

**Titre:** Culture de cellules végétales en bioréacteur : suivi et contrôle du phosphate intracellulaire  
Title: phosphate intracellular

**Auteur:** Inesse Sifi  
Author:

**Date:** 2006

**Type:** Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

**Référence:** Sifi, I. (2006). Culture de cellules végétales en bioréacteur : suivi et contrôle du phosphate intracellulaire [Mémoire de maîtrise, École Polytechnique de Montréal].  
Citation: PolyPublie. <https://publications.polymtl.ca/7915/>

## Document en libre accès dans PolyPublie

Open Access document in PolyPublie

**URL de PolyPublie:** <https://publications.polymtl.ca/7915/>  
PolyPublie URL:

**Directeurs de recherche:** Michel Perrier, & Jean Archambault  
Advisors:

**Programme:** Non spécifié  
Program:

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

CULTURE DE CELLULES VÉGÉTALES EN BIORÉACTEUR :  
SUIVI ET CONTRÔLE DU PHOSPHATE INTRACELLULAIRE

INESSE SIFI  
DÉPARTEMENT DE GÉNIE CHIMIQUE  
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION  
DU DIPLÔME DE MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES  
(GÉNIE CHIMIQUE)  
AOÛT 2006



Library and  
Archives Canada

Published Heritage  
Branch

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

Bibliothèque et  
Archives Canada

Direction du  
Patrimoine de l'édition

395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

*Your file* *Votre référence*  
ISBN: 978-0-494-19333-4

*Our file* *Notre référence*  
ISBN: 978-0-494-19333-4

#### NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

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

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

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

#### AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

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

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

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 :

**CULTURE DE CELLULES VÉGÉTALES EN BIORÉACTEUR :  
SUIVI ET CONTRÔLE DU PHOSPHATE INTRACELLULAIRE**

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

M. DUBOIS Charles, Ph.D., président  
M. PERRIER Michel, Ph.D., membre et directeur de recherche  
M. ARCHAMBAULT Jean, Ph.D., membre et codirecteur de recherche  
M. JOLICŒUR Mario, Ph.D., membre

## REMERCIEMENTS

Je remercie mon directeur de recherche Dr. Michel Perrier pour m'avoir donnée l'opportunité d'effectuer des études de maîtrise et un projet de recherche à l'Ecole Polytechnique de Montréal.

Je remercie Dr. Jean Archambault pour m'avoir incité il y a quelques années à effectuer des études supérieures dans le domaine des biotechnologies et bioprocédés. Je le remercie aussi pour m'avoir donné l'opportunité de me familiariser avec la culture cellulaire et l'optimisation des bioprocédés au sein de son groupe de recherche. En m'introduisant dans le domaine des biotechnologies Dr. Archambault a ouvert pour moi les portes d'un monde fascinant, passionnant et surtout plein de défis qui je suis sûre m'aideront à me réaliser sur le plan professionnel.

Je remercie tout le groupe de Phytobiotech dont Joël Sirois, Dany Aubry, Martin Gaudette, Luc Lavoie, Robert Williams, Steve Fiset et bien d'autres pour toutes les connaissances pratiques et théoriques acquises grâce à eux.

Je remercie mes parents ainsi que mes frères et ma sœur pour leur soutien continu.

## RÉSUMÉ

L'objectif principal de ce projet de recherche était le suivi et le contrôle du phosphate intracellulaire dans le but d'obtenir des cultures de cellules végétales à hautes densités. Des cellules d'*Eschscholtzia californica* ont servi de système modèle pour les cultures. Le modèle mathématique développé par Sirois (1997) a été utilisé pour élaborer des stratégies d'alimentation dans le cas de 5 cultures.

Dans le cas de deux cultures, les ajouts de nutriments ont été effectués en se basant sur les mesures de la concentration des nutriments dans le milieu de culture. Après chaque mesure de la concentration des nutriments, des ajouts étaient effectués au besoin pour maintenir celles-ci aux niveaux fixés par Sirois (1997).

Dans un premier temps un bioréacteur performant a été choisi. Pour ce faire un bioréacteur HRI d'un volume nominal de 3L a été comparé à un bioréacteur HRI d'un volume nominal de 5L à l'aide de cultures réalisées dans chacun de ses bioréacteurs en même temps, avec les mêmes conditions d'inoculation et les mêmes conditions d'opération.

