

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

DÉVELOPPEMENT D'UN MODÈLE BIOGINÉTIQUE DU MÉTABOLISME
PRIMAIRE DE *CATHARANTHUS ROSEUS*

MATHIEU LEDUC

DÉPARTEMENT DE GÉNIE CHIMIQUE
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLÔME DE MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES
(GÉNIE CHIMIQUE)
JANVIER 2004



National Library
of Canada

Bibliothèque nationale
du Canada

Acquisitions and
Bibliographic Services

Acquisitions et
services bibliographiques

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

ISBN: 0-612-90841-0

Our file Notre référence

ISBN: 0-612-90841-0

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

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

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

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

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

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

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

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

Canada

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé:

DÉVELOPPEMENT D'UN MODÈLE BIOCINÉTIQUE DU MÉTABOLISME
PRIMAIRE DE *CATHARANTHUS ROSEUS*

présenté par: LEDUC Mathieu

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

a été présenté au jury d'examen constitué de:

M. LEGROS Robert, Ph.D., président

M. RIVOAL Jean, Ph.D., membre

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

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

À Susie

Remerciements

Comme je risque d'oublier quelques personnes dans cette section si j'y effectue une énumération, je tiens à offrir mes remerciements à toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à mes travaux.

Résumé

Catharanthus roseus, la pervenche du Madagascar, est la source de plusieurs alcaloïdes utilisés comme agents pharmaceutiques. Les plus importants sont la vinblastine et la vincristine qui sont principalement utilisées pour traiter la maladie d'Hodgkin, les stades avancés des cancers des testicules et du sein ainsi que la leucémie. On retrouve aussi des agents antihypertenseurs tels que l'ajmalicine et la serpentine. À ce jour, malgré les nombreuses recherches faites sur cette plante, les alcaloïdes sont toujours extraits de plantes entières, car les cultures de cellules *in vitro* n'ont pas produit de résultats satisfaisants. Ces dernières n'ont que de faibles rendements et leur reproductibilité reste faible. Dans le but d'étudier ces limitations, la modélisation mathématique du métabolisme de cellules de plante en conditions *in vitro* pourrait être un atout important pour améliorer la productivité et la reproductibilité d'un procédé de production. Un modèle pourrait éventuellement permettre d'identifier les voies métaboliques limitant la production d'alcaloïdes. De plus, en assurant un meilleur contrôle de l'état nutritionnel des cellules, la reproductibilité des cultures pourrait être augmentée. Ainsi, le présent mémoire présente la validation d'un modèle mathématique décrivant le métabolisme primaire de *C. roseus* qui pourrait être étendu au métabolisme secondaire dans le cadre de projets futurs. Le modèle présenté dans ce mémoire poursuit les travaux effectués lors des travaux de maîtrise de Cyril Tikhomiroff (2001). Ce modèle inclus 68 bilans

autour de divers métabolites, nutriments et navettes énergétiques dont 27 sont considérées. Vingt bilans décrivent le sous-réseau métabolique stationnaire (SPMP). Ces réactions ont été obtenues en considérant que les intermédiaires du SPMP sont à concentrations constantes. Par contre, les bassins de nutriments alimentant ces réactions sont dynamiques. Vingt et une autres réactions sont utilisées par le sous-réseau métabolique transitoire primaire (SMTP). Ce dernier regroupe la dégradation des molécules, l'absorption des nutriments, le transport entre le cytosol et la vacuole et la respiration. Quarante-six autres réactions sont utilisées par le sous-réseau métabolique transitoire secondaire (SMTS). Ce dernier prend en charge les voies du métabolisme secondaire.

Finalement, la dernière réaction intracellulaire décrit la croissance des cellules à partir des macromolécules. Ainsi, contrairement à la très grande majorité des modèles présentés dans la littérature, les nutriments (phosphate inorganique, nitrate, sucres) sont d'abord transformés en macromolécules (acides aminés, acides organiques, phosphates organiques, lipides et hexoses structuraux) avant d'être utilisés pour la croissance. De plus, le modèle utilise les navettes énergétiques (NTP/NDP , NAD^+/NADH et $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$) pour fin de régulation des réactions biocinétiques. Les sommes des concentrations de chacun de ces couples de navettes énergétiques ont été considérées constantes par cellule.

Les paramètres jugés optimaux ont été obtenus en minimisant l'erreur entre les données expérimentales (deux cultures en boîtes de Pétri : une cuvée et une

cuvée-alimentée) et les simulations. Une analyse de sensibilité faite sur ces paramètres démontre que l'erreur peut encore être diminuée pour la culture en mode cuvée ou en mode semi-cuvée, mais non pour les deux cultures simultanément. Les paramètres obtenus dans ce modèle sont dans les plages de ceux cités dans la littérature.

La simulation de la croissance pour les deux types de cultures a été effectuée avec succès. De plus, le plateau observé lors de la culture en mode cuvée a pu être reproduit lors de la simulation. Le calcul de la croissance en fonction de macromolécules au lieu des nutriments semble être performant. La plupart des données expérimentales ont été simulées avec succès. Par contre, quelques nutriments et métabolites ont été surestimés (acides aminés, nitrate, ammonium) et d'autres sous-estimés (glucose, fructose). Le fait que le modèle ne fasse pas la distinction entre les nutriments entreposés dans la vacuole et ceux disponibles dans le cytosol ne semble pas affecté la véracité du modèle. De plus, l'utilisation de fonctions décisionnelles tenant compte de l'accumulation de nutriments, de cosubstrats et de navettes énergétiques semble être performant dans la simulation de la croissance et de la nutrition de *C. roseus*.

Abstract

Catharanthus roseus, Madagascar periwinkle, produces lot of alkaloids used as pharmaceutical agents. The most important of these are the vinblastine and the vincristine which are used to treat the Hodgkin disease, the advanced stages of testicular and breast cancer and the leukaemia. This organism is also a source for the antihypertensive agents ajmalicine and serpentine. To date, despite the numerous researches done on plant cells, alkaloids are still extracted from entire plants, because the *in vitro* culture of cells have not give the expected results. *In vitro* cultures only resulted in poor yield and lack of reproducibility. In the objective of studying these limitations, the mathematical modelization of plant cells metabolism cultivated *in vitro* could be an important asset to improve yield and reproducibility of a production process. A model could eventually allow to identify bottleneck metabolic pathways of the alkaloids production. Moreover, in assuring the control of the nutritional state of the cells, the reproducibility of the cultures could be significantly increased. Therefore, the present dissertation presents the validation of a mathematical model describing the primary metabolism of *C. roseus* which could be extended to its secondary metabolism in future works.

The model proposed here continues the work done in the master thesis of Cyril Tikhomiroff (2001). The model includes 68 mass balances around various metabolites, nutrients and energetic shuttles. Of these 68 mass balances 27

are considered. Twenty mass balances describe the stationary primary metabolism pathways (SPMP). These reactions were obtained considering that intermediates of SPMP have constant concentrations. On the other hand, nutrient pools feeding these reactions are dynamic. Twenty-one other reactions are used by the transient primary metabolic pathways (TPMP). They are responsible for molecules degradation, nutrients absorption, transport between cytosol and vacuole, and the respiration. Forty-six reactions are used by the transient secondary metabolic pathways (TSMP). This part of the model describes the secondary metabolism.

Finally, the last reaction describes the cell growth from macro-molecules. Therefore, contrary to the vast majority of models presented in the literature, the nutrients (inorganic phosphate, nitrate and carbohydrates) are first transformed into macro-molecules (amino acids, organic acids, organic phosphates, lipids, and structural hexoses) before being used for growth. Moreover, the model uses energetic shuttles (NTP/NDP , NAD^+/NADH and $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$) to regulate biokinetics reactions. The sum of concentrations of each of these energetic shuttles couple is taken as constant.

The simulations of two type of cultures (one batch and one fed-batch) were successfully done. The optimal parameters were obtained by minimising error between experimental data (obtained by two cultures in Petri dishes; one batch and one fed-batch) and the simulations taking care of the data having a lower experimental error (biomass, extracellular nitrate) compared with other data

(amino acids, intracellular nitrate, ammonium). The parameters obtained in this model were in the range of those found in literature.

The growth simulation for the two types of cultures has been done with success. Furthermore, the plateau observed in the batch culture has also been simulated. The computation of growth by mean of macromolecules instead of nutrients seems to be efficient. Most experimental has been followed with success. Some nutrients and metabolites have been overestimated (nitrate, ammonium, amino acids) and others underestimated (fructose and glucose). The simulations do not seem to be affected by the fact that there is no compartmentalization (vacuole, cytosol) included in the model. The utilization decision function accounting for nutrients, co-substrate and energetic shuttles seem to be efficient in simulating growth and nutrition of *C.roseus*.

Table des matières

Dédicace.....	iv
Remerciements.....	v
Résumé	vi
Abstract.....	ix
Table des matières	xii
Liste des tableaux	xiv
Liste des figures.....	xv
Liste des annexes	xvii
Liste des notations.....	xviii
1. Introduction	1
1.1 Problématique.....	2
1.2 Objectif de la recherche.....	7
1.3 Méthodologie	7
2. Revue de la littérature	9
2.1 Les cellules de plantes	9
2.2 Nutriments	10
2.4 Métabolisme primaire	16
2.5 Métabolites secondaires	22
2.6 Modèles de cellules de plantes.....	26

3. Développement du modèle.....	28
3.1 Bases du modèle	28
3.2 Fonctions Décisionnelles	31
3.3 Recherche de paramètres	33
4. Development of a Kinetic Metabolic Model for Plant Cells : Application to <i>Catharanthus roseus</i> hairy roots cultures.....	36
4.1 Présentation.....	36
4.2 Development of a Kinetic Metabolic Model for Plant Cells : Application to <i>Catharanthus roseus</i> hairy roots cultures	37
5. Discussion générale	93
6. Conclusion.....	100
Références	105

Liste des tableaux

Tableau 4.1 Biochemical reactions of the Stationary Primary Metabolic Pathways (SPMP).....	46
Tableau 4.2 Independent fluxes of the Stationary Primary Metabolic Pathways (SPMP)	53
Tableau 4.3 Biochemical reactions of the Transient Primary Metabolic Pathways (TPMP)	56
Tableau 4.4 Description of the fluxes kinetic	57
Tableau 4.5 Affinity constants (K_m).....	69
Tableau 4.6 Maximum reaction rates (v_{max}).....	70
Tableau 4.7 Initial values ($t=0$) used for model simulations.....	84

Liste des figures

Figure 2.1	Glycolyse dans les plantes.....	17
Figure 2.2	Voie des pentoses phosphate dans les plantes.....	19
Figure 2.3	Cycle de l'acide citrique.....	20
Figure 2.4	Biosynthèse des alcaloïdes indoles terpénoïdes.....	24
Figure 4.1	Global model structure.....	43
Figure 4.2	Fluxes in the stationary primary metabolic pathways.....	45
Figure 4.3	Fluxes in the transient primary metabolic pathways.....	47
Figure 4.4	Reduced independent biochemical pathways (r1 to r4) from the stationary primary metabolic pathways.....	48
Figure 4.5	Reduced independent biochemical pathways (r5 to r8) from the stationary primary metabolic pathways.....	49
Figure 4.6	Reduced independent biochemical pathways (r9 to r12) from the stationary primary metabolic pathways.....	50
Figure 4.7	Reduced independent biochemical pathways (r13 to r16) from the stationary primary metabolic pathways.....	51
Figure 4.8	Reduced independent biochemical pathways (r17 to r20) from the stationary primary metabolic pathways.....	52
Figure 4.9	Sensitivity Analysis on model parameters.....	72

Figure 4.10 <i>C. roseus</i> hairy root specific growth rate and intracellular concentration in macromolecules with time.....	73
Figure 4.11 Extracellular concentration in nutrients with time.....	74
Figure 4.12 Intracellular concentration in nutrients and metabolites with time.....	78
Figure 4.13 Ratios in energetic shuttles with time.....	83

Liste des annexes

Programme <i>modele_test.m</i>	117
Programme <i>kernel.m</i>	137
Programme <i>matrix.m</i>	147
Programme <i>sigma.m</i>	161
Programme <i>decis.m</i>	161
Programme <i>results.m</i>	162

Liste des notations

AA	Acides aminés intracellulaire
ACOA	Acetyl-coenzyme A
ADP	Adénosine triphosphate
ATP	Adénosine 5'-triphosphate
CHATS	Système de transport de nitrate à haute affinité constitutif
CHO	Chorismate
DW	Poids sec
E4P	Erythrose-4-phosphate
EFRU	Fructose extracellulaire
EGLC	Glucose extracellulaire
ENH ₄ ⁺	Ammonium extracellulaire
ENO ₃ ⁻	Nitrate extracellulaire
E _{Pi}	Phosphate extracellulaire
ESUC	Saccharose extracellulaire
F6P	Fructose-6-phosphate
FADH ₂	Flavine adénine dinucléotide réduit
FRU	Fructose intracellulaire
FW	Poids humide
G3P	Glucose-3-phosphate
G6P	Glucose-6-phosphate

GLC	Glucose intracellulaire
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance
IHATS	Système de transport du nitrate à haute affinité induit
K_m	Constante d'affinité dans une cinétique de Monod
LATS	Système de transport du nitrate à basse affinité
LIP	Lipides intracellulaires
NAD^+	Nicotinamide adénine dinucléotide
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide réduit
$NADP^+$	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit
NDP	Nucléotide diphosphate
NH_4^+	Ammonium intracellulaire
NO_3^-	Nitrate cytosolaire
NTP	Nucléotide 5'-triphosphate
OAA	Oxaloacetate
OP	Composés organiques phosphates intracellulaires
ORA	Acides organiques intracellulaires
OXO	Oxoglutarate
PEP	Phosphoenolpyruvate
Pi	Phosphate inorganique cytosolaire
PPi	Pyrophosphate intracellulaire

1. Introduction

Depuis le début des temps, les plantes ont toujours fasciné l'homme. Que ce soit pour la nourriture qu'elles lui fournissaient ou les fragrances qu'elles dégageaient, elles ont constamment su attirer son attention. De plus, certaines plantes étaient et sont encore utilisées pour leur propriétés médicinales. Une population humaine toujours grandissante ainsi que l'ère industrielle ont poussées l'homme à vouloir augmenter la production de produits. Suite à l'inefficacité des techniques de synthèse chimique pour produire certaines molécules complexes dont les molécules d'origine végétales, une autre avenue a été étudiée : les biotechnologies.

Une application très médiatisée actuellement concerne les biotechnologies végétales d'application agricoles (OGM). On préconise l'introduction de protéines normalement produites par des bactéries (bt) et autres afin d'améliorer les rendements. Certains chercheurs proposent depuis peu l'introduction d'une capacité à produire des protéines humaines d'intérêt thérapeutiques. Toute la problématique liée à la culture de plantes entières demeure une limitation importante à l'obtention de meilleurs rendements et reproductibilités. Jusqu'à maintenant, pour obtenir des molécules complexes, les organismes entiers fabriquant originalement ces molécules d'intérêt sont encore utilisés (Taxol et Taxotere). Une solution possible consiste à cultiver les cellules de plantes dans un milieu confiné, permettant le contrôle en tout temps

des conditions environnementales. On fait alors références à la culture *in vitro*, en bioréacteur.

Les produits les plus intéressants économiquement sont sans aucun doute les produits pharmaceutiques. Par exemple, le paclitaxel (Taxol) et le docetaxel (Taxotere) sont parmi les seules molécules extraites de végétaux ayant connu un grand succès commercial. Ces deux agents sont principalement utilisés dans le traitement du cancer des ovaires et du sein (Fitzpatrick, 2003). Malgré toutes les études conduites sur les cellules de plantes, leurs applications restent très marginales dû aux faibles rendements obtenus lors de cultures *in vitro*.

1.1 Problématique

Actuellement, la plupart des molécules phyto-pharmaceutiques sont extraites de plantes entières. Le temps de production ainsi que le rendement de ces cultures ne peuvent toutefois être adéquatement contrôlés dû aux changements climatiques par exemple. Pour augmenter le contrôle pouvant être appliqué sur les cultures de plantes, on peut les cultiver sous forme de cellules *in vitro* de façon aseptique. Ainsi un seul type de cellule peut être cultivé à la fois, ce qui augmente la reproductibilité et permet de mieux interpréter les résultats obtenus.

En culture *in vitro*, il est possible de contrôler les nutriments alimentés aux cellules grâce à des milieux de culture définis. Ainsi, les études sur les

réactions des cellules végétales en fonction de différentes concentrations de nutriments peuvent être mieux conduites. Il devient donc possible, suite aux résultats obtenus par ces études, d'optimiser les cultures de cellules de plante *in vitro* et peut-être même d'en augmenter le rendement. Le rendement est un paramètre extrêmement important dans la culture de cellules végétales étant donné le temps nécessaire pour mener à terme ce type de culture. Ainsi, le rendement est directement relié à la rentabilité du procédé.

Depuis des décennies des chercheurs travaillent à améliorer le rendement des cultures *in vitro* sans toutefois réussir. Les expériences qui visent à augmenter la production de ces molécules d'intérêt sont conduites en tentant d'imiter la nature. Par exemple, des chercheurs ont tenté d'augmenter la productivité en alimentant des précurseurs de certaines voies métaboliques. Ainsi l'effet de l'ajout de tryptophane et de typtamine au milieu sur la production d'alcaloïde terpènes indoles a été étudié et les effets rapportés sont contradictoires (Döller et al., 1976; Zenk et al., 1977; Krueger et Carew, 1978; Bongaerts et al., 1998). Plusieurs études (Zenk et al., Naudascher et al., 1990; Facchini et Dicosmo, 1991; Moreno et al., 1993; Morgan et Shanks, 2000) ont démontré que l'ajout de loganine et de secologanine dans le milieu augmenterait la production de métabolites secondaires. Ces études avaient pour but de trouver les étapes limitantes du métabolisme secondaire des cellules de plantes. Ainsi un réactif d'une voie métabolique supposée limitante était ajouté au milieu de culture et les effets sur les concentrations des autres molécules intracellulaires mesurées

(Whitmer *et al.* 2002; Contin *et al.* 1999). Malheureusement ces études n'ont donné que des résultats limités et la stabilité génétique est un problème majeur pour les lignées produisant beaucoup de métabolites secondaires (Whitmer *et al.* 2002).

D'autres chercheurs ont étudié l'ajout de molécules élicitrices retrouvées dans la nature et imitant des agressions par des pathogènes et autres ennemis des plantes (Zhao *et al.* 2001a, 2001b; Moreno *et al.* 1996). Ainsi, Moreno *et al.* (1996) a obtenu une augmentation de tryptamine dans les cellule et une augmentation de composé phénoliques dans le milieu de culture suite à l'élicitation par un filtrat autoclavé de *Phythium aphanidermatum*. Zhao *et al.* (2001a) a observé une plus grande accumulation de différents alcaloïdes (ajmalicine, serpentine et catharanthine) suite à l'élicitation de cellules de *C. roseus* avec différents broyats de mycéliums fongiques. De plus, Rijhwani et Shanks (1998) ont observé un augmentation de l'ajmalicine, de la serpentine, de la lochnericine et de la hörhammerecine suite à l'élicitation avec de l'acide jasmonique. Ces molécules élicitrices ont donc pour but de stimuler les flux des réactions du métabolisme secondaire des cellules végétales. Ce métabolisme est le réseau métabolique responsable de la production de molécules de défense pour les cellules, et ce sont précisément ces molécules qui sont les produits pharmaceutiques de haute valeurs ajoutées (Verpoorte and Memelink 2002).

Afin de mieux comprendre le comportement des cellules végétales et d'illustrer ce comportement par des expressions mathématiques capables de prédire ce comportement, une modélisation d'abord développée sur des cellules bactériennes et des levures a été appliquée aux cellules de plantes. Malheureusement, les cellules de plantes étant plus complexes en termes de structures et de compartimentation, ces modèles dits classiques n'ont pu être appliqués avec succès. La plus grande différence résidant dans le fait que contrairement aux cellules de bactéries et des levures, les cellules de plantes ont une grande capacité de stockage de nutriments et de métabolites, tel que le phosphate intracellulaire (P_i) (Bielecki et Fergusson, 1983), le nitrate (Ames et al., 1983) et les glucides (Schellenbaum et al. 1998). Les cellules de plante peuvent ainsi vivre sur leur réserve alors que leur environnement s'en trouve épuisé. Ainsi, un modèle d'un niveau supplémentaire en complexité est requis. Un modèle idéal contiendrait toutes les réactions présentes dans les cellules. Un tel modèle serait utile à la compréhension de l'ensemble des mécanismes présents dans les cellules. De plus, une meilleure capacité à prédire le comportement, et donc le rendement d'une culture pourrait éventuellement permettre de mieux préparer, mettre au point et opérer une culture. Un tel modèle est donc recherché, mais nous devons procéder par étape de développement, car l'état des connaissances en est encore aux premiers stades.

La plupart des travaux de recherche effectués au laboratoire Bio-P² de l'École Polytechnique de Montréal ont portés sur des cellules végétales. Ce système a conduit à l'établissement d'un modèle biocinétique structuré, basé sur des dynamiques entre différents bassins intracellulaires de nutriments et capable de prédire la croissance des racines transformées (Jolicoeur et al., 2002). Par contre, comme la carotte ne produit pas de métabolites secondaires à haut intérêt commercial (à notre connaissance), les racines transformées de *C. roseus* ont été choisies comme nouveau système d'étude, car cette plante (la pervenche de Madagascar) produit deux molécules anti-cancer : la vinblastine et la vincristine. Or, le rendement de ces molécules dans les cultures de cellules ou de tissus cellulaires doit être amélioré de beaucoup pour être comparable avec celui des cultures de plantes entières (Moreno et al., 1995). Misant sur la levée des inhibitions présentes dans les voies métaboliques dans un futur rapproché, l'extension des modèles biocinétiques présentés par Jolicoeur et al. (2002) et Bouchard-Marchand (2000) à la description des métabolismes primaires et secondaires de racines transformées de *C. roseus* pourrait permettre d'acquérir un outil de meilleure compréhension sur l'influence de l'état nutritionnel des cellules sur la production de métabolites secondaires. C'est précisément dans ce contexte que les objectifs de recherches suivant ont été proposés.

1.2 Objectif de la recherche

La structure du modèle biocinétique-métabolique ayant déjà été déterminée lors de travaux antérieurs au laboratoire (Tikhomiroff, 2001), l'objectif principal de la recherche est la validation du modèle. La validation du modèle comprend la confirmation de sa structure ainsi que la recherche de paramètres qui permettront au modèle de décrire et prédire des données expérimentales. Pour ce qui est de la recherche des paramètres, quelques uns seront estimés à partir de la littérature, mais la plupart seront déduits d'études expérimentales. Il est donc primordial de bien conduire ces études pour en tirer l'information requise. Ce dernier aspect constitue l'objectif secondaire.

1.3 Méthodologie

La description du métabolisme primaire est précisée en termes de flux métaboliques et de stratégies cellulaires pour la régulation des flux. L'état physiologique des racines est défini en terme de concentrations en nutriments et en intermédiaires réactionnels clés. De plus, le modèle prévoit des termes d'ajouts ou de retraits permettant de simuler des cultures en mode cuvée, semi-cuvée, ou continue, ou même l'extraction en continue des métabolites secondaires à l'aide de la phase organique. (Tikhomiroff, 2001).

Des cultures en boîtes de Pétri en mode cuvée et cuvée-alimentée ont été effectuées afin de recueillir les données expérimentales. Un milieu de culture

minimal (Bécard et Fortin, 1988) avec une concentration 3 fois plus élevée de KH_2PO_4 (0.106) et contenant 3% (p/v) de saccharose a été utilisé dans les deux cas. Lors des deux cultures un échantillon (3 boîtes de Pétri) a été pris à tous les 3 jours. Le milieu de culture en mode cuvée-alimentée a été renouvelé tous les 3 jours. La masse sèche (DW) des racines dans le temps, ainsi que l'ensemble des ions (anions et cations) et des glucides du milieu de culture (extracellulaires) et intracellulaires ont été mesurés.

Dans cet ordre d'idée, la revue de la littérature est présentée au chapitre suivant et le chapitre trois est consacré à la validation du modèle à l'aide de deux cultures en boîtes de Pétri, publication soumise à la revue *Metabolic Engineering*. L'ensemble des méthodologies expérimentales ainsi que l'étalonnage du modèle se trouvent explicités dans l'article scientifique.

2. Revue de la littérature

La modélisation du comportement de cellules végétales, incluant la croissance et la production de molécules d'intérêt en culture *in vitro*, requiert une étude approfondie des voies métaboliques impliquées. En effet, la vraisemblance d'un modèle dépend directement des hypothèses posées. Il est donc important de bien cerner les nutriments et voies métaboliques jouant un rôle primordial dans la croissance des cellules de plante ainsi que leurs mécanismes de régulation. Il est important de noter que la revue de la littérature présentée ici sert à compléter celle présentée dans le chapitre résultats de ce mémoire.

2.1 Les cellules de plantes

Les cellules de plantes sont des cellules eucaryotes possédant une paroi cellulaire complexe, composée de polymère de glucides : la cellulose. Ces cellules possèdent aussi une membrane plasmique composée d'une double couche de phospholipides. De plus, une cellule se compose de plusieurs compartiments dont les plus importants sont : le cytoplasme, la vacuole, le noyau, les chloroplastes, les plastes, les amyoplastes et les mitochondries. Chacun de ces compartiments a un rôle qui lui est propre dans la gestion du métabolisme. Les mitochondries, par exemple, produisent la majorité de l'énergie non photosynthétique d'une cellule en conditions aérobies. Il faut aussi distinguer le noyau qui contient le matériel génétique de la cellule. En

moyenne, une cellule de plante est composée à 45% de carbone, à 6% d'hydrogène, à 45% d'oxygène, à 1,5% d'azote, à 1% de potassium, à 0,5% de calcium (0,5%), à 0,2% de magnésium, à 0,2% de phosphate, à 0,1% de soufre et à 0,1% de silicium (Epstein, 1972). D'autres composants sont utilisés en très petites quantités par les plantes et sont par conséquent appelés les micro nutriments. Ceux-ci regroupent le bore, le chlore, le cuivre, le fer, le manganèse, le molybdène et le zinc (Taiz et Zieger, 1998).

2.2 Nutriments

Les minéraux entrent dans la composition de plusieurs constituants de la plante et sont utilisés comme co-facteurs dans différentes réactions bio-chimiques. Sans ces précieux nutriments, la plante ne pourrait survivre. Malgré le fait que tous ces nutriments sont essentiels, trois types sont particulièrement étudiés au laboratoire : le phosphate, les sources d'azote (nitrate et ammonium) et les glucides.

Phosphate inorganique

Le phosphate inorganique est un des éléments les plus indispensables pour les plantes, car il est souvent limitant dans le sol et dans les milieux de culture utilisés. Le phosphate inorganique (Pi) est présent à la fois comme constituant dans les composés tel que les acides nucléiques, les phospholipides et l'ATP, comme métabolite impliqué dans le transfert d'énergie, pour l'activation et la

désactivation des protéines et la régulation des processus métaboliques (Marschner, 1995).

Malgré son importance plus que capitale, les plantes ne peuvent absorber ce nutriment que sous sa forme monovalente (H_2PO_4^-) (Bielecki, 1973). Le Pi peut être entreposé dans la vacuole, un compartiment pouvant occuper près de 95% du volume cellulaire. Lors d'une limitation importante en Pi, la concentration dans le cytoplasme demeure constante et celle de la vacuole diminue, car le maintien d'un niveau minimal de Pi dans le cytosol est critique pour le maintien du métabolisme normal de la plante (Laurer, 1989). Le Pi dans la vacuole sert donc de réservoir permettant d'atténuer les fluctuations pouvant avoir lieu dans le cytosol (Plaxton, 1998). Le phosphate inorganique ne serait pas en deçà de 10 mM (0,05 mmol/gDW) dans le cytoplasme et à des concentrations de 0 à 120 mM (0 à 0,6 mmol/gDW) dans la vacuole (Mimura, 1999) pour des plantes cultivées dans un milieu non limité en phosphate.

Le transport du phosphate se fait par deux co-transporteurs H^+ / Pi différents. Le premier est un transporteur à haute affinité ayant une constante d'affinité (K_m) d'environ $5\mu\text{M}$ (Raghothama, 1999). Le deuxième est un transporteur de basse affinité ayant un K_m d'environ (1-10 mM) (Raghothama, 1999). Les vitesses maximales de ces deux co-transporteurs varient grandement selon les conditions de cultures. Ainsi le v_{max} du transporteur à haute affinité varie entre 10 et 330 nmol/min/g FW et celui du transporteur à basse affinité entre 4 et 110 nmol/min/g masse humide (FW) (Mimura, 1999).

Le transport entre la vacuole et le cytosol se produit à travers la membrane du tonoplaste et implique l'influx et l'efflux. La stimulation du transport par l'ATP (Mimura, 1995) suggère qu'un système de transport actif est présent pour l'influx. Il a été aussi démontré que la perméabilité du tonoplaste augmente considérablement lors de conditions limitées en phosphate (Mimura, 1995) ce qui suggère un transport de type diffusion passive pour le transport de la vacuole vers le cytosol. Par contre, le mécanisme qui accomplit et régule le transport à travers le tonoplaste n'a pas encore été élucidé.

Azote

L'azote est indispensable à la structure et aux fonctions des protéines, des glycoprotéines, des acides nucléiques, et de plusieurs autres molécules de la plante (Werner et Schmidt 2002). Les macromolécules nécessitent de l'azote dans leur groupement amino/amine et dans leurs cycles hétéroaromatiques. De plus, les métabolites secondaires contiennent aussi au moins un atome d'azote. Les plantes absorbent principalement l'azote sous forme de nitrate et il se retrouve principalement sous forme de nitrate, de nitrite et d'ammonium intracellulaires. Par contre, l'accumulation de nitrite est rare et les concentrations d'ammonium sont relativement faibles (entre 0,004 et 0,01 M) (Hewitt *et al.*, 1975). Malgré ces faibles concentrations, les plantes doivent réduire le nitrate en nitrite puis en ammonium avant de pouvoir l'incorporer dans de nombreux acides aminés.

Le nitrate tout comme le phosphate peut être entreposé dans la vacuole. Dans les cellules de plante, la concentration de nitrate dans le cytosol est de l'ordre de 10 à 35 mM (0,05 à 0,175 mmol/gDW) (Miller et Smith, 1996) et celle de la vacuole peut s'élever jusqu'à 100 mM (0,5 mmol/gDW) (Crawford et Glass 1998). La concentration du nitrate dans la vacuole fluctue pour pouvoir conserver la concentration du nitrate dans le cytosol à des concentrations quasi constantes.

Les cellules de racines possèdent trois types de transporteurs de nitrate. Le premier est un transporteur à basse affinité (LATS pour Low Affinity Transport System) contribuant significativement au transport du nitrate pour des concentrations supérieures à 250 μ M. De plus, ce transporteur ne sature pas pour des concentrations aussi élevées que 50 mM (Crawford et Glass, 1998). Les cellules de plante possèdent aussi deux transporteurs à haute affinité. Le premier est exprimé de manière constitutive (CHATS pour Constitutive High Affinity Transport System) et possède un K_m et v_{max} de l'ordre de 6 à 20 μ M et 0,3-0,82 μ mol g FW / h respectivement (Crawford et Glass, 1998). Contrairement au CHATS, le deuxième transporteur à haute affinité (IHATS pour Inductible High Affinity Transport System) est induit par la présence de nitrate extracellulaire. Il possède un K_m et v_{max} plus élevées 20 à 100 μ M et 3 à 8 μ mol g FW / h respectivement (Crawford et Glass, 1998). Le mécanisme d'accumulation de nitrate dans la vacuole a été proposé comme étant un antiport à protons (Miller et Smith, 1992). La remobilisation du nitrate vacuolaire

se ferait par des canaux du même type que ceux de l'ion chlorure (Williams et Miller, 2001).

Les mécanismes de transport de l'ammonium ne sont pas inclus dans cette revue de la littérature, car ils ne sont pas inclus dans le modèle parce que le milieu de culture utilisé ne contenait pas d'ammonium.

Saccharoses et hexoses

Les glucides sont la principale source de carbone pour les cellule non-photosynthétiques de la plante. Le saccharose doit être hydrolysé en glucose et en fructose (FRU) ou être converti en UDP-glucose et en fructose par la saccharose synthase (Huber et Huber, 1996) pour être utilisé par la cellule (Rausch and Greiner 2003). L'hydrolyse du saccharose se fait à l'aide d'invertases (Sturm, 1999) qui sont présentes sur la paroi cellulaire, dans le cytosol et dans la vacuole.

Le saccharose joue aussi un rôle de régulation. Lorsque le saccharose est hydrolysé à l'aide des invertases vacuolaires et de la membrane plasmique, les hexoses ainsi relâchés représentent, en plus de métabolites pour la respiration et des processus de synthèse, des signaux métaboliques importants, qui peuvent affecter dramatiquement le profil d'expression des gènes (Jand et Sheen, 1994; Koch, 1996; Smeekens *et al.*, 1997; Smeekens, 2000; Rolland *et al.*, 2002).

Le stockage des glucides dans les cellules de plantes se fait sous forme d'amidon dans les plastes et de saccharose dans la vacuole (Avigad et Dey, 1997). Lors de limitations, l'amidon est utilisé comme source de glucides. L'amidon-phosphorylase permet de dépolymériser l'amidon en glucose-1-phosphate en utilisant du P_i . De plus, lors d'une limitation en phosphate et par conséquent d'ATP, la synthèse d'amidon permet de libérer du phosphate sous forme de pyrophosphate (PP_i). En plus d'être une source de phosphate, le pyrophosphate peut être utilisé comme source d'énergie à la place de l'ATP dans certaines réactions (Plaxton, 1996).

Le transporteur de saccharose le plus commun SUT1 possède un K_m de l'ordre de 1 mM (Lemoine, 2000). Étant donné que la cellule peut hydrolyser le saccharose avant même son entrée dans la cellule, par l'effet des invertases apoplastiques, les cellules des racines nécessitent donc des transporteurs de monosaccharides (glucose et fructose) (Lalonde *et al.*, 1999). Jolicoeur (1998) a observé que les racines transformées de carottes se servent uniquement de transporteurs de monosaccharide et de l'hydrolyse du saccharose à l'aide des invertases pour l'absorption de glucides. Tous les transporteurs de monosaccharides caractérisés jusqu'à maintenant sont des symports à protons dépendant d'énergie et acceptent les monosaccharides en formant un cycle pyranose (Buttner et Sauer, 2000).

Comme le saccharose peut aussi être stocké dans la vacuole, il devrait y avoir un transporteur spécifique sur le tonoplaste. Aucun transporteur de saccharose

du cytosol à la vacuole n'a été caractérisé, mais ce transport semble être réalisé à l'aide d'un anti-port à protons. Le chemin inverse (de la vacuole au cytosol) serait un phénomène passif (Lalonde *et al.*, 1999).

2.4 Métabolisme primaire

Glycolyse

La glycolyse sert principalement à la rupture du glucose, composé à 6 carbones, en deux molécules de pyruvate (trois carbones) qui peuvent être utilisées dans le cycles des acides tricarboxyliques (TCA). Le schéma général de la glycolyse est donné à la figure 2.1.

Les cellules de plante possèdent des voies alternatives de la glycolyse pour générer de l'énergie et des squelettes carbonés lors d'une limitation en phosphate (Plaxton 1998). Ces voies utilisent des enzymes qui ne sont pas dépendantes du P_i et de l'adénosine diphosphate (ADP) / adénosine triphosphate (ATP). La glycolyse est principalement inhibée par la présence de fructose-2,6-biphosphate et de phosphoénolpyruvate (Plaxton, 1996). Ainsi une accumulation d'un ou de plusieurs de ces métabolites inhibe la glycolyse.

La glycolyse résulte en une production nette de deux molécules d'ATP et de deux nicotinamide adénine dinucléotide réduit (NADH) pour chaque molécule

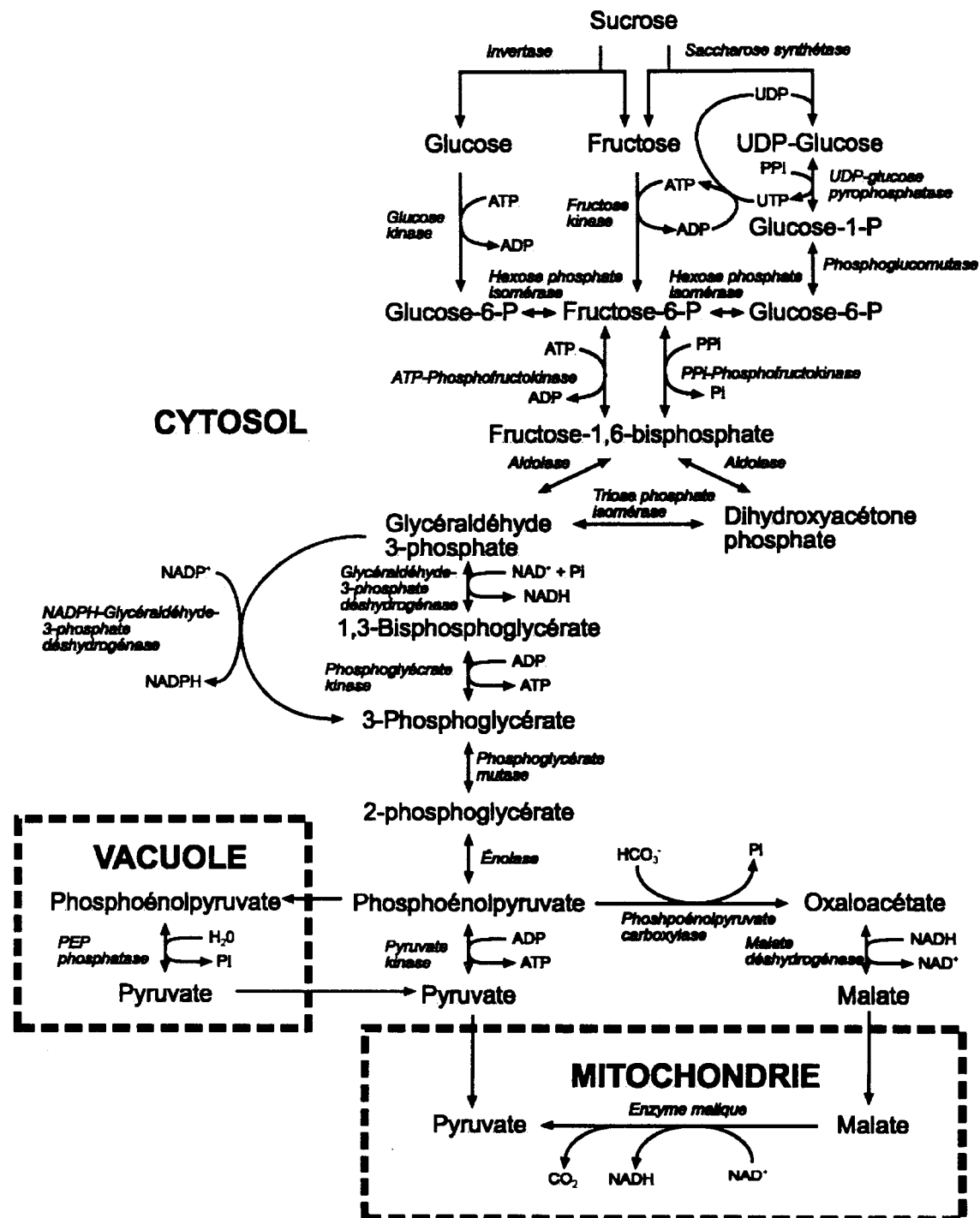


Figure 2.1 – Glycolyse dans les plantes (adapté de Plaxton (1996, 1998)). Les enzymes sont écrites en italique. Les réactions partant du glucose-1-P jusqu'au pyruvate ont lieu également dans les plastes.

de glucose consommée. La glycolyse ainsi que les voies alternatives lors d'une limitation en phosphate sont incluses dans le modèle.

