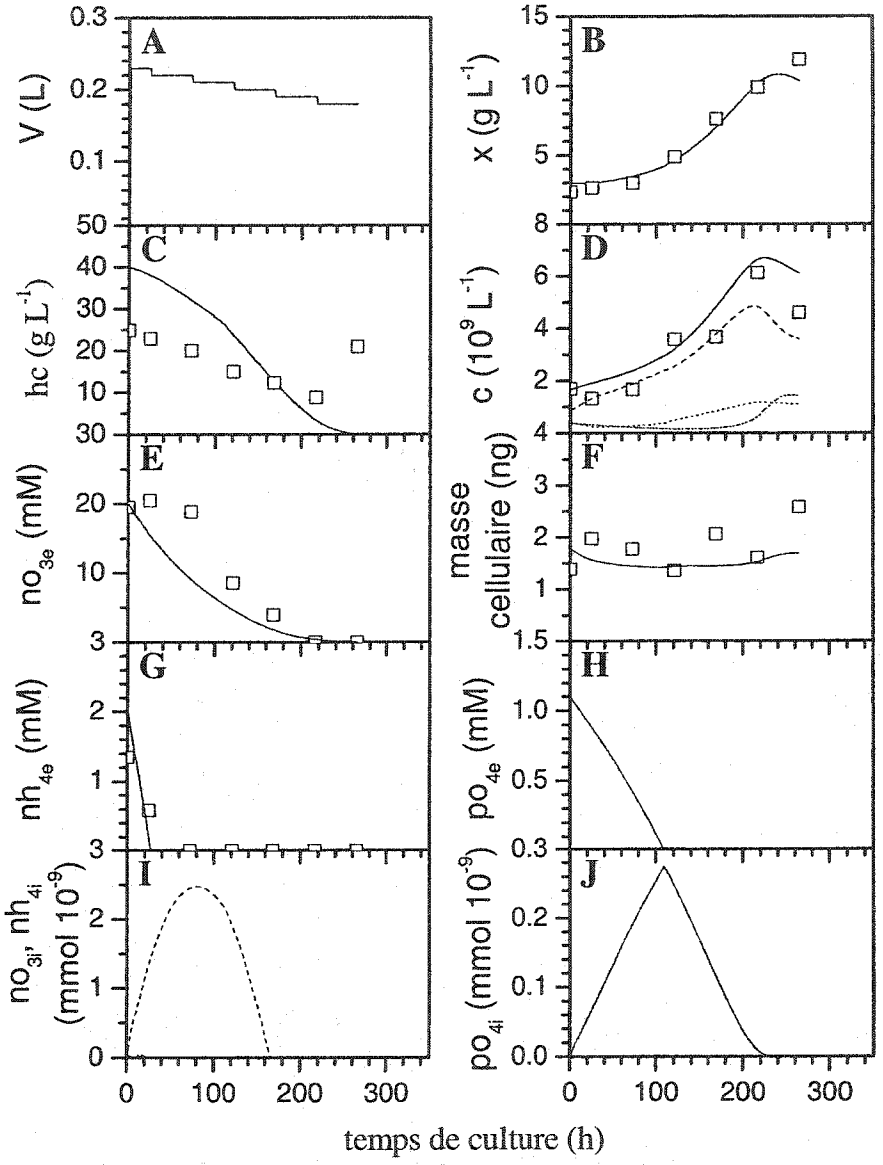


Figure O.14: **Estimations de variables de croissance et de concentrations nutritionnelles pour la culture-fille J13 par le modèle de croissance cellulaire. □ mesure expérimentale, — estimation. D. — Concentration cellulaire totale. ----- Cellules a····· Cellules bb. ----- Cellules cc. I. -----Nitrate intracellulaire, — Ammonium intracellulaire.**

Annexe P

Comparaison des estimations de la croissance de cultures de cellules végétales par les modèlesnon ségrégué, physiologique et cellulaire