Ces cultures ont permis de constater que le bioréacteur HRI de 3 L permet un meilleur transfert de gaz que le bioréacteur HRI de 5 L.

Après ces deux cultures le choix s'est porté sur le bioréacteur HRI de 3 L pour la suite des travaux.

Une culture a servi à affiner le suivi du phosphate intracellulaire. Cette culture a permis de constater que des ajouts plus fréquents et plus importants de phosphate sont nécessaires pour maintenir le phosphate intracellulaire au-dessus de zéro et éviter des limitations dans le cas de ce nutriment.

Le contrôle du phosphate intracellulaire s'est donc avéré important pour éviter des limitations.

Le phosphate intracellulaire a été contrôlé à  $0,5\text{mmol}\times 10^{-9}$  cellules lors de deux cultures et à  $1\text{mmol}\times 10^{-9}$  cellules lors de deux autres cultures.

Il a été plus facile de contrôler le phosphate intracellulaire à  $1\text{mmol}\times 10^{-9}$  cellules que de le contrôler à  $0,5\text{ mmol}\times 10^{-9}$  cellules. Cependant le maintien du phosphate intracellulaire à  $1\text{mmol}\times 10^{-9}$  cellules semble provoquer la saturation des réserves de phosphate et inhiber la croissance cellulaire.

Contrairement à Coelho (2000) et à Sirois (1997) qui ont obtenu une concentration cellulaire de  $20,0.10^{+9}\text{c.L}^{-1}$  lors de cultures optimales avec l'espèce *Eschscholtzia californica*, la plus haute concentration cellulaire obtenue dans le cadre de ce projet de recherche était de  $12,5.10^{+9}\text{c.L}^{-1}$ .

Cette concentration cellulaire a été obtenue lors d'une culture sans ajouts de phosphate. L'impossibilité de maintenir certains nutriments aux concentrations fixées par Sirois (1997) et les ajouts important de phosphate sont probablement à l'origine des faibles concentrations cellulaire obtenues lors de ce projet de recherche.

## ABSTRACT

The main objective of this project was the monitoring and the control of the intracellular phosphate. This work was performed using *Eschscholtzia californica* cells as a model. The mathematical model developed by Sirois (1997) was used to elaborate the feeding strategies for 5 cultures. For two cultures the feeding was performed based on the measure of the nutrients level in order to maintain the nutrient's concentrations at the levels set by Sirois (1997).

First, an effective bioreactor was selected by comparing between the performance of an HRI 3-L bioreactor and an HRI 5-L bioreactor. In order to compare the two bioreactors a culture was performed in each of them. The cultures were done simultaneously, with identical inoculum and conditions of operation.

The gas transfer was better in the HRI3-L bioreactor compared to the HRI 5-L bioreactor. After those cultures the HRI 3-L bioreactor was selected to perform the remaining cultures.

A culture was used to refine the monitoring of the intracellular phosphate. As a conclusion of this culture the control of the intracellular phosphate concentration is very important in order to prevent a limitation in phosphate and depletion of this nutrient.

The phosphate concentration was controlled at  $0.5\text{mmol} \times 10^{-9}$  cells during two cultures and at  $1\text{mmol} \times 10^{-9}$  cells.

It was easier to control the intracellular phosphate concentration at  $1\text{mmol} \times 10^{-9}$  cells than  $0.5\text{mmol} \times 10^{-9}$  cells. However at an intracellular phosphate of  $1\text{mmol} \times 10^{-9}$  cells, the phosphate stores seem to be saturated and the cellular growth seem to be inhibited by this nutrient.

The optimal cell concentration reached during this project was  $12,5 \times 10^{+9} \text{c.L}^{-1}$ . This cell concentration was reached with a culture during which the intracellular phosphate was monitored and there was no adding of phosphate. During this project, the cell growth was probably affected by the impossibility to maintain the glucose, the nitrate and the ammonium at the concentrations set by Sirois (1997) and the probable toxic effect of the phosphate.