Voies des pentoses phosphate

La voie des pentoses phosphate peut être utilisée en même temps que la glycolyse. Elle est importante dans la biosynthèse aussi bien que dans le catabolisme. La voie des pentoses phosphate sert principalement à réduire la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (de NADP^+ à NADPH). Le NADPH sert de source d'électrons pour la réduction de molécules au cours de la biosynthèse. La voie synthétise des glucides à 4 et à 5 carbones dans des buts variés. L'érythrose 4-phosphate, glucide à 4 carbones est utilisé pour la synthèse des acides aminés aromatique. Un pentose, le ribose 5-phosphate, est un composant majeur des acides nucléiques (Taiz et Zeiger, 1998; Bramley, 1997) et le ribulose 1,5-bisphosphate est l'accepteur primaire de CO_2 dans la photosynthèse. La régulation de la voie des pentoses phosphate est faite sur la glucose-6-phosphate déshydrogénase qui est inhibée lorsque le ratio $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$ est élevé (Taiz et Zieger, 1998).

Cycle de l'acide citrique

Le cycle de l'acide citrique est principalement responsable de la régénération du NADH . Il utilise comme substrat l'acétyl co-enzyme A provenant du catabolisme de nombreux glucides, lipides et acides aminés. La dégradation d'une molécule

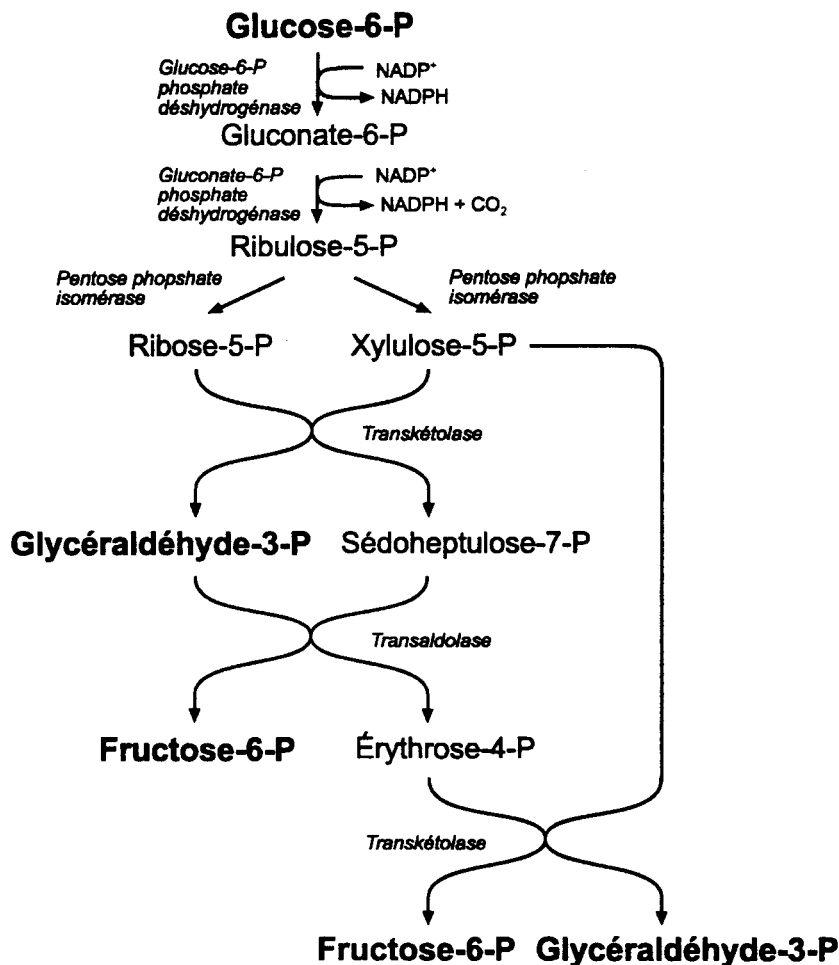


Figure 2.2 – Voie des pentoses phosphates dans les plantes (adapté de Taiz et Zeiger (1998)). Les enzymes sont écrites en italique. Les intermédiaires réactionnels communs à la glycolyse sont notés en caractères gras.

d'acétyl co-enzyme A génère 2 molécules de CO_2 , 3 de NADH, 1 de flavine adénine dinucléotide réduit (FADH_2) et la régénération d'un ATP.

Les intermédiaires du cycle des acides tricarboxyliques sont utilisés dans la synthèse de plusieurs molécules. Par exemple, l'aspartate est produit à partir de l'oxaloacétate et la glutamine à partir de l' α -cétoglutarate. Il y a donc une

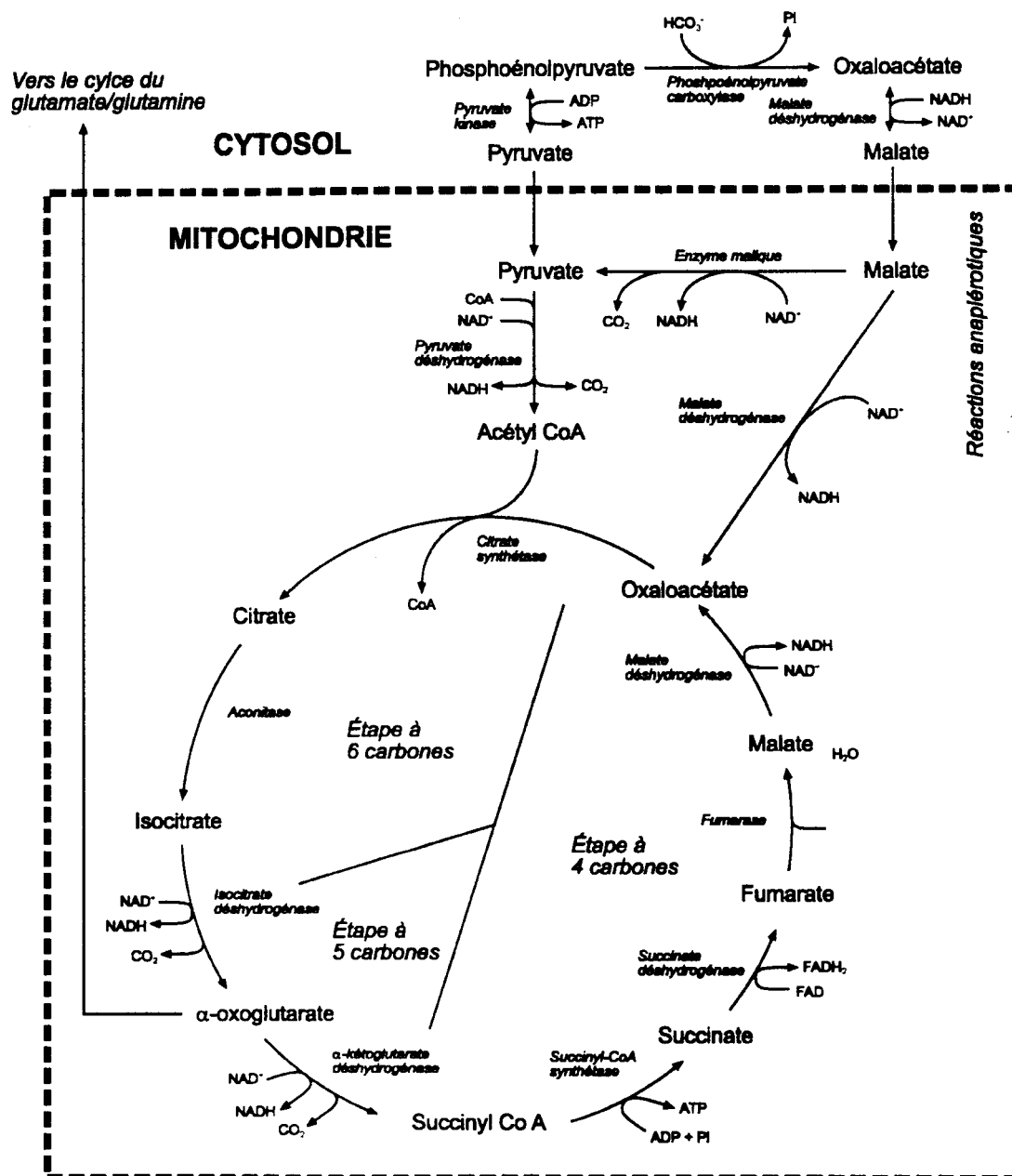


Figure 2.3 – Cycle de l'acide citrique (TCA). (Taiz et Zieger, 1998) Les enzymes sont écrites en italique. La fonction principale du TCA est de générer du NADH utilisé par la chaîne respiratoire. Ses intermédiaires sont utilisés dans des réactions de biosynthèse. L' α -oxoglutarate est le précurseur du glutamate. Les réactions anaplerotiques sont responsables de la régénération des intermédiaires du TCA.

grande demande de carbone pour la biosynthèse à partir du cycle des acides tricarboxyliques. Les plantes possèdent des réactions anaplerotiques qui permettent de produire du malate et de l'oxaloacétate à partir du pyruvate (Brownleader *et al.*, 1997; Taiz et Zeiger, 1998).

À l'inverse des cellules de mammifère, les cellules de plante sont capables de synthétiser du malate à partir du pyruvate lors d'une limitation en phosphate. Le malate peut aussi être excrété à l'extérieur de la cellule pour solubiliser le P_i minéral (Plaxton, 1996).

La régulation de la voie de acides tricarboxyliques est faite grâce au NADH qui à forte concentration inhibe plusieurs enzymes du cycle (Taiz et Zeiger, 1998).

Respiration

La chaîne respiratoire est composée d'une série de transporteurs d'électrons qui agissent ensemble pour transférer les électrons de donneurs tels que le NADH et le $FADH_2$ à l'accepteur, l'oxygène. Les électrons sont transférés de transporteurs dont le potentiel de réduction est plus négatif vers ceux dont le potentiel est plus positif et enfin se combinent à l'oxygène et l'hydrogène pour former de l'eau. La différence de potentiel de réduction entre le NADH et l'oxygène est élevée et rend possible la libération d'une grande quantité d'énergie qui sera utilisée pour former de l'ATP. Théoriquement, 2,5 ATP sont synthétisés par molécules de NADH oxydée dans la chaîne respiratoire (Brownleader *et al.*, 1997). La respiration sert donc à régénérer l'ATP et à

oxyder le NADH et le FADH₂. La respiration est contrôlée par le ratio ATP/ADP et la concentration en Pi. Lorsque la concentration en ADP diminue, l'ensemble des voies de la respiration sont inhibées.

2.5 Métabolites secondaires

Le but ultime de cette recherche étant l'optimisation de la production de métabolites secondaires, cette section se veut une introduction à ceux-ci. Par contre, le métabolisme secondaire n'étant pas encore implanté dans le modèle, les métabolites secondaires ne seront plus mentionnés outre que dans cette section.

Les plantes sont capables de produire de nombreux métabolites secondaires qui, à l'inverse des métabolites primaires, sont souvent spécifiques à quelques espèces de plantes. Ces métabolites secondaires servent principalement de systèmes de défenses pour les plantes et ils peuvent être regroupés en 3 catégories : les composés phénoliques, les isoprénoides et les composés azotés.

La première étape de la formation des métabolites secondaires implique la formation d'enzymes de bifurcation qui redirige une certaine partie du métabolisme primaire au métabolisme secondaire (Edwards et Gatehouse, 1999). Ainsi le métabolisme secondaire est lié au métabolisme primaire par 5 voies métaboliques : la voie de l'acide shikimique, de l'acide malonique, de

l'acide mévalonique, des acides aminés (Taiz et Zeiger, 1998) et du G3P via la voie des pentoses phosphates (Contin *et al.*, 1998). Ces voies ont comme principaux précurseurs l'acétyl co-enzyme A, l'érythrose 5-phosphate, le pyruvate, le phosphoénol pyruvate, le 3-phosphoglycérate et les acides aminés. Les métabolites secondaires produits par *C. roseus* font partie de la famille des alcaloïdes indoles terpénoïdes. Les terpénoïdes sont la plus grande famille de produits naturels avec 30 000 membres (Sacchettini and Poulter 1997; Dewick 2002). Ces derniers sont des composés azotés qui contiennent au moins un atome d'azote hétérocyclique. Les alcaloïdes ont généralement une activité biologique ce qui fait d'eux de possibles agents pharmaceutiques. Ils entrent dans la composition de nombreux médicaments comme principe actif. La plupart d'entre eux sont utilisés dans la nature comme moyen de défense contre les herbivores et les pathogènes (Caporale, 1995; Wink, 1999), car ils sont toxiques.

Plus de 100 alcaloïdes de *C. roseus* qui ont été identifiés partagent plusieurs étapes de biosynthèse. Les étapes de formation (fig 2.4) des alcaloïdes dans *C. roseus* impliquent la formation de la tryptamine (TRY) à partir du tryptophane et sa condensation avec la sécologanine (SEC) pour produire un intermédiaire central soit la strictosidine (STR). La strictosidine est un précurseur commun des alcaloïdes indoles monoterpénoïdes. La tryptamine est obtenue par décarboxylation du tryptophane par la tryptophane décarboxylase (Noé *et al.*,

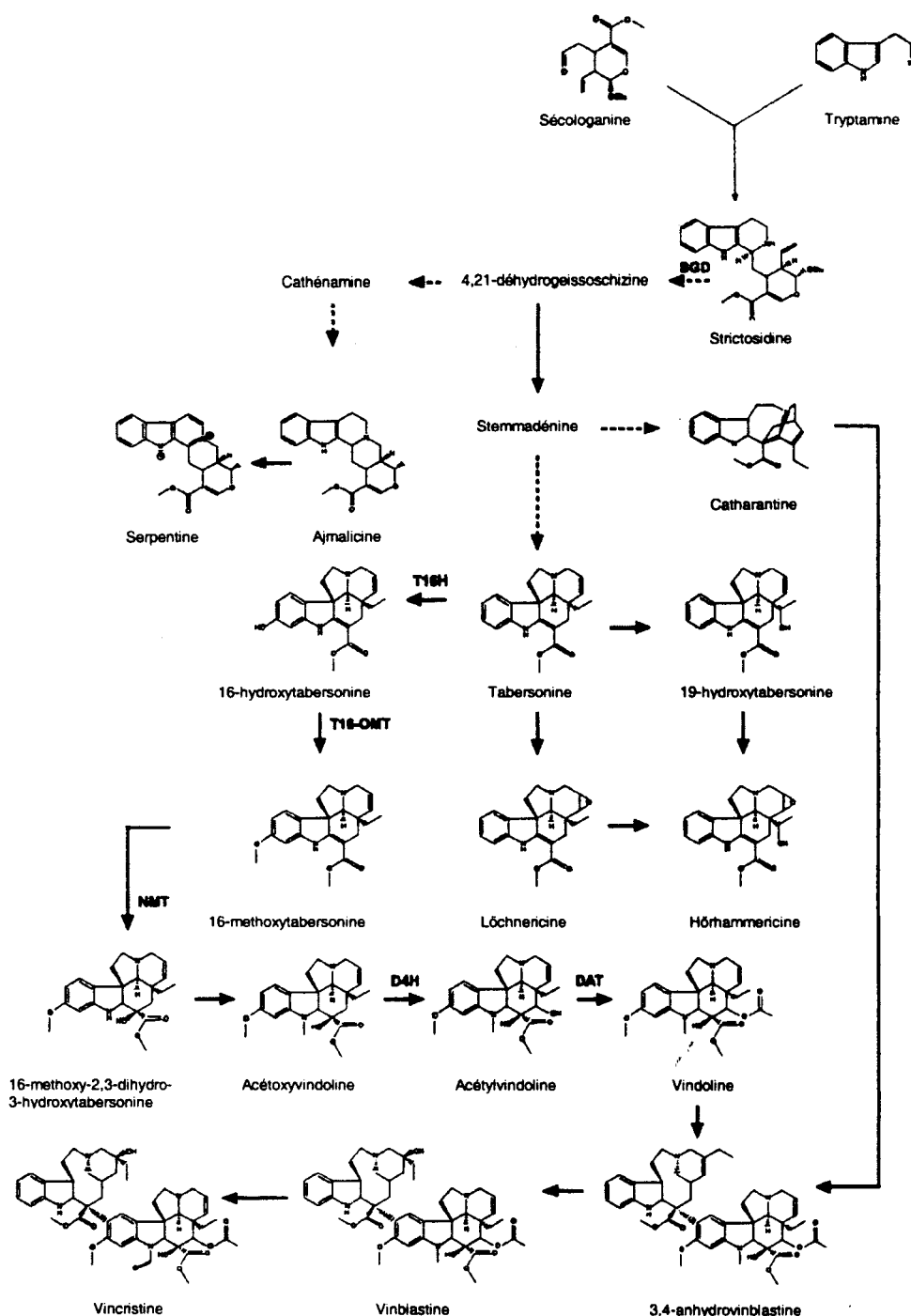


Figure 2.4 Biosynthèse des alcaloïdes indoles terpénoïdes (adapté de Tikhomiroff, 2001). Les flèches pleines indiquent une réaction, les flèches en pointillés indiquent plusieurs réactions connues ou inconnues.

1984). Le tryptophane provient quant à lui du métabolisme primaire. Il est formé par la voie de l'acide shikimique. Pour sa part, la sécologanine provient de l'isopentényl pyrophosphate (IPP), précurseur de tous les isoprénoides. Deux voies de biosynthèses sont connues : la première utilise la voie de l'acide malvénique et utilise 3 molécules d'acétyl co-enzyme A (Taiz et Zeiger, 1998) et la seconde utilise le glycéraldéhyde-3-phosphate provenant de la voie des pentose phosphates et du pyruvate (Contin *et al.*, 1998).

Les voies biosynthétiques des alcaloïdes de *C. roseus* sont parmi les mieux connus au niveau des gènes (Gantet et Memelink, 2002). Malgré cela, les étapes enzymatiques et la régulation de ce réseau complexes demeurent très peu documentées dans la littérature. Comme les modèles servent à décrire et à imiter les comportements naturels en s'appuyant sur des équations décrivant ces phénomènes, il est donc pratiquement impossible de créer un modèle performant si les réactions ne sont pas explicitement décrites.

Suite à cette revue de la littérature, plusieurs aspects ressortent en tant qu'essentiels à l'obtention d'un modèle descriptif performant. Il faut bien sûr inclure les nutriments les plus importants (Pi, nitrate (NO_3^-), glucose (GLC), fructose (FRU) et saccharose (SUC)) et leurs mécanismes de transport ainsi que toutes les réactions de stockage, d'anabolisme et de catabolisme de ces nutriments. Le choix des nutriments est basé sur les études faites par Tikhomiroff (2001) et Bouchard-Marchand (2000). Jolicoeur *et al.* (2002) a

aussi démontré que ce le milieu minimum est équilibré et que les 3 nutriments choisis risquent d'être limitants. De plus il est indispensable d'inclure une réaction représentant la croissance cellulaire. Et finalement, comme le but ultime de ce projet est d'augmenter la production de métabolites secondaires, les réactions charnières du métabolisme primaire et précurseurs du métabolisme secondaire seront considérées. Le modèle développé est présenté sous forme d'article dans le chapitre suivant.

2.6 Modèles de cellules de plantes

En comparaison avec les cellules bactériennes et de mammifères, les plantes possèdent plusieurs particularités. La plus fondamentale est l'incorporation du CO₂ par le cycle de Calvin-Benson. De plus, les plantes sont extrêmement compartimentalisées au niveau des organes, des tissus et de la cellule elle-même. Les plastes sont le compartiments le plus important puisqu'ils sont responsables de la fixation du carbone, de la biosynthèse des lipides et des acides aminées en plus de participer aux réactions de la glycolyse et de la voie des pentoses phosphates (Morgan et Rhodes, 2002). Une dernière différence qui a le plus grand impact sur les stratégies de modélisation est la rareté des conditions de régime permanent (Morgan et Rhodes, 2002). Tout cela, en plus du fait que les cellules végétales ont une grande capacité de stockage des

nutriments font en sorte que les modèles métaboliques développés pour les cellules bactériennes et de mammifères sont inadéquats pour représenter les cellules végétales. Par conséquent, de nouveaux modèles métaboliques exclusif aux plantes doivent être développés. C'est dans cet ordre d'idée que des modèles métaboliques cinétiques sont généralement appliqués à des petits segments du métabolismes pour expliquer le comportement du sous-système métabolique à une perturbation (Morgan et Rhodes, 2002). Cette méthode requiert une connaissance détaillée des cinétiques des enzymes, car elle utilise des expressions cinétiques pour relier les vitesse de réactions aux substrats et aux effecteurs (Gombert et Nielsen, 2000). Ainsi la modélisation métabolique à l'aide de modèle cinétique a été utilisée pour étudier les sous-systèmes comme la photosynthèse (Farquhar et al., 2001; Fridlyand and Scheibe, 1999) et la respiration dans les mitochondries (Affourtit et al., 2001). Par contre, il n'existe pas à notre connaissance de modèle bio-cinétique pour simuler des cultures in vitro de cellules végétales. C'est dans cet ordre d'idée que le modèle présenté au chapitre suivant a été développé.

3. Développement du modèle

Cette partie présente le développement et la validation du modèle. Les principales étapes de développement du modèle sont tout d'abord présentées. Par la suite, une explication des fonctions décisionnelles incluses dans les modèles ainsi que la méthode de recherche des paramètres adoptée sont décrites. L'article présentant le modèle en détail ainsi que les résultats de simulations et des données expérimentales conclut ce chapitre.

3.1 Bases du modèle

Puisque les travaux suivants poursuivent ceux de Tikhomiroff (2001), Bouchard-Marchand (2000) et Jolicoeur (1998), les bases de développement du modèle seront résumées ici.

Tout d'abord le but du modèle est de prévoir le comportement métabolique d'une culture de racines transformées de *C. roseus* en mode cuvée et semi continu. Cet objectif atteint, le modèle pourra être utilisé pour accroître notre compréhension du comportement des cellules en plus d'être un outil pour la définition de stratégies de contrôle des cultures cellulaires.

Un modèle descriptif et prédictif doit cependant tenir compte de la capacité des cellules de plante à accumuler les nutriments et les métabolites.

Comme les cultures simulées sont en régime transitoire (cuvée et semi continu), plusieurs flux métaboliques doivent être considérés en régime transitoire. Plusieurs modèles métaboliques ont été appliqués aux cellules de plantes pour

étudier des sous-réseaux spécifiques tel que la photosynthèse (Farquhar *et al.*, 2001; Fridlyand et Scheibe, 1999), la respiration (Affourtit *et al.*, 2001), la biosynthèse de la cellulose (Delmer et Haigler, 2002) et la biosynthèse des lipides (Ramli *et al.*, 2002). Ces études ont aussi démontrées l'importance de l'utilisation des navettes énergétiques dans le contrôle de voies métaboliques.

Le modèle prend donc comme point de départ les voies métaboliques primaires suivantes : la glycolyse, la voie des pentoses phosphates, le cycle des acides tricarboxyliques, la respiration et la formation des précurseurs de métabolites secondaires: la tryptamine (TRY) ainsi que la sécologanine (SEC). Les réactions de ces voies métaboliques ont d'abord été réduites de 31 réactions à 20 par la technique de l'analyse des flux métaboliques (MFA) (Stephanopoulos *et al.* 1998). Il est à noter que cette technique nécessite que des concentrations de métabolites soient considérées comme constantes. Ainsi, l'hypothèse que la concentration de quelques uns des métabolites a été proposée comme constante (voir la publication pour plus de détails) tel que récemment vérifié par Rontein *et al.* (2002). Cette partie du modèle est le sous-réseau métabolique stationnaire (SPMP). Elle est principalement chargée de décrire la synthèse de macro-molécules (acides aminés (AA), lipides (LIP), acides organiques (ORA), composés organiques phosphates (OP) et hexoses structuraux (STH)), de précurseurs de métabolites secondaires (TRY et SEC) et de la génération d'énergie à partir des nutriments disponibles dans le cytosol (GLU, FRU, SUC, l'amidon (STA) et l'ammonium (NH_4^+)). Les réactions servant à produire de

l'énergie sont la glycolyse, la voie des pentoses phosphates ainsi que le cycle des acides tricarboxyliques.

À cette partie s'ajoute une deuxième chargée du transport des nutriments dans la cellule, la cinétique de stockage de ces nutriments et la cinétique de croissance liée à l'utilisation de macro-molécules. Ce réseau est appelé sous-réseau métabolique transitoire primaire (TPMP). Les nutriments transportés dans la cellule sont le saccharose, le glucose, le fructose, le nitrate et le phosphate inorganique. De plus, une réaction est incluse pour tenir compte des invertases présentes sur la membrane plasmique. La cinétique de stockage des nutriments comprend le transport entre le vacuole et le cytosol (non utilisé dans le présent modèle). Cette partie comprend aussi la réaction qui tient compte de la respiration cellulaire qui régénère la nicotinamide adénine dinucléotide (NAD^+) et l'ATP.

Une troisième partie, le sous-réseau métabolique secondaire (TSMP) sera incorporée plus tard pour tenir compte de toutes les voies de production des métabolites secondaires,

Le modèle étant ainsi subdivisé permet de résoudre les parties séparément. Cela simplifie grandement le processus et permet aussi de produire un modèle descriptif et prédictif même si les voies des métabolites secondaires ne sont pas encore incluses dans le modèle. De plus, un modèle du métabolisme primaire peut être appliqué à beaucoup d'autres espèces de plantes. Par conséquent, ce modèle est très versatile. Une fois la structure du modèle validé il suffira

d'adapter les paramètres biocinétiques pour pouvoir l'appliquer à d'autres espèces de plantes.

Les hypothèses de modélisation ainsi que toutes les réactions présentes dans ces deux réseaux de voies métaboliques sont présentées dans la publication.

Les vitesses de réactions suivent pour la plupart des cinétiques de Monod, à une ou deux affinités. En effet, les réactions de transport ou de conversions chimiques sont toutes enzymatiques et ce type de réactions est bien décrit par une cinétique de Monod. Ainsi tous les réactifs d'une réaction sont présents dans le calcul de la réaction y compris les navettes énergétiques. Par contre, comme certaines réactions doivent être limitées (P_i toxique au delà de 35 mM (Bielecki et Ferguson, 1983; Clarkson 1985) par exemple) des fonctions de décisions doivent être implantées dans le modèle.

3.2 Fonctions Décisionnelles

Les fonctions décisionnelles sont utilisées pour réguler les différentes réactions présentes dans le modèle. L'emploi de ce type de fonctions est rendu nécessaire suite à la présence de nombreux mécanismes de régulation de la cellule. Il faut tout d'abord mettre une limite à l'accumulation de certains métabolites, tel que l'amidon dans le cas présent, pour modéliser le fait que la cellule n'a pas un volume infini. Ainsi, une fonction qui retourne une valeur de 0 à 1 pour n'importe quelle concentration doit être utilisée dans le calcul du flux de la réaction de production d'amidon. Cette fonction est 0 lorsque la quantité

stockée d'amidon est à son maximum et 1 lorsqu'il n'y a pas d'amidon de stocké dans les plastes. Le même type de fonction est utilisé dans les réactions de production d'énergie (glycolyse, TCA, pentoses phosphate, respiration) pour contrôler leurs flux. Ainsi, le modèle peut imiter l'inhibition de ces voies suite à l'accumulation de certains métabolites (voir chapitre Revue de la littérature). Ce type de fonction peut aussi permettre de fixer une concentration plancher d'un métabolite au-dessous de laquelle les réactions ne se produiront pas. Ainsi dans le présent modèle, le Pi possède un tel niveau qui se situe à environ 0.05 mmol/gDW. Par contre, certaines autres réactions (dégradation de certaines molécules telle que les phosphates organiques pour produire du Pi) se produiront lorsque le niveau de Pi sera en dessous d'un certain niveau. Ainsi les réactions de dégradation possèdent toutes une fonction décisionnelle. Plusieurs types de fonctions sont présents dans la littérature. En voici quelques exemples.

Premièrement, une fonction de type Tessier

$$1 - e^{-K([X] - [X_{\text{seuil}}])}$$

tel qu'employée par Jolicoeur et al. (2002) peut être utilisée pour introduire la notion de seuil minimal ou maximal. Par contre, cette fonction peut devenir négative pour certaines valeurs de X ou introduire des points de cassure.

Une fonction de type sigmoïde (Thornley et Jonhson, 1990)

$$\frac{X^n}{X_{\text{seuil}}^n + X^n}$$

n'est présentement utilisée que pour les interactions entre les enzymes. Cette fonction peut être réglée en terme de pente en jouant sur l'exposant. Par contre, lorsque l'exposant est grand, la fonction peut avoir des fluctuations indésirables dû à un polynôme de degré élevé.

Une fonction du type utilisé dans les réseaux neuronaux (Lee et al. 2003 par exemple)

$$\frac{1}{1 + e^{-a(C - C_t)}}$$

produit une fonction lisse, sans point de cassure. Cette fonction a la propriété d'accepter n'importe quelle valeur de concentration et de la transformer en une fonction de 0 à 1. De plus, la pente de la fonction est ajustable. Ainsi c'est la fonction qui donne le plus de liberté et le moins de contrainte mathématique.

Dans le présent modèle, c'est la fonction décision la plus employée. Elle est utilisée pour réguler tous les flux. La fonction de type sigmoïde est utilisée lorsqu'un niveau plancher est nécessaire (Pi et NO₃⁻). Les fonctions décisions présentes dans les différentes équations du modèle sont présentées dans la publication.

3.3 Recherche de paramètres

Beaucoup de données en rapport aux transporteurs de nitrate et de phosphate sont présentées dans la littérature. Plusieurs de ces transporteurs ont été

caractérisés en exprimant leur gène dans des levures (*Saccharomyces cerevisiae*) (Smith et al., 2002). Ces cellules hôtes sont généralement choisis en fonction de mutations. On prend une cellule qui ne peut pas transporter le nitrate par exemple et on y introduit le gène transporteur de nitrate qu'on veut étudier. Ainsi le gène du transporteur est étudié dans ces cellules hôtes et les calculs sont faits sur l'expression de ce gène dans la levure et non directement dans la cellule de plante. Les transporteurs sont étudiés dans des conditions biologiques différentes et leurs valeurs peuvent différer par rapport à la réalité pour *C. roseus*.

Il est aussi possible de caractériser les transporteurs en utilisant un isotope radioactif d'un nutriment et en mesurant l'influx net sur une période de temps déterminé à l'aide d'un appareil à scintillation (Mimura, 1999). Ainsi, les paramètres cinétiques des transporteurs peuvent être obtenus pour les cellules étudiées. Les paramètres cités dans la littérature sont utilisés comme des estimés initiaux et non comme des valeurs absolues. Les valeurs des transporteurs de nitrate et de phosphate sont présentées dans la publication.

La détermination des paramètres a été un processus long passant par plusieurs étapes. Premièrement les paramètres cités dans la littérature ont été incorporés dans le modèle. Deuxièmement, les autres paramètres ont été ajustés, par essais et erreurs, en rapport avec la réduction de l'erreur totale et de la tendance des courbes. La troisième étape a consisté en l'utilisation de l'algorithme du simplex pour préciser les valeurs obtenus précédemment.

Finalement, les paramètres ont été ajusté en fonction de la réduction de l'erreur lors de l'étude de sensibilité sur les paramètres (+50% et –50% du paramètres) (voir publication).

4. Development of a Kinetic Metabolic Model for Plant Cells : Application to *Catharanthus roseus* hairy roots cultures

4.1 Présentation

Ce chapitre présente le développement du modèle biocinétique ainsi que sa validation à l'aide de deux cultures effectuées en boîtes de Pétri.

Le modèle est divisé en deux parties : le sous-réseau métabolique stationnaires et le sous-réseau métabolique transitoire primaire. Le premier est à l'état pseudo-permanent et s'occupe des réactions de formations des macro-molécules, de la voie des pentoses phosphates, de la glycolyse et du cycle des acides tricarboxyliques. Le deuxième est à l'état transitoire et s'occupe du transport des nutriments, de la croissance, de la respiration et des réactions de dégradation des macro-molécules lors de limitations.

L'originalité de ce modèle réside dans le fait qu'il utilise des navettes énergétiques dans ses réactions cinétiques et que la croissance est basée sur des macro-molécules (blocs de construction) au lieu d'être basée sur des nutriments.

L'article a été soumis à la revue *Biotechnology and Bioengineering*.

4.2 Development of a Kinetic Metabolic Model for Plant Cells : Application to *Catharanthus roseus* hairy roots cultures

**Development of a Kinetic Metabolic Model for Plant Cells:
Application to *Catharanthus roseus* hairy roots cultures**

M. Leduc, C. Tikhomiroff, M. Perrier and M. Jolicoeur*

Canada Research Chair on the Development of Metabolic Engineering Tools
BIO-P² Research Unit, Department of Chemical Engineering, École
Polytechnique de Montréal, P.O. Box 6079, Centre-ville Station, Montréal,
Québec, Canada, H3C 3A7.

Running title: A metabolic model for *Catharanthus roseus* hairy roots

***Corresponding Author**

4.2.1 Abstract

A kinetic metabolic model describing *Catharanthus roseus* hairy root growth and nutrition was developed. The metabolic network includes glycolysis, pentose phosphate pathway, TCA cycle and the catabolic reactions leading to macromolecules such as amino acids, organic acids, organic phosphates, lipids and structural hexoses. The primary metabolic network was considered at pseudo-steady state. MFA technique allowed reducing from 31 metabolic fluxes to 20 independent pathways. Hairy root specific growth rate was described as a function of intracellular concentration in macromolecules. Intracellular transport and accumulation kinetics of major nutrients such as inorganic phosphate, nitrate, ammonium and sugars were included. Metabolic controls on the fluxes kinetics such as inhibition or activation from a nutrient and requirements in energy shuttles were considered. Energy shuttles such as NTP (sum of ATP, UTP and GTP), NDP, NADH, NADP⁺, NADPH and NADP⁺ were used. Model calibration was performed using experimental data obtained from Petri dish batch and fed-batch liquid cultures of *C. roseus* hairy roots using a minimal medium. The model was efficient in estimating the hairy roots growth rate and the intracellular concentrations in major nutrients.

4.2.2 Introduction

Plants are a unique source for many highly complex biomolecules of therapeutic interest because of their specific catalytic activity. Allowing a controlled

environment, *in vitro* plant biotechnology has been widely studied for phyto-pharmaceuticals and recombinant proteins production, but to our knowledge, there is still very little industrial success. Low productivity and poor reproducibility have been identified as the major bottlenecks that are limiting the economical feasibility of such bioprocesses. Moreover, the lack of reproducibility of the cultures significantly complicates process validation by the regulatory agencies, and thus the potential to rapidly put a product to market. Different approaches have succeeded in decreasing the technological risk associated to *in vitro* plant biotechnology. The introduction of elicitors such as chitin (Lamb et al., 1989; Darvill and Albersheim, 1984) and jasmonic acid (Gundlach et al., 1992) has shown to enhance significantly the production level for many plant species cultured as cell suspensions and hairy roots. The use of an extractive phase has also revealed improving the productivity as well as it allowed to simplify harvesting procedures (Tikhomiroff et al., 2002; Byun and Pedersen, 1994). In complement, in the wake of studying cell behaviour from a metabolic perspective, cell engineering studies have shown the potential of improving cell catalytic capacity towards the production of secondary metabolites (Lessard et al., 2002, and the references therein; Verpoorte et al., 2002; Hughes and Shanks, 2002) and *in vitro* molecular farming for recombinant human proteins (Sharp and Doran, 2001). However, high variability levels in cell growth and production in biomolecules of interest is still observed and genetic flexibility of plant cells (Fiehn et al., 2000) may be involved.