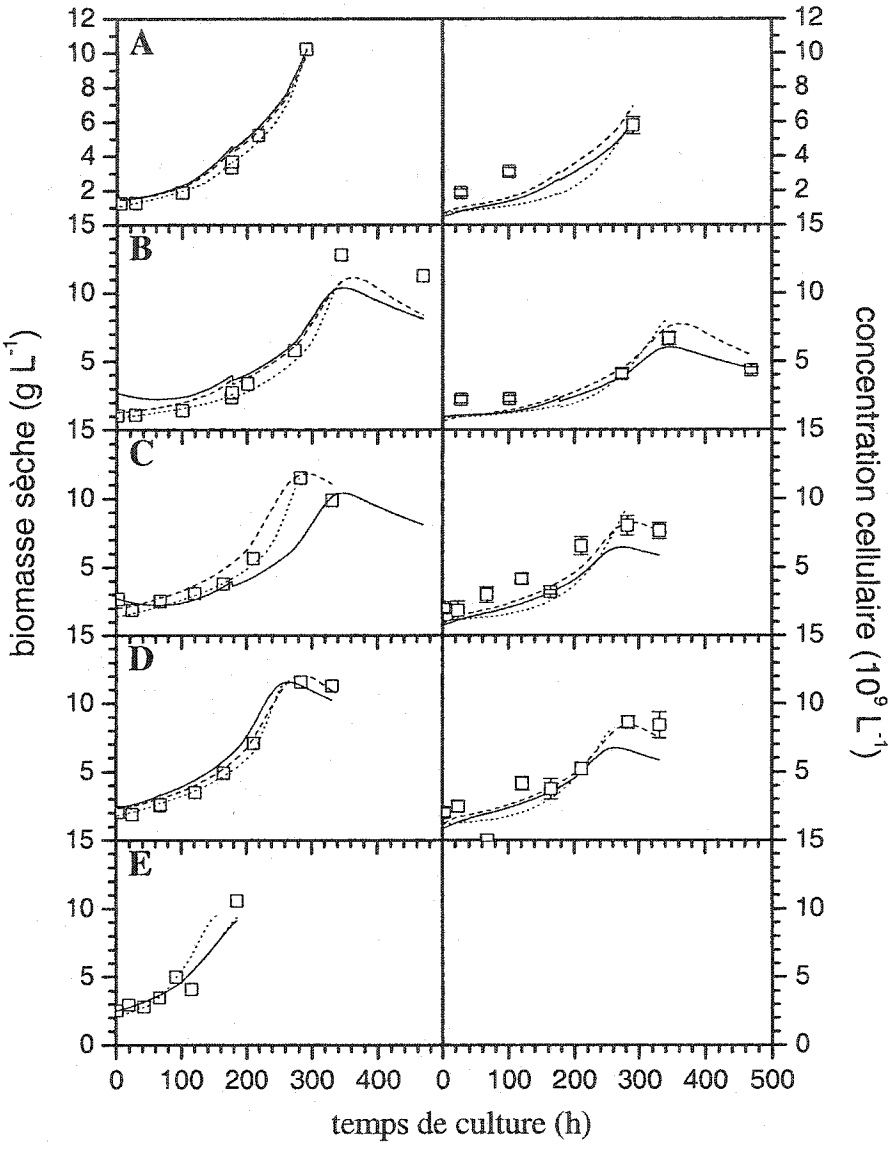


Figure P.1: **Comparaison des estimations des variables de croissance des cultures 2SH8 à 2SH12 par les trois modèles de croissance. ☐ mesure expérimentale, ····· modèle non-ségrégué, ----- modèle physiologique, — modèle cellulaire. A. 2SH8, B. 5SH9, C. 2SH10, D. 5SH11, E. 2SH12.**