## TABLE DES MATIERES

<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>IV</b>
<b>RÉSUMÉ.....</b>	<b>V</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>VIII</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES .....</b>	<b>X</b>
<b>LISTE DES ANNEXES .....</b>	<b>XII</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>XIII</b>
<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>XIV</b>
<b>NOMENCLATURE .....</b>	<b>XVII</b>
<b>CHAPITRE1: INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
1.1 L'intérêt commercial des plantes.....	1
1.2 Problématique.....	3
1.2.1 Le temps d'opération.....	4
1.2.2 Le rendement.....	4
1.3 Objectif.....	7
<b>CHAPITRE2: REVUE DE LITTERATURE .....</b>	<b>8</b>
2.1 La culture des cellules végétales .....	8
2.2 Nutrition des Cellules végétales.....	9
2.2.1 Le phosphate .....	9
2.2.2 Mesure du phosphate intracellulaire .....	10
2.2.3 Transport du phosphate et sa distribution dans la cellule .....	13
2.2.4 Régulation du transport de phosphate .....	19
2.2.5 Effets du phosphate sur la croissance cellulaire et la production de métabolites secondaires.....	20
<b>CHAPITRE3: METHODOLOGIE .....</b>	<b>24</b>
3.1 Lignée cellulaire et maintien.....	24

3.2 Cultures en bioréacteurs .....	25
3.2.1 Description du bioréacteur de 5L à double ruban hélicoïdal .....	25
3.2.2 Description du bioréacteur de 3L à simple ruban hélicoïdal.....	26
3.2.3 Préparation des cultures et inoculation des bioréacteurs.....	27
3.2.4 Conditions d'opération .....	28
3.2.5 Échantillonnage et suivi .....	28
3.2.6 Modèle de croissance et planification des ajouts .....	30
3.2.7 Contrôle manuel du phosphate intracellulaire .....	31
3.2.8 Analytique .....	32
3.2.9 Mesures respirométriques.....	34
3.2.10 Cultures témoins en flacon.....	38
<b>CHAPITRE4 : CULTURES EN BIOREACTEURS .....</b>	<b>39</b>
4.1 Comparaison entre le bioréacteur de 5 L et le bioréacteur de 3 L .....	40
4.2 Suivi du phosphate intracellulaire .....	58
4.3 Contrôle manuel du phosphate intracellulaire à $0,5 \text{ mmol} \cdot 10^{-9}$ cellules ..	66
4.4 Contrôle manuel du phosphate intracellulaire à $1 \text{ mmol} \cdot 10^{-9}$ cellules ..	85
<b>CHAPITRE5 : DISCUSSION SYNTHESE.....</b>	<b>100</b>
<b>CHAPITRE6 : CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS .....</b>	<b>103</b>
<b>CHAPITRE7 : BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>105</b>

LISTE DES ANNEXES

Annexe.1 Solutions pour les comptes cellulaires.....	118
Annexe.2 Milieux de culture.....	119
Annexe.2.1 Composition du milieu B5.....	119
Annexe.2.2 Composition du milieu d'ajouts.....	121
Annexe.2.3 Composition du milieu Murashige-Skooge.....	122
Annexe.3 Résultats des cultures en bioréacteurs.....	123
Annexe.4 Ajouts.....	128

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1 Produits d'intérêt commercial provenant des plantes (Scragg, 1995).....	2
Tableau 1.2 rendement en métabolites secondaires chez certaines plantes.....	6

## LISTE DES FIGURES

FIGURE 3.1: Schéma du bioréacteur HRI de 5 Litres (© Dany Aubry, 1995) .....	26
FIGURE 3.2: Schéma du bioreacteur HRI de 3 litres.....	27
FIGURE 4.1: Courbes de croissance, évolution du rapport masse humide/masse sèche pour la culture IH11 .....	41
Figure 4.2: Courbes de consommation du glucose, du sodium et du phosphate pour la culture IH11 .....	42
Figure 4.3: Courbes de consommation de l'ammonium, du nitrate et du nitrite pour la culture IH11 .....	44
Figure 4.4: Courbes de consommation du chlore, du magnésium et du sulfate pour la culture IH11 .....	46
Figure 4.5: Courbes de consommation du calcium, du manganèse et du potassium pour la culture IH11 .....	47
Figure 4.6: Taux de respiration et coefficient de transfert d'oxygène pour la culture IH11.....	48
Figure 4.7: Courbes de croissance, évolution du rapport masse humide/masse Pour la culture IH5-1 .....	50
Figure 4.8: Courbes de consommation du glucose, du sodium et du phosphate pour la culture IH5-1.....	52
Figure 4.9: Courbes de consommation de l'ammonium, du nitrate et nitrite pour la culture IH5-1 .....	53
Figure 4.10: Courbes de consommation du chlore, du magnésium et du sulfate pour la culture IH5-1 .....	55
Figure 4.11: Courbes de consommation du calcium, du manganèse et du potassium pour la culture IH5-1 .....	56