The key for improving plant cell culture reproducibility could thus require the integration of multiple ideas resulting in the understanding of links between plant cell physiological state and its potential towards growth and the production of a biomolecule of interest. This understanding (following that of Bailey (1998)) could take the form of a descriptive and predictive metabolic model, and such a structured model may then be either useful to enhance our understanding on cell behaviour as well as being a tool for defining adequate controlled culture conditions. Describing plant cell physiology has to account for cell metabolic state as well as its nutritional state. The large capacity of plant cells for nutrient and metabolite accumulation and compartmentalization is playing a crucial role defining cells growth and biomolecule production as observed for *Daucus carota* hairy roots (Jolicoeur et al., 2002) and *Eschscholtzia californica* suspension cells (Lamboursain and Jolicoeur, 2002). A model based on intracellular nutrients such as inorganic phosphate (Pi), nitrate and sugars was efficient in simulating carrot hairy root growth using different culture media composition. Some of the metabolic fluxes should then be taken as transient, adding that batch and fed-batch cultures are mostly feasible for plant cells and hairy roots. Metabolic modeling has been applied to plant cells for studying specific metabolic sub-networks such as photosynthesis (Farquhar et al., 2001; Fridlyand and Scheibe, 1999), respiration (Affourtit et al., 2001), cellulose biosynthesis (Delmer and Haigler, 2002) and lipid biosynthesis (Ramli et al., 2002). These studies have clearly showed the importance of the energy shuttles

in the control of metabolic pathways. In addition, some nutrients are known to be also involved in the regulation of cell metabolism. Intracellular Pi plays a central role in the regulation of enzymes activity through phosphorylation/dephosphorylation processes, ATP/ADP concentration ratio, starch synthesis and storage, and in the distribution between the glycolysis and the pentose phosphate pathway (PPP). Intracellular nitrate and ammonium affect amino acid production.

The aim of this work was thus to develop a metabolic model efficient in predicting the growth of plant cells from estimations of its physiological state. *Catharanthus roseus* was studied as a model biological system. Cellular nutritional state in Pi, nitrogen (NO_3^- and NH_4^+) and carbohydrates (sucrose, fructose and glucose) have been considered. The hypothesis of a central primary metabolism at steady state was proposed, as observed by Rontein et al. (2002) and Stitt and Fernie (2003).. Most of the primary metabolism was then taken at steady state using metabolic flux analysis (MFA) approach and a model reduction (Simpson et al., 1999) was applied resulting in independent pathways. A complementary set of fluxes describing nutrient uptake, carbohydrate storage and macromolecule formation were taken as transient and the kinetics have included regulations from energy shuttles and nutrients. The root cells specific growth rate was described as a function of cell content in macromolecules such as amino acids (including proteins), lipids, organic acids, organic phosphates (including nucleic acids), and structural hexoses. Metabolic controls such as

energetically catalyzed fluxes from nutrient limitation conditions, and carbon source management while plants have access to sucrose, glucose and fructose, have been described using decision functions. Batch and fed-batch *C. roseus* hairy root cultures were performed and the experimental data were used for model calibration.

4.2.3 Model Description

General Structure

A metabolic model describing plant cell and tissue growth has to consider transient kinetics since batch and fed-batch cultures are mostly feasible. Plant cells have the capacity to accumulate and store significant amounts of a variety of nutrients and metabolites. Therefore, it has been hypothesized that the primary metabolism is at pseudo steady-state, as recently reported by Rontein et al. (2002) for a batch culture of tomato suspension cells. The central metabolism may then be maintained at steady-state from the different intracellular storage pools in nutrients and metabolites. Therefore, hairy root cells metabolic network was divided into two interlinked sub-networks (Figure 4.1), the stationary (SPMP) (Figure 4.2) and the transient (TPMP) primary metabolic pathways (Figure 4.3), which are described in the next sections. Biochemical reactions of the SPMP include the anabolic reactions of glycolysis and pentose phosphate pathway, the TCA cycle and the catabolic reactions leading to the cells macromolecules. The TPMP network describes cells growth

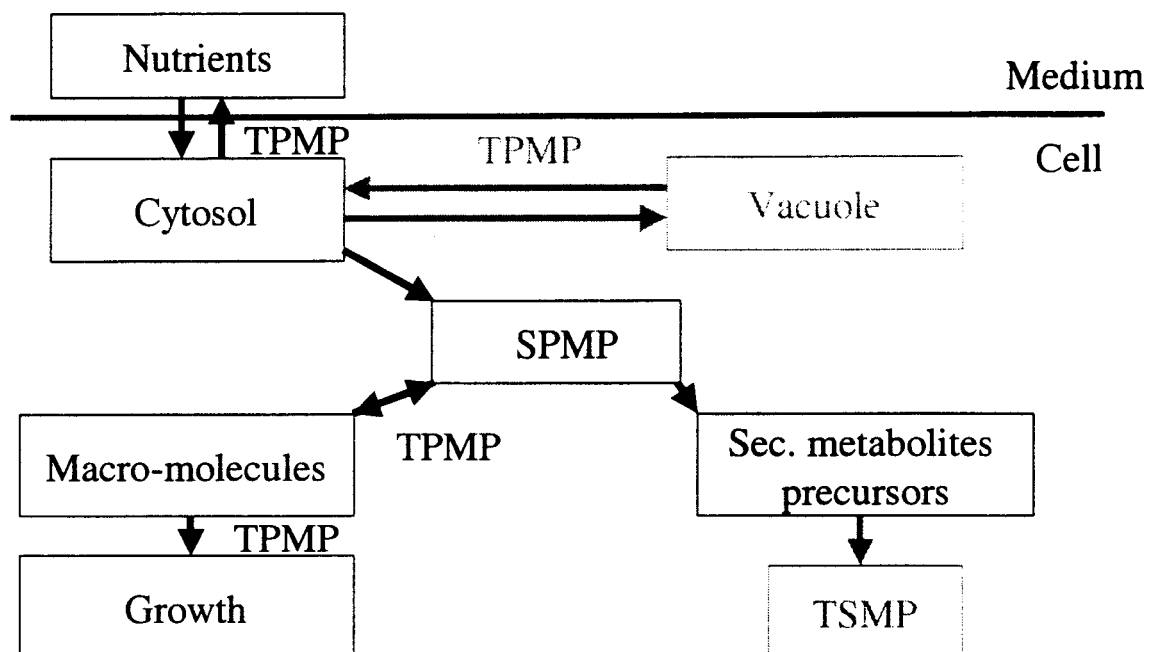


Figure 4.1. Global model structure. SPMP: Stationary Primary Metabolic Pathways. TPMP: Transient Primary Metabolic Pathways. TSMP: Transient Secondary Metabolic Pathways.

and nutrient transport between medium and intracellular compartment. Nutrients compartmentalization between the cytosol and the vacuole has not been included in the model and the hairy root cells were taken as a unique compartment. The transient secondary metabolism pathways (TSMP) have been simplified to the accumulation of tryptamine (TRY) and secologanine (SEC), which are the early precursors of the secondary metabolism. The model is composed of interlinked metabolic networks that are at steady state (SMTP) and transient (TMTP), and is described by a mass balance using the stoichiometric matrix and the cells' specific growth rate:

$$\frac{dX}{dt} = S \cdot \Phi - \mu X \quad (1)$$

where S is, Φ is the vector containing biochemical reaction fluxes, μ is the cells specific growth rate and X is the vector containing the concentration in metabolites.

Stationary Primary Metabolic Pathways (SPMP)

The SPMP network includes the biochemical reactions that are hypothesized to satisfy the pseudo-steady state hypothesis. The metabolic network of the SPMP has 31 fluxes (Figure 4.2 and Table 4.1). For model simplification the network was reduced to 20 independent pathways (Figures 4.4, 4.5, 4.6, 4.7 and 4.8 and Table 4.2) using the method proposed by Stephanopoulos et al. (1998) (see also Simpson et al., 1999). The following assumptions were made to perform model reduction. The nutrients used by the primary metabolism are glucose (GLC), fructose (FRU), sucrose (SUC), ammonium (NH_4^+) and inorganic phosphate (Pi). The metabolites resulting from the SPMP are starch (STA), structural hexoses (STH) (cell wall and membrane constituents), organic phosphates (OP) (nucleotides, phospholipids, nucleic acids), total amino acids (AA) including that of proteins, organic acids (ORA), tryptamine (TRY) and secologanine (SEC). Carbon skeleton of different amino acids are issued from oxaloacetate (OAA), ribosyl-5-phosphate (R5P), and erythrose-4-phosphate

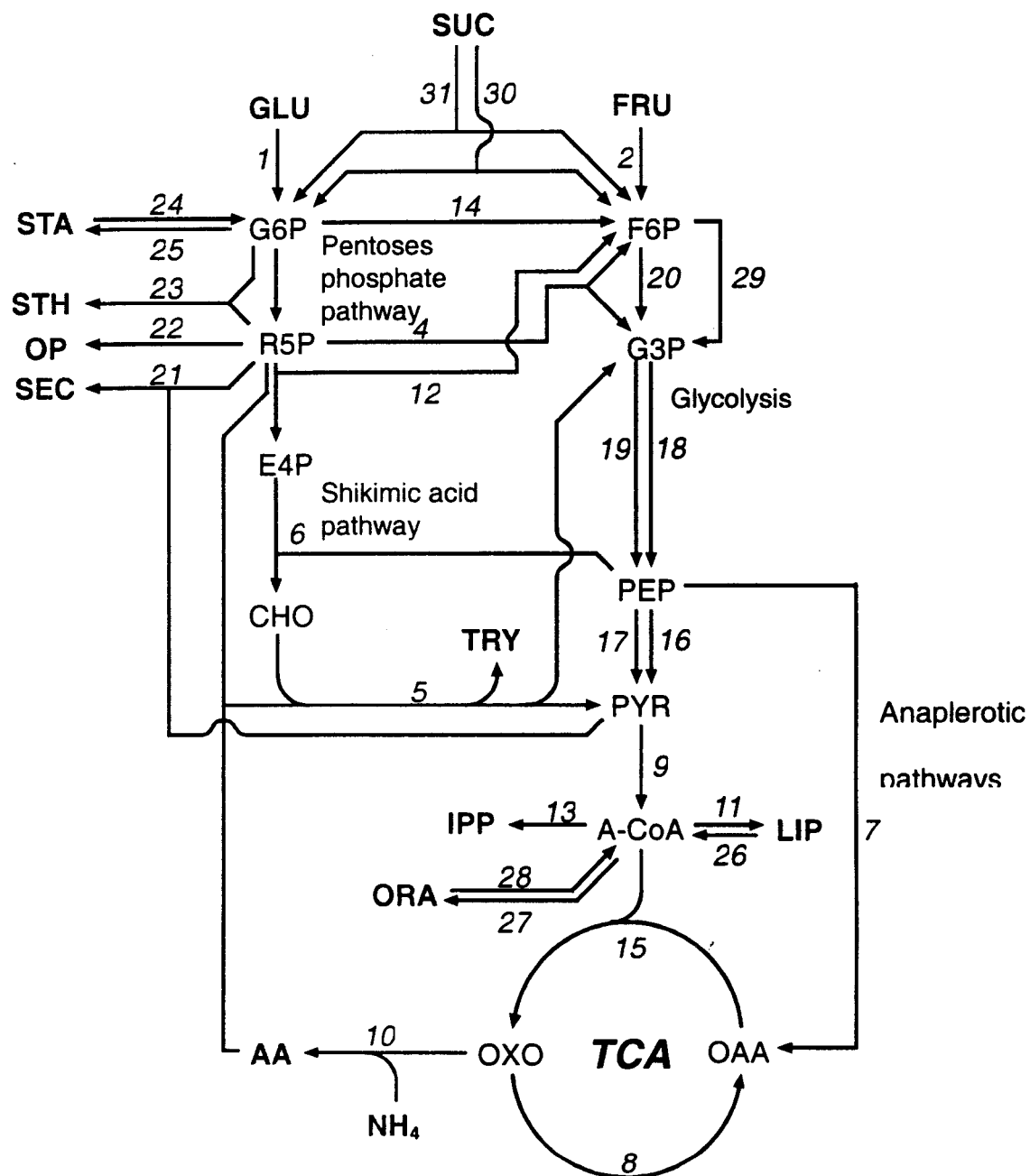


Figure 4.2. Fluxes in the stationary primary metabolic pathways (SPMP). Flux numbers refer to the stoichiometric biochemical reactions of Table 4.1.

Table 4.1. Biochemical reactions of the Stationary Primary Metabolic Pathways (SPMP).

Flux	
1 ^{a,b,c}	$\text{GLC} + \text{NTP} \rightarrow \text{G6P} + \text{NDP}$
2 ^{a,b,c}	$\text{FRU} + \text{NTP} \rightarrow \text{F6P} + \text{NDP}$
3 ^a	$\text{G6P} + 2 \text{NADP}^+ \rightarrow \text{R5P} + 2 \text{NADH}$
4 ^a	$3 \text{R5P} \rightarrow 2 \text{F6P} + \text{G3P}$
5 ^b	$\text{E4P} + 2 \text{PEP} + \text{NTP} + \text{NADH} \rightarrow \text{CHO} + 4 \text{Pi} + \text{NDP} + \text{NAD}^+$
6 ^b	$\text{CHO} + 2 \text{AA} + 2 \text{NTP} + \text{R5P} \rightarrow \text{PYR} + 2 \text{NDP} + \text{PPi} + \text{G3P} + \text{TRY}$
7 ^{a,c}	$\text{PEP} \rightarrow \text{OAA} + \text{Pi}$
8 ^a	$\text{OXO} + 2 \text{NAD}^+ + \text{NDP} + \text{Pi} \rightarrow \text{OAA} + 2 \text{NADH} + \text{NTP}$
9 ^a	$\text{PYR} + \text{NAD}^+ \rightarrow \text{NADH} + \text{ACOA}$
10 ^b	$\text{OXO} + \text{NH}_4^+ + 3 \text{NADPH} + 3 \text{NTP} \rightarrow \text{AA} + 3 \text{NADP}^+ + 3 \text{NDP} + 3 \text{Pi}$
11 ^a	$\text{ACOA} + \text{NTP} + 2 \text{NADPH} \rightarrow \text{LIP} + \text{NDP} + \text{Pi} + 2 \text{NADP}^+$
12 ^a	$2 \text{R5P} \rightarrow \text{F6P} + \text{E4P}$
13 ^a	$3 \text{ACOA} + 2 \text{NADPH} + 3 \text{NTP} \rightarrow \text{SEC} + 2 \text{NADP}^+ + 3 \text{NDP} + 3 \text{Pi}$
14 ^{a,b,c}	$\text{G6P} \rightarrow \text{F6P}$
15 ^a	$\text{ACOA} + \text{OAA} + \text{NAD}^+ \rightarrow \text{OXO} + \text{NADH}$
16 ^{a,b,c}	$\text{PEP} + \text{NDP} \rightarrow \text{PYR} + \text{NTP}$
17 ^{c,d}	$\text{PEP} \rightarrow \text{PYR} + \text{Pi}$
18 ^{a,b,c}	$\text{G3P} + \text{Pi} + \text{NDP} + \text{NAD}^+ \rightarrow \text{PEP} + \text{NTP} + \text{NADH}$
19 ^{c,d}	$\text{G3P} + \text{NADP}^+ \rightarrow \text{PEP} + \text{NADPH}$
20 ^{a,b,c}	$\text{F6P} + \text{NTP} \rightarrow 2 \text{G3P} + \text{NDP}$
21 ^e	$\text{R5P} + \text{PYR} + \text{NTP} \rightarrow \text{SEC} + \text{NDP} + 2 \text{Pi}$
22 ^b	$\text{R5P} + 3.75 \text{AA} + 7 \text{NTP} + 0.25 \text{NAD}^+ \rightarrow$ $7 \text{NDP} + 3.5 \text{Pi} + 1.75 \text{PPi} + 0.25 \text{NADH} + \text{OP}$
23 ^b	$\text{G6P} + 2 \text{NTP} + \text{NADPH} \rightarrow \text{STH} + 2 \text{NDP} + \text{NADP}^+ + \text{Pi} + \text{PPi}$
24 ^a	$\text{STA} + \text{Pi} \rightarrow \text{G6P}$
25 ^b	$\text{G6P} + \text{NTP} \rightarrow \text{STA} + \text{NDP} + \text{PPi}$
26 ^e	$\text{LIP} + 2 \text{NTP} + \text{NAD}^+ \rightarrow 2 \text{NDP} + \text{PPi} + \text{NADH}$
27	$\text{ACOA} \rightarrow \text{ORA}$
28	$\text{ORA} \rightarrow \text{ACOA}$
29 ^d	$\text{F6P} + \text{PPi} \rightarrow 2 \text{G3P} + \text{Pi}$
30 ^a	$\text{SUC} + 2 \text{NTP} \rightarrow \text{G6P} + \text{F6P} + 2 \text{NDP}$
31 ^d	$\text{SUC} + \text{PPi} \rightarrow \text{G6P} + \text{F6P}$
a: Taiz et Zeiger (1998)	
b : Michal (1999)	
c : Brownleader et al. (1997)	
d : Plaxton (1998)	
e : Contin et al. (1998)	
f : Harwood (1997)	

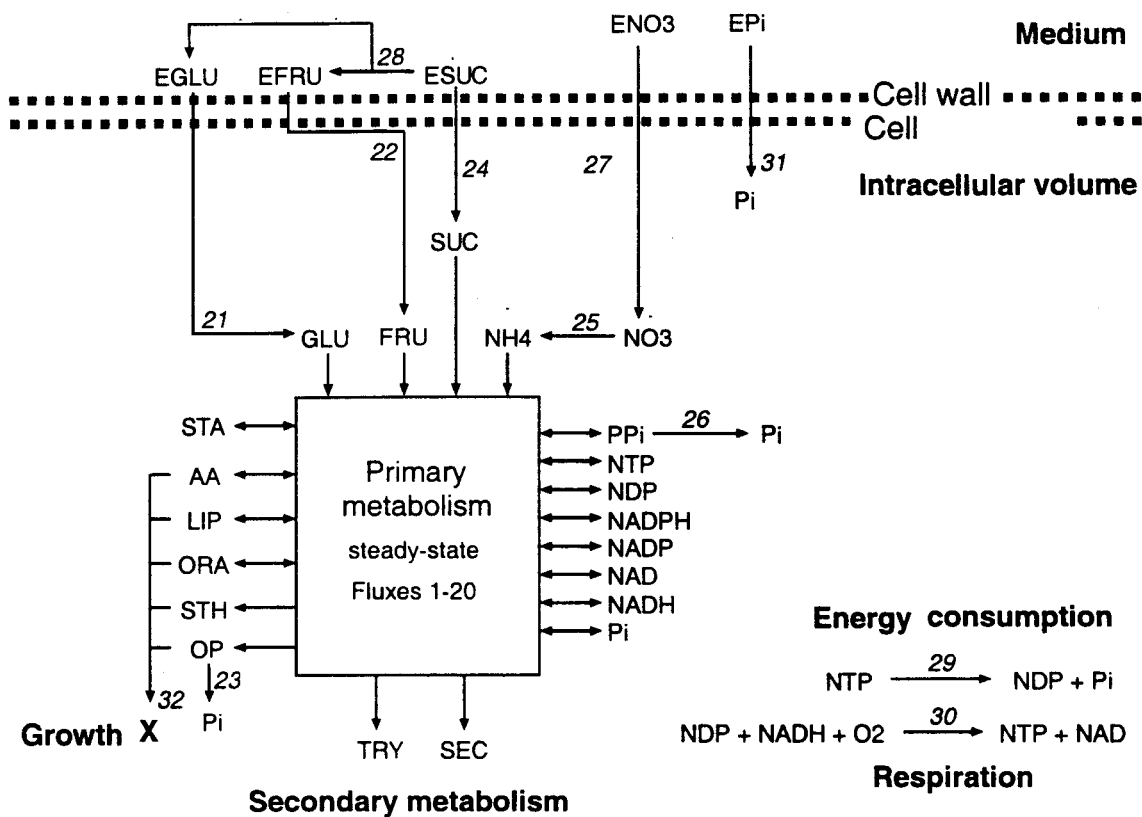


Figure 4.3. Fluxes in the transient primary metabolic pathways (TPMP). Flux numbers refer to the stoichiometric biochemical reactions of Table 4.3. Kinetic description of the resulting fluxes are presented in Table 4.4.

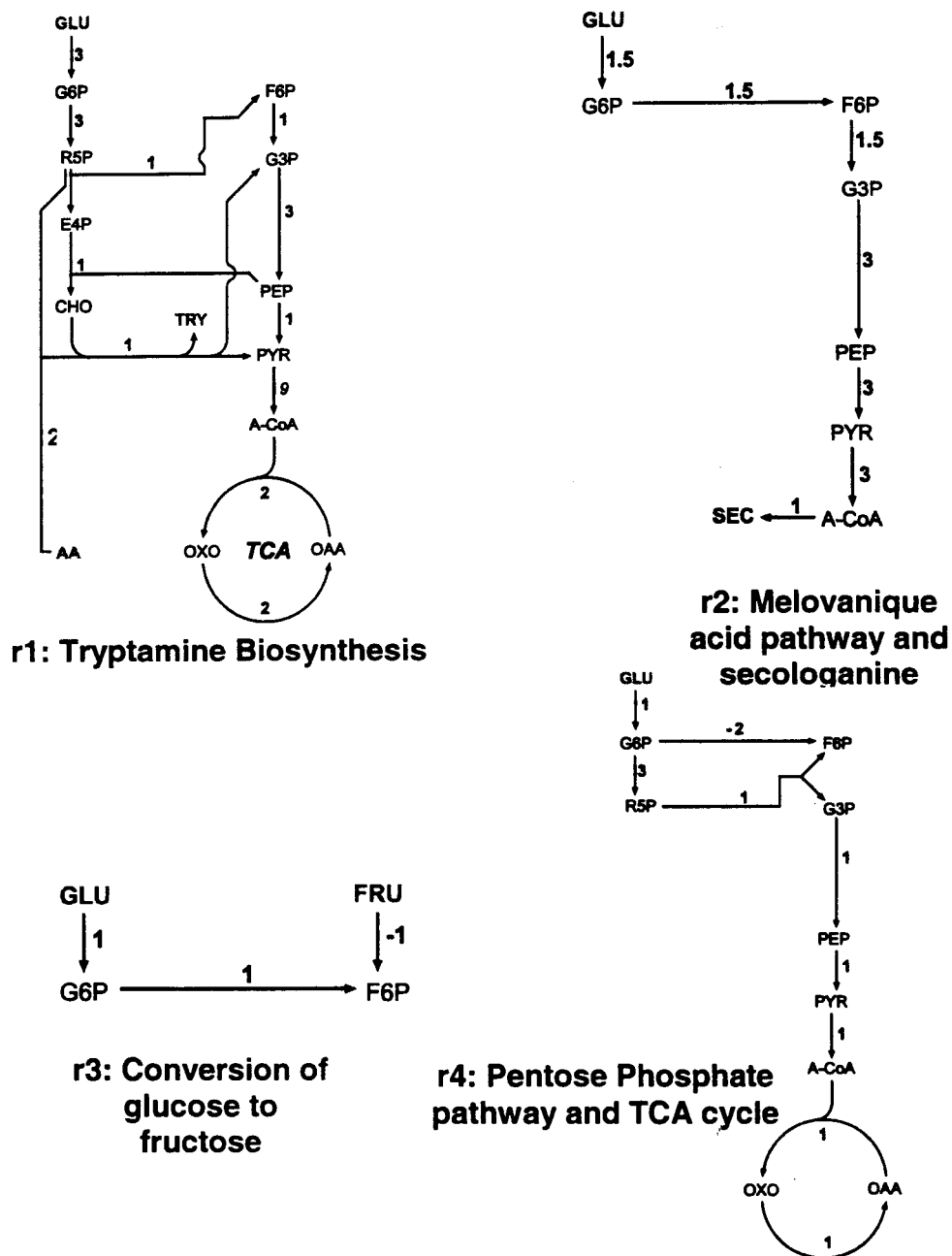
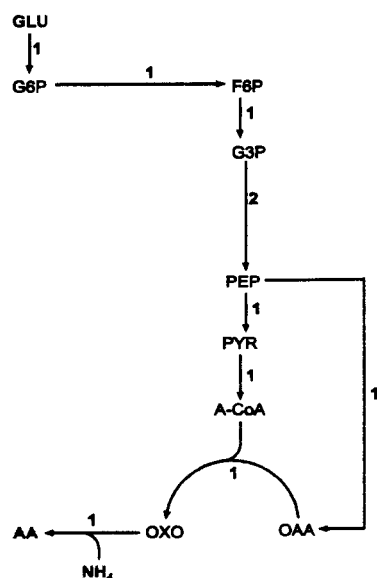
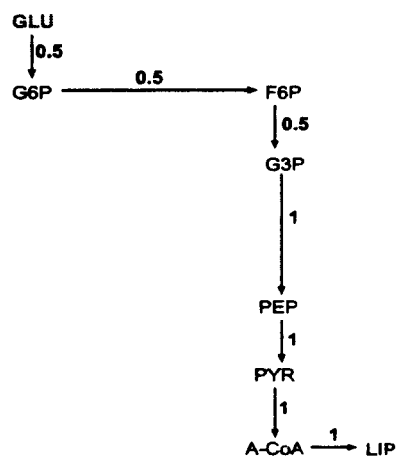
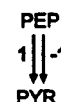


Figure 4.4. Reduced independent biochemical pathways (r1 to r4) from the stationary primary metabolic pathways (SPMP). Pathways numbers refer to the stoichiometric biochemical reactions of Table 4.2. Kinetic description of the resulting fluxes are presented in Table 4.4.

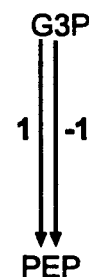


**r5: Amino acids
synthesis pathway**

**r6: Pyruvate kinase
regulation**

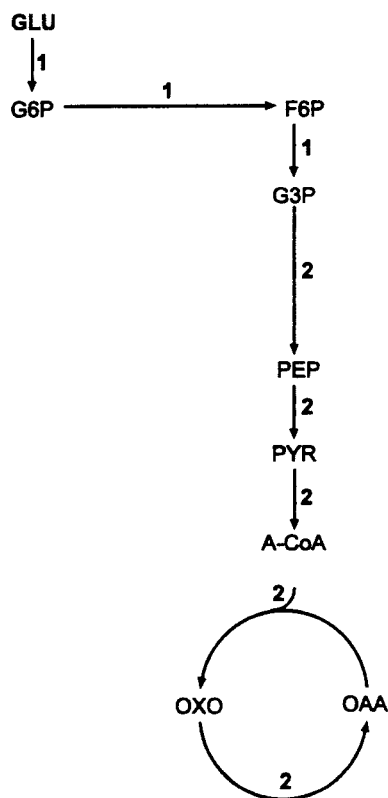


**r7: Lipids
synthesis**

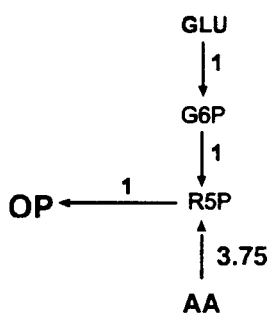


**r8:
Glyceraldehyde-3-
P conversion**

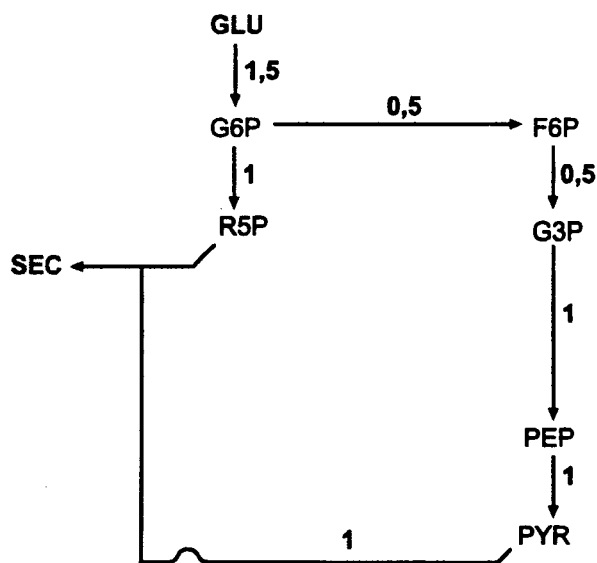
Figure 4.5. Reduced independent biochemical pathways (r5 to r8) from the stationary primary metabolic pathways (SPMP). Pathways numbers refer to the stoichiometric biochemical reactions of Table 4.2. Kinetic description of the resulting fluxes are presented in Table 4.4.



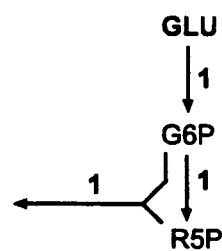
**r9: Glycolysis and
TCA pathways**



**r11: Organic
phosphate (OP)
synthesis**

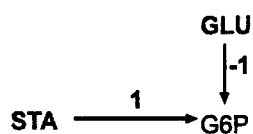


**r10: Secologanine synthesis by
the phosphate trioses and
pyruvate**

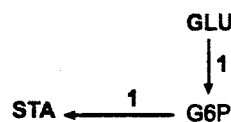


**r12: Cell wall synthesis
(STH)**

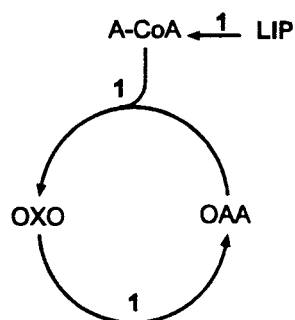
Figure 4.6. Reduced independent biochemical pathways (r9 to r12) from the stationary primary metabolic pathways (SPMP). Pathways numbers refer to the stoichiometric biochemical reactions of Table 4.2. Kinetic description of the resulting fluxes are presented in Table 4.4.



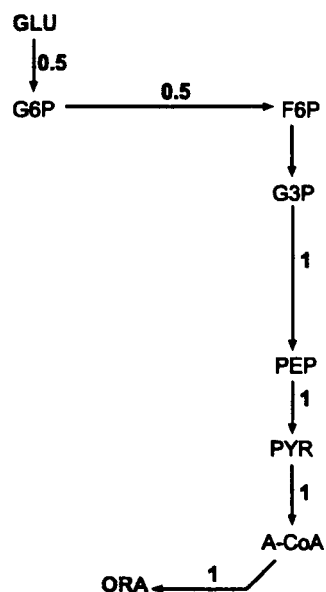
**r13: Starch
catabolism**



**r14: Starch
synthesis**

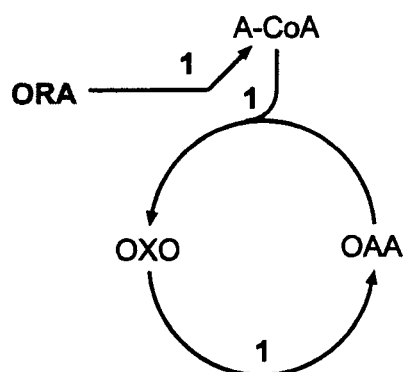


r15: Lipid catabolism

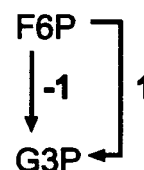


**r16: Organic acids
(ORA) synthesis**

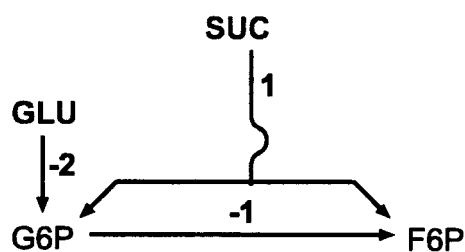
Figure 4.7. Reduced independent biochemical pathways (r13 to r16) from the stationary primary metabolic pathways (SPMP). Pathways numbers refer to the stoichiometric biochemical reactions of Table 4.2. Kinetic description of the resulting fluxes are presented in Table 4.4.



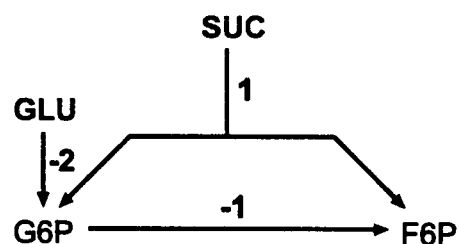
**r17: Organic acids
(ORA) catabolism**



**r18:
Phosphofructokinase
regulation**



r19: Invertase pathway



**r20: Sucrose
synthetase**

Figure 4.8. Reduced independent biochemical pathways (r17 to r20) from the stationary primary metabolic pathways (SPMP). Pathways numbers refer to the stoichiometric biochemical reactions of Table 4.2. Kinetic description of the resulting fluxes are presented in Table 4.4.

Table 4.2. Independent fluxes of the Stationary Primary Metabolic Pathways (SPMP) after pathways reduction using MFA method.

Flux ^a	
r1	$2 \text{ AA} + 3 \text{ GLC} + 10 \text{ NAD}^+ + 6 \text{ NADP}^+ + \text{NTP} + \text{Pi} \rightarrow 10 \text{ NADH} + 6 \text{ NADPH} + \text{NDP} + \text{PPi} + \text{TRY}$
r2	$1.5 \text{ GLC} + 6 \text{ NAD}^+ + 2 \text{ NADP}^+ \rightarrow 6 \text{ NADH} + 2 \text{ NADPH} + \text{SEC}$
r3	$\text{FRU} \rightarrow \text{GLC}$
r4	$\text{GLC} + 5 \text{ NAD}^+ + 6 \text{ NADP}^+ + 2 \text{ NDP} + 2 \text{ Pi} \rightarrow 5 \text{ NADH} + 6 \text{ NADPH} + 2 \text{ NTP}$
r5	$\text{GLC} + 4 \text{ NAD}^+ + 3 \text{ NADPH} + 2 \text{ NTP} + \text{NH}_4^+ \rightarrow \text{AA} + 4 \text{ NADH} + 3 \text{ NADP}^+ + 2 \text{ NDP} + 2 \text{ Pi}$
r6	$\text{NTP} \rightarrow \text{NDP} + \text{Pi}$
r7	$0.5 \text{ GLC} + 2 \text{ NAD}^+ + 2 \text{ NADPH} \rightarrow \text{LIP} + 2 \text{ NADH} + 2 \text{ NADP}^+$
r8	$\text{NADH} + \text{NADP}^+ + \text{NTP} \rightarrow \text{NAD}^+ + \text{NADPH} + \text{NDP} + \text{Pi}$
r9	$\text{GLC} + 10 \text{ NAD}^+ + 4 \text{ NDP} + 4 \text{ Pi} \rightarrow 10 \text{ NADH} + 4 \text{ NTP}$
r10	$1.5 \text{ GLC} + 2 \text{ NADP}^+ + \text{NTP} + \text{NAD}^+ \rightarrow \text{SEC} + 2 \text{ NADPH} + \text{NDP} + \text{Pi} + \text{NADH}$
r11	$3.75 \text{ AA} + \text{GLC} + 0.25 \text{ NAD}^+ + 2 \text{ NADP}^+ + 8 \text{ NTP} \rightarrow 0.25 \text{ NADH} + 2 \text{ NADPH} + 8 \text{ NDP} + 3.5 \text{ Pi} + 1.75 \text{ PPi} + \text{OP}$
r12	$\text{GLC} + \text{NADP}^+ + 3 \text{ NTP} \rightarrow \text{NADPH} + 3 \text{ NDP} + \text{Pi} + \text{PPi} + \text{STH}$
r13	$\text{NDP} + \text{Pi} + \text{STA} \rightarrow \text{GLC} + \text{NTP}$
r14	$\text{GLC} + 2 \text{ NTP} \rightarrow 2 \text{ NDP} + \text{PPi} + \text{STA}$
r15	$\text{LIP} + 4 \text{ NAD}^+ + \text{NTP} + \text{Pi} \rightarrow 4 \text{ NADH} + \text{NDP} + \text{PPi}$
r16	$0.5 \text{ GLC} + 2 \text{ NAD}^+ + \text{NDP} + \text{Pi} \rightarrow 2 \text{ NADH} + \text{NTP} + \text{ORA}$
r17	$3 \text{ NAD}^+ + \text{NDP} + \text{ORA} + \text{Pi} \rightarrow 3 \text{ NADH} + \text{NTP}$
r18	$\text{NDP} + \text{PPi} \rightarrow \text{NTP} + \text{Pi}$
r19	$\text{SUC} \rightarrow 2 \text{ GLC}$
r20	$\text{SUC} + \text{PPi} + 2 \text{ NDP} \rightarrow 2 \text{ GLC} + 2 \text{ NTP}$

a: The biochemical reactions are denoted with an "r" to indicate that they are obtained from pathways reduction.

(E4P) - glyceraldehydes, which are aminated using glutamate or glutamine (Michal, 1999). However, all amino acids (AA) are assumed to be synthesised from oxoglutarate since it is the site for ammonium fixation, which is the initiation step of amino acid synthesis. Amino acids are taken as a unique metabolite pool

for simplification purpose. Tryptamine (TRY) synthesis has been explicitly described because this amino acid is a precursor to the formation of secondary metabolites. Organic phosphates (OP) synthesis has been simplified as illustrated in Figures 4.4, 4.5, 4.6, 4.7 and 4.8 and the four nucleotides were considered. The synthesis of structural hexoses (STH) is resulting from multiple biochemical reactions (Reid, 1997). The reaction for STH formation being part of the model is an average of the reactions implicated in the synthesis of cellular wall considering that a precursor (G6P) is converted into a certain quantity of cellular wall. The equation resulting from this assumption is the formation of STH from the condensation of R5P and G6P. The synthesis and catabolism of lipids (LIP) has been linked to acetyl-coenzyme A (Harwood, 1997) so as for organic acids (ORA) synthesis and catabolism.