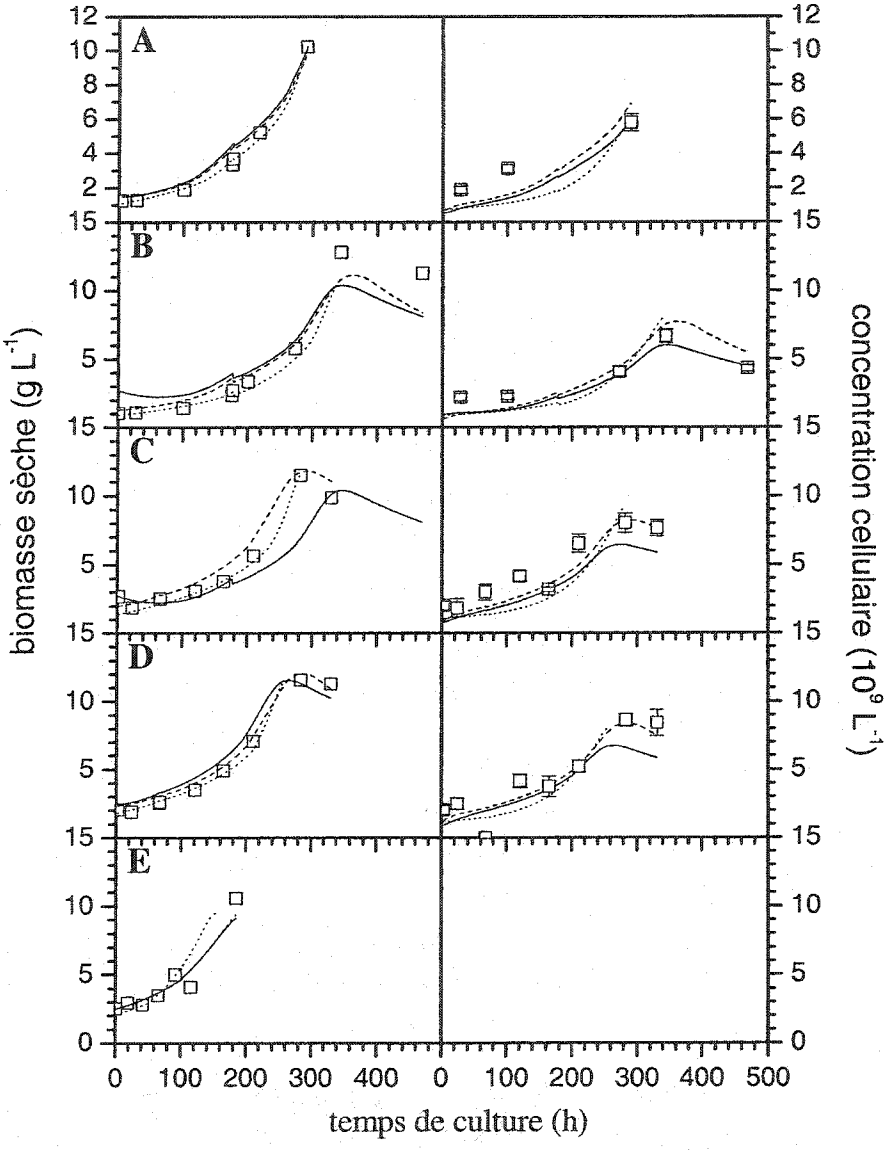


Figure P.2: **Comparaison des estimations des variables de croissance des cultures 5SH13 à 5SH21 par les trois modèles de croissance. ☐ mesure expérimentale, ····· modèle non-ségrégué, ----- modèle physiologique, — modèle cellulaire. A. 5SH13, B. 2SH16, C. 5SH17, D. 2SH20, E. 5SH21.**

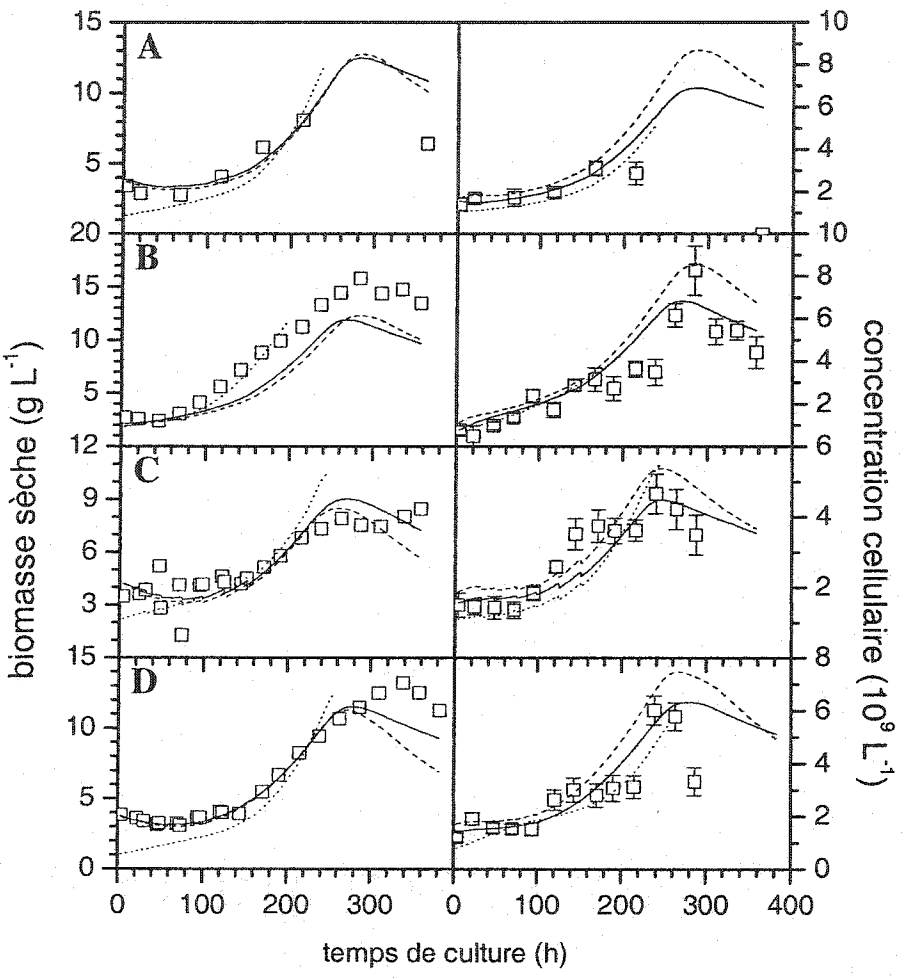


Figure P.3: **Comparaison des estimations des variables de croissance des cultures 2SH22 à 5SH25 par les trois modèles de croissance. ☐ mesure expérimentale, ····· modèle non-ségrégué, ----- modèle physiologique, — modèle cellulaire. A. 2SH22, B. 5SH23, C. 2SH24, D. 5SH25.**