Transient Primary Metabolic Pathways (TPMP)

The TPMP network includes the biochemical reactions that are not satisfying the pseudo-steady state hypothesis. Nutrient transport and accumulation kinetics, root cells growth and energy shuttles dynamics were thus described into the TPMP. The general structure of the TPMP and its interactions with the SPMP is illustrated in Figure 4.3. The fluxes stoichiometric mass balances are presented in Table 4.3 and the fluxes kinetics are described in Table 4.4. Nutrient transport from the culture medium into the cells has been described. Extracellular nutrients are sucrose (ESUC), glucose (EGLC), fructose (EFRU), ammonium

(ENH_4^+), nitrate (ENO_3^-) and Pi (EPI). The sucrose is hydrolysed into fructose and glucose by apoplastic invertases or into the cytosol. Intracellular hydrolysis has been included in the SPMP (Table 4.2, pathway 19) and apoplastic hydrolysis has been included into the TPMP (Table 4.3, pathway 28). It should be noted that sucrose biosynthesis (Table 4.2, pathway 20) was not included into the model. Alternative glycolytic pathways (Plaxton 1998) have been included in the model since the carbohydrate source can vary between sucrose, glucose, fructose and starch. However, since the biosynthesis pathways have glucose for precursor, four independent pathways have been selected to allow using a combination of the available carbohydrate from glucose uptake (vh(1)), fructose uptake (vh(2)), starch catabolism (vh(3)), and sucrose hydrolysis (v(35)). Plant cell adaptation mechanism to Pi deficiency was described (Plaxton, 1998). Fluxes describing catabolic reactions have been included in order to allow the reallocation of essential nutrients in times of limitations. Pyrophosphate and organic phosphates can be degraded into Pi. Sugars, NO_3^- , NH_4^+ , Pi and macromolecules storage capacity of the plant cells have been considered without describing intracellular compartmentalization between the different compartments. The concentrations in energy shuttles were taken constant and only the concentration ratios of energy rich to total energy content is time dependent. The anaplerotic pathways are simplified to the transformation of phosphoenolpyruvate into oxaloacetate. Respiration, which regenerates ATP and NAD^+ is described. However, oxygen has been assumed to be non-limiting

and was thus not included into the model. Energy loss associated with maintenance and other reactions that are not included into the SPMP is taken into account in flux 29 (Table 4.3).

Table 4.3. Biochemical reactions of the Transient Primary Metabolic Pathways (TPMP).

Flux	
21	$\text{EGLC} + \text{NTP} \rightarrow \text{GLC} + \text{NDP} + \text{Pi}$
22	$\text{EFRU} + \text{NTP} \rightarrow \text{FRU} + \text{NDP} + \text{Pi}$
23	$\text{OP} \rightarrow \text{Pi}$
24	$\text{ESUC} + \text{NTP} \rightarrow \text{SUC} + \text{NDP} + \text{Pi}$
25	$\text{NO}_3^- + \text{NADH} + 3 \text{NADPH} \rightarrow \text{NH}_4^+ + \text{NAD}^+ + 3 \text{NADP}^+$
26	$\text{PPi} \rightarrow 2 \text{Pi}$
27	$\text{ENO}_3^- + \text{NTP} \rightarrow \text{NO}_3^- + \text{NDP} + \text{Pi}$
28	$\text{ESUC} \rightarrow \text{EGLC} + \text{EFRU}$
29	$\text{NTP} \rightarrow \text{NDP} + \text{Pi}$
30	$2.5 \text{NDP} + 2.5 \text{Pi} + \text{NADH} + \text{O}_2 \rightarrow 2.5 \text{NTP} + \text{NAD}^+$
31	$\text{EPi} + 2 \text{NTP} \rightarrow 3 \text{Pi} + 2 \text{NDP}$
32	$\text{AA} + \text{LIP} + \text{ORA} + \text{STH} + \text{OP} \rightarrow \text{X}$

Table 4.4. Description of the fluxes kinetic.

Flux kinetic equation ^{a,b,c,d,e,f}
$v_{GLC} = v_{\max_{GLC}} \frac{GLC}{Km_{GLC} + GLC}$
$v(r1) = v_{GLC} \cdot v_{\max(r1)} \frac{AA}{Km_{AA} + AA} \frac{NAD}{Km_{NAD} + NAD} \frac{NADP}{Km_{NADP} + NADP} \frac{NTP}{Km_{NTP} + NTP} \frac{Pi^2}{Km_{Pi}^2 + Pi^2}$
$v(r2) = v_{GLC} \cdot v_{\max(r2)} \frac{NAD}{Km_{NAD} + NAD} \frac{NADPH}{Km_{NADPH} + NADPH}$
$v(r3) = v_{\max(r3)} \frac{FRU}{Km_{FRU} + FRU} \left(1 - \frac{1}{1 + e^{-100(GLC-0.02)}} \right)$
$v(r4) = v_{GLC} \cdot v_{\max(r4)} \frac{NAD}{Km_{NAD} + NAD} \frac{NADP}{Km_{NADP} + NADP} \frac{NDP}{Km_{NDP} + NDP} \frac{Pi^2}{Km_{Pi}^2 + Pi^2} \left(\frac{1}{1 + e^{-8 \left(\frac{NADP}{NADP + NADPH} - 0.5 \right)}} \right)$
$v(r5) = v_{GLC} \cdot v_{\max(r5)} \frac{NAD}{Km_{NAD} + NAD} \frac{NADPH}{Km_{NADPH} + NADPH} \frac{NTP}{Km_{NTP} + NTP} \frac{NH_4^2}{Km_{NH_4} + NH_4^2}$
$v(r6) = v_{\max(r6)} \frac{NTP}{Km_{NTP} + NTP} \left(1 - \frac{1}{1 + e^{-10(Pi-1)}} \right)$
$v(r7) = v_{GLC} \cdot v_{\max(r7)} \frac{NAD}{Km_{NAD} + NAD} \frac{NADPH}{Km_{NADPH} + NADPH}$
$v(r8) = v_{\max(r8)} \frac{NADH}{Km_{NADH} + NADH} \frac{NADP}{Km_{NADP} + NADP} \frac{NTP}{Km_{NTP} + NTP} \left(1 - \frac{1}{1 + e^{-10(Pi-1)}} \right)$
$v(r9) = v_{GLC} \cdot v_{\max(r9)} \frac{NAD}{Km_{NAD} + NAD} \frac{NDP}{Km_{NDP} + NDP} \frac{Pi^2}{Km_{Pi}^2 + Pi^2} \left(\frac{1}{1 + e^{-8 \left(\frac{NAD}{NAD + NADH} - 0.5 \right)}} \right)$
$v(r10) = v_{GLC} \cdot v_{\max(r10)} \frac{NAD}{Km_{NAD} + NAD} \frac{NADP}{Km_{NADP} + NADP} \frac{NTP}{Km_{NTP} + NTP}$
$v(r11) = v_{GLC} \cdot v_{\max(r11)} \frac{AA}{Km_{AA} + AA} \frac{NAD}{Km_{NAD} + NAD} \frac{NADP}{Km_{NADP} + NADP} \frac{NTP}{Km_{NTP} + NTP} \left(\frac{1}{1 + e^{-100(Pi-0.1)}} \right) \left(1 - \frac{1}{1 + e^{-1000((P-0.045)}}$
$v(r12) = v_{GLC} \cdot v_{\max(r12)} \frac{NADPH}{Km_{NADPH} + NADPH} \frac{NTP}{Km_{NTP} + NTP}$
$v(r13) = v_{\max(r13)} \frac{NDP}{Km_{NDP} + NDP} \frac{Pi^2}{Km_{Pi}^2 + Pi^2} \frac{STA}{Km_{STA} + STA} \left(1 - \frac{1}{1 + e^{-100(GLC-0.2)}} \right)$

Table 4.4. Description of the fluxes kinetic. (Continued)

Flux kinetic equation ^{a,b,c,d,e,f}
$v(r14) = v_{GLC} \cdot v_{\max}(r14) \frac{NTP}{Km_{NTP} + NTP} \left(\frac{1}{1 + e^{-10(FRU+GLU+0.5SUC-0.2)}} \right) \left(1 - \frac{1}{1 + e^{-200(STA-1.5)}} \right)$
$v(r15) = v_{\max}(r15) \frac{LIP}{Km_{LIP} + LIP} \frac{NAD}{Km_{NAD} + NAD} \frac{NTP}{Km_{NTP} + NTP} \frac{Pi^2}{Km_{Pi}^2 + Pi^2} \left(1 - \frac{1}{1 + e^{-10(NADH-1)}} \right)$
$v(r16) = v_{GLC} \cdot v_{\max}(r16) \frac{NAD}{Km_{NAD} + NAD} \frac{NDP}{Km_{NDP} + NDP} \frac{Pi^2}{Km_{Pi}^2 + Pi^2}$
$v(r17) = v_{\max}(r17) \frac{NAD}{Km_{NAD} + NAD} \frac{NDP}{Km_{NDP} + NDP} \frac{ORA}{Km_{ORA} + ORA} \frac{Pi^2}{Km_{Pi}^2 + Pi^2} \left(1 - \frac{1}{1 + e^{-10(NADH-1)}} \right)$
$v(r18) = v_{\max}(r18) \frac{NDP}{Km_{NDP} + NDP} \frac{PPi}{Km_{PPi} + PPi} \left(1 - \frac{1}{1 + e^{-10(Pi-1)}} \right)$
$v(r19) = v_{\max}(r19) \frac{SUC}{Km_{SUC} + SUC} \left(1 - \frac{1}{1 + e^{-100(GLC-0.02)}} \right)$
$v(21)^d = v_{\max}(21) \frac{EGLC}{Km_{EGLC} + EGLC} \frac{NTP}{Km_{NTP} + NTP} \left(1 - \frac{1}{1 + e^{-100(STA-0.07)}} \right)$
$v(22)^d = v_{\max}(22) \frac{EFRU}{Km_{EFRU} + EFRU} \frac{NTP}{Km_{NTP} + NTP} \left(1 - \frac{1}{1 + e^{-100(STA-0.02)}} \right)$
$v(23) = v_{\max}(23) \frac{OP^4}{Km_{OP}^4 + OP^4} \left(1 - \frac{1}{1 + e^{-333(Pi-0.045)}} \right)$
$v(24) = v_{\max}(24) \frac{ESUC}{Km_{ESUC} + ESUC} \frac{NTP}{Km_{NTP} + NTP} \left(1 - \frac{1}{1 + e^{-100(STA-0.02)}} \right)$
$v(25) = v_{\max}(25) \frac{NO3^2}{Km_{NO3}^2 + NO3^2} \frac{NADH}{Km_{NADH} + NADH} \frac{NADPH}{Km_{NADPH} + NADPH}$
$v(26) = v_{\max}(26) \frac{PPi}{Km_{PPi} + PPi}$
$v(27)^e = \left(v_{\max}(27, LA) \frac{ENO3}{Km_{NO3_LA} + ENO3} + v_{\max}(27, HA) \frac{ENO3}{Km_{NO3_HA} + ENO3} \right) \frac{NTP}{Km_{NTP} + NTP} \frac{X}{V}$
$v(28) = v_{\max}(28) \frac{ESUC}{Km_{ESUC} + ESUC} \frac{STH}{0.02 + STH}$
$v(29) = v_{\max}(29) \frac{NTP}{Km_{NTP} + NTP}$

Table 4.4. Description of the fluxes kinetic. (Continued)

Flux kinetic equation ^{a,b,c,d,e,f}	
$v(26) = v_{\max}(26) \frac{NO_3^2}{Km_{NO_3}^2 + NO_3^2} \frac{NADH}{Km_{NADH} + NADH} \frac{NADPH}{Km_{NADPH} + NADPH}$	
$v(31) = v_{\max}(31) \frac{PPi}{Km_{PPi} + PPi}$	
$v(34)^d = \left(v_{\max}(34, LA) \frac{ENO3}{Km_{NO_3_LA} + ENO3} + v_{\max}(34, HA) \frac{ENO3}{Km_{NO_3_HA} + ENO3} \right) \frac{NTP}{Km_{NTP} + NTP} \frac{X}{V}$	
<i>a :</i>	Reaction number refers to pathways of SPMP in Figure 3, and of TPMP in Figure 4.
<i>b :</i>	Not shown fluxes are related to exchange between the cytoplasm and the vacuole and were not included in this model.
<i>c :</i>	Use of NTP, NDP, NADH, NAD ⁺ , NADPH and NADP ⁺ in flux kinetics was taken from: Biochemical pathways: An Atlas of biochemistry and molecular biology, Wiley, Gerhard Michal Ed., New York, 277pp. 1999.
<i>d :</i>	Tanner and Caspari, 1996.
<i>e :</i>	Crawford and Glass, 1998.
<i>f :</i>	Raghothama, 1999.

Metabolic Regulation

Metabolic regulations of three kinds were integrated into the model: that associated to the cell energy level, to the cell nutritional state and to phosphorylation/dephosphorylation processes. Requirements in energy shuttles to catalyze biochemical reaction pathways have been described (Table 4.4). NADH, NADPH and NTP as the sum of ATP, GTP, CTP and UTP as well as their reduced formed (NAD⁺, NADP⁺ and NDP) have been considered. The sum per cell in energy shuttles in both oxidised and reduced forms (NADH + NAD⁺;

$\text{NDP} + \text{NTP}$; $\text{NADPH} + \text{NADP}^+$) has been taken constant with time but not for the ratio ($\text{NADH}/(\text{NADH} + \text{NAD}^+)$; $\text{NTP}/(\text{NDP} + \text{NTP})$ $\text{NADPH}/(\text{NADPH} + \text{NADP}^+)$). ATPase proton pumps that are linked to H^+ /nutrient co-transport system for intracellular pH control were considered when needed. Therefore, effect of NTP concentration were applied to the rate for glucose transport (Table 4.4, flux 21), fructose transport (Table 4.4, flux 22), nitrate transport (Table 4.4, flux 27) and Pi transport (Table 4.4, flux 31). A unique value for the affinity constant for NTP ($K_{m\text{NTP}}$) was considered for all the fluxes where it is involved. The same strategy of using unique affinity constants for NAD^+ , NADH , NADP^+ and NADPH was applied. Cell nutritional state can affect crucial metabolic pathways. Therefore, ATP (NTP) rate of biosynthesis was related to Pi intracellular concentration and amino acid (AA) biosynthesis was related to NH_4^+ intracellular concentration (Figures 4.4, 4.5, 4.6, 4.7 and 4.8 and Table 4.4). Each of the Michaelis-Menten parameters were at power two for NH_4^+ and Pi since second order kinetic is involved in their used. NH_4^+ has first to be transformed in NH_2 radical and then being integrated into a protein structure. In the case of a biochemical reaction that is catalyzed by an enzyme Pi is first removed or linked to the enzyme for its activation and then the reaction can occur. Carbon source management is highly important for plant cells since glucose, fructose, sucrose and starch can be used. It was thus considered that each of the available intracellular sugar sources is contributing to the cell metabolism. However, it can be seen in Figures 4.4, 4.5, 4.6, 4.7 and 4.8 and

Table 4.4 that the model considers that sugar sources have first to be converted into glucose and then glucose is used. Therefore, each of the metabolic pathways requiring glucose has been calculated for all of the carbon sources denoted as $vh(i)$ and sequentially used for GLC $vh(1)$, FRU $vh(2)$ and STA catabolism $vh(3)$, and the sum was then applied obtaining the global use in carbon sources. Describing cell nutrition also implies that the model can "decide" which metabolic pathway has to be more active in the use of a define nutrient. A sigmoid function was used as it allows for continuous dynamic (Thornley et Jonhson, 1990):

$$\frac{1}{1 + e^{-a(C - C_t)}} \quad (2)$$

where "a" is a parameter defining the steepness of the function, "C" is the concentration of the nutrient involved in a flux control and C_t is the nutrient concentration threshold. The regulation of the biochemical reactions has been described as follows (see also Table 4.4 for details). It is important to note that all parameters used in regulation function were obtained from model calibration by the minimization of the experimental error versus simulated curves. Starch synthesis (flux r14) is controlled by the cell sugar concentrations. The sum in intracellular GLC, FRU and SUC has to be above 0.2 mmol/gDW. The cell maximal STA storage capacity at 1.5 mmol/gDW obtained experimentally (see Results and Discussion section) was used. Starch will be degraded (flux r13) only at a low total concentration in GLC, FRU and SUC below 0.2 mmol/gDW.

Pentose phosphate pathway (flux r4) is regulated by $\text{NADP}^+ / (\text{NADP}^+ + \text{NADH})$ ratio which has to be above 0.5. Pyruvate kinase regulation (flux r6) is controlled by intracellular Pi concentration with a flux increase below 1 mmol Pi /gDW. G3P conversion into PEP (flux r8) is regulated by Pi concentration with a flux increase below 1 mmol Pi /gDW is required. TCA cycle (flux r9) is regulated by the $\text{NAD}^+ / (\text{NAD}^+ + \text{NADH})$ ratio. A ratio above 0.5 will induce a flux increase. GLC (flux 21) and FRU (flux 22) uptake require a STA concentration below 0.07 and 0.02 mmol/gDW, respectively. OP synthesis (flux r11) is regulated by intracellular Pi concentration with a flux increase above 0.1 mmol Pi /gDW. There is also a minimum OP concentration of 0.045 mmol/gDW required for the cell to be growing. OP degradation (flux 23) is controlled by intracellular Pi concentration with a flux increase below 0.03 mmol Pi /gDW. LIP (flux r15) and ORA (flux r17) degradation into A-CoA is controlled by NADH concentration with fluxes increase below 1 mmol NADH/gDW. Phosphofructokinase regulation (flux r18) is controlled by intracellular Pi with a flux increase below 1 mmol Pi/gDW. Respiration rate (flux 30) is controlled by $\text{NDP} / (\text{NTP} + \text{NDP})$ ratio with a flux increase above 0.5 is required.

4.2.4 MATERIALS AND METHODS

Culture Conditions

Hairy roots of *Catharanthus roseus* L. G. Don were established as described by Bhadra et al., (1993), with *Agrobacterium rhizogenes* strain A₄. Hairy roots were

transferred every month in Petri dishes in 25 mL of minimum medium (Bécard and Fortin, 1998) supplemented with 3% (w/v) sucrose and with three times the concentration in KH_2PO_4 (0.106 mM) of the M medium (Bécard and Fortin, 1988). The minimum medium was used instead of the B5 medium with half the salt concentrations (B5/2) since Tikhomiroff (2001) observed the presence of callus when the current hairy root cell line was cultivated in the B5/2 medium. In the batch culture experiments, approximately 0.25 g FW of hairy root were inoculated in each petri dish containing 25 ml of minimum medium. In the fed-batch culture experiments, approximately 0.25 g FW of hairy root were inoculated in petri dish containing 25 mL of minimum medium. The medium was renewed at three or two day intervals to assure presence of Pi in the medium at anytime during the culture. Whole Petri dishes were harvested periodically and taken as distinct samples. Liquid of each dish was filtered at 0.45 μm and stored at -20°C for further analysis. Roots were filtered under vacuum on a glass fibber filter and rinsed 3 times with 20 ml of de-ionized water. The filtered roots were removed from the filter and weighed for fresh weight (FW) in a disposable aluminium dish (Fisher Scientific, # 08-732) on a precision balance (Sartorius). Fresh roots were immediately frozen into liquid N_2 and stored in liquid N_2 for further analysis. Root samples were then freeze dried (Duratop and Duradry, FTS Systems inc., Stone Ridge NY), weighted for dry weight (DW) measurement and grinded (mortar and pestle) for further analysis. All further analyses were performed using freeze dried roots.

Amino Acids Analysis

Approximately 2 mg of freeze dried roots were extracted in 1 mL of 2% w/v 5-sulfosalicylic acid. The samples were sonicated for 15 minutes and then centrifuged at 12000g for 5 minutes. The supernatant was analysed for total amino acids by the Rosen colorimetric method (Rosen, 1957). The Rosen colorimetric method consists of adding cyanid-acetate buffer and 3% Ninhydrin in Methyl Cellosolve and heating the sample for 15 minutes at 100°C. After removing the sample from heat, isopropyl alcohol is added to the sample. The sample is allowed to cool and is read in a spectrophotometer at 570 nm. The results from this test included all amino acids and proteins presents in the cell.

Carbohydrates Extraction

Approximately 10 mg of freeze dried roots was washed with 80% ethanol and then centrifuged at 16 000 g for 5 minutes. This wash was done three times and each time the supernatant was evaporated, re-suspended in 75% acetonitrile and 25% water (mobile phase) and then kept for the glucose, fructose, sucrose analyses. After the third wash the pellet was kept for the starch analysis.

Carbohydrates Analysis

Glucose, fructose and sucrose analysis was performed with a Beckman Coulter HPLC system equipped with a pump module 126, an auto-sampler model 508 and a refractive index detector. A Prevail Carbohydrate ES column 4.6 mm x 250 mm (Alltech Canada, Guelph, Ontario, Canada), coupled with a Prevail Carbohydrate ES All-Guard 4.6 mm x 7.5 mm guard column (Alltech Canada,

Guelph, Ontario, Canada), was used at a column temperature of 35°C. The injection volume was 20 µL. The mobile phase consisted of acetonitrile and water 75:25 (v/v) at 1.0 mL/min. Starch was analyzed using the Strach Analysis Assay Kit (SA-20) from Sigma Aldrich as described therein.

Ions Extraction

Ions were extracted from approximately 10 mg of freeze dried roots in 1.5 mL of 5% (w/v) Trichloroacetic acid. This mixture was sonicated at 40°C for 30 minutes and then centrifuged at 16 000g for 10 minutes. The supernatant was filtered at 0.45 µm and analysed by HPLC.

Ions Analysis

Culture medium and intracellular contents in majors ions (Cl^- , NO_3^- , H_2PO_4^- , SO_4^{2-} , NH_4^+ , K^+ , Na^+ , Ca^{2+}) were analyzed using a Dionex HPLC system (Dionex Canada Ltd., Oakville, Canada) equipped with an isocratic pump, an automated sampler AS-3500, and a pulsed electrochemical detector in the conductivity mode, controlled by the Dionex A1-450 software for cations and the Dionex Peaknet software for anions. Anions were separated using a 4 x 250 mm IONPAC AS14A-SC analytical column, an IONPACAG14A-SC guard column and a ASRS-1 anion self regeneration suppressor to improve the signal-to-noise ratio. The mobile phase consisted of an aqueous buffer of 2mM Na_2CO_3 / 1 mM NaHCO_3 solution flowing at a rate of 1.0 mL/min. Cations were separated using a 4 x 250 IONPAC CS-12 analytical column, a IONPAC CG-12 guard column, and a CSRS-1 cation self regenerating suppressor. The mobile

phase was an aqueous 20 mM methanesulphonic acid solution flowing at a rate of 0.9 mL/min.

Model Simulations

The model simulations were done using the Matlab software (The MathWorks Inc., Natick, MA, USA). The differential equations system was integrated through the Ordinary Differential Equation solver (ode15s.m). The model error minimization was done by means of manual and algorithm base methods. The former was done to find good first estimates. The latter was then used to enhance the fitting of the curves. The algorithm used was the "fminsearch.m" subroutine (Optimisation toolbox, Matlab) based on the Nelder-Mead simplex algorithm (Nelder and Mead, 1985).

4.2.5 RESULTS AND DISCUSSION

Model Calibration

Model calibration was performed using experimental data obtained from *C. roseus* hairy root batch and fed-batch cultures. Because of a high number of unknown parameters, as shown in Tables 4.5 and 4.6, model calibration has been achieved in multiple steps. Parameter values were obtained from experimental data and from literature, taking values from different plant species when unavailable for *C. roseus*. Adjustment of unknown parameters as well as of values taken from literature for other plant species was performed manually in

parallel to using a minimization function (fmins) from Matlab software (The MathWorks Inc., Natick, MA, USA) focusing on the minimization of the sum of squares of the normalized errors as described above.

$$\text{error} = e_{\text{NO}_3} + e_{\text{P}_i} + e_{\text{NH}_4} + e_{\text{ESUC}} + e_{\text{EGLU}} + e_{\text{EFRU}} + e_{\text{ENO}_3} + e_{\text{EP}_i} + e_{\text{AA}} + e_{\text{STA}} + e_{\text{SUC}} + e_{\text{FRU}} + e_{\text{GLC}} + e_{\text{X}}$$

$$\text{where } e_i = \sum \left[\frac{(e_i)_{\text{exp}} - (e_i)_{\text{model}}}{\frac{1}{2}(\max(e_i)_{\text{exp}} + \min(e_i)_{\text{exp}})} \right]^2$$

Even though the weigh of each error term is taken as 1, the error reduction was based on data believed to have lowest experimental error (EP_i , ENO_3^- , biomass). Minimization of the error by using the minimization function was rejected if it increased the error of EP_i , ENO_3^- or biomass. Experimental data obtained in batch culture and only during the growth phase in fed-batch culture (see *Simulation of Hairy Root Growth* section) were considered. Values for estimated parameters that were outside the ranges found in literature were rejected. With the amount of kinetic parameters that needed to be adjusted it can be understood that there was no unique solution in the setting of optimal parameter values. A sensitivity analysis clearly shows (Figure 4.9) that the value of some of the parameters can still be optimized to reduce the error for the batch or for the fed-batch but not for both simultaneously and these values were then used further. Parameters used in this model do not vary with time because there is no differentiation on age or roles that have been described in the model.

However, to take into account those phenomena the parameters would have to be taken as dynamic eventually in further studies.

Model Behaviour

Simulation of Hairy Root Growth

Model simulations described hairy root growth for both batch and fed-batch cultures (Figure 4.10). The plateau in hairy root dry weight observed at 40 d in the batch culture was also simulated. Surprisingly, both batch and fed-batch cultures behaved similarly with similar specific growth rate and growth cessation around 40 d. Periodic (each 3 days) medium renewal has avoided nutrient depletion in macronutrients and sugars (only sugars, Pi and NO_3^- are shown in Figure 4.11). However, the plateau observed in the fed-batch experiment may have resulted from a limitation in a non-measured nutrient such as micronutrients. Experimental data of the fed-batch that were obtained before the occurrence of the plateau were considered for model calibration and other analyses. Simulation of the fed-batch culture has predicted continuous growth from day 15. Therefore, the strategy of describing cell growth as a function of intracellular content in macromolecules (cell building blocs) thus showed to perform adequately. This result may confirm the global model structure including the pseudo-steady state hypothesis for the primary metabolic network (SMN), as recently showed by Rontein et al. (2002) for tomato suspension cells

Table 4.5. Affinity constants (K_m)

Component	Value	Literature	Species	Units	References
AA	0.0147			mmol/gDW	
FRU	0.120			mmol/gDW	
GLC	0.120			mmol/gDW	
LIP	0.00254			mmol/gDW	
NAD ⁺	0.000 23			mmol/gDW	
NADH	0.000 30			mmol/gDW	
NADP ⁺	0.000 585			mmol/gDW	
NADPH	0.000 37			mmol/gDW	
NDP	0.010			mmol/gDW	
NH ₄ ⁺	0.151			mmol/gDW	
NTP	0.006 25			mmol/gDW	
ORA	0.008 07			mmol/gDW	
Pi	0.200			mmol/gDW	
PPi	0.0735			mmol/gDW	
SUC	1.00			mmol/gDW	
STA	1.00			mmol/gDW	
STH	0.2			mmol/gDW	
OP	0.020			mmol/gDW	
EFRU	0.0461			mM	
EGLC	0.0535			mM	
ENO ₃ _HA	0.0677	0.281 0.005-0.2	<i>Citrus reticulata</i> <i>Arabidopsis thaliana</i>	mM	Cerezo et al., 1997 Filleur and Daniel-Vedele, 1999
ENO ₃ _LA	1.43	0.006-0.02 0.5	<i>Zea mays</i> <i>Arabidopsis thaliana</i>	mM	Crawford and Glass, 1998 Filleur and Daniel-Vedele, 1999
EPI_HA	0.0026	0.02-0.1 0.007 0.0056 0.0035 0.003 0.0025	<i>Zea mays</i> <i>C. roseus</i> <i>C. roseus</i> <i>C. roseus</i> <i>C. roseus</i> <i>Nicotinana tabacum</i>	mM	Crawford and Glass, 1998 Sakano et al., 1995 Schmidt et al., 1992 Furihata et al., 1992 Furihata et al., 1992 Shimogawara and Usuda, 1995
		0.0079 0.00049	<i>Lemma gibba</i> <i>Zea mays</i>		Ullrich-Eberius et al., 1984 Sentenac and Grignon, 1985
		0.0018	<i>Zea mays</i>		Sentenac and Grignon, 1985
EPI_LA	0.080	0.900 0.0463 0.058	<i>C. roseus</i> <i>C. roseus</i> <i>Nicotinana glutinosa</i>	mM	Furihata et al., 1992 Furihata et al., 1992 Mettler and Leonard, 1979
		0.076	<i>Lemma gibba</i>		Ullrich-Eberius et al., 1984
ESUC	12.01			mM	
NO ₃	0.369			mmol/gDW	

Table 4.6. Maximum reaction rates ($V_{\max}$)

Reaction in TPMP	Current value (mmol/gDW/d)	Literature	Species	Reference
r1	100		<i>C. roseus</i>	Model calibration
r2	2		"	"
r3	0.764		"	"
r4	10000		"	"
r5	75		"	"
r6	1.00		"	"
r7	0.1		"	"
r8	3.0		"	"
r9	30.0		"	"
r10	2.00		"	"
r11	6.00		"	"
r12	0.05		"	"
r13	15.0		"	"
r14	2.00		"	"
r16	5.00		"	"
r18	0.764		"	"
r19	0.1		"	"
r20	0.01		"	"
21	15.1		"	"
22	5.00		"	"
23	0.500		"	"
24	0.100		"	"
25	0.75		"	"
26	33.5		"	"
27 HA	0.0015	0.1555	<i>Citrus reticulata</i>	Cerezo et al., 1997
		0.072-0.1968	<i>Zea mays</i>	Crawford and Glass, 1998
27 LA	0.167	0.72-1.92	<i>Zea mays</i>	Crawford and Glass, 1998
28	1.00		<i>C. roseus</i>	Model calibration
29	1.00		"	"
30	900		"	"
31 HA	0.00175	3.80	<i>C. roseus</i>	Sakano et al., 1995
		0.415	<i>C. roseus</i>	Schmidt et al., 1992
		0.127	<i>C. roseus</i>	Furihata et al., 1992
		0.196	<i>C. roseus</i>	Furihata et al., 1992
		1.96	<i>Nicotiana tabacum</i>	Shimogawara and Usuda, 1995
		0.0369	<i>Nicotiana tabacum</i>	Shimogawara and Usuda, 1995
		0.1728	<i>Lemma gibba</i>	Ullrich-Eberius et al., 1984
		0.13824	<i>Zea mays</i>	Sentenac and Grignon, 1985
31 LA	0.040	1.268	<i>C. roseus</i>	Furihata et al., 1992
		0.090	<i>C. roseus</i>	Furihata et al., 1992
		0.046	<i>Nicotina glutinosa</i>	Mettler and Leonard, 1979
		0.265	<i>Lemma gibba</i>	Ullrich-Eberius et al., 1984
		0.023	<i>Lemma gibba</i>	Ullrich-Eberius et al., 1984
GLC	1.12		<i>C. roseus</i>	Model calibration
32	0.140		"	"

(see also Stitt and Fernie, 2003).

In this work, total amino acids (AA) contents of hairy roots and culture medium was the only macromolecule measured. The analytical method has accounted for the sum of free amino acids and of proteins. Simulated total amino acids concentration for the fed-batch culture follows experimental data. On the other hand, the amino acids concentration for the batch culture is overestimated. This deviation can not be explained, however, by exsuded amino acids and proteins since it was not detected in the used culture media. Values of 0.25 mmol AA/gDW (batch) and 0.4 (fed-batch) mmol AA/gDW were measured as compared to 0.21 mmol AA/gDW for tobacco suspension cells using B5 medium (Fernie et al., 2001) and 0.19 mmol AA/gDW in potato tuber (Roessner et al., 2000). Total amino acid rate of biosynthesis of 0.046 mmol/gDW/d obtained from model simulation was in the range of 0.094 to 0.36 mmol/gDW/d observed by Rontein et al. (2002) for tomato suspension cells. Maximal simulated biosynthesis rate of structural hexoses (STH) was 0.0046 mmol/gDW/d as compared to 0.36 mmol/gDW/d for Rontein et al. (2002). Maximal net starch (STA) formation was 0.36 mmol/gDW/d as compared to 0.15 mmol/gDW/d (Rontein et al., 2002). Rontein et al. (2002) have reported a specific growth rate of 0.4 d^{-1} for tomato suspension cells in B5 medium as compared to 0.036 d^{-1} in this study for *C. roseus* and using a minimal medium. The minimal medium used has been reported previously to induce lower growth rate for carrot hairy roots

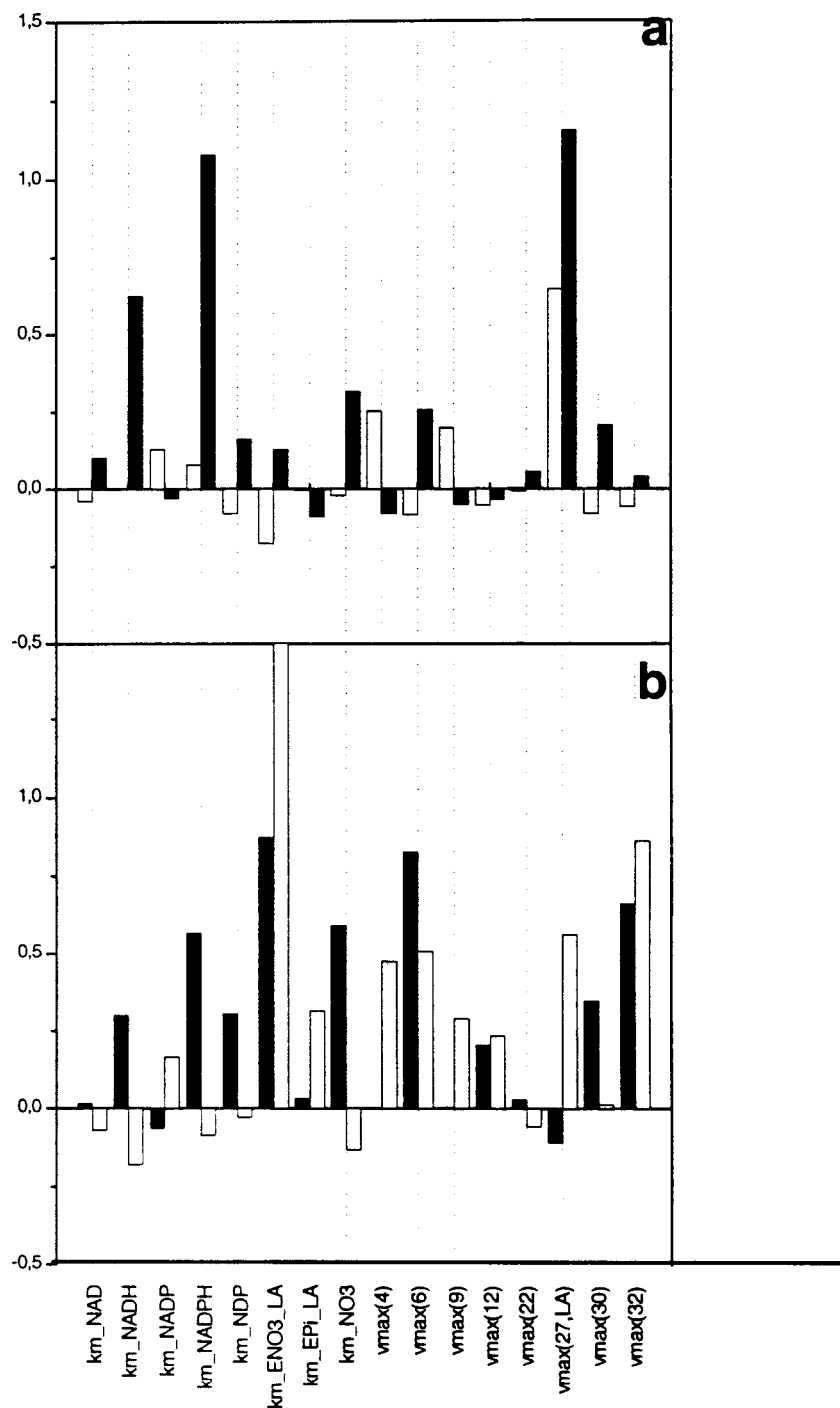


Figure 4.9. Sensitivity analysis on model parameters. Relative change in error is calculated as described in the Model Calibration section. Parameter adjustment of +50% (Empty bar). Parameter adjustment of -50% (Solid bar). Parameters not shown have relative error changes above a value of -0.06.

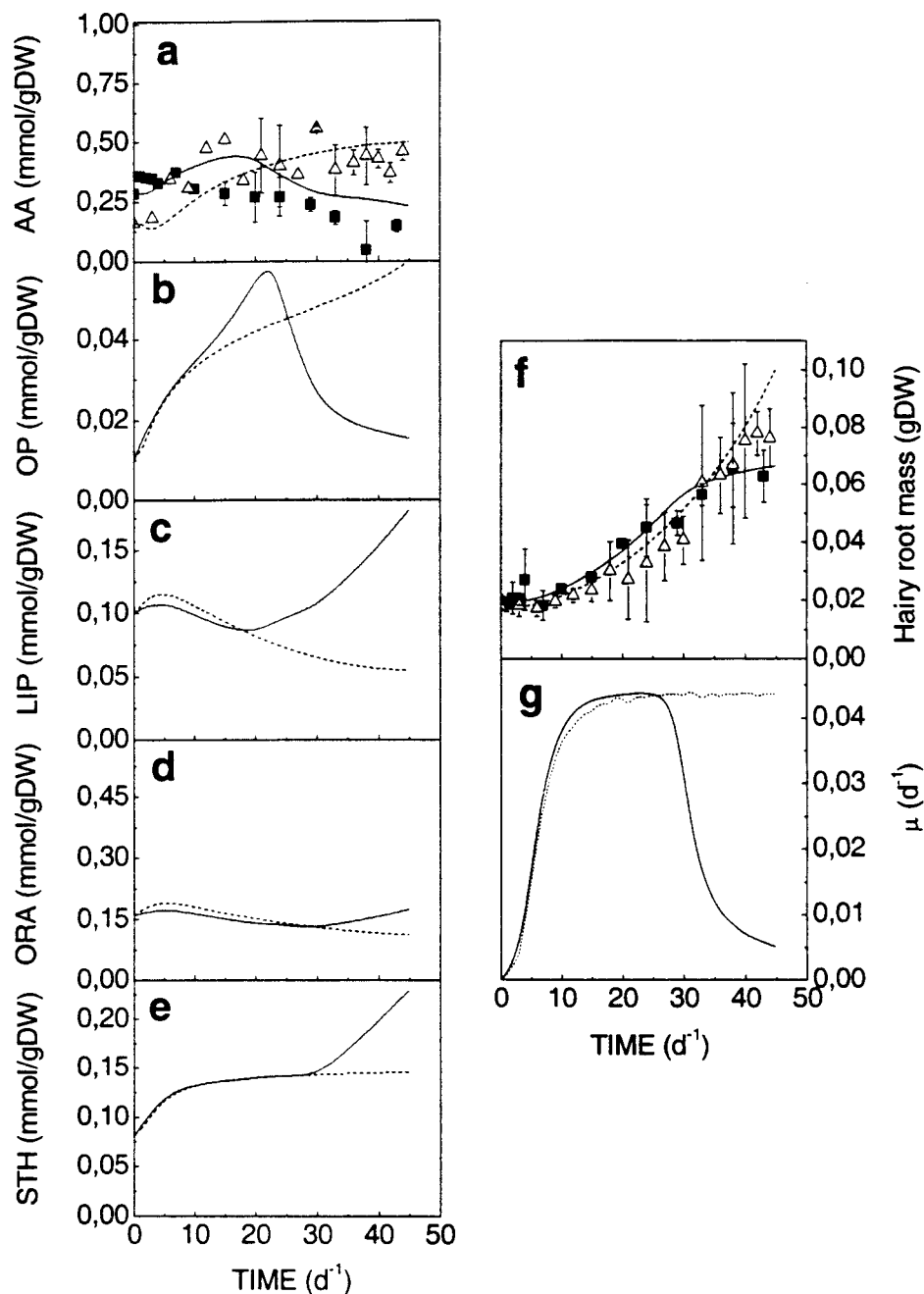


Figure 4.10. *C. roseus* hairy root intracellular concentration in amino acids (a), organic phosphate (b), lipids (c), organic acids (d) and structural hexoses (e) and biomass (f) and specific growth rate (g) with time. The specific growth rate is described as a function of intracellular concentration in macromolecules. Experimental data for *C. roseus* hairy root batch (■) and fed-batch (△) liquid cultures in Petri dish. Model simulations for batch (solid lines) and fed-batch (dashed lines) cultures.

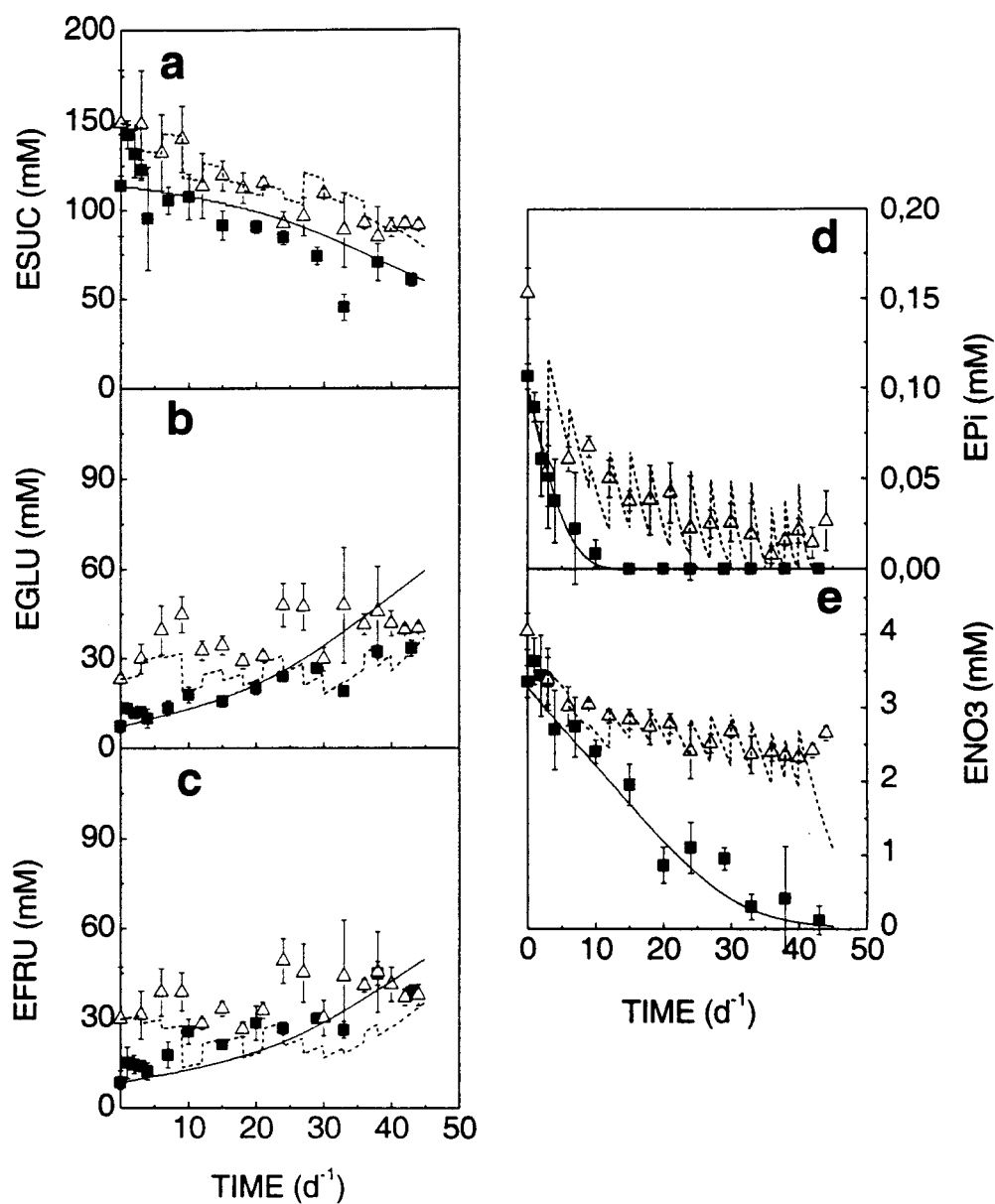


Figure 4.11. Extracellular concentrations of sucrose (a), glucose (b), fructose (c), inorganic phosphate (d), nitrate (e) with time. Experimental data for *C. roseus* hairy root batch (■) and fed-batch (Δ) liquid cultures in Petri dish. Model simulations for batch (solid lines) and fed-batch (dashed lines) cultures.

(Jolicoeur et al., 2002). A maximal sucrose hydrolysis rate of 0.78 mmol/gDW/d was observed as compared to 1.7 mmol/gDW/d for *D. carota* hairy roots in minimal medium (Jolicoeur et al., 2002). However, differences in metabolic fluxes may be explained with differences in the specific growth rate among plant species and from using different culture media.

Model simulations of batch and fed-batch culture modes behave similarly during the growth phase in the macro-molecule concentration evolutions. However, since the concentration in structural hexoses, lipids and organic acids rise when the biomass reaches a plateau, the growth seems to be controlled by the organic phosphate (OP) concentration or the amino acids (AA). The concentration in these two macro-molecules decrease after having reached a maximum on day 20. The control of growth by amino acids is however improbable, since the affinity constant of amino acids is 0.147 mmol/gDW and the concentration of amino acids is never below 0.25 mmol/gDW. Therefore the growth is only controlled by OP concentration in the simulations. This can be explained by the fact that the only decision function in the equation accounting for growth in the model is based on OP.

Simulation of Hairy Root Nutrition

Extracellular sucrose (ESUC) concentration was simulated by the model for both the batch and the fed-batch cultures, thus suggesting that the sucrose hydrolysis and transport strategy was adequate (Figure 4.11). In the case of

glucose (EGLC) and fructose (EFRU) the simulations for the batch culture followed experimental data before growth cessation has occurred at 35 d. Then, glucose and fructose seemed to accumulate in the culture medium as compared to experimental data, suggesting that the model is underestimating glucose and fructose uptake at reduced growth. In the case of the fed-batch culture the model has simulated adequately sugar experimental data except for extracellular glucose and fructose which were underestimated for most of the culture duration. This may be due to the overestimation of the used medium trapped by the roots when the medium was renewed (≈ 79 mL/gDW). The function used to take into account this phenomena need to be more accurate. The intracellular sucrose was satisfactorily simulated for both cultures (Figure 4.12). On the other hand, the intracellular glucose and fructose are overestimated by the model suggesting that the carbone utilization by the model is underestimated. This may be due by the underestimated metabolic flux to the secondary metabolism. Model simulations for starch (STA) concentration were underestimated for the batch culture and overestimated for the fed-batch culture. This may be due by a too tight control (steep of the decision function) on the starch formation and utilization. However, the model predicted a plateau and both culture reached one. The experimental data were within ranges found in literature. Contents of 0.4 mmol SUC/gDW (batch) and 0.3 mmol SUC/gDW (fed-batch) were obtained as compared to 0.26 mmol SUC/gDW for Roessner et al. (2000) and 0.4 mmol SUC/gDW for Fernie et al. (2001). For glucose, cell

content of 0.2 mmol GLC/gDW to 0.05 mmol GLC/gDW were obtained as compared to 0.24 mmol GLC/gDW (Roessner et al., 2000) and 0.18 mmol GLC/gDW (Ferne et al., 2001). For fructose, cell content of 0.01 mmol FRU/gDW to 0.06 mmol FRU/gDW were observed as compared to 0.0001 mmol FRU/gDW (Roessner et al., 2000) and 0.21 mmol FRU/gDW (Ferne et al., 2001). A high maximum starch accumulation was reached with 1.75 mmol STA/gDW as compared to 0.055 (Ferne et al., 2001) but plant species may behave differently. In the case of Pi, NO₃ and NH₄, model simulations followed experimental data for the complete duration of the batch and the fed-batch cultures except for NO₃ of the fed-batch culture. The underestimation of Pi at the end of the fed-batch culture is probably due to the fact that the model still predict growth while the culture reached a plateau. The overestimation of NO₃ in the fed-batch culture may be due to the underestimated metabolic flux to anabolic reactions. Cells accumulation capacity in Pi was clearly observed since its depletion from the culture medium occurred at 15 d, and then intracellular content (Figure 4.12) has continued to support root growth. It is interesting to note that the final intracellular Pi concentration in the batch culture seemed to reach a plateau at 0.05 mmol/gDW that has been simulated. This plateau may represent Pi that is essential to maintain the endogeneous metabolism (Mimura, 1999). A plateau in Pi accumulation has only been observed for the fed-batch culture at 0.2 mmol/gDW, which was similar to that obtained in batch culture.

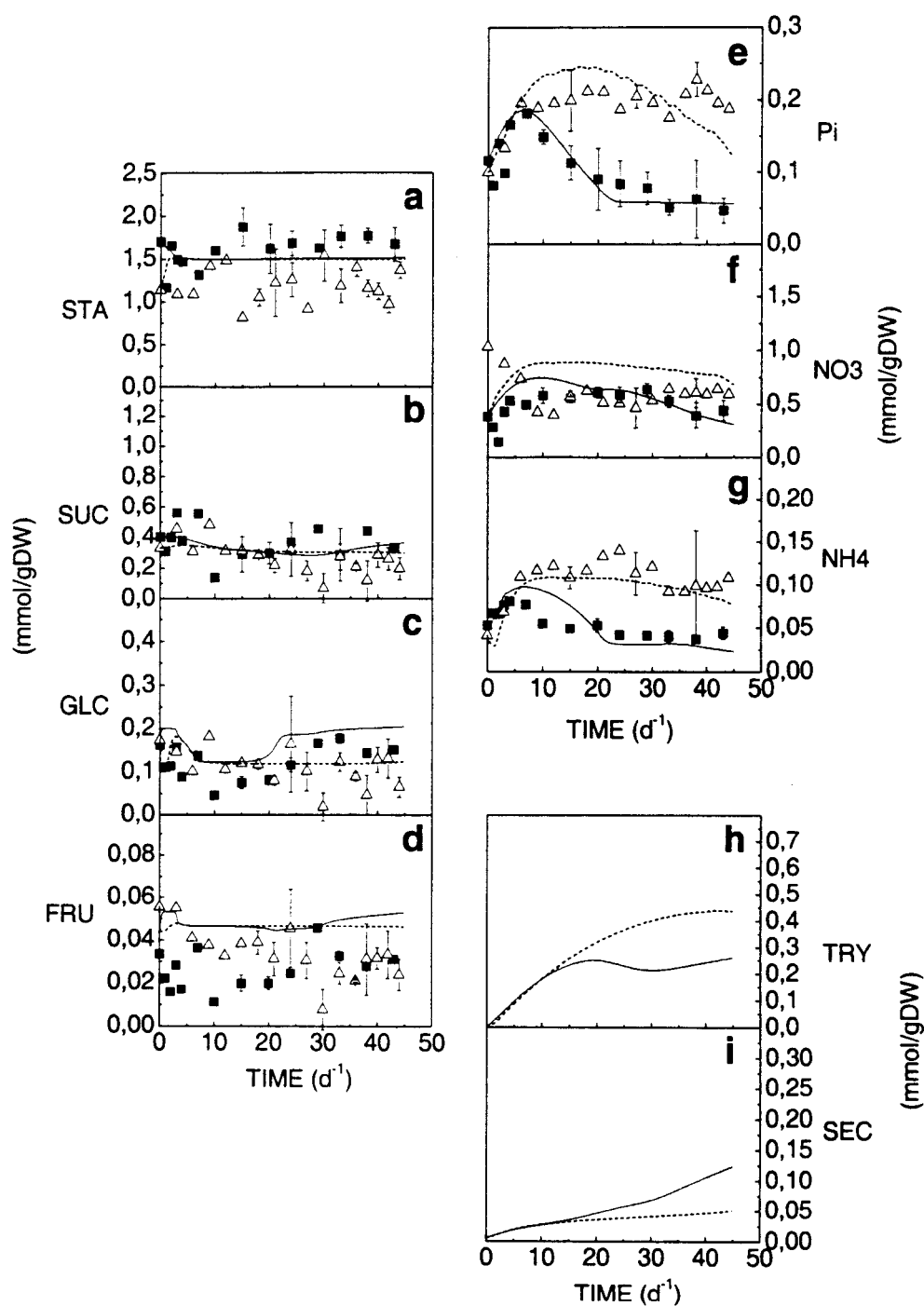


Figure 4.12. Intracellular concentrations of starch (a), sucrose (b), glucose (c), fructose (d), inorganic phosphate (e), nitrate (f), ammonium (g), tryptamine (h) and secologanine (i) with time. Experimental data for *C. roseus* hairy root batch (■) and fed-batch (Δ) liquid cultures in Petri dish. Model simulations for batch (solid lines) and fed-batch (dashed lines) cultures.

This value is close to the maximum value of 0.23 mmol/gDW measured for carrot hairy roots (Jolicoeur et al., 2002). NO_3^- concentration kept at maximal value for the fed-batch and slowly decreased to its initial value ($t = 0\text{d}$) for the batch. Maximum intracellular nitrate and ammonium concentrations were reached after 5 days, which was ~ 10 days before reaching maximum specific growth rate. A value of 0.6 mmol NO_3^-/gDW was measured for both cultures. Intracellular nitrate was kept constant for the fed-batch but decreased to its initial value ($t = 0\text{d}$) for the batch. Intracellular ammonium reached value of 0.12 mmol NH_4^+/gDW for the fed-batch culture, which has decreased to 0.09 mmol NH_4^+/gDW from 30 d. For the batch culture intracellular ammonium reached a maximum at 5 d and then decreased closely to its initial value at inoculation. The simulated amino acid concentration for fed-batch culture followed the trend observed experimentally but the simulation has behaved opposing to experimental data obtained for batch culture. Amino acids concentration measured in the medium may be involved in the simulation difference knowing that an average Petri dish content of 0.04 gDW in 25 ml culture medium is around 1.5 gDW/l and that the detection limit of the method was of $\sim 1\text{mmol/l}$. This detection limit then represents a maximum error (non measured) of 0.67 mmol AA/gDW. Because the secondary metabolites can not be completely quantified, the secondary metabolism was simplified to the formation of tryptamine (reaction #1 in Figure 4.3) and secologanine (reaction #2 and 10 in Figure 4.10). The amino acids synthesis and secondary metabolites pathway in

the model may require to be more specified. The model did not seem to be affected by the fact that it did not describe vacuolar Pi compartmentalization, as previously suggested (Jolicoeur et al., 2002).

Sensitivity Analysis

The sensitivity analysis shows the parameters and pathways having the most effect on model behavior. Since the nitrate is overestimated in the fed-batch culture and therefore contribute a lot to the error, it is normal to find that the parameters related to nitrate ($K_m \text{ ENO}_3^- \text{ LA}$ and $v_{\max}(27, \text{LA})$) have the greatest impact on model behavior. This fact explicitly shows that the synthesis of amino acids and secondary metabolism pathways must be included more in thoroughly in the model. The affinity constants of most of the energetic shuttles (NAD^+ , NADH , NADP^+ , NADPH and NDP) being part of a lot of reactions also have a big impact on model behavior. It has already been showed that energetic shuttles are important in the control of metabolic pathways (Fridlyand and Scheibe, 1999; Affourtit et al., 2001; Farquhar et al., 2001). However, the parameter that must be noted is the maximum reaction rate for respiration ($v_{\max}(30)$). Since this parameter has one of the biggest effect on model behavior, the oxygen in the reaction should not be taken as non-limitant and should be included in further studies. Doing this will improve the truthfulness of the respiration flux.

Performance of Using Decision Functions

The use of decision functions accounting for accumulated nutrients, co-substrates, and energy shuttles showed to be efficient in simulating *C. roseus* hairy roots growth and nutrition. It is thus suggesting that the selected combination of decision functions can be used to describe metabolic flux network regulation. ATP, ADP, NADH, NAD⁺, NADPH and NADP⁺ are crucial to support the catalytic activity driving most of the biochemical reactions and the control effect of these molecules is well established. In plants, the ATP to ADP ratio is involved in control of photosynthesis (Fridland and Scheibe, 1999; Fridland, 1998). The root cells were energy rich with high levels in NADPH, NTP and to a lesser extent in NADH (Figure 4.13). Simulated energy levels decreased from 10 d in batch culture and were constant for the fed-batch culture. Since the medium was renewed every 3 days the fed-batch experiment a pseudo steady state was expected. NTP to NDP ratio of 3.5 was simulated as compared to 3.4 observed by Ferni et al. (2001) for tobacco suspension cells. These authors have measured level of 0.13 $\mu\text{mol/gDW}$ in NTP and 0.038 $\mu\text{mol/gDW}$ in NDP as compared to 7.0 $\mu\text{mol/gDW}$ in NTP and 2.0 $\mu\text{mol/gDW}$ in NDP obtained through simulations, respectively. Intracellular nutrients such as glucose, fructose and sucrose were helpful in deciding to produce and store starch (STA) or to degrade it for internal use as simulated trends are similar to experimental data. Regulation from intracellular Pi concentration clearly showed to be important (AA, STH) follow the same trend. On the other hand, LIP, ORA

and OP concentration follow the same trend for the first 15-20 days but their concentrations are lower for rest of the batch experiment. The limitation in free Pi (Figure 4.11) forces the model to use alternative pathways. The LIP, ORA and OP formation fluxes are near to 0 and the OP degradation begins. The OP is depleted until it is near the threshold for growth and growth rate is decreased.

4.2.6 CONCLUSION

The proposed metabolic model structure showed to perform efficiently in describing hairy roots growth and nutrition. However, some nutrients and metabolites were overestimated (starch, nitrate for the fed-batch culture, amino acids for the batch culture and fructose for both culture) and some were underestimated (extracellular glucose and extracellular fructose for the fed-batch culture and starch for the batch culture). The extracellular glucose and fructose concentrations were also overestimated when the growth rate was near 0. The model, at this step of development, was tested on its structure. Therefore, the similar trends between the model simulations and experimental data are very promising. More precision on the model simulation and parameter values will be accomplished with more experimentation. Using three nutrients of the culture medium (Pi, NO_3^- and sucrose) the structure of the model is based on the metabolic pathways of plant cells. For ease of simulation and comprehension, the model is divided into three parts: stationary primary

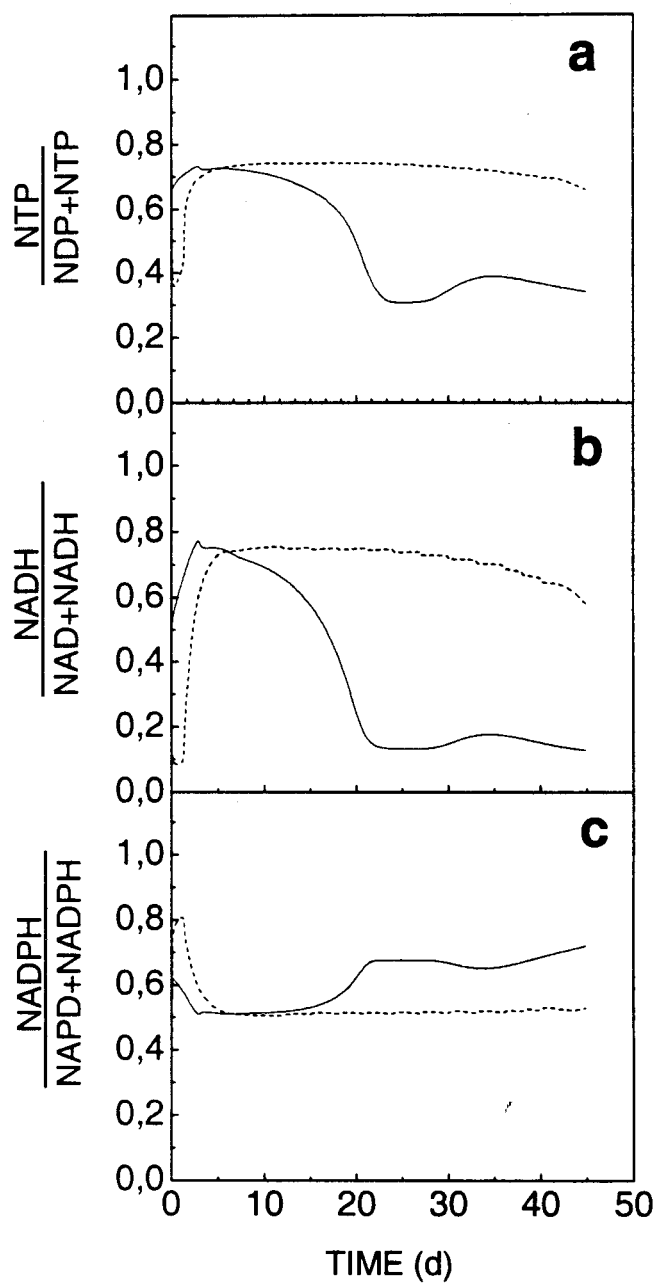


Figure 4.13. Ratios in energetic shuttles $NTP/(NDP+NTP)$ (a), $NADH/(NADH+NAD)$ (b) and $NADPH/(NADPH+NADP)$ (c) with time. Model simulations for *C. roseus* hairy root batch (solid lines) and fed-batch (dashed lines) liquid cultures in Petri dish.

Table 4.7 : Initial Values (t=0) Used for Model Simulations

Component	Values	Units	Species	References
AA	0.286/0.162	mmol/gDW	<i>C. roseus</i>	Batch/Fed-batch
FRU	0.0336/0.0556	mmol/gDW	"	Batch/Fed-batch
GLC	0.1625/0.1744	mmol/gDW	"	Batch/Fed-batch
SEC	0.00515	mmol/gDW	"	Tikhomiroff, 2001
LIP	0.1	mmol/gDW	<i>Nicotiana tabacum</i> suspension cells	Fernie et al., 2001
NAD ⁺	2.43e-4	mmol/gDW	Young photosynthetic tissue	Bieleski, 1973
NADH	1.6e-5	mmol/gDW	"	Bieleski, 1973
NADP ⁺	1.22e-4	mmol/gDW	"	Bieleski, 1973
NADPH	4.1e-5	mmol/gDW	"	Bieleski, 1973
NDP	7.13e-4	mmol/gDW	"	Bieleski, 1973
NH ₄ ⁺	0.053/0.041	mmol/gDW	<i>C. roseus</i>	Batch/Fed-batch
NTP	1.296e-3	mmol/gDW	Young photosynthetic tissue	Bieleski, 1973
ORA	0.16	mmol/gDW	<i>N. tabacum</i> suspension cells	Fernie et al., 2001
Pi	0.117/0.100	mmol/gDW	<i>C. roseus</i>	Batch/Fed-batch
PPi	2.43e-5	mmol/gDW	potato tubers	Farré et al 2001
SUC	0.403/0.330	mmol/gDW	<i>C. roseus</i>	Batch/Fed-batch
STA	1.705/1.137	mmol/gDW	<i>C. roseus</i>	Batch/Fed-batch
STH	0.081	mmol/gDW	<i>N. tabacum</i> suspension cells	Fernie et al., 2001
TRY	0.001428	mmol/gDW	<i>C. roseus</i>	Tikhomiroff, 2001
OP	0.01	mmol/gDW	"	Model calibration
EFRU	8.33/29.6	mM	"	Batch/Fed-batch
EGLC	7.22/23.0	mM	"	Batch/Fed-batch
ENH ₄ ⁺	0	mM	"	Culture medium
ENO ₃ ⁻	3.27/3.27	mM	"	Batch/Fed-batch
EPI	0.100/0.100	mM	"	Batch/Fed-batch
ESUC	114.0/149.0	mM	"	Batch/Fed-batch
NO ₃ ⁻	0.385	mmol/gDW	"	Batch
X	0.0197/0.0180	mM	"	Batch/Fed-batch

metabolic pathway, transient primary metabolic pathway and secondary metabolic pathway. Purpose of modeling metabolic fluxes in plant cells is to detect possible regulatory roles (Wiechert, 2002). Therefore, the use of a model structure describing cell physiology will be of much help in the identification of limited reactions in the metabolism of plant cells secondary metabolism. The target was to develop and validate a model structure. The confidence level on parameter values may be taken as preliminary. Many authors argue that such parameters values are normally evolving through a cell culture. Model structure can thus evolve including genetic transcription regulation. At this point, the model is useful in predicting culture behaviour. It needs to be improved by the addition of many things. As to increase model prediction potential the secondary metabolism has to be implemented as well as its regulation mechanisms. There is no distinction made between vacuolar and cytosolic concentrations. This could results in some error because only the cytosolic part of the nutrients found in the cell can be use for reactions, the vacuolar part is almost only used for storage (Bieleski 1973). The hypothesis of stationary state in the primary metabolism and the decision functions used in the model will be further tested. A better study in metabolic regulation could lead to the usage of more adapted functions, and better simulations in transient states.

4.2.7 ACKNOWLEDGEMENTS

The Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and the "Fonds Québécois de la recherche sur la nature et les technologies" (FQRNT) funded this research project.

4.2.8 REFERENCES

Affourtit C, Krab K, Moore AL. 2001. Control of plant mitochondrial respiration. *Biochim. Biophys. Acta.* 1504:58-69.

Bailey JE. 1998. Mathematical Modeling and analysis in biochemical engineering: past accomplishments and future opportunities. *Biotechnol. Progr.* 14:8-20.

Bécard G, Fortin JA. 1998. Early Events of Vesicular-Arbuscular Mycorrhiza Formation on Ri T-DNA Transformed Roots. *New Phytol.* 108:211-218.

Bhadra R, Vani S, Shanks JV. 1993. Production of Indole Alkaloids by Selected Hairy Root Lines of *Catharanthus roseus*. *Biotechnol. Bioeng.* 41:581-592.

Bieleski R. 1973. Phosphate pools, phosphate transport, and phosphate availability. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 24:225-252.

Brownleader MD, Harbone JB, Dey PM. 1997. Carbohydrate metabolism : primary metabolism of monosaccharides. In: Dey PM, Harbone JB, eds, *Plant Biochemistry*, Academic Press, London, pp 111-141.

Burns DJW, Beever RE. 1977. Kinetic characterization of the two phosphate uptake systems in the fungus *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.* 132:511-519.

Byun SY; Pedersen H. 1994. Two-phase airlift fermentor operation with elicitation for enhanced production of Benzophenanthridine alkaloids in cell suspensions of *E. californica*. *Biotechnol. Bioeng.* 44:14-20.

Cerezo M. Garcia AP, Serna MD, Primo-Millo E. 1997. Kinetics of nitrate uptake by Citrus seedlings and inhibitory effects of salinity. *Plant Sci.* 126:105–112.

Contin A, van der Heijden R, Lefeber AWM, Verpoorte R. 1998. The iridoid glucoside secologanin is derived from the novel triose phosphate/pyruvate pathway in a *Catharanthus roseus* cell culture. *FEBS Lett.* 434:413-416.

Crawford NM, Glass ADM. 1998. Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. *Trends Plant Sci.* 3:389-395.

Delmer DP, Haigler CH. 2002. The Regulation of Metabolic Flux to Cellulose, a Major Sink for Carbon in Plants. *Metab. Eng.* 4:22-28.

Farquhar GD, von Caemmerer S, Berry JA. 2001. Models of Photosynthesis. *Plant Physiol.* 125:42-45.

Fernie AR, Roscher A, Ratcliffe RG, Kruger NJ. 2001. Fructose 2,6-biphosphate activates pyrophosphate: fructose6-phosphate 1-phosphotransferase and increases triose phosphate to hexose phosphate cycling in heterotrophic cells. *Planta* 212: 250-263.

Fiehn O, Kopka J, Dörmann P, Altmann T, Trethewey RN, Willmitzer L. 2000. Metabolite profiling for plant functional genomics. *Nat. Biotechnol.* 18:1157-1161.

Filleur S, Daniel-Vedele F. 1999. Expression analysis of a high-affinity nitrate transporter isolated from *Arabidopsis thaliana* by differential display. *Planta* 207:461-469.

Fridlyand LE. 1998. Independent Changes of ATP:ADP or DpH could cause Oscillations in Photosynthesis. *J. Theor. Biol.* 193:739-741.

Fridlyand LE, Scheibe R. 1999. Regulation of the Calvin cycle for CO₂ fixation as an example for general control mechanisms in metabolic cycles. *BioSystems.* 51:79-93.

Furihata T, Suzuki M, Sakurai H. 1992. Kinetic characterization of two phosphate uptake systems with the different affinities in suspension-cultured *Catharanthus roseus* protoplasts. *Plant Cell Physiol.* 33:1151-1157.

Harwood JL. 1997. Plant Lipid Metabolism. In: Dey PM, Harbone JB, eds, *Plant Biochemistry*, Academic Press, London, pp 237-272.

Hughes EH, Shanks JV. 2002. Metabolic Engineering of Plants for Alkaloid Production. *Metab. Eng.* 4:41–48.

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

Lessard PA, Kulaveerasingam H, York GM, Strong A, Sinskey AJ. 2002.

Manipulating Gene Expression for the Metabolic Engineering of Plants. *Metab. Eng.* 4:67–79.

Mettler IJ, Leonard RT. 1979. Ion transport in isolated protoplasts from tobacco suspension cells. II. Selectivity and kinetics. *Plant Physiol.* 63:191-194.

Michal G. 1999. *Biochemical Pathways*. New York, John Wiley & Sons, Inc. 277pp.

Mimura T, Reid RJ, Smith F. 1998. Control of phosphate transport across the plasma membrane of *Chara corallina*. *J. Exp. Bot.* 49:13-19.

Mimura T. 1999. Regulation of phosphate transport and homeostasis in plant cells. *Int. Rev. Cytol.* 191:149-200.

Nelder JA, Mead R. 1965. A Simplex Method for Function Minimization. *Comput. J.* 7:308-313.

Plaxton WC. 1998. Metabolic aspects of phosphate starvation in plants, In: Deikamn J, Lynch J, eds, *Phosphorus in plant biology: Regulatory roles in molecular, cellular, organismic, and ecosystem processes*, American Society of Plant Physiologists, Rockville, pp 164-176.

Raghothama KG. 1999. Phosphate acquisition. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50:665-693.

Ramli US, Baker DS, Quant PA, Harwood JL. 2002. Regulation of Fatty Acid Synthesis. *Biochem. Soc. T.* 30:1043-1046.

- Reid JS. 1997. Carbohydrate metabolism : Structural Carbohydrates, In: Dey PM, Harbone JB, eds, Plant Biochemistry, Academic Press, London, pp 205-236.
- Rosen H. 1957. A Modified Ninhydrin Colorimetric Analysis for Amino Acids. Arch. Biochem. Biophys. 67:10-15.
- Roessner U, Wagner C, Kopka J, Tretheway RN, Willmitzer L. 2000. Simultaneous analysis of metabolites in potato tuber by gas chromatography-mass spectrometry. Plant J. 23:131-142.
- Rontein D, Dieuaide-Noubhani M, Dufourc EJ, Raymond P, Rolin D. 2002. The metabolic architecture of plant cells : Stability of central metabolism and flexibility of anabolic pathways during the growth cycle of tomato cells. J. Biol. Chem. 277:43948-43960.
- Sakano K, Yazaka Y, Okihara K, Mimura T, Kiyota S. 1995. Lack of control in inorganic phosphate uptake by *Catharanthus roseus* (L.) G. Don cells. Plant Physiol. 108:295-302.
- Schmidt ME, Heim S, Wylegalla C, Helmbrecht C, Wagner K. 1992. Characterization of phosphate uptake by suspension cultured *Catharanthus roseus* cells. J. Plant Physiol. 140:179-184.
- Sentenac H, Grinon C. 1985. Effet of pH on orthophosphate uptake by corn roots. Plant Physiol. 77:136-141.

Sharp JM, Doran PM. 2001. Strategies for Enhancing Monoclonal Antibody

Accumulation in Plant Cell and Organ Cultures. *Biotechnol. Progr.* 17:979-992.

Shimogawara L, Usuda H. 1995. Uptake of inorganic phosphate by suspension-cultured tobacco cells: Kinetics and regulation by Pi starvation. *Plant Cell Physiol.* 36:341-351.

Simpson TW, Follstad BD, Stephanopoulos G. 1999. Analysis of the pathway structure of metabolic networks. *J. Biotechnol.* 71:207-223.

Smith FA. 1966. Active phosphate uptake by *Nitella translucens*. *Biochim. Biophys. Acta.* 126:94-99.

Stephanopoulos GS, Aristidou AA, Nielsen J. 1998. *Metabolic Engineering. Principles and Methodologies*, Academic Press, London, 725 p.

Stitt M, Fernie AR. 2003. From measurements of metabolites to metabolomics : an 'on the fly' perspective illustrated by recent studies of carbon-nitrogen interactions. *Curr. Opin. Biotech.* 14:136-144.

Taiz L, Zeiger E. 1998. *Plant Physiology*. Sunderland : Sinauer Associates Inc. 690 p.

Tanner W, Caspari T. 1996. Membrane transport carriers. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47:595-626.

Thornley JHM, Johnson IR. 1990. *Plant crop modeling - A mathematical approach to plant and crop physiology*. Oxford University Press, New York. 669 p.

Tikhomiroff C, Allais S, Klvana M, Hisiger S, Jolicoeur M. 2002. Continuous selective extraction of secondary metabolites from *Catharanthus roseus* hairy roots with silicon oil in a two-liquid-phase bioreactor. *Biotechnol. Prog.* 18:1003-1009.

Ullrich-Eberius CI, Novacky A, van Bel AJE. 1984. Phosphate uptake in *Lemna gibba* G1: Energetics and kinetics. *Planta.* 161:46-52.

Verpoorte R, Contin A, Memelink J. 2002. Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. *Phytochemistry Reviews* 1:13–25.

Wiechert W. 2002. Modeling and simulation: tools for metabolic engineering. *J. Biotechnol.* 94:37-63.

5. Discussion générale

Les simulations du modèle décrivent la croissance des racines pour la culture en mode cuvée et celle en mode semi-cuvée (figure 3.10). Le plateau observé lors de la culture en mode cuvée a aussi été simulé. Étonnamment, les deux cultures se comportent de la même façon: elles ont le même taux de croissance et un arrêt de la croissance vers le jour 40. Le renouvellement périodique (tous les 3 jours) du milieu de la culture cuvée-alimentée a évité l'épuisement des nutriments dans le milieu (figure 3.11). Par contre, le plateau observé lors de la culture cuvée-alimentée peut résulter d'une limitation d'un nutriment non-mesuré. Ainsi, les données expérimentales, pour la culture semi-cuvée, obtenues avant l'obtention du plateau sont utilisées pour la calibration du modèle et les autres analyses. La simulation de la culture cuvée-alimentée prédit une croissance continue à partir du jour 15. Par conséquent, la stratégie consistant en la description de la croissance comme étant une fonction de macro-molécules (blocs de construction pour la cellule) semble performante. Ce résultat semble confirmer la structure globale du modèle incluant l'hypothèse du régime pseudo-permanent pour le métabolisme stationnaire primaire (SPMP) tel que récemment démontré par Rontein et al. (2002) pour les cellules en suspension de tomates (voir aussi Stitt et Fernie, 2003).

Dans ce travail, les acides aminés totaux des racines et du milieu sont les seules macro-molécules mesurées. La méthode analytique permet de

quantifier la concentration totale d'acides aminés libres et de protéines. La simulation des acides aminés lors de la culture cuvée-alimentée suit bien les résultats expérimentaux. Par contre, la concentration des acides aminés est surestimée. Cette déviation ne peut cependant pas être expliquée par les acides aminés et protéines excrétés dans le milieu, car ils n'ont pas été décelés dans le milieu.

Les concentrations de macro-molécules simulées dans les deux cultures durant la phase de croissance ont un comportement semblable. Cependant, puisque les concentrations d'hexoses structuraux, de lipides et d'acides organiques augmentent lorsque la biomasse atteint un plateau, la phase de croissance semble être contrôlée par les concentrations de phosphates organiques ou d'acides aminés. La concentration de ces deux macro-molécules diminue après avoir atteint un maximum au jour 20. Le contrôle de la croissance par la concentration en acides aminés semble toutefois improbable puisque la constante d'affinité pour les acides aminés est de 0.147 mmol/gDW alors que la concentration en acides aminés ne descend jamais en dessous de 0.25 mmol/gDW. La croissance semble donc être contrôlée par la concentration en phosphates organiques. Ceci peut être expliqué par le fait que la seule fonction décisionnelle présente dans l'équation de la croissance est basée sur les phosphates organiques.

Le saccharose extracellulaire a été simulé par le modèle pour les deux cultures. Cela suggère que la stratégie de transport et d'hydrolyse du saccharose semble

adéquate (Figure 3.11). Dans le cas du glucose extracellulaire et du fructose extracellulaire, les simulations de la culture cuvée suivent les données expérimentales avant l'atteinte du plateau en croissance au jour 35. Par la suite, ces nutriments semblent s'accumuler dans le milieu comparativement aux données expérimentales ce qui suggère que le modèle sous-estime le transport de ces deux glucides lorsque le taux de croissance est moins élevé. Dans le cas de la culture semi-cuvée, le modèle simule bien les données expérimentales pour les glucides excepté pour le glucose extracellulaire et le fructose extracellulaire qui sont sous-estimés. Ceci pourrait être expliqué par la sur-estimation du milieu usé retenu par les racines lors du changement de milieu (≈ 79 mL/gDW). La fonction qui tient en compte ce phénomène devra être précisée. Les concentrations intracellulaires des glucides ont été simulées adéquatement (Figure 3.12) pour les deux cultures. Par contre, les concentrations de glucose intracellulaire et de fructose intracellulaire ont été sur-estimées par le modèle ce qui suggère que l'utilisation du carbone dans le modèle est sous-estimé. Ceci pourrait être dû à une sous-estimation du flux métabolique vers le métabolisme secondaire. Les simulations de la concentration d'amidon faites par le modèle sous-estiment l'amidon dans la culture cuvée et le sur-estiment dans la culture semi-cuvée. Ceci peut provenir d'un contrôle trop serré (pente de la fonction décision) sur la formation et l'utilisation d'amidon. Par contre, le modèle prédit l'atteinte d'un plateau et les deux cultures en atteignent un.

Dans le cas du P_i , de NO_3 et du NH_4 les simulations du modèle suivent les données expérimentales pour toute la durée des cultures excepté pour le nitrate de la culture semi-cuvée. La sous-estimation du P_i à la fin de la culture semi-cuvée est probablement due au fait que le modèle prédit encore un taux de croissance élevé tandis que la culture a atteint un plateau. La sur-estimation du NO_3 dans la culture semi-cuvée peut être due à la sous-estimation des flux métaboliques vers les réactions anaboliques. L'accumulation en P_i par les cellules a été clairement démontrée puisque l'épuisement du P_i survient au jour 15 (Figure 3.12) alors que la croissance continue jusqu'au jour 35. Il est intéressant de noter que la concentration intracellulaire finale en P_i semble atteindre un plateau à 0.05 mmol/gDW. Ce plateau pourrait représenter la concentration en P_i essentielle afin de maintenir le métabolisme endogène de la cellule (Mimura, 1999). Un plateau en P_i a aussi été observé lors de la culture semi-cuvée à 0,2 mmol/gDW, ce qui est similaire à celle obtenue lors de la culture cuvée. Cette valeur est proche de celle mesurée par Jolicoeur et al. (2002) qui est de 0.23 mmol/gDW pour des racines transformées de carottes. Le nitrate est à sa concentration maximale pour la culture semi-cuvée et diminue graduellement jusqu'à sa concentration initiale lors de la culture cuvée. Les concentrations maximales pour le nitrate et l'ammonium sont atteintes au jour 5, soit ~10 jours avant d'atteindre le taux de croissance maximum. La simulation des acides aminés lors de la culture semi-cuvée suit la tendance observée par les données expérimentales. Par contre, le comportement des

simulations cuvée et semi-cuvée est opposé. La concentration des acides aminés dans le milieu peut être la cause de cette différence. En effet, une boîte de Pétri contient en moyenne 0.04 gDW dans 25 mL de milieu. Comme la limite de détection est d'environ ~ 1 mmol/L, l'erreur maximale est donc de 0.67 mmol AA/gDW.

Étant donné que les métabolites secondaires ne peuvent être quantifiés entièrement, le métabolisme secondaire est réduit à la formation de tryptamine (réaction #1, figure 3.3) et de secologanine (réaction #2 et #10, figure 3.3). La synthèse des acides aminés et le métabolisme secondaire devraient être précisés dans le modèle. Le modèle ne semble pas être influencé par le fait qu'il ne décrit pas la compartimentalisation du Pi dans la vacuole, comme suggéré précédemment (Jolicoeur et al., 2002).

L'analyse de sensibilité fait ressortir les paramètres ayant la plus grande influence sur le comportement du modèle. Comme le nitrate est sur-estimé dans la culture semi-cuvée, et par conséquent contribue grandement à l'erreur, il est normal de retrouver des paramètres reliés au nitrate $K_m \text{ ENO}_3^- \text{ LA}$ et $v_{\max}(27, \text{LA})$. Cet état de fait démontre que la synthèse des acides aminés ainsi que le métabolisme secondaire doivent être inclus plus rigoureusement dans le modèle. Les constantes d'affinité des navettes énergétiques (NAD^+ , NADH , NADP^+ , NADPH et NDP) ont aussi un grand impact sur le comportement du modèle puisque qu'elles font partie d'un grand nombre de réactions. Il a déjà été démontré que les navettes énergétiques exercent un

grand contrôle sur les réseaux métaboliques (Fridlyand et Scheibe, 1999; Affourtit et al., 2001; Farquhar et al., 2001). Par contre, il faut aussi noter que la vitesse maximum de réaction de la respiration ($v_{\max}(30)$) fait aussi partie de l'étude. Par conséquent, l'oxygène utilisé dans la réaction de la respiration devrait être inclus dans les études ultérieures.

L'utilisation de fonctions décisionnelles pour les nutriments accumulés, les co-substrats et les navettes énergétiques, lors des simulations de croissance des racines de *C. roseus*, se sont montrés efficaces. Ceci suggère que la combinaison choisie de fonctions décisionnelles peut être utilisée pour décrire la régulation du réseau métabolique. L'ATP, l'ADP, le NADH, le NAD⁺, le NADPH et le NADP⁺ sont cruciaux pour supporter l'activité catalytique rendant possible la plupart des réactions biochimiques. De plus, l'effet de contrôle de ces molécules est bien établi. Dans les plantes, le ratio ATP/ADP est impliqué dans la photosynthèse (Fridland et Scheibe, 1999; Fridland, 1998). Les racines étaient riches en énergie avec de hauts niveaux de NADPH et d'ATP et à un niveau un peu moindre de NADH (Figure 3.13). La simulation des niveaux d'énergie diminue à partir du jour 10 dans la culture cuvée et est constante dans la culture semi-cuvée. Puisque le milieu était renouvelé tous les 3 jours dans la culture semi-cuvée un régime pseudo-permanent était à prévoir. La régulation par le Pi intracellulaire semble être importante puisque les acides aminés et les phosphates organiques suivent la même tendance. Par ailleurs, les concentrations de lipides, des hexoses structuraux et des acides organiques

suivent les mêmes tendances pour les 15 à 20 premiers jours, mais sont moins élevées pour la culture semi-cuvée vers la fin de la culture. La limitation en P_i force le modèle à utiliser les voies alternatives. La formation des LIP, ORA et OP est pratiquement nulle et la dégradation du OP débute. Les phosphates organiques s'épuisent jusqu'à la concentration limite pour la croissance et la croissance arrête.

6. Conclusion

Ces travaux de maîtrise proposaient le développement et la validation d'un modèle biocinétique-métabolique décrivant le métabolisme primaire de racines transformées de *Catharanthus roseus*.

Le modèle proposé tient compte des nutriments suivants : le saccharose, le glucose, le fructose, l'amidon, l'ammonium, le nitrate, et le Pi. Il fait aussi intervenir les navettes énergétiques nucléotide diphosphate/triphosphate (NTP/NDP) (ATP, GTP, CTP et UTP) et les couples d'oxydo-réduction NADH/NAD⁺ et NADPH/NADP⁺ ayant un effet régulateur dans les réactions. La croissance est basée sur des bassins de macro-molécules (acides aminés, lipides, hexoses structuraux, phosphates organiques et acides organiques). Le modèle est séparé en trois parties : le sous-réseau métabolique stationnaire, le sous-réseau transitoire primaire et le sous-réseau transitoire secondaire. Le premier a été obtenu en supposant un régime pseudo-stationnaire pour les concentrations intermédiaires du métabolisme primaire. Par réduction, il est composé de 20 réactions qui sont des combinaisons linéaires de 31 voies décrites linéairement indépendantes. Le second, le sous-réseau transitoire primaire, décrit la répartition des nutriments entre la vacuole et le cytosol (réactions toutefois non-considérées dans le présent modèle), de l'absorption des nutriments et de la respiration. Le dernier s'occupe des réactions enzymatiques du métabolisme secondaire.

Le modèle a été développé sous le logiciel Matlab ®. Le modèle a été optimisé sur deux cultures (une en mode cuvée et l'autre en mode cuvée-alimentée) de racines transformées de *C. roseus* en boîtes de Pétri en milieu liquide. Par contre, le métabolisme secondaire ainsi que la répartition des nutriments entre la vacuole et le cytosol n'ont pas encore considéré.

Le modèle prédit bien les deux types de cultures et les paramètres des équations cinétiques utilisées dans le modèle sont dans les plages citées dans la littérature. La description de la croissance à l'aide de macromolécules au lieu de nutriments semble bien fonctionner, malgré le fait que seuls les acides aminés aient été mesurés parmi les macromolécules. La croissance des deux cultures (cuvée et cuvée-alimentée) a été simulée avec succès et le plateau observé lors de la culture en mode cuvée a pu être reproduit. Le modèle semble toutefois surestimer le nitrate, le fructose, et l'amidon pour la culture cuvée-alimentée ainsi que le fructose, le glucose et les acides aminés pour la culture cuvée-alimentée. Le glucose extracellulaire et le fructose extracellulaire sont aussi surestimés, mais seulement lorsque le taux de croissance diminue lors de la culture cuvée. Le modèle semble sous-estimer le glucose extracellulaire et le fructose extracellulaire de la culture semi-cuvée ainsi que l'amidon lors de la culture en mode cuvée. Malgré tout, la simulation du phosphate extracellulaire et intracellulaire, du nitrate extracellulaire, du saccharose intracellulaire et extracellulaire ainsi que de l'ammonium

intracellulaire pour les deux cultures est très satisfaisante. La simulation du nitrate intracellulaire pour la culture cuvée est aussi satisfaisante.

Il est important de noter qu'à cette étape de développement du modèle des tendances semblables entre les courbes simulées et les données expérimentales sont satisfaisantes. En effet, le modèle n'est testé que pour sa structure, et qu'une plus grande précision de la part du modèle et des ses paramètres requerra un plus grand nombre d'expérimentations.

Le modèle ne semble pas être affecté par le fait que les nutriments ne sont pas compartimentés dans la cellule (cytosol, vacuole). De plus, l'utilisation de fonctions décisionnelles tenant compte de l'accumulation de nutriments, de co-substrats et de navettes énergétiques semble être performant dans la simulation de la croissance et de la nutrition de *C. roseus*.

L'ajustement des paramètres a été centré sur la biomasse et le nitrate extra cellulaire, car l'erreur expérimentale sur ces paramètres était la plus faible. Aussi, il nous semblait primordial de pouvoir estimer avec précision ces paramètres qui pourront servir à la mise en place d'une stratégie de régulation efficace en bioréacteur. L'analyse de sensibilité fait sur les paramètres jugés optimums démontre que l'erreur totale fait par rapport aux points expérimentaux pour l'une ou l'autre des cultures peut être encore réduite. Par contre, la diminution de l'erreur totale ne peut être fait sur les deux cultures simultanément. Ainsi les paramètres obtenus sont identifiés comme les plus utiles.

Ce modèle se veut un outil de calcul prédictif. Il peut être utilisé pour simuler des cultures avant même de les effectuer pour prédire la croissance optimale par exemple. Ce modèle pourrait aussi être utilisé en parallèle à une culture pour pouvoir calculer l'alimentation nécessaire à l'obtention de concentrations intracellulaires en nutriments pré-déterminées. Il pourrait aussi être utilisé pour étudier les flux métaboliques présents dans les cellules de plantes et ainsi cibler les réactions limitantes présentes dans le métabolisme.

Tout d'abord, il serait intéressant d'introduire le terme d'oxygène dans les réactions du modèle et de conduire les prochaines manipulations avec un contrôle sur l'oxygène.

De plus, quelques composés faisant partie du modèle n'ont pas été quantifiés. Ainsi avec des mesures sur le phosphates organiques, les acides organiques totaux, les lipides et le pyrophosphate, de meilleurs paramètres pourraient être trouvés.

Par ailleurs, l'hypothèse faite sur les concentrations constantes des intermédiaires du métabolisme primaire devrait être validée. Si elle ne tient pas la route, les réactions présentées par le présent modèle pour le sous-réseau métabolique primaires devraient repasser de 20 à 31 réactions et les espèces intermédiaires devraient être modélisées ce qui augmenterait le nombre de paramètres du modèle et le nombres de mesures expérimentales.

Enfin, l'application du modèle comme outil pour trouver les conditions optimales de croissance et/ou de production de métabolites secondaires devrait être simulée puis testée par la culture en bioréacteur.

7. Références

- AMES, R.N., REID, C.P.P., PORTER, L.K., CAMBARDELLA, C., 1983. "Hyphal uptake and transport of nitrogen from two ¹⁵N-labelled sources by *Glomus mosseae* arbuscular vesicular mycorrhizal fungus." *New Phytol.* 95, 381-396.
- AVIGDAD, G. and DEY, P.M. 1997. "Carbohydrates metabolism: storage carbohydrates." Dans: DEY, P.M. and HARBONE J., eds, *Plant Biochemistry* Academic Press, London, p 143-205.
- BIELESKI, R., 1973. "Phosphate pools, phosphate transport, and phosphate availability". *Ann Rev Plant Physiol.* 24, 225-252.
- BIELESKI, R.L., FERGUSON, I.B., 1983. "Physiology and metabolism of phosphate and its compounds." Dans: LAUCHI, A., BIELESKI, R.L. (Eds.), *Inorganic plant nutrition, Encyclopedia of plant physiology* (New series). Springer, Wien, New York, p. 422-449.
- BONGAERTS, R.J.M., VIERKANT, M.A., VERPOORTE, R. 1998. "Effects of aromatic amino acids feeding on alkaloid accumulation and related enzyme activities in *Catharathus roseus* cell suspension cultures." Dans: *The chorismate branching point in Catharanthus roseus. Aspects of anthranilate synthase regulation in relation to alkaloid biosynthesis*. Thèse de doctorat, Leiden University, p 91-105.

- BOUCHARD-MARCHAND, E. 2000. *Études biocinétiques et nutritionnelles de racines transformées de carotte en culture in vitro*. Mémoire de maîtrise en génie chimique, École Polytechnique de Montréal.
- BRAMLEY, P. M. 1997. "Isoprenoid metabolism", Dans: Dey, P.M. and Harbone, J., eds, *Plant Biochemistry* Academic Press, London, p 417-434.
- BRITTO, D.T and KRONZUCKER, H.J. 2001 "Constancy of nitrogen turnover kinetics in the plant cell: Insights into the integration of subcelular N fluxes." *Planta*. 213, 175-181.
- BROWNLEADER, M.D., HARBONE, J.B. and DEY, P.M. 1997. "Carbohydrate metabolism : primary metabolism of monosaccharides." Dans: Dey, P.M. and Harbone, J., eds, *Plant Biochemistry* Academic Press, London, p 111-141.
- BUTTNER, M. and SAUER, N. 2000. "Monosaccharide transporters in plants: structure, function and physiology" *Biochemica and Biophysica Acta*. 1465, 263-274.
- CAPORALE, L. H. 1995. "Chemical ecology : a view from the pharmaceutical industry." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 92, 75-82.
- CLARKSON, D. and HANSON, J. 1980. "The mineral nutrition of higher plants." *Ann. Rev. Physiol*. 31, 239-298.
- CONTIN, A., HEIJDEN, R. and VERPOORTE, R. 1999. "Effects of alkaloid precursor feeding and elicitation on the accumulation of secologanin in a *Catharanthus roseus* cell suspension culture" *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 56, 111-119.

- CONTIN, A., HEIJDEN, R. van der, LEFEBER, A. W. M. and VERPOORTE, R. 1998. "The iridoid glucoside secologanin is derived from the novel triose phosphate/pyruvate pathway in a *Catharanthus roseus* cell culture." *FEBS Letters*. 434, 413-416.
- CRAWFORD, N. M. and GLASS, A. D. M. 1998. "Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants." *Trends in plant science*. 3, 389-395.
- DEWICK, P.M. 2002. "The biosynthesis of C5-C25 terpenoid compounds" *Nat. Prod. Rep.* 19, 181-222.
- DÖLLER, G., ALFERMANN, A.W., REINHARD, E. 1976. "Production von Indolalkaloiden in Callus-Kulturen von *Catharanthus roseus*." *Plant Cell Rep.* 12-702-705.
- DROUX, M. 2003. "Plant serine acetyltransferase: new insights for regulation of sulphur metabolism in plant cells." *Plant Physiology and Biochemistry*. 41, 619-627.
- EPSTEIN, E. 1972. *Mineral nutrition of plants : principles and perspectives*. New York, Wiley and Sons.
- FACCHINI, PJ, DICOSMO, F. 1991. "Secondary metabolite biosynthesis in cultured cells of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don immobilized by adhesion to glass fiber." *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 35, 382-392.

- FERNIE, A.R., ROSCHER, A., RATCLIFFE, R.G., KRUGER, N.J. 2001. "Fructose 2,6-biphosphate activates pyrophosphate: fructose6-phosphate 1-phosphotransferase and increases triose phosphate to hexose phosphate cycling in heterotrophic cells." *Planta*. 212, 250-263.
- FITZPATRICK, F.A. and WHEELER, R. 2003. "The immunopharmacology of paclitaxel (Taxol), docetaxel (Taxotere), and related agents." *International Immunopharmacology*. 3, 1699-1714.
- GANTET, P., MEMELINK, J. 2002. "Transcription factors: tools to engineer the production of pharmacologically active plant metabolites" *Trends in Pharmacological Sciences*. 23, 563-569.
- GOMBERT, A.K., NIELSEN, J. 2000. "Mathematical modeling of metabolism." *Curr. Opin. Biotechnol.* 11, 180-186.
- HAEHNEL, W. 1984. "Photosynthetic electron transport in higher plants." *Ann. Rev. Plant Physiol.* 35, 659-693.
- HEWITT, E. J., HUCKLESBY, D. P. and NOTTON, B. A. 1975. "Nitrate metabolism.". Dans: BONNER, J., VARNER, J.E., eds, *Plant Biochemistry*. Academic Press, New York.
- HOWITT, S. M. and UDVARDI, M. K. 2000. "Structure, function and regulation of ammonium transporters in plants." *Biochemica and Biophysica Acta*. 1465, 152-170.

- HUBER, S. C. and HUBER, J. L. 1996. "Role and regulation of saccharose-phosphate synthase in higher plants." *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* 47, 431-444.
- IVASHIKINA, N. V. and SOKOLOV, O. A. 1997. "Regulation of nitrate uptake and distribution in maize seedlings by nitrate, nitrite, ammonium and glutamate." *Plant Science*. 123, 29-37.
- JOLICOEUR, M. 1998. *Optimisation d'un procédé de production de champignons endomycorhiziens en bioréacteur*. Thèse de doctorat. École Polytechnique de Montréal.
- JOLICOEUR, M., BOUCHARD-MARCHAND, E., BÉCARD, G. and PERRIER, M. 2002. "Regulation of mycorrhizal symbiosis: development of a structured nutritional dual model." *Ecological Modelling*. 158, 121-142.
- KOCH, K.E. 1996. "Carbohydrate-modulated gene expression in plants" *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Bio.* 47,509-540.
- KRUGER, R.J., CAREW, D.P. 1978. "*Catharanthus roseus* tissue culture: the effects of precursors on growth and alkaloid production." *J. Nat. Prod.* 41, 327-331.
- LALONDE, S., BOLES, E., HELLMAN, H., BARKER, BL., PATRICK, J. W., FROMMEW, W. B. and WARD, J. M. 1999. "The dual function of sugar carriers : transport and sugar sensing." *The plant cell*. 11, 707-726.

LAURER, L.J., BLEVINS, D.G. and GRACZ, S.H. 1989. ^{32}P -nuclear magnetic resonance determination of phosphate compartmentation in leaves of reproductive soybeans (*Glycine max* L.) as affected by phosphate nutrition." *Plant physiol.* 89, 1331-1336.

LEE, J.H.W., HUANG, Y., DICKMAN, M., JAYAWARDENA, A.W. 2003. "Neural network modelling of coastal algal blooms" *Ecological Modelling.* 159, 179-201.

LEIGH, R.A, WYN JONES, R.G., 1984 "A hypothesis relating critical potassium concentrations for growth to the distribution and functions of this ion in the plant cell." *New Phytol.* 97, 1-13.

LEMOINE, R. 2000. "Saccharose transporters in plants : update on function and structure." *Biochemica and Biophysica Acta.* 1465, 246-262.

MARSCHNER, H. 1995. *Mineral Nutrition of Higher Plants*, 2^e edition, London : Academic Press. 889 p.

MICHAL, G. 1999. *Biochemical pathways*. New York, John Wiley & Sons, Inc., Gerhard Michal. 277p.

MILLER, A. J. and SMITH, S. J. 1992. "The mecanism of nitrate transport across the tonoplast of barley root cells." *Planta.* 187, 554-557.

MILLER, A. J. and SMITH, S .J. 1996. "Nitrate transport and compartmentation in cereal root cells." *J. exp. Bot.* 47, 843-854.

MIMURA, T., SAKANO, K., SHIMMEN, T. 1996 "Studies on distribution, re-translocation and homeostasis of inorganic phosphate in barley leaves." *Plant Cell Environ.* 19, 311-320.

- MIMURA, T. 1999. "Regulation of phosphate transport and homeostasis in plant cells." *Int. Rev. Cytol.* 191, 149-200.
- MORANDINI, P., SALAMINI, F. 2003. "Plant biotechnology and breeding: allied for years to come." *Trends in Plant Science.* 8, 70-75.
- MORENO, P.H.R., POULSEN, C., HEIJDEN, R., VERPOORTE, R. 1996. "Effects of elicitation on different metabolic pathways in *Catharanthus roseus* (L.) G. cell suspension cultures" *Enzyme and Microbial Technology* 18, 99-107.
- MORENO, P.R.H., VAN DER HEIJDEN, R., VERPOORTE, R. 1995. "Cell and tissue cultures of *Catharanthus roseus*: A literature survey." *Plant Cell. Tissue and Organ Culture.* 42, 1-25.
- MORENO, P.R.H., VAN DER HEIJDEN, R., VERPOORTE, R. 1993. "Effect of terpenoid precursors feeding and elicitation of formation of indole alkaloids in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*." *Plant Cell Rep.* 12, 702-705.
- MORGAN, J.A., RHODES, D. 2002. "Mathematical Modeling of Plant Metabolic Pathways." *Metabolic Engineering.* 4, 80-89.
- MORGAN, J.A., SHANKS, J.V. 2000. "Determination of metabolic rate-limitations by precursor feeding in *Catharanthus roseus* hairy root cultures." *J. Biotechnol.* 79, 137-145.
- NAUDASCHER, F., DOIREAU, P., THIERSAULT, M., GUILLOT, A., MÉRILLON, J.M., CHENIEUX, J.C. 1990. "Influence de la disponibilité en précurseurs sur l'accumulation alcaloïdique dans les cellules de *Catharanthus*

roseus cultivées in vitro. Comparaison entre suspensions en phase de croissance et suspensions en phase stationnaire." *Les Colloq. De l'INRA*. 51, 307-309.

NOÉ, W., MOLLENSCHOTT, C., BERLIN, J. 1984. "Tryptophan decarboxylase from *Catharanthus roseus* cell suspension cultures: purification, molecular and kinetic data of the homogenous protein." *Plant Mol. Biol.* 3, 281-288.

PHIPPS, R.H., 2002 "Environmental benefits of genetically modified crops: global and European perspectives on their ability to reduce pesticide use." *J. Anim. Feed Sci.* 11, 1-18.

PLAXTON, W. C. 1996. "The organization and regulation of plant glycolysis." *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* 47, 185-214.

PLAXTON, W. C. 1998. Metabolic aspects of phosphate starvation in plants. Dans: DEIKAMN, J, LYNCH, J, eds, *Phosphorus in plant biology: Regulatory roles in molecular, cellular, organismic, and ecosystem processes*, American Society of Plant Physiologists, Rockville, pp 164-176.

PRESCOTT, H.A.K. 1993. *Microbiologie*. De Boeck University, W.C. Brown Communication Inc.

RIJHWANI, S.K., SHANKS, J.V. 1998. "Effect of Elicitor Dosage and Exposure Time on biosynthesis of indole alkaloids by *Catharanthus roseus* hairy root cultures." *Biotechnol. Prog.* 14, 442-449.

ROLLAND, F., MOORE, B., SHEEN, J. 2002. "Sugar sensing and signaling in plants." *Plant Cell*. 14, 185-205.

ROSEN, H. 1957. "A modified ninhydrin colorimetric analysis for amino acids." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 67, 10-15.

SACCHETTINI, J.C. and POULTER, C.D., 1997 "Creating isoprenoid diversity" *Science* 277, 1788–1789

SANDERS, D., BROWNLEE, C. and HARPER, J.F. 1999. "Communicating with calcium." *The Plant Cell* 11, 691-706.

SCHELLENBAUM, L., MÜLLER, J., BOLLER, T., WIEMKEN, A., 1998. "Effects of drought on non-mycorrhizal and mycorrhizal maize: changes in the pools of non-structural carbohydrates, in the activities of invertase and trehalase, and in the pools of amino acids and imino acids." *New Phytol.* 138, 59-66.

SCHLATMANN, J. E., HOOPEN, H. J. G. ten and HEIJNEN, J. J. 1999. "A simple structured model for maintenance, biomass formation, and ajmalicine production by nondividing *Catharanthus roseus* cells." *Biotechnology and Bioengineering* 66, 147-157.

SMEEKENS, S., ROOK, S. 1997 "Sugar-sensing and sugar-mediating signal transduction in plants" *Plant Physiol.* 115, 7-13.

SMEEKENS, S., 2000 "Sugar-induced signal transduction in plants" *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol Bio.* 51, 49-81.

SMITH, A.W., DENYER, K., MARTIN, C. 1997 "The synthesis of the starch granule." *Annu. Rev. Plant Physiol Plant Mol boil.* 48, 65-87.

SMITH, F.W., MUDGE, S.R., RAE, A.L. AND GLASSOP, D. 2002 "Phosphate transport in plants." *Plant and Soil.* 248, 71-83.

- STURM, A. 1999. "Invertases. Primary structures, functions and roles in plant development and saccharose partitionning." *Plant Physiol.* 121, 1-7.
- SZE, H., LI, X. AND PALMGREN, M. G. 1999. "Energization of plant cell membranes by H⁺-pumping ATPases: regulation and biosynthesis." *The Plant Cell.* 11, 677-689.
- TAIZ, L. AND ZIEGER, E. 1998. Plant physiology. Sunderland, Sinauer Associates Inc. 690 p.
- TAUBERGER, E., FERNIE, A.R., EMMERMANN, M., RENZ, A., KOSSMANN, J., WILLMITZER, L., TRETHEWEY, R.N. 2000 "Antisense inhibition of plastidial phosphoglucomutase provides compelling evidence that potato tuber amyoplasts import carbon from the cytosol in the form of glucose-6-phosphate." *Plant J.* 23, 43-53.
- TERRY, N. 1977. "Photosynthesis, growth and the role of chloride." *Plant physiol.* 60, 69-75.
- THORNLEY, J.H.M., JONHSON, I.R. 1990. "Plant and crop modeling – A mathematical approach to plant and crop physiology." Oxford University Press, New York.
- TIKHOMIROFF, C. 2001. *Étude des métabolismes primaire et secondaire des raciness transformées de Catharanthus roseus en vue du développement d'un modèle cinétique*. 261p. Mémoire de maîtrise en génie chimique, École Polytechnique de Montréal.

- VERPOORTE, R. AND MEMELINK, J., 2002. "Engineering secondary metabolite production in plants." *Current Opinions in Biotechnology* 13, 181-187.
- WALKER, D.J., BLACK, C.R. AND MILLER, A.J. (1998) "Role of cytosolic potassium and pH in the growth of barley roots." *Plant Physiol.* 118, 957-964.
- WERNER, R.A. AND SCHMIDT, H., 2002. "The in vivo nitrogen isotope discrimination among organic plant compounds" *Phytochemistry*. 61, 465-484.
- WHITE, P.J., BOWEN, H.C., DEMIDCHIK, C.N., DAVIES, J.M., 2002. "Genes for calcium-permeable channels in the plasme membrane of plant root cells" *Biochemica et Biophysica Acta*. 1564, 299-309.
- WHITMER, S., HEIJDEN, R., VERPOORTE, R. 2002. "Effect of precursor feeding on alkaloid accumulation by a tryptophan decarboxylase over-expressing transgenic cell line T22 of *Catharanthus roseus*". *Journal of Biotechnology* 96, 193-203.
- WILLIAMS, L. E., LEMOINE, R. AND SAUER, N. 2000. "Sugar transporter in higher plants - a diversity of roles and complex regulation." *Trends in Plant Science* 5, 283-290.
- WILLIAMS, L.E. AND MILLER, A.J. 2001. "Transporters responsible for the uptake and partitionning of nitrogen solutes." *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* 52, 659-688.

WINK, M. 1999. "Plant secondary metabolites from higher plants: biochemistry, function and biotechnology." Dans: WINK, M., ed, *Biochemistry of Plant Secondary Metabolism, Annual Plant Reviews*, pp. 1–16. Sheffield Academics, Sheffield

ZENK, M.H., EL-SHAGI, H., STOCKIGT, J., WEILER, E.W., DEUS, B. 1997. "Formation of the indole alkaloids serpentine and ajmalicine in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*." Dans: BARZ, W, REINHARD, E, ZENK, MH. (Eds.), *Plant tissue culture and its biotechnological application*. Springer, Berlin, pp. 27-44.

ZHAO, J., HU, Q., GUO, Y., ZHU, W. 2001a. "Elicitor-induced indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus* cell cultures is related to Ca^{2+} influx and the oxidative burst." *Plant Science*. 161, 423-431.

ZHAO, J., HU, Q., GUO, Y., ZHU, W. 2001b. "Enhanced catharantine production in *Catharanthus roseus* cell cultures by combined elicitor treatment in shake flasks and bioreactors" *Enzyme and Microbial Technology*. 28, 673-681.

8. Annexes

Programme *modele_test.m*

```
%***** BUT du SCRIPT *****%  
%  
% Cette fonction a pour but d'initialiser :  
% - les parametres cinetiques  
% - les concentrations de depart  
%  
% Cette fonction lance ensuite matrix.m qui calcule la matrice  
% stoichiometrique du systeme utilisee.  
%  
% Cete fonction demare ensuite la resolution du systeme d'equations  
% differentielles  
%*****  
  
%***** NOTES DIVERSES *****%  
%  
% Les variables de depart du modele sont pratiquement toutes  
% sous forme de vecteur (sauf les variables definies explicitement  
% dans les variables globales). Ainsi chaque reaction a plusieurs  
% vmax, plusieurs Km, accessible par vmax(no reaction, no vmax) et  
% idem pour km.  
% De meme, les concentrations initiales sont sous forme du vecteur  
% X, avec les memes indices que ceux definis dans le systeme  
% matriciel.  
%  
% Cette approche est utilisee a la place d'une approche ou on bombarde  
% le programme avec plein de variables par ligne dont le nom est  
% explicitement donne sous une forme en general reduite, ce qui rend le  
% programme illisible.  
%*****
```

```
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%% FIN DES NOTES %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
```

```
%%%% Effacer toutes les variables %%%%
```

```
clear all
```

```
%%%% Effacer toutes les figures %%%%
```

```
close all
```

```
%%%%%%%%% VARIABLES GLOBALES %%%%%%%%%%
```

```
global vseuil vmax km v_suc vmax_glu vmax_fru vmax_suc km_glu km_fru km_suc V s sl
para_init sucok mu
```

```
%%%%%%%%% INITIALISATION DES VARIABLES %%%%%%%%%%
```

```
% 1 g DW occupe FW - DW , le rapport FW/DW est environ 6
```

```
% On prend 1 litre d'eau correspond donc a 200g DW
```

```
% Pour convertir une concentration intracellulaire en mol/l en mol/gDW on utilise le
facteur
```

```
k=200; % (g DW par litre)
```

```
% pour les concentrations exterieures, on calcule la concentraton en nutriment par
```

```
% mmol /g DW = mmol / litre * volume milieu / g DW de biomasse et volume milieu = 0.020
litres ou 0.025 litres.
```

```
% volume milieu
```

```
V=0.025;
```

```
% Variables gloables cinetiques
```

```
vmax=zeros(69,2);
```

```
km=zeros(69,5);
```

```
X=zeros(51,1);
```

```
vseuil=ones(69,2);
```

```
t=0;
```

```
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
```

```
%
```

```
% -les vmax sont donnees en mmol par g DW par jour
```

```
% -les Km sont donnees en mmol par litre mais sont ensuite
```

```
% convertis en mmol par g DW pour les reactions intracellulaires
```

```
% -les concentrations INTRACELLULAIRES sont donnees en mmol par g DW
```

```
% -les concentrations EXTRACELLULAIRES sont donnees en mmol par l (de milieu)
```

```
% -le temps est donne en jour
```

```
%
```

```
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
```

```
%para_init = load('c:/work/master/matlab/doninit.dat','-ascii');
```

```
%para_init = load('d:/mathieu/maitrise/matlab/doninit.dat','-ascii');
```

```
%para_init = para_init(:);
```

```
%para_init = para_init.';
```

```
km_AA = 0.014693; km_FRU = 24/200; km_GLU = 24/200; km_SEC = 0;
```

```
km_LIP = 0.00254376;
```

```
km_NAD = 0.046/200; km_NADH= 0.06/200; km_NADP=0.117/200; km_NADPH=
0.074/200; km_NDP = 0.01;
```

```
km_NH4 = 0.15054; km_NTP = 1.25/200; km_ORA = 0.0080702; km_Pi = 0.2;
```

```
km_PP_i = 0.0735103;
```

```
km_SUC = 1; km_STA = 1; km_STH =0.03; km_TRY = 0;
```

```
km_OP = 0.02;
```

```
km_VNO3 = 0; km_VPi = 0; km_VSUC= 0; km_EFRU= 0.046091;
```

```
km_EGLU=0.053519;
```

```
km_ENH4 = 1; km_ENO3_2=0.05; km_ENO3_1= 8; km_EPi_1= 0.08;
```

```
km_EPi_2= 0.0026;
```

```
km_ESUC = 12.011574; km_NO3 = 0.369143;
```

```
km_STR = 0; km_AJM = 0; km_SER = 0; km_CAT = 0;
```

```
km_TAB=0;
```

```
km_LOC = 0; km_HOR = 0; km_VIN = 0; km_VBL = 0;
```

```
km_VCR = 0;
```

```
vmax(1)=0; vmax(2)=0; vmax(3)=0.7638; vmax(4) =10000;
```

```
vmax(5)=7;
```

```

vmax(6)=0.7638;          vmax(7)=0.067822;          vmax(8)=10;          vmax(9) =10;
vmax(10)=0;
vmax(11)=3;          vmax(12)=0.01;          vmax(13)=15;          vmax(14)=2;
vmax(15)=0;
vmax(16)=0.666904;    vmax(17)=0;          vmax(18)=0.7638;    vmax(19)=0;
vmax(20)=0;
vmax(21)=15.1259;    vmax(22)=5;          vmax(23)=0.106412;    vmax(24)=0;
vmax(25)=0;
vmax(26)=0.8;          vmax(27) = 0;          vmax(28) = 0;          vmax(29) = 0;
vmax(30) = 0;
vmax(31)=33.533;      vmax(34,1)= 0.5;      vmax(34,2)=0.00027;    vmax(35)= 2;
vmax(36)=0.3819;
vmax(37)=400;          vmax(38,1)=0.04;      vmax(38,2)=0.00175;    vmax_glu=0.7638;
vmax(69)= 0.14;

vseuil(4) = 0.5;      vseuil(4,2) = 8;
vseuil(6)=1;          vseuil(6,2)=10;
vseuil(8)=1;          vseuil(8,2)=10;      vseuil(9)=0.5;          vseuil(9,2)=8;
vseuil(11) = 0.1;      vseuil(11,2) = 100;
vseuil(13)=0.2;      vseuil(13,2) = 100;    vseuil(14,1)=0.2;      vseuil(14,2) =
10;
vseuil(15)=1;          vseuil(15,2)=10;      vseuil(16) = 1.5;      vseuil(16,2) =
200;
vseuil(17) =1;          vseuil(17,2) =10;
vseuil(18)=1;          vseuil(18,2)=10;          vseuil(21)=0.07;
vseuil(21,2)=100;
vseuil(22)=0.02;      vseuil(22,2)=100;      vseuil(23)=0.03;
vseuil(23,2)=333;
vseuil(24)=0.3;      vseuil(24,2)=15;      vseuil(26)=0.5;          vseuil(26,2)=100;
vseuil(27)=0.5;      vseuil(27,2)=1;      vseuil(28)=0.5;          vseuil(28,2)=1;
vseuil(29)=0.2;      vseuil(29,2)=2;      vseuil(30)=0.2;          vseuil(30,2)=2;
vseuil(37) = 0.5;      vseuil(37,2) = 8;      vseuil(69) = 0.0150866; vseuil(69,2) =
1;

%km_ENO3_2 = 0.0677;
%km_ENO3_1 = 1.43;
%vmax(34,1) = 0.1670;
%vmax(34,2) = 0.0015;

```

```

%km_EPi_1 = 0.08;
%km_EPi_2 = 0.0026;
%vmax(38,1) = 0.04;
%vmax(38,2) = 0.00175;

%cult = 1; % 1 = batch ; 2 = fb lim N ; 3 = fb lim Pi
nbcult = 5;

%Literature
%km_ENO3_2=0.05; km_ENO3_1=0.25;
%km_EFRU=0.045; km_EGLU=0.045; km_NADH=0.06/200;
%km_NAD = 0.046/200; km_Pi=4.7/200; km_GLU=24/200; km_NTP=1.25/200;
%km_NADPH=0.074/200; km_NADP=0.117/200; km_FRU = km_GLU;
%km_EPi_1=0.1; km_EPi_2=0.005;
%vmax(38,2)=0.144;

km_STH = 0.2;
vmax(7) = 0.1;
vmax(12) = 0.05;
vmax(16) = 1.5;

vmax(1) = 50;
vmax(26) = 1.4;
vmax(5) = 20;

vmax(6) = 1.5;
vmax(2) = 2;

vmax(35) = 1;

vmax(10) = 2;

vmax(6) = vmax(6)*1.5;
vseuil(11) = vseuil(11)*0.5;
vmax(37) = vmax(37)*1.5;
vseuil(9,2) = vseuil(9,2)*0.5;
vmax(37) = vmax(37)*1.5;

```

```

%vseuil(23) = vseuil(23)*0.5;
vseuil(23) = vseuil(23)*1.5;

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%% Cinetiques de transport %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

% transport EGLU -> GLU
km(21)=km_EGLU;
km(21,3)=km_NTP;
% transport EFRU -> FRU
km(22)=km_EFRU;
km(22,3)=km_NTP;
% transport ESUC -> SUC
km(24)=km_ESUC;
km(24,3) = km_NTP;
% transport ENH4 -> NH4
km(25,1)=km_ENH4;
km(25,2)=km_ENH4;
% transport NO3 -> VNO3
km(27)=km_NO3;
km(27,3)=km_NTP;
% transport VNO3 -> NO3
km(28)=km_VNO3;
% transport Pi -> VPi
km(29)=km_Pi;
km(29,3)=km_NTP;
% transport VPi -> Pi
km(30)=km_VPi;
% transport NH4 -> ENH4
km(32)=km_NH4;
% transport NO3 -> ENO3
km(33)=km_NO3;
% transport ENO3 -> NO3
km(34,1)=km_ENO3_1;
km(34,2)=km_ENO3_2;
km(34,3)=km_NTP;
% transport EPi -> Pi
km(38,1)=km_EPi_1;
km(38,2)=km_EPi_2;

```

```

km(38,3)=km_NTP;

% transport Pi -> Epi
km(39)=km_Pi;

% transport SUC -> VSUC
km(40)=km_SUC;

% transport VSUC -> SUC
km(41)=km_VSUC;

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%% CINETIQUES ENZYMATIQUES %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

% OP -> Pi
km(23)=km_OP;

% NO3 -> NH4
km(26,1)=km_NO3;
km(26,2)=km_NADH;
km(26,3)=km_NADPH;

% Ppi -> Pi
km(31)=km_PPi;

% external invertase ESUC -> EFRU + EGLU
km(35)=km_ESUC;

% maintenace and leak : NTP -> NDP
km(36)=km_NTP;

% respiration
km(37,1)=km_NADH;
km(37,2)=km_NDP;
km(37,3)=km_Pi;

% entree glucose dans biosynthese
km_glu=km_GLU;

% entree fructose dans biosynthese
km(3)=km_FRU;

% entree sucrose dans biosynthese
km(19)=km_SUC;
km(20)=km_SUC;

% entree STA dans biosynthese
km(13)=km_NDP;
km(13,2)=km_Pi;
km(13,3)=km_STA;

% degradation des lipides

```

```

km(15,1)=km_LIP;
km(15,2)=km_NAD;
km(15,3)=km_NTP;
km(15,4)=km_Pi;
% degradation ORA
km(17,1)=km_NAD;
km(17,2)=km_NDP;
km(17,3)=km_ORA;
km(17,4)=km_Pi;
% carence en Pi
km(6)=km_NTP;
km(8,1)=km_NADH;
km(8,2)=km_NADP;
km(8,3)=km_NTP;
km(18,1)=km_NDP;
km(18,2)=km_PPi;
% reaction de biosynthese
% TRY
km(1,1)=km_AA;
km(1,2)=km_NAD;
km(1,3)=km_NADP;
km(1,4)=km_NTP;
km(1,5)=km_Pi;
% SECologanine (mevalonate pathway)
km(2,1)=km_NAD;
km(2,2)=km_NADP;
% penthose pathway
km(4,1)=km_NAD;
km(4,2)=km_NADP;
km(4,3)=km_NDP;
km(4,4)=km_Pi;
% AA (acides amines)
km(5,1)=km_NAD;
km(5,2)=km_NADPH;
km(5,3)=km_NTP;
km(5,4)=km_NH4;
% LIPides
km(7,1)=km_NAD;

```

```

km(7,2)=km_NADPH;

% glycolyse + TCA
km(9,1)=km_NAD;
km(9,2)=km_NDP;
km(9,3)=km_Pi;

% SECologanine (pentoses phosphate)
km(10,1)=km_NADP;
km(10,2)=km_NTP;
km(10,3)=km_NAD;

% OP (phosphates organiques)
km(11,1)=km_AA;
km(11,2)=km_NAD;
km(11,3)=km_NADP;
km(11,4)=km_NTP;

% STH (mur cellulaire)
km(12,1)=km_NADPH;
km(12,2)=km_NTP;

% STA (stockage amidon)
km(14)=km_NTP;

% ORA (acides organiques)
km(16,1)=km_NAD;
km(16,2)=km_NDP;
km(16,3)=km_Pi;

% mu
km(69,1)=km_AA;
km(69,2)=km_LIP;
km(69,3)=km_STH;
km(69,4)=km_OP;
km(69,5)=km_ORA;

%%% METABOLITES SECONDAIRES %%%
km(48,1) = km_SEC;
km(48,2) = km_TRY;
km(49,1) = km_STR;
km(50,1) = km_STR;
km(51,1) = km_STR;
km(52,1) = km_TAB;
km(53,1) = km_AJM;

```

```

km(54,1) = km_TAB;
km(55,1) = km_LOC;
km(56,1) = km_TAB;
km(57,1) = km_CAT;
km(57,2) = km_VIN;
km(58,1) = km_VBL;
km(59,1) = km_CAT;
km(60,1) = km_SER;
km(61,1) = km_HOR;
km(62,1) = km_LOC;
km(63,1) = km_TAB;
km(64,1) = km_VIN;
km(65,1) = km_VBL;
km(66,1) = km_VCR;
km(67,1) = km_AJM;

```

```

%parametre2;

```

```

if nbcult == 5
    depart = 4;
else
    depart = 1;
end

```

```

%%% qte dans le milieu pour culture 5 (fed-batch) %%%

```

```

jourkkk = [3      6      9      12     15  18      21      24      27      30
33      36      38      40      42   ];
fructose = [5.071  4.7    2.275  3.955  4    2.888  4.918  3.577  3.104  2.902
3.2    4.698  4.193  4.84   4.049]/180.15*1000;
glucose = [5.306  5.403  3.198  4.443  4    3.708  5.164  4.381  3.542  3.025
3.868  5.812  4.615  4.391  4.786]/180.15*1000;
sucrose = [45.504  49.346  40.006  43.631  40  37.869  39.511  36.365  42.565  36.57
38.084  32.44  31.595  31.506  35.409]/342.3*1000;
nitrate = [3548.11  3006.01  2777.89  2997.42  3000      3001.92  2907.65  2912.91  2984.79
3021.63  2929.6  2809.01  2686.04  2911.23  2942.13]/1000;
phosphate = [119.778  91.6419      59.3004  69.6099  70    62.6093  55.9381  59.1646  54.9206
56.0043  56.0155  41.4398  46.7216  57.7583  56.1559]/1000;

```

```

jourkkk2 = [0 jourkkk 45];

kkk = 1;

cult = 4;
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%%%%%%%%%%% CONCENTRATIONS INITIALES INTRACELLULAIRE %%%%%%%%%%%%%%
for cult = depart:nbcult
    cult;
    X= zeros(31,1);
    %ACIDES AMINES
    X(1)=0.286; %experience HFM, comme etant le nitrate total (donc ca compte aussi NO3
mais NO3<<N total)
    %FRUCTOSE
    X(2)=0.2; %a peu pres, sucres intra
    %GLUCOSE
    X(3)=0.2; %a peu pres, sucres intra
    %SECOLOGANINE
    X(4)=0.0012813; % mesure grosse manip et poids moleculaire secologanin=400 environ
    %LIPIDES
    X(5)=0.01; % Ce sont les limides disponibles pour la croissance, pas les lipides
totaux
    %NAD
    X(6)=7e-5;
    %NADH
    X(7)=1.25e-4;
    %NADP
    X(8)=8e-6;
    %NADPH
    X(9)=1.12e-4; % Bieleski, Annual review plant physiol
    %NDP
    X(10)=2e-3;
    %AMMONIUM
    X(11)=0.053; % pas de resultat, on dit que c'est comme NO3
    %NTP
    X(12)=6.8e-3;
    %ACIDES ORGANIQUES
    X(13)=0.01;
    %PYROPHOSPHATE

```

```

X(15)=0.015; % aucune idee

%SUCROSE
X(16)=0; %on a dit que le sucrose est d'abord hydrolyse par les invertases
apoplastiques

%AMIDON
%X(17)=0.01; % on n'a qu'a dire que les reserves sont epuisees
X(17) = 1.705;

%MUR CELLULAIRE
X(18)=0.01; % idem.

%TRYPTAMINE
X(19)=0.0008722; % grosse manip jour 0

%COMPOSES PHOSPHATES
X(20)=0.01; % reserve a plat

%NITRATE VACUOLAIRE
X(21)=0; % plus rien dans la vacuole

%PHOSPHATE INORGANIQUE VACUOLAIRE
X(22)=0; % plus rien dans la vacuole

%SUCROSE VACUOLAIRE
X(23)=0; % pas de sucrose dans la vacuole

%NITRATE INTRACELLULAIRE
if (cult == 1)
    X(30)=0.10513; % grosse manip
    %PHOSPHATE INORGANIQUE INTRACELLULAIRE
    X(14)=0.01103; %pas beaucoup beaucoup !!
elseif (cult == 4)
    X(30) = 0.385;
    X(14) = 0.117;
    X(1) = 0.286;
    X(2) = 0.0121/180*1000/2;
    X(3) = 0.0585/180*1000/2;
    X(11) = 0.053;
    X(16) = 0.2757/342*1000/2;
    X(17) = 1.705;
elseif (cult ==5)
%    X(30) = 1.033;
    X(30) = 0.385;
    X(14) = 0.100;
    X(1) = 0.162;

```

```

X(2) = 0.01/180*1000;
X(3) = 0.0314/180*1000;
X(11) = 0.041;
X(16) = 0.1129/342*1000;
X(17) = 1.137;
else
X(30)=0.01653;
X(14)= 0.01875;
end

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%%%%%%%%%%%% CONCENTRATIONS INITIALES EXTRACELLULAIRE %%%%%%%%%%%%%%%

%FRUCTOSE EXTRACELLULAIRE
%X(24)=0; % pas de fructose dans le milieu
if cult == 4
X(24)=1.5*1000/180.15;
elseif cult==5
X(24) = 5.34*1000/180.15;
else
X(24)=29.44;
end

%GLUCOSE EXTRACELLULAIRE
%X(25)=0; % pas de glucose dans le milieu
if cult == 4
X(25)=1.3*1000/180.15;
elseif cult==5
X(25) = 4.14*1000/180.15;
else
X(25)=29.60;
end

%AMONNIUM EXTRACELLULAIRE
X(26)=0; % pas d'ammonium dans le milieu
%NITRATE EXTRACELLULAIRE
X(27)=3.27525; % 3 mM de nitrate dans 25 ml de milieu
%PHOSPHATE INORGANIQUE EXTRACELLULAIRE

```

```

%X(28)=0.08740; % .1 mM PO4 dans 25 ml de milieu
X(28) = 0.1;
%SUCROSE EXTRACELLULAIRE
if cult == 4
    X(29)=39.0/342.3*1000;
elseif cult==5
    X(29) = 50.9*1000/342.3;
else
    X(29)=90.88;
end
% 30g/l sucrose (MW=342) soit 87 mM

%%% Metabolite secondaires %%%
X(31) = 1/530.5736;
X(32) = 1.5598/352.4322;
X(33) = 1.72/349;
X(34) = 1.97/336.4328;
X(35) = 0.0096/336.4328;
X(36) = 0.0205/352.4322;
X(37) = 1/368.4316;
X(38) = 1/456.5376;
X(39) = 1/810.9856;
X(40) = 1/824.9692;
% BIOMASSE INITIALE SECHE

if cult == 1
    X(51)=0.032;
elseif (cult ==2) | (cult == 3)
    X(51)=164 *0.001/6;
elseif cult == 4
    X(51) = 0.0197;
else
    X(51) = 0.018;
end
%X(51) = .13/6;

X(5) = 0.1;
X(18) = 0.081;

```

```

X(13) = 0.16;
X(4) = 2/ 388.3706;
X(19) = 0.2/160.2182;
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%% Chargement de la matrice stoichiometrique s %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

s=matrix;
s1=s(:,1:20);

%options = odeset('OutputFcn','odeplot','maxstep',0.25,'refine',10);
options = odeset('maxstep',0.25,'refine',10);
%options = odeset('Reltol',1e-2 , 'Abstol',1e-2,'stats','on');

t1 = 0;
t = 0;
y = X.';
sucok =1 ;
itt = 1;
%cult = 3;
if (cult == 1) | (cult == 4)

    %[t, y]=rk4('kernel', 0, X.', 0.1, 25);
    [tb,yb]=ode15s('kernel', [0 50], X,options);

else
    for i = 2:length(jourkkk2)
        debut = jourkkk2(i-1);
        fin = jourkkk2(i);
        [t2,y2]=ode15s('kernel', [debut fin], X,options);
        dimens = size(t2);
        X = y2(dimens(1),:);
        if i < length(jourkkk2)-1
            Vol_ret = (X(51) * 8 * 9.9144) - 0.0376; % en ml
            X(24) = ((fructose(i-1) * 25) + (X(24) * Vol_ret)) / (25 + Vol_ret);
            X(25) = ((glucose(i-1)* 25) + (X(25) * Vol_ret)) / (25 + Vol_ret);
            X(29) = ((sucrose(i-1)* 25) + (X(29) * Vol_ret)) / (25 + Vol_ret);
            X(26) = 0; %pas de NH4 dans le milieu
            X(27) = ((nitrate(i-1)* 25) + (X(27) * Vol_ret)) / (25 + Vol_ret);

```

```

        X(28) = ((phosphate(i-1)* 25) + (X(28) * Vol_ret)) / (25 + Vol_ret);
    end
    t1 = t1+i;
    t = [t;t2];
    y = [y;y2];
    %pie((i+3)/48);
    %pause(1);

end

end

    t5 = t;
    y5 = y;
clear y
clear t
clear y2
clear t2
clear X

end

    %erreur(t,y)
    results(tb,yb,4);
    results(t5,y5,5);

    % AFFICHAGE DES FIGURES RESULTATS
%    if cult == 4
%        results(tb,yb,4)
%    elseif cult == 5
%        results(t5,y5,5)
%
%    else
%        if nbcult >= 1
%            results(tb,yb,1);
%        end
%        if nbcult >= 2
%            results(tn,yn,2);
%        end
%        if nbcult == 3

```

```
%           results(tp,yp,3);  
%           comparaison2(tb,yb,tn,yn,tp,yp);  
%           end  
%           end  
           %comparaison(tp,yp,3);  
  
%save('results_poster.txt','t','-ascii')  
  
figure  
erreur(tb,yb,t5,y5);
```

Programme *kernel.m*

```

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
% Copyright 2001 by Cyril Tikhomiroff. All rights reserved.
%
% Redistribution and use in source and binary forms, with or without
% modification, are permitted provided that this entire copyright notice
% is duplicated in all such copies.
%
% This software is provided "as is" and without any expressed or implied
% warranties, including, without limitation, the implied warranties of
% merchantability and fitness for any particular purpose.
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

function y=kernel(t,X)

global vseuil vmax km vmax_suc vmax_glu vmax_fru km_glu km_fru km_suc V s s1 para_init
itt fm0 mu

y=zeros(51,1);

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%% CALCUL DE LA REPARTITION DES SOURCES DE CARBONES VERS v_h %%%%%%%%%%

v=zeros(20,1);
w=zeros(67,1);

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%% Utilisation du glucose %%%%%%%%%%

v_h(1)=vmax_glu*sigma(X(3),km_glu,1);
%v_h(1)=0;

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%% Utilisation du fructose %%%%%%%%%%

v_h(2)=vmax(3)*sigma(X(2),km(3),1);
%v_h(2)=0;

```

```

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
Utilisation de l'amidon %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

v_h(3)=vmax(13)*sigma(X(10),km(13,1),1)*sigma(X(14),km(13,2),2)*sigma(X(17),km(13,3),1)*
(1-decis(X(2)+X(3)+X(16))/2,vseuil(13),vseuil(13,2)));
%v_h(3)=0; % pas de degradation d'amidon;

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
Utilisation de sucrose %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

v_h(4)=vmax(19)*sigma(X(16),km(19),1)*sigma(X(12)/(X(12)*X(14)),0.1,3);
v_h(5)=vmax(20)*sigma(X(16),km(20),1)*(1-sigma(X(12)/(X(12)*X(14)),0.1,3));

% Hyp: la cellule ne transporte pas de sucrose dans le cytosol %
%v_h(4)=0;
%v_h(5)=0;

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%% CALCUL DES VITESSES DES REACTIONS DE BIOSYNTHESE %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

for i=1:5 % 5 sources de carbohydrates possibles\
    % Calcul des flux des reactions de synthese en fonction de la source de
    carbohydrates

    v(1)=v_h(i)*vmax(1)*sigma(X(1),km(1,1),1)*sigma(X(6),km(1,2),1)*sigma(X(8),km(1,3),1)*s
    igma(X(12),km(1,4),1)*sigma(X(14),km(1,5),2);
    v(2)=v_h(i)*vmax(2)*sigma(X(6),km(2,1),1)*sigma(X(8),km(2,2),1);

    v(4)=v_h(i)*vmax(4)*sigma(X(6),km(4,1),1)*sigma(X(8),km(4,2),1)*sigma(X(10),km(4,3),1)*s
    igma(X(14),km(4,4),2)*decis(X(8)/(X(8)+X(9)),vseuil(4),vseuil(4,2));

    v(5)=v_h(i)*vmax(5)*sigma(X(6),km(5,1),1)*sigma(X(9),km(5,2),1)*sigma(X(12),km(5,3),1)*s
    igma(X(11),km(5,4),2);
    v(7)=v_h(i)*vmax(7)*sigma(X(6),km(7,1),1)*sigma(X(9),km(7,2),1);

    v(9)=v_h(i)*vmax(9)*sigma(X(6),km(9,1),1)*sigma(X(10),km(9,2),1)*sigma(X(14),km(9,3),2)*
    decis(X(6)/(X(7)+X(6)),vseuil(9),vseuil(9,2));

    v(10)=v_h(i)*vmax(10)*sigma(X(8),km(10,1),1)*sigma(X(12),km(10,2),1)*sigma(X(6),km(10,3)
    ,1);

```

```

v(11)=v_h(i)*vmax(11)*sigma(X(1),km(11,1),1)*sigma(X(6),km(11,2),1)*sigma(X(8),km(11,3),
1)*sigma(X(12),km(11,4),1)*decis(X(14),vseuil(11),vseuil(11,2))*(1-
decis(X(20),0.045,1000));

    v(12)=v_h(i)*vmax(12)*sigma(X(9),km(12,1),1)*sigma(X(12),km(12,2),1);
    switch i
        case 1

v(14)=v_h(i)*vmax(14)*sigma(X(12),km(14),1)*decis(X(2)+X(3)+X(16)/2,vseuil(14,1),vseuil(
14,2));

            case 2

v(14)=v_h(i)*vmax(14)*sigma(X(12),km(14),1)*decis(X(2)+X(3)+X(16)/2,vseuil(14,1),vseuil(
14,2));

                case 3
                    v(14)=0;
                case 4

v(14)=v_h(i)*vmax(14)*sigma(X(12),km(14),1)*decis(X(2)+X(3)+X(16)/2,vseuil(14,1),vseuil(
14,2));

                    case 5

v(14)=v_h(i)*vmax(14)*sigma(X(12),km(14),1)*decis(X(2)+X(3)+X(16)/2,vseuil(14,1),vseuil(
14,2));

                        end
                            v(14) = v(14) * (1-decis(X(17),vseuil(16),vseuil(16,2)));

v(16)=v_h(i)*vmax(16)*sigma(X(6),km(16,1),1)*sigma(X(10),km(16,2),1)*sigma(X(14),km(16,3
),2);

% Calcul des variations de concentrations a partir des reactions precedentes
z=s1*v(1:20);
yy=zeros(20,1);

% Rectification selon le type de carbohydrates
switch i
    case 2, % Fructose

```

```

yy(3)=-z(3);
%z(3)=0;
case 3, % Amidon
yy(13)=-z(3);
%z(3)=0;
case 4, % sucrose voie normale
yy(19)=-z(3);
%z(3)=0;
case 5, % sucrose voie en limitation de Pi
yy(20)=-z(3);
%z(3)=0;
end

% ajouter aux variations de concentration les variations z et la correction
% si la source de carbohydate n'est pas du glucose
% dans ce cas, le calcul doit donner s1*yy(3)=0 .

y(1:50)=y(1:50)+z+s1*yy;

end

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%% DEGRADATION AMIDON -> GLU %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
w(13)=vmax(13)*sigma(X(10),km(13,1),1)*sigma(X(14),km(13,2),2)*sigma(X(17),km(13,3),1)*(
1-decis(X(3),vseuil(13),vseuil(13,2)));
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%% DEGRADATION DES LIPIDES et ORA %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
w(15)=vmax(15)*sigma(X(5),km(15,1),1)*sigma(X(6),km(15,2),1)*sigma(X(12),km(15,3),1)*sig
ma(X(14),km(15,4),2)*(1-decis(X(7),vseuil(15),vseuil(15,2)));
%v(15)=0; % pas de degradation des lipides

%v(17)=0; % ORA n'interviennent pas pour le moment
w(17)=vmax(17)*sigma(X(6),km(17,1),1)*sigma(X(10),km(17,2),1)*sigma(X(13),km(17,3),1)*si
gma(X(14),km(17,4),2)*(1-decis(X(7),vseuil(17),vseuil(17,2)));

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%% VOIES ALTERNATIVES SI CARENCE EN ATP %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

%%% Hypothese pour le moment : pas de mecanisme de carence en phosphate %%%

```

```

%v(6)=0;
w(6)=vmax(6)*sigma(X(12),km(6),1)*(1-decis(X(14),vseuil(6),vseuil(6,2)));
%v(8)=0;
w(8)=vmax(8)*sigma(X(7),km(8,1),1)*sigma(X(8),km(8,2),1)*sigma(X(12),km(8,3),1)*(1-
decis(X(14),vseuil(8),vseuil(8,2)));
%v(18)=0;
w(18)=vmax(18)*sigma(X(10),km(18,1),1)*sigma(X(15),km(18,2),1)*(1-
decis(X(14),vseuil(18),vseuil(18,2)));

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%% DEGRADATION D'ADN EN Pi %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

%w(23)=0;
w(23)=vmax(23)*sigma(X(20),km(23),4)*(1-decis(X(14),vseuil(23),vseuil(23,2)));

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%% CALCULS DES AUTRES FLUX %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

w(21)=(vmax(21)*sigma(X(25),km(21),1)*sigma(X(12),km(21,3),1) * (1-
decis(X(3),vseuil(21),vseuil(21,2))));
w(22)=(vmax(22)*sigma(X(24),km(22),1)*sigma(X(12),km(22,3),1) * (1-
decis(X(2),vseuil(22),vseuil(22,2))));

%w(24)=0; % sucrose ne rentre pas dans la cellule;
w(24) = (vmax(24)*sigma(X(29),km(24),1)*sigma(X(12),km(24,3),1) * (1-
decis(X(16),vseuil(24),vseuil(24,2))));
w(25)=0; % pas de nh4 dans le milieu;
w(26)=vmax(26)*sigma(X(30),km(26,1),2)*sigma(X(7),km(26,2),1)*sigma(X(9),km(26,3),1);%*d
ecis(X(30),vseuil(26),vseuil(26,2));
%w(26)=0;
w(31)=vmax(31)*sigma(X(15),km(31),1);
%w(31)=0;
w(32)=0; % pas de nh4 qui sort dans le milieu;
%w(33)=vmax(33)*sigma(X(30),km(34),1);
w(33)=0; % pas d'efflux de no3
w(34)=(vmax(34,1)*sigma(X(27),km(34,1),1) +
vmax(34,2)*sigma(X(27),km(34,2),1)*sigma(X(12),km(34,3),1));
w(35)=(vmax(35)*sigma(X(29),km(35),1)*sigma(X(18),vseuil(69),vseuil(69,2)));
w(36)=vmax(36)*sigma(X(12),km(36),1);

```

```

w(37)=vmax(37)*sigma(X(7),km(37,1),1)*sigma(X(10),km(37,2),1)*sigma(X(14),km(37,3),2)*de
cis(X(10)/(X(12)+X(10)),vseuil(37),vseuil(37,2));
w(38)=(vmax(38,1)*sigma(X(28),km(38,1),1)
vmax(38,2)*sigma(X(28),km(38,2),1)*sigma(X(12),km(38,3),1));
%w(39)=vmax(39)*sigma(X(14),km(39),1);
w(39)=0; % pas d'efflux de phosphate

%Vacuole

%NO3
%w(27)=vmax(27)*sigma(X(30),km(27),1)*sigma(X(12),km(27,3),1)*(sigma(X(30),vseuil(27),vs
euil(27,2)));
w(27)=0;
%w(28)=vmax(28)*sigma(X(21),km(28),1)*(1-sigma(X(30),vseuil(28),vseuil(28,2)));
w(28)=0;
%Pi
%w(29)=vmax(29)*sigma(X(14),km(29),2)*sigma(X(12),km(29,3),1)*(sigma(X(14),vseuil(29),vs
euil(29,2)));
w(29)=0;
%w(30)=vmax(30)*sigma(X(22),km(30),1)*(1-sigma(X(14),vseuil(30),vseuil(30,2)));
%w(30)=0;
%SUC
w(40)=0; % pas de sucrose dans la cellule
w(41)=0; % pas de sucrose dans la cellule

%Flux d'alimentation exterieure.

w(42)=0; % pas d'alimentation exterieure
w(43)=0; % pas d'alimentation exterieure
w(44)=0; % pas d'alimentation exterieure
w(45)=0; % pas d'alimentation exterieure
w(46)=0; % pas d'alimentation exterieure
w(47)=0; % pas d'alimentation exterieure

%%% METABOLITES SECONDAIRES %%%
w(48) = vmax(48) * sigma(X(4),km(48,1),1) * sigma(X(19),km(48,2),1);
w(49) = vmax(49) * sigma(X(31),km(49,1),1);

```

```

w(50) = vmax(50) * sigma(X(31),km(50,1),1);
w(51) = vmax(51) * sigma(X(31),km(51,1),1);
w(52) = vmax(52) * sigma(X(35),km(52,1),1);
w(53) = vmax(53) * sigma(X(32),km(53,1),1);
w(54) = vmax(54) * sigma(X(35),km(54,1),1);
w(55) = vmax(55) * sigma(X(36),km(55,1),1);
w(56) = vmax(56) * sigma(X(35),km(56,1),1);
w(57) = vmax(57) * sigma(X(34),km(57,1),1) * sigma(X(38),km(57,2),1);
w(58) = vmax(58) * sigma(X(39),km(58,1),1);

```

```

%%% EXCRETION DES META II %%%

```

```

w(59) = vmax(59) * sigma(X(34),km(59,1),1);
w(60) = vmax(60) * sigma(X(33),km(60,1),1);
w(61) = vmax(61) * sigma(X(37),km(61,1),1);
w(62) = vmax(62) * sigma(X(36),km(62,1),1);
w(63) = vmax(63) * sigma(X(35),km(63,1),1);
w(64) = vmax(64) * sigma(X(38),km(64,1),1);
w(65) = vmax(65) * sigma(X(39),km(65,1),1);
w(66) = vmax(66) * sigma(X(40),km(66,1),1);
w(67) = vmax(67) * sigma(X(32),km(67,1),1);

```

```

y(1:50)=y(1:50)+s*w;

```

```

%%%%%%%%%% Mise a jour des vitesse de consommation %%%%%%%%%%%
%%%%%%%%%% des differentes sources de carbohydate %%%%%%%%%%%

```

```

%y(2)=y(3)/v_h*v_fru;
%y(17)=y(3)/v_h*v_sta;
%y(16)=y(3)/v_h*v_suc;
%y(3)=y(3)/v_h*v_glu;

```

```

%%%%%%%%%% Conversion des flux em mM/jour pour les %%%%%%%%%%%
%%%%%%%%%% concentrations extra-cellulaires %%%%%%%%%%%

```

```

y(24)=y(24)*X(51)/V;
y(25)=y(25)*X(51)/V;
y(26)=y(26)*X(51)/V;

```

```

y(27)=y(27)*X(51)/V;
y(28)=y(28)*X(51)/V;
y(29)=y(29)*X(51)/V;
y(41)=y(41)*X(51)/V;
y(42)=y(42)*X(51)/V;
y(43)=y(43)*X(51)/V;
y(44)=y(44)*X(51)/V;
y(45)=y(45)*X(51)/V;
y(46)=y(46)*X(51)/V;
y(47)=y(47)*X(51)/V;
y(48)=y(48)*X(51)/V;
y(49)=y(49)*X(51)/V;

```

```

%%% Conversion O2 de mmol/gDW/j en mmol/j

```

```

y(50)=y(50)*X(51);

```

```

%%%%%%%%%% Calcul du mu %%%%%%%%%%%

```

```

y(51)=vmax(69)*X(51)*sigma(X(1),km(69,1),1)*sigma(X(5),km(69,2),1)*sigma(X(18),km(69,3),
1.25)*sigma(X(20),km(69,4),4)*sigma(X(13),km(69,5),1);%*sigma(X(18),vseuil(69),vseuil(69
,2));

```

```

    %if X(18) > vseuil(69)
    for i5 = 1:40
        if (i5 ~= 6) & (i5 ~= 7) & (i5 ~= 8) & (i5 ~= 9) & (i5 ~= 10) & (i5 ~= 12) & (i5
~= 24) & (i5 ~= 25) & (i5 ~= 26) & (i5 ~= 27) & (i5 ~= 28) & (i5 ~= 29)
            y(i5) = y(i5) - (y(51) / X(51) * X(i5));
        end
    end
end

```

```

ATP0 = 1.5/200;
NADH0 = 30e-6*6;
NADPH0 = 15e-6*6;

```

```

% Utilisation de Pi, NH4+ et Glu pour formation de ATP, NADH NADPH

```

```

    y(3) = y(3) - ((y(51) / X(51)) * ATP0 * (10/6)) - ((y(51) / X(51)) * NADH0 * (21/6))
- ((y(51) / X(51)) * NADPH0 * (21/6));
    y(11) = y(11) - ((y(51) / X(51)) * ATP0 * (5/1)) - ((y(51) / X(51)) * NADH0 * (7/1))
- ((y(51) / X(51)) * NADPH0 * (7/1));
    y(14) = y(14) - ((y(51) / X(51)) * ATP0 * (3/1)) - ((y(51) / X(51)) * NADH0 * (2/1))
- ((y(51) / X(51)) * NADPH0 * (3/1));

%else
%y(51) = 0;
%end

```

Programme *matrix.m*

```
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
```

```
% Copyright 2001 by Cyril Tikhomiroff. All rights reserved.
```

```
%
```

```
% Redistribution and use in source and binary forms, with or without
```

```
% modification, are permitted provided that this entire copyright notice
```

```
% is duplicated in all such copies.
```

```
%
```

```
% This software is provided "as is" and without any expressed or implied
```

```
% warranties, including, without limitation, the implied warranties of
```

```
% merchantability and fitness for any particular purpose.
```

```
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
```

```
function y=matrix;
```

```
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%5 Reduction des 31 reactions du MFA en 20 reactions independantes
```

```
%%%%%%%%
```

```
s3=sparse(50,67);
```

```
s3(4,48) = -1;
```

```
s3(19,48) = -1;
```

```
s3(31,48) = 1;
```

```
s3(31,49) = -1;
```

```
s3(32,49) = 1;
```

```
s3(31,50) = -1;
```

```
s3(34,50) = 1;
```

```
s3(31,51) = -1;
```

```
s3(35,51) = 1;
```

```
s3(35,52) = -1;
```

```
s3(38,52) = 1;
```

```
s3(32,53) = -1;
```

$s_3(33, 53) = 1;$

$s_3(35, 54) = -1;$

$s_3(36, 54) = 1;$

$s_3(36, 55) = -1;$

$s_3(37, 55) = 1;$

$s_3(35, 56) = -1;$

$s_3(37, 56) = 1;$

$s_3(34, 57) = -1;$

$s_3(38, 57) = -1;$

$s_3(39, 57) = 1;$

$s_3(39, 58) = -1;$

$s_3(40, 58) = 1;$

$s_3(34, 59) = -1;$

$s_3(43, 59) = 1;$

$s_3(33, 60) = -1;$

$s_3(42, 60) = 1;$

$s_3(37, 61) = -1;$

$s_3(46, 61) = 1;$

$s_3(36, 62) = -1;$

$s_3(45, 62) = 1;$

$s_3(35, 63) = -1;$

$s_3(44, 63) = 1;$

$s_3(38, 64) = -1;$

$s_3(47, 64) = 1;$

$s_3(39, 65) = -1;$

$s_3(48, 65) = 1;$

```

s3(40,66) = -1;
s3(49,66) = 1;
s3(32,67) = -1;
s3(41,67) = 1;

s2=sparse(30,27);

s2(3,1)=1;
s2(10,1)=1;
s2(12,1)=-1;
s2(14,1)=1;
s2(25,1)=-1;

s2(2,2)=1;
s2(10,2)=1;
s2(12,2)=-1;
s2(14,2)=1;
s2(24,2)=-1;

s2(14,3)=1;
s2(20,3)=-1;
s2(11,3)=+3.75; %ligne ajoutee!

s2(10,4)=1;
s2(12,4)=-1;
s2(14,4)=1;
s2(16,4)=1;
s2(29,4)=-1;

s2(10,5)=1;
s2(11,5)=1;
s2(12,5)=-1;
s2(14,5)=1;
s2(26,5)=-1;

s2(6,6)=1;
s2(7,6)=-1;

```

```
s2(8,6)=3;  
s2(9,6)=-3;  
s2(30,6)=-1;  
s2(11,6)=1;
```

```
s2(10,7)=1;  
s2(12,7)=-1;  
s2(14,7)=1;  
s2(21,7)=1;  
s2(30,7)=-1;
```

```
s2(21,8)=-1;  
s2(30,8)=1;
```

```
s2(10,9)=1;  
s2(12,9)=-1;  
s2(22,9)=1;
```

```
s2(14,10)=1;  
s2(22,10)=-1;
```

```
s2(14,11)=2;  
s2(15,11)=-1;
```

```
s2(11,12)=-1;  
s2(26,12)=1;
```

```
s2(27,13)=1;  
s2(30,13)=-1;
```

```
s2(10,14)=1;  
s2(12,14)=-1;  
s2(14,14)=1;  
s2(27,14)=-1;  
s2(30,14)=1;
```

```
s2(24,15)=1;  
s2(25,15)=1;
```

s2(29,15)=-1;

s2(10,16)=1;

s2(12,16)=-1;

s2(14,16)=1;

s2(6,17)=1;

s2(7,17)=-1;

s2(10,17)=-2.5;

s2(12,17)=2.5;

s2(14,17)=-2.5;

s2(50,17)=-0.5;

s2(10,18)=2;

s2(12,18)=-2;

s2(14,18)=3;

s2(28,18)=-1;

s2(14,19)=-1;

s2(28,19)=1;

s2(10,20)=1;

s2(12,20)=-1;

s2(14,20)=1;

s2(16,20)=-1;

s2(23,20)=1;

s2(16,21)=1;

s2(23,21)=-1;

%s2(32,22)=-1;

s2(25,22)=1;

%s2(33,23)=-1;

s2(24,23)=1;

%s2(37,24)=-1;

s2(29,24)=1;

```

% s2(34,25)=-1;
s2(26,25)=1;

% s2(35,26)=-1;
s2(27,26)=1;

% s2(36,27)=-1;
s2(28,27)=1;

n6=sparse(19,20);

n6(15,1)=1;

n6(1,2)=1;
n6(15,2)=-1;

n6(2,3)=1;
n6(15,3)=-1;

n6(15,4)=-1;
n6(16,4)=1;

n6(16,5)=-1;
n6(19,5)=1;

n6(1,6)=-1;
n6(14,6)=1;

n6(13,7)=1;
n6(16,7)=-1;

n6(12,8)=1;
n6(13,8)=-1;

n6(12,9)=1;
n6(16,9)=-1;

```

```
n6(2,10)=-1;
n6(17,10)=1;
n6(19,10)=-1;
```

```
n6(17,11)=-1;
n6(18,11)=1;
```

```
n6(2,12)=-1;
n6(4,12)=1;
```

```
n6(7,13)=1;
n6(14,13)=-1;
```

```
n6(5,14)=1;
n6(12,14)=-1;
```

```
n6(6,15)=1;
n6(13,15)=-1;
```

```
n6(8,16)=1;
n6(16,16)=-1;
```

```
n6(11,17)=1;
n6(19,17)=-1;
```

```
n6(9,18)=1;
n6(17,18)=-1;
```

```
n6(10,19)=1;
n6(18,19)=-1;
```

```
n6(1,20)=-1;
n6(3,20)=1;
```

```
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%% Reduction des 31 reactions du MFA en 20 reactions independantes %%%%%%%%%
```

```
n1=[
```

```

1 0 -1 0 0 0 0 0 0 0 0;
0 1 0 2 0 0 0 0 0 0 0;
0 0 1 -3 -1 0 0 0 0 0 0;
0 0 0 1 1 0 0 0 0 0 0;
0 0 0 0 0 -1 0 0 0 0 0;
0 0 0 0 0 -2 -1 0 0 0 0;
0 0 0 0 -1 1 0 0 0 0 0;
0 0 0 0 1 0 0 0 -1 0 0;
0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 -1;
0 0 0 0 0 0 0 -1 0 -1 0;
0 0 0 0 0 0 1 1 0 0 0];

```

```
n1=sparse(n1);
```

```
n2=[
```

```

0 0 -1 0 0 0 0 0 0 0 0 -1 1 -1 0 0 0 0 1 1;
1 0 1 0 0 0 0 0 -1 0 0 0 0 0 0 0 0 -1 1 1;
-2 0 0 0 0 0 0 0 0 0 -1 -1 0 0 0 0 0 0 0 0;
0 0 0 0 0 0 -1 -1 2 0 0 0 0 0 0 0 0 2 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 -1 -1 1 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 1 1 0 0 0 -1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0;
0 -3 0 -1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 -1 1 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 -1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0];

```

```
n2=sparse(n2);
```

```

b=[1 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 0 0 0 0 0 0 0 0 0;
0 1.5 -1 -2 1 0 0.5 0 1 0.5 0 0 0 0 0 0.5 0 0 -0.5 -0.5;
2 0 0 1 1 0 0 0 2 0 0 0 0 0 1 0 1 0 0 0;
1 3 0 1 1 -1 1 0 2 1 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;
3 3 0 1 2 0 1 -1 2 1 0 0 0 0 0 1 0 0 0 0;
0 0 0 0 0 0 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0;
1 1.5 0 0 1 0 0.5 0 1 0.5 0 0 0 0 0 0.5 0 -1 0 0;

```

```

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 1 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 0 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 1 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 0 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 1 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 0 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 0.5;
0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0.5;];

```

```
b=sparse(b);
```

```
d=-n1\'(n2*b);
```

```
d=full(d);
```

```
k=[d;b]; % Kernel Matrix du systeme MFA
```

```
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
```

```
n3=sparse(20,31);
```

```
n3(3,1)=-1;
```

```
n3(10,1)=1;
```

```
n3(12,1)=-1;
```

```
n3(2,2)=-1;
```

```
n3(10,2)=1;
```

```
n3(12,2)=-1;
```

```
n3(8,3)=-2;
```

```
n3(9,3)=2;
```

```
n3(6,5)=1;
```

```
n3(7,5)=-1;
```

```
n3(10,5)=1;
```

$n_3(12,5)=-1;$

$n_3(14,5)=4;$

$n_3(1,6)=-2;$

$n_3(10,6)=2;$

$n_3(12,6)=-2;$

$n_3(15,6)=1;$

$n_3(19,6)=1;$

$n_3(14,7)=1;$

$n_3(6,8)=-2;$

$n_3(7,8)=2;$

$n_3(10,8)=-1;$

$n_3(12,8)=1;$

$n_3(14,8)=-1;$

$n_3(6,9)=-1;$

$n_3(7,9)=1;$

$n_3(1,10)=1;$

$n_3(8,10)=3;$

$n_3(9,10)=-3;$

$n_3(10,10)=3;$

$n_3(11,10)=-1;$

$n_3(12,10)=-3;$

$n_3(14,10)=3;$

$n_3(5,11)=1;$

$n_3(8,11)=2;$

$n_3(9,11)=-2;$

$n_3(10,11)=1;$

$n_3(12,11)=-1;$

$n_3(14,11)=1;$

$n_3(4,13)=1;$

$n_3(8,13)=2;$

$n_3(9,13)=-2;$

```
n3(10,13)=3;  
n3(12,13)=-3;  
n3(14,13)=3;  
  
n3(6,15)=-1;  
n3(7,15)=1;  
  
n3(10,16)=-1;  
n3(12,16)=1;  
  
n3(14,17)=1;  
  
n3(6,18)=-1;  
n3(7,18)=1;  
n3(10,18)=-1;  
n3(12,18)=1;  
n3(14,18)=-1;  
  
n3(8,19)=-1;  
n3(9,19)=1;  
  
n3(10,20)=1;  
n3(12,20)=-1;  
  
n3(4,21)=1;  
n3(10,21)=1;  
n3(12,21)=-1;  
n3(14,21)=2;  
  
n3(1,22)=-3.75;  
n3(6,22)=-0.25;  
n3(7,22)=0.25;  
n3(10,22)=7;  
n3(12,22)=-7;  
n3(14,22)=3.5;  
n3(15,22)=1.75;  
n3(20,22)=1;
```

```
n3(8,23)=1;  
n3(9,23)=-1;  
n3(10,23)=2;  
n3(12,23)=-2;  
n3(14,23)=1;  
n3(15,23)=1;  
n3(18,23)=1;
```

```
n3(14,24)=-1;  
n3(17,24)=-1;
```

```
n3(10,25)=1;  
n3(12,25)=-1;  
n3(15,25)=1;  
n3(17,25)=1;
```

```
n3(5,26)=-1;  
n3(6,26)=-1;  
n3(7,26)=1;  
n3(10,26)=2;  
n3(12,26)=-2;  
n3(15,26)=1;
```

```
n3(13,27)=1;
```

```
n3(13,28)=-1;
```

```
n3(15,29)=-1;  
n3(14,29)=1;
```

```
n3(10,30)=2;  
n3(12,30)=-2;  
n3(16,30)=-1;
```

```
n3(15,31)=-1;  
n3(16,31)=-1;
```

```
n3;
```

```

r=n3*k; % Equivalent stoichiometric matrix of the 20 independant reactions

z=sparse(10,20);

s1=[r;z];

s1 = [s1 zeros(30,47) ; zeros(20,67)];
s2 = [zeros(50,20) s2 zeros(50,20)];

s = s1 + s2 + s3; % Stoichiometric matrix of the whole system

%s=full(s);

y=s;

```

Programme *sigma.m*

```

function y=sigma(c,k,n)

y=c^n/(c^n+k^n);

```

Programme *decis.m*

```

function y=decis(c,k,n)

y=1/(1+exp(-n*(c-k)));

```

Programme *results.m*

```

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
% Copyright 2001 by Cyril Tikhomiroff. All rights reserved.
%
% Redistribution and use in source and binary forms, with or without
% modification, are permitted provided that this entire copyright notice
% is duplicated in all such copies.
%

```

```
% This software is provided "as is" and without any expressed or implied
% warranties, including, without limitation, the implied warranties of
% merchantability and fitness for any particular purpose.
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
```

```
function results(t,y,cult);
```

```
global km vseuil V
```

```
clear Ntot2
```

```
clear Ptot2
```

```
clear Bio2
```

```
if cult ==1
```

```
jour = [0      1      2      3      5      8      11      14      17
20      23      26      29      32      35      38      41];
```

```
jour2 = jour;
```

```
jour3 = jour2;
```

```
NO3 = [0.10513      0.1376      0.1178      0.1782      0.0623      0.2494      0.1632      0.2781
0.2997      0.3197      0.2071      0.2718      0.1454      0.1702      0.1874      0.1040      0.0503];
```

```
Pi = [0.01103      0.01925      0.02764      0.03868      0.02870      0.02015      0.01401      0.01994
0.03586      0.01270      0.00886      0.00941      0.01846      0.01263      0.01449      0.01390      0.01419];
```

```
ESUC = [90.88      87.41      62.17      87.74      77.48      66.15      72.09      71.73      66.55
60.43      94.85      83.89      57.16      57.83      63.10      49.52      40.75];
```

```
EGLU = [29.60      24.14      18.31      8.84      10.59      12.52      28.13      29.68      23.06
25.54      45.21      42.86      47.18      38.94      42.38      45.51      44.31];
```

```
EFRU = [29.44      24.21      16.83      6.40      8.67      11.55      27.09      28.51      21.87
24.92      44.18      42.42      49.63      40.71      47.15      51.06      49.72];
```

```
ENO3 = [3.27525      2.99      2.90      2.85      2.77      2.14      2.11      1.81      1.07
0.76      0.70      0.41      0.084      0.074      0.024      0.025      0.11];
```

```
EPi = [0.08740      0.0607      0.0465      0.0423      0      0      0      0      0
0      0      0      0      1.51e-3      1.14e-3      0      0];
```

```
Bio = [32      31      0      24      30      30      44      42      61
57      67      55      89      77      81      82      80];
```

```
Bio = Bio*0.001;
```

```
%Bio = [0.0466      0.0437      0      0.0343      0.0430      0.0424      0.0599      0.0588
0.0871      0.0808      0.0949      0.0762      0.1276      0.1101      0.1144      0.1173      0.1141];
```

```

TRY =      [0.0008722  0.001254 0.001118 0.001120 0.001211 0.000812 0.000843 0.000731
0.000792 0.000929 0.000874 0.000814 0.000692 0.000791 0.000788 0.000675 0.001283];
SEC =      [0.0012813  0.001298 0.000974 0.003892 0.001481 0.005392 0.000769 0.001775
0.001681 0.001441 0.006696 0.003474 0.008063 0.009284 0.005186 0.004475 0.004365];
Ntot =     [1.269808    1.186304 1.361897 1.38413  1.548529 1.47375  1.453464 1.350349
1.367387 1.40676  1.474628 1.42056  1.164056 1.183853 1.237644 1.25525  1.31678
];
Ptot =     [0.04768      0.063029 0.082225 0.063732 0.103605 0.103437 0.089769 0.074359
0.057793 0.062761 0.063117 0.063016 0.048546 0.041547 0.043988 0.039785 0.036642];

```

```

Cat = [1.97      2.57      1.81      1.79      1.17      1.89      1.67      1.65      1.64      1.43
1.97      2.39      2.00      2.48      2.23      2.47      2.14]/336.4328;
Tab = [0.0096    0.0199    0.0373    0.0450    0.0174    0.0967    0.0366    0.0490    0.0482    0.0668
0.0301    0.0403    0.0311    0.0280    0.0239    0.0168    0.0109]/336.4328;
Ser = [1.72      1.72      1.20      1.72      1.71      1.08      1.44      1.25      1.02      1.31
1.46      1.42      1.44      1.38      1.33      1.51      1.40]/349;
Ser2= [0.83      1.75      1.01      1.92      1.03      0.05      0.68      1.61      0.37      2.16
0.79      0.71      1.18      0.94      0.93      0.99      0.86]/349;
Loc = [0.0205    0.0352    0.0699    0.1114    0.0645    0.2202    0.0703    0.1317    0.1897    0.1635
0.1125    0.1279    0.0877    0.0693    0.0726    0.0554    0.0352]/352.4322;
Try = [0.13975   0.2008    0.1781    0.1795    0.1939    0.1301    0.1350    0.1170    0.1268    0.1488
0.1400    0.1303    0.1108    0.1266    0.1263    0.1082    0.1344]/160.2182;
Sec = [0.4976    0.5042    0.3784    1.5114    0.5751    2.0939    0.2987    0.6892    0.6529    0.5595
2.6006    1.3490    3.1315    3.6055    2.0141    1.7378    1.6952]/388.3706;
Ajm = [1.5598    1.6166    1.3557    1.9717    1.4474    1.3623    1.2198    1.2766    1.2328    1.4445
2.0847    1.8496    1.3772    2.1622    1.7852    1.6398    1.8417]/352.4322;

```

```
elseif cult==2
```

```
%%%%% FED - BATCH lim N
```

```

jour = [2          5          8          11          14          17          20
23          26          29          32          35          41          47];
NO3 = [0.04319    0.09239    0.12149    0.16407    0.17695    0.16701    0.20372
0.09120    0.71263    0.35126    0.20488    0.11899    0.10375    0.0451];
Pi = [0.02108    0.02736    0.04081    0.04059    0.06426    0.06110    0.08082
0.04074    0.15662    0.29916    0.15211    0.13346    0.2258    0.13799];

```

```

Bio = [152      135      133      253      154      304      274
248      337      330      310      400      487      619    ];
Bio = Bio * 0.001 / 6;
Ntot = [1.173871  1.438548  1.602333  1.444423  1.501875  1.565688  1.639334
1.56438      1.840541  2.061429  2.068125  1.553062  1.687033  1.67325];
Ptot = [0.065994  0.091561  0.10914  0.158955  0.18869  0.103339  0.14453
0.11317      0.164961  0.173468  0.199274  0.149121  0.191525  0.163486];

jour2 = [2      3      5      6      8      9      11
14      15      17      20      23      26      27      29
30      32      33      35      41      42      45      47];
ESUC = [80.38      60.94      76.11      61.81      77.90      75.54      29.88
46.48      48.83      79.57      21.82      111.24      116.32      118.62
81.88      98.47      84.54      113.15      85.00      81.00      68.21
62.18      68.54];
EGLU = [13.22      32.30      16.59      9.89      8.52      41.75      39.12
30.37      34.94      21.28      47.36      24.89      26.14      30.86
36.48      30.54      27.99      42.30      31.34      27.91      37.07
38.20      34.24];
EFRU = [11.82      32.30      14.74      8.93      6.03      40.33      43.71
31.52      35.07      19.33      43.46      20.85      22.13      27.39
34.41      26.93      24.56      40.00      33.34      29.90      39.16
39.94      36.52];
ENO3 = [2.80427  2.91382  3.00318  2.4617  2.80589  3.19346  3.18326
2.93795      2.82273  2.78654  2.14012  1.94386  2.81256  2.65377
0.00488      0.01922  0      0      0.00242  0.00      0.00145  0.0
0];
EPi = [0.03903  0.02665  0.05865  0.01383  0.00556  0.07677  0.09267
0.06769      0.08102  0.02730  0      0.04009  0.04625  0.04221
0.02268      0.06481  0.04612  0.02241  0.04060  0.01806  0.03421
0.04687      0.04994];
%TRYn = zeros(size(jour));
%SECn = zeros(size(jour));
jour3 = jour2;

elseif cult == 3
%%%% FED - BATCH lim Pi

```

```

jour = [2          5          8          11         14         17         20
23          26          29          32          35          42          44];
NO3 = [0.04319    0.09239    0.12149    0.16407    0.17695    0.16701    0.20372
0.09120    0.71263    0.42743    0.42411    0.67351    0.35373    0.46548];
Pi = [0.02108    0.02736    0.04081    0.04059    0.06426    0.06110    0.08082
0.04074    0.15662    0.13631    0.10478    0.13636    0.12393    0.04961];
Bio = [152        135        133        253        154        304        274
248        337        400        425        453        540        487];
Bio = Bio * 0.001 / 6;
Ntot = [1.173871  1.438548  1.602333  1.444423  1.501875  1.565688  1.639334
1.56438    1.840541  2.065683  2.604444  2.174641  2.64956    2.008187];
Ptot = [0.065994  0.091561  0.10914   0.158955  0.18869   0.103339  0.14453
0.11317    0.164961  0.220863  0.180645  0.136613  0.155542  0.099445];

jour2 = [2          3          5          6          8          9          11
14          15          17          20          23          26          27          29
30          32          33          35          39          42          44          45];
ESUC = [80.38      60.94      76.11      61.81      77.90      75.54      29.88
46.48      48.83      79.57      21.82      111.24     116.32     118.62
103.3      98.45      70.43      100.36     98.16      102.29     95.64
85.41      83.34];
EGLU = [13.22      32.30      16.59      9.89      8.52      41.75      39.12
30.37      34.94      21.28      47.36      24.89      26.14      30.86
24.72      27.35      37.65      46.13      26.41      35.12      23.74
21.84      33.60];
EFRU = [11.82      32.30      14.74      8.93      6.03      40.33      43.71
31.52      35.07      19.33      43.46      20.85      22.13      27.39
20.67      24.39      37.59      45.82      28.34      36.17      26.31
25.60      36.24];

jour3 = [2          3          5          6          8          9          11
14          15          17          20          23          26          27          29
30          32          33          35          41          42          44          45];
ENO3 = [2.80427    2.91382    3.00318    2.4617    2.80589    3.19346    3.18326
2.93795    2.82273    2.78654    2.14012    1.94386    2.81256    2.65377
3.05573    2.857570    2.12195    1.49753    1.38114    1.81434    1.08127
2.21493    2.12151];

```

```

Epi = [0.03903    0.02665    0.05865    0.01383    0.00556    0.07677    0.09267
0.06769    0.08102    0.02730    0          0.04009    0.04625    0.04221    0.0
0.00        0.00        0.00        0.00        0          0.00        0          0];
%TRYp = zeros(size(jour));
%SECp = zeros(size(jour));

elseif cult == 4
%%%% Batch Petris juillet
jour = [0      1      2      3      4      7      10     15     20     24
29     33     38     43];
NO3 = [0.385  0.284  0.149  0.435  0.534  0.495  0.581  0.555  0.610  0.589
0.638  0.530  0.397  0.442];
Pi = [0.117  0.082  0.141  0.099  0.166  0.182  0.149  0.113  0.090  0.084
0.078  0.051  0.063  0.047];
Bio = [0.0197 0.0188 0.0209 0.0206 0.0273 0.0184 0.0241 0.0281 0.0396 0.0452
0.0467 0.0566 0.0657 0.0629];
NH4 = [0.053  0.067  0.066  0.076  0.081  0.077  0.055  0.049  0.053  0.042
0.041  0.040  0.037  0.044];
AA = [0.286  0.359  0.352  0.349  0.329  0.374  0.305  0.286  0.270  0.270
0.238  0.185  0.050  0.150];
STA = [1.705  1.167  1.653  1.499  1.468  1.317  1.605  1.877  1.622  1.686
1.628  1.768  1.773  1.676];
Ntot = [0];
Ptot = [0];
jour2 = jour;
jour3 = jour2;
ESUC = [39.0  48.8  45.1  42.0  32.6  36.1  36.8  31.3  30.9  28.9
25.3  15.4  24.1  20.7]/342.3*1000; %transfo de g/l a mmol/L
EGLU = [1.3  2.4  2.1  2.2  1.8  2.4  3.2  2.8  3.6  4.3
4.8  3.4  5.8  6.0]/180.15*1000; %transfo de g/l a mmol/L
EFRU = [1.5  2.7  2.6  2.5  2.2  3.2  4.6  3.8  5.1  4.8
5.4  4.7  8.1  7.0]/180.15*1000; %transfo de g/l a mmol/L
ENO3 = [3.3525 3.6308 3.4352 3.3638 2.6954 2.7340 2.3996 1.9540 0.8670 1.1031 0.9541
0.2995 0.4112 0.1188];
Epi = [0.1063 0.0893 0.0607 0.0513 0.0376 0.0223 0.0087 0.0 0.0 0.0 0.0 0.0 0.0 ];
FRU = [0.0121 0.0080 0.0057 0.0102 0.0062 0.0131 0.0041 0.0072 0.0072 0.0088
0.0165 0.0118 0.0100 0.0112]/180.15*1000/2;

```

```

GLU = [0.0585    0.0399    0.0409    0.0565    0.0319    0.0499    0.0163    0.0271    0.0294    0.0420
0.0601    0.0644    0.0519    0.0547]/180.15*1000/2;
SUC = [0.2757    0.2118    0.2730    0.3848    0.2599    0.3806    0.0952    0.1983    0.2034    0.2541
0.3117    0.1965    0.3009    0.2278]/342.3*1000/2;

```

```

%TRYp = zeros(size(jour));
%SECp = zeros(size(jour));

```

```
elseif cult == 5
```

```
%%%% Fed Batch Petris janiver
```

```

jour = [0      3      6      9      12     15     18     21     24     27
30      33      36      38      40      42      44];

```

```

NO3 = [1.033  0.881  0.735  0.664  0.467  0.570  0.621  0.514  0.507  0.466
0.536  0.645  0.598  0.607  0.594  0.639  0.592];

```

```

Pi = [0.073  0.134  0.196  0.189  0.196  0.199  0.212  0.211  0.187  0.205
0.196  0.176  0.208  0.228  0.213  0.196  0.188];

```

```

Bio = [0.0131 0.0185 0.0174 0.0198 0.0218 0.0235 0.0302 0.0272 0.0329 0.0386
0.0408 0.0607 0.0632 0.0668 0.0752 0.0778 0.0762];

```

```

NH4 = [0.041  0.068  0.109  0.117  0.122  0.108  0.116  0.133  0.140  0.113
0.121  0.092  0.092  0.099  0.096  0.097  0.108];

```

```

AA = [0.162  0.183  0.343  0.307  0.473  0.511  0.337  0.443  0.399  0.360
0.555  0.382  0.413  0.441  0.430  0.370  0.460];

```

```

STA = [0.184  0.176  0.176  0.229  0.241  0.131  0.170  0.198  0.204  0.148
0.250  0.192  0.227  0.187  0.182  0.156  0.222]/162*1000;

```

```
Ntot = [0];
```

```
Ptot = [0];
```

```
jour2 = jour;
```

```
jour3 = jour2;
```

```

ESUC = [56.73  50.70  45.28  47.90  38.91  40.90  38.49  39.45  31.59  32.91
37.44  30.33  31.75  29.02  30.83  31.63  31.30  ]/342.3*1000; %transfo de g/l a
mmol/L

```

```

EGLU = [4.14  5.39  7.12  8.05  5.88  6.18  5.23  5.53  8.63  8.53
5.36  8.60  7.46  8.25  7.52  7.14  7.25  ]/180.15*1000; %transfo de g/l a
mmol/L

```

```

EFRU = [5.34    5.59    6.96    6.98    5.07    5.98    4.74    5.87    8.85    8.14
5.42    7.92    7.38    8.18    7.46    6.67    6.81    ]/180.15*1000; %transfo de g/l a
mmol/L

ENO3 = [4046.5 3386.3 3017.6 3039.1 2883.1 2842.4 2735.9 2782.5 2400.9 2510.0
2679.4 2362.6 2392.7 2347.0 2327.2 2417.6 2650.9 ]/1000;

EPi = [152.6 55.2 60.4 67.3 49.7 37.5 38.0 42.0 22.4 25.0
25.6 19.0 7.9 16.0 21.2 14.5 26.4 ]/1000;

SUC = [0.1129 0.1562 0.1055 0.1653 0.1069 0.1073 0.0961 0.0742 0.1101 0.0616
0.0236 0.0931 0.0710 0.0399 0.0977 0.0890 0.0669 ]/342.3*1000;

FRU = [0.0100 0.0099 0.0074 0.0068 0.0059 0.0069 0.0070 0.0056 0.0082 0.0055
0.0014 0.0044 0.0038 0.0056 0.0057 0.0060 0.0043 ]/180.15*1000;

GLU = [0.0314 0.0265 0.0183 0.0328 0.0191 0.0217 0.0211 0.0145 0.0296 0.0182
0.0034 0.0222 0.0161 0.0084 0.0232 0.0238 0.0117 ]/180.15*1000;

end

Ntot2(1) = Ntot(1);
Ptot2(1) = Ptot(1);
for i=2:length(t)

    if y(i,27) ~= 3
        Ntot2(i) = (((y(i-1,27) * V) - (y(i,27)*V))/y(i,51)) + Ntot2(i-1)*(y(i-
1,51)/y(i,51)) - (y(i,30) - y(i-1,30) + y(i,21) - y(i-1,21))*(y(i-1,51)/y(i,51));
    else
        Ntot2(i) = Ntot2(i-1);
    end

    if y(i,28) ~= 0.1
        Ptot2(i) = (((y(i-1,28) * V) - (y(i,28)*V))/y(i,51)) + Ptot2(i-1)*(y(i-
1,51)/y(i,51));
    else
        Ptot2(i) = Ptot2(i-1);
    end

    Bio2(i) = (((y(i,17) + y(i,2) + y(i,3)) * 180.15) + (y(i,16) * 342.30) +
((y(i,21)+y(i,30))*62) + (y(i,11)*18.04) + ((y(i,22)+y(i,14))*96.99)) * 1e-3 * y(i,51);
end

%close all;

```

```

%plot(t,y(:,2),'b',t,y(:,3),'b--',t,y(:,6),'b:',t,y(:,7),'k-',t,y(:,10),'k--');
figure;

subplot(6,5,5);
if (cult == 4 ) | (cult == 5)
    plot(t,y(:,1),jour,AA,'o','markersize',2);
else
    plot(t,y(:,1));
end
xmax = xlim;
ymax = ylim;
text((xmax(2)/2),((ymax(2)-
0.000)*0.9)+0.000,'AA','fontsize',8,'horizontalalignment','center','fontweight','bold');

subplot(6,5,16);
if (cult == 4 ) | (cult == 5)
    plot(t,y(:,2),jour,FRU,'o','markersize',2);
else
    plot(t,y(:,2));
end
xmax = xlim;
ymax = ylim;
text((xmax(2)/2),((ymax(2)-
0.000)*0.9)+0.000,'FRU','fontsize',8,'horizontalalignment','center');

subplot(6,5,6);
if (cult == 4 ) | (cult == 5)
    plot(t,y(:,3),jour,GLU,'o','markersize',2);
else
    plot(t,y(:,3));
end
xmax = xlim;
ymax = ylim;
text((xmax(2)/2),((ymax(2)-
0.000)*0.9)+0.000,'GLU','fontsize',8,'horizontalalignment','center');

%subplot(6,5,22);

```

```

%plot(t,Ntot2,jour,Ntot,'o','markersize',2);

%xmax = xlim;
%ymax = ylim;
%text((xmax(2)/2),((ymax(2)-
0.000)*0.9)+0.000,'NTOT','fontsize',8,'horizontalalignment','center');

subplot(6,5,10);
plot(t,y(:,5));
xmax = xlim;
ymax = ylim;
text((xmax(2)/2),((ymax(2)-
0.000)*0.9)+0.000,'LIP','fontsize',8,'horizontalalignment','center','fontweight','bold')
;

subplot(6,5,4);
plot(t,y(:,6));
xmax = xlim;
ymax = ylim;
text((xmax(2)/2),((ymax(2)-
0.000)*0.9)+0.000,'NAD','fontsize',8,'horizontalalignment','center');

subplot(6,5,9);
plot(t,y(:,7));
xmax = xlim;
ymax = ylim;
text((xmax(2)/2),((ymax(2)-
0.000)*0.9)+0.000,'NADH','fontsize',8,'horizontalalignment','center');

subplot(6,5,14);
plot(t,y(:,8));
xmax = xlim;
ymax = ylim;
text((xmax(2)/2),((ymax(2)-
0.000)*0.9)+0.000,'NADP','fontsize',8,'horizontalalignment','center');

subplot(6,5,19);
plot(t,y(:,9));
xmax = xlim;

```

```

ymax = ylim;
text((xmax(2)/2), ((ymax(2)-
0.000)*0.9)+0.000, 'NADPH', 'fontsize', 8, 'horizontalalignment', 'center');

subplot(6,5,24);
plot(t,y(:,10));
xmax = xlim;
ymax = ylim;
text((xmax(2)/2), ((ymax(2)-
0.000)*0.9)+0.000, 'NDP', 'fontsize', 8, 'horizontalalignment', 'center');

subplot(6,5,17);
if (cult == 4) | (cult == 5)
    plot(t,y(:,11), jour, NH4, 'o', 'markersize', 2);
else
    plot(t,y(:,11));
end
xmax = xlim;
ymax = ylim;
text((xmax(2)/2), ((ymax(2)-
0.000)*0.9)+0.000, 'NH4', 'fontsize', 8, 'horizontalalignment', 'center');

subplot(6,5,29);
plot(t,y(:,12));
xmax = xlim;
ymax = ylim;
text((xmax(2)/2), ((ymax(2)-
0.000)*0.9)+0.000, 'NTP', 'fontsize', 8, 'horizontalalignment', 'center');

subplot(6,5,25);
plot(t,y(:,13));
xmax = xlim;
ymax = ylim;
text((xmax(2)/2), ((ymax(2)-
0.000)*0.9)+0.000, 'ORA', 'fontsize', 8, 'horizontalalignment', 'center');

subplot(6,5,8);
plot(t,y(:,14), jour, Pi, 'o', 'markersize', 2);

```

```

xmax = xlim;
ymax = ylim;
text((xmax(2)/2),((ymax(2)-
0.000)*0.9)+0.000,'Pi','fontsize',8,'horizontalalignment','center');

subplot(6,5,13);
plot(t,y(:,15));
xmax = xlim;
ymax = ylim;
text((xmax(2)/2),((ymax(2)-
0.000)*0.9)+0.000,'Ppi','fontsize',8,'horizontalalignment','center');

subplot(6,5,22);
if (cult == 4 ) | (cult == 5)
    plot(t,y(:,16),jour,SUC,'o','markersize',2);
else
    plot(t,y(:,16));
end
xmax = xlim;
ymax = ylim;
text((xmax(2)/2),((ymax(2)-
0.000)*0.9)+0.000,'SUC','fontsize',8,'horizontalalignment','center');

subplot(6,5,26);
if (cult == 4) | (cult == 5)
    plot(t,y(:,17),jour,STA,'o','markersize',2);
else
    plot(t,y(:,17));
end
xmax = xlim;
ymax = ylim;
text((xmax(2)/2),((ymax(2)-
0.000)*0.9)+0.000,'STA','fontsize',8,'horizontalalignment','center');

subplot(6,5,15);
plot(t,y(:,18));
xmax = xlim;
ymax = ylim;

```

```

text((xmax(2)/2), ((ymax(2)-
0.000)*0.9)+0.000, 'STH', 'fontsize', 8, 'horizontalalignment', 'center', 'fontweight', 'bold')
;

%subplot(6,5,23);
%plot(t,Ptot2,jour,Ptot,'o','markersize',2);
%xmax = xlim;
%ymax = ylim;
%text((xmax(2)/2), ((ymax(2)-
0.000)*0.9)+0.000, 'PTOT', 'fontsize', 8, 'horizontalalignment', 'center');

subplot(6,5,20);
plot(t,y(:,20));
xmax = xlim;
ymax = ylim;
text((xmax(2)/2), ((ymax(2)-
0.000)*0.9)+0.000, 'OP', 'fontsize', 8, 'horizontalalignment', 'center', 'fontweight', 'bold');

subplot(6,5,12);
plot(t,y(:,21));
xmax = xlim;
ymax = ylim;
text((xmax(2)/2), ((ymax(2)-
0.000)*0.9)+0.000, 'VNO3', 'fontsize', 8, 'horizontalalignment', 'center');

subplot(6,5,18);
plot(t,y(:,22));
xmax = xlim;
ymax = ylim;
text((xmax(2)/2), ((ymax(2)-
0.000)*0.9)+0.000, 'VPi', 'fontsize', 8, 'horizontalalignment', 'center');

subplot(6,5,28);
plot(t,y(:,51),t,Bio2);
xmax = xlim;
ymax = ylim;
text((xmax(2)/2), ((ymax(2)-0.000)*0.9)+0.000, 'Dry
Weight', 'fontsize', 8, 'horizontalalignment', 'center');

```

```

subplot(6,5,11);
plot(t,y(:,24),jour2,EFRU,'o','markersize',2);
xmax = xlim;
ymax = ylim;
text((xmax(2)/2),((ymax(2)-
0.000)*0.9)+0.000,'EFRU','fontsize',8,'horizontalalignment','center');

subplot(6,5,1);
plot(t,y(:,25),jour2,EGLU,'o','markersize',2);
xmax = xlim;
ymax = ylim;
text((xmax(2)/2),((ymax(2)-
0.000)*0.9)+0.000,'EGLU','fontsize',8,'horizontalalignment','center');

subplot(6,5,27);
plot(t,y(:,50));
xmax = xlim;
ymax = ylim;
text((xmax(2)/2),((ymax(2)-
0.000)*0.9)+0.000,'O2','fontsize',8,'horizontalalignment','center');

subplot(6,5,2);
plot(t,y(:,27),jour3,ENO3,'o','markersize',2);
xmax = xlim;
ymax = ylim;
text((xmax(2)/2),((ymax(2)-
0.000)*0.9)+0.000,'ENO3','fontsize',8,'horizontalalignment','center');

subplot(6,5,3);
plot(t,y(:,28),jour3,EPi,'o','markersize',2);
xmax = xlim;
ymax = ylim;
text((xmax(2)/2),((ymax(2)-
0.000)*0.9)+0.000,'EPi','fontsize',8,'horizontalalignment','center');

subplot(6,5,21);
plot(t,y(:,29),jour2,ESUC,'o','markersize',2);

```

```

xmax = xlim;
ymax = ylim;
text((xmax(2)/2), ((ymax(2)-
0.000)*0.9)+0.000, 'ESUC', 'fontsize', 8, 'horizontalalignment', 'center');

subplot(6,5,7);
plot(t,y(:,30), jour, NO3, 'o', 'markersize', 2);
xmax = xlim;
ymax = ylim;
text((xmax(2)/2), ((ymax(2)-
0.000)*0.9)+0.000, 'NO3', 'fontsize', 8, 'horizontalalignment', 'center');

subplot(6,5,30);
plot(t,y(:,51), jour, Bio, 'o', 'markersize', 2);
xmax = xlim;
ymax = ylim;
text((xmax(2)/2), ((ymax(2)-
0.000)*0.9)+0.000, 'X', 'fontsize', 8, 'horizontalalignment', 'center');

subplot(6,5,23);
plot(t,y(:,19), t, y(:,4));
xmax = xlim;
ymax = ylim;
text((xmax(2)/2), ((ymax(2)-0.000)*0.9)+0.000, 'TRY
SEC', 'fontsize', 8, 'horizontalalignment', 'center');

for il = 1:30
    subplot(6,5,il)
    set(gca, 'xtick', [0 10 20 30 40 50], 'fontsize', 6);
    if (il ~= 27)
        v = axis;
        v(3) = 0;
        axis(v);
    end
    grid

```

```

end

if cult == 1
    figure

    subplot(4,4,1);
    plot(t,y(:,31));
    xmax = xlim;
    ymax = ylim;
    text((xmax(2)/2),((ymax(2)-
0.000)*0.9)+0.000,'Str','fontsize',8,'horizontalalignment','center');
    subplot(4,4,2);
    plot(t,y(:,32),jour,Ajm,'o','markersize',2);
    xmax = xlim;
    ymax = ylim;
    text((xmax(2)/2),((ymax(2)-
0.000)*0.9)+0.000,'Ajm','fontsize',8,'horizontalalignment','center');
    subplot(4,4,3);
    plot(t,y(:,33),jour,Ser,'o','markersize',2);
    xmax = xlim;
    ymax = ylim;
    text((xmax(2)/2),((ymax(2)-
0.000)*0.9)+0.000,'Ser','fontsize',8,'horizontalalignment','center');
    subplot(4,4,4);
    plot(t,y(:,34),jour,Cat,'o','markersize',2);
    xmax = xlim;
    ymax = ylim;
    text((xmax(2)/2),((ymax(2)-
0.000)*0.9)+0.000,'Cat','fontsize',8,'horizontalalignment','center');
    subplot(4,4,5);
    plot(t,y(:,35),jour,Tab,'o','markersize',2);
    xmax = xlim;
    ymax = ylim;
    text((xmax(2)/2),((ymax(2)-
0.000)*0.9)+0.000,'Tab','fontsize',8,'horizontalalignment','center');
    subplot(4,4,6);
    plot(t,y(:,36),jour,Loc,'o','markersize',2);
    xmax = xlim;

```

```

ymax = ylim;
text((xmax(2)/2), ((ymax(2) -
0.000)*0.9)+0.000, 'Loc', 'fontsize', 8, 'horizontalalignment', 'center');
subplot(4,4,7);
plot(t,y(:,37));
xmax = xlim;
ymax = ylim;
text((xmax(2)/2), ((ymax(2) -
0.000)*0.9)+0.000, 'Hor', 'fontsize', 8, 'horizontalalignment', 'center');
subplot(4,4,8);
plot(t,y(:,38));
xmax = xlim;
ymax = ylim;
text((xmax(2)/2), ((ymax(2) -
0.000)*0.9)+0.000, 'Vin', 'fontsize', 8, 'horizontalalignment', 'center');
subplot(4,4,9);
plot(t,y(:,39));
xmax = xlim;
ymax = ylim;
text((xmax(2)/2), ((ymax(2) -
0.000)*0.9)+0.000, 'Vbl', 'fontsize', 8, 'horizontalalignment', 'center');
subplot(4,4,10);
plot(t,y(:,40));
xmax = xlim;
ymax = ylim;
text((xmax(2)/2), ((ymax(2) -
0.000)*0.9)+0.000, 'Vcr', 'fontsize', 8, 'horizontalalignment', 'center');
subplot(4,4,11);
plot(t,y(:,4), jour, Sec, 'o', 'markersize', 2);
xmax = xlim;
ymax = ylim;
text((xmax(2)/2), ((ymax(2) -
0.000)*0.9)+0.000, 'Sec', 'fontsize', 8, 'horizontalalignment', 'center');
subplot(4,4,12);
plot(t,y(:,19), jour, Try, 'o', 'markersize', 2);
xmax = xlim;
ymax = ylim;

```

```

        text((xmax(2)/2),((ymax(2)-
0.000)*0.9)+0.000,'Try','fontsize',8,'horizontalalignment','center');
        subplot(4,4,16);
        plot(t,y(:,51),jour,Bio,'o','markersize',2);
        xmax = xlim;
        ymax = ylim;
        text((xmax(2)/2),((ymax(2)-
0.000)*0.9)+0.000,'X','fontsize',8,'horizontalalignment','center');
        for i1 = 1:12
            subplot(4,4,i1)
            set(gca,'xtick',[0 10 20 30 40 50],'fontsize',6);
            v = axis;
            v(3) = 0;
            axis(v);
            grid
        end
end

```