Figure 4.12: Taux de respiration et coefficient de transfert d'oxygène pour la culture IH5-1.....	57
Figure 4.13: Courbes de croissance, évolution du rapport masse humide/masse sèche et densité cellulaire pour la culture IH12 .....	59
Figure 4.14: courbes de consommation des hydrates de carbone, du sodium et du phosphate pour la culture IH12.....	60
Figure 4.15: Courbes de consommation de l'ammonium, du nitrate et du nitrite pour la culture IH12.....	62
Figure 4.16: Courbes de consommation du chlore, du magnésium et du sulfate pour la culture IH12 .....	64
Figure 4.17: courbes de consommation du calcium, du manganèse et du potassium pour la culture IH 12 .....	65
Figure 4.18: Courbes de croissance, évolution du rapport masse humide/masse sèche et densité cellulaire pour la culture IH17 .....	68
Figure 4.19: Courbes de consommation du glucose, du sodium et du phosphate pour la culture IH17 .....	70
Figure 4.20: Courbes de consommation de l'ammonium, du nitrate et du nitrite pour la culture IH17.....	72
Figure 4.21: Courbes de consommation du chlore, du magnésium et du sulfate pour la culture IH 17 .....	74
Figure 4.22: Courbes de consommation du calcium, du manganèse et du potassium pour la culture IH 17 .....	75
Figure 4.23: Courbes de croissance, évolution du rapport masse humide/masse sèche et densité cellulaire pour la culture IH18 .....	77
Figure 4.24: Courbes de consommation du glucose, du sodium et du phosphate pour la culture IH18 .....	79
Figure 4.25: Courbes de consommation de l'ammonium, du nitrate et du nitrite pour la culture IH18.....	81

Figure 4.26: Courbes de consommation du chlore, du magnésium et du sulfate pour la culture IH 18 .....	82
Figure 4.27: Courbes de consommation du calcium, du manganèse et du potassium pour la culture IH 18 .....	84
Figure 4.28: Courbes de croissance, évolution du rapport masse humide/masse sèche et densité cellulaire pour la culture IH24 .....	86
Figure 4.29: Courbes de consommation du glucose, du sodium et du phosphate pour la culture IH24 .....	87
Figure 4.30: Courbes de consommation de l'ammonium, du nitrate et du nitrite pour la culture IH 24 .....	90
Figure 4.31: Courbes de consommation du chlore, du magnésium et du sulfate pour la culture IH 24 .....	91
Figure 4.32: Courbes de consommation du calcium, du manganèse et du potassium pour la culture IH 24 .....	92
Figure 4.33: Courbes de croissance, évolution du rapport masse humide/masse sèche et densité cellulaire pour la culture IH25 .....	94
Figure 4.34: Courbes de consommation du glucose, du sodium et du phosphate pour la culture IH25 .....	95
Figure 4.35: Courbes de consommation de l'ammonium, du nitrate et du nitrite pour la culture IH 25 .....	97
Figure 4.36: Courbes de consommation du chlore, du magnésium et du sulfate pour la culture IH 25 .....	98
Figure 4.37: courbes de consommation du calcium, du manganèse et du potassium pour la culture IH 25 .....	99

NOMENCLATURE

a	Aire interfaciale gaz-liquide	$\text{m}^2/\text{m}^3$
Ca	Concentration du calcium extracellulaire	$\text{mM}$
Ca <sub>i</sub>	Concentration du calcium intracellulaire	$\text{mmol} \cdot 10^{-9} \text{cellules}$
CHOt	Concentration totale en hydrate de carbone	$\text{g/L}$
CHOt <sub>i</sub>	Concentration totale en hydrate de carbone Intracellulaire	$\text{g/L}$
Cl	Concentration du chlore extracellulaire	$\text{mM}$
Cl <sub>i</sub>	Concentration du chlore intracellulaire	$\text{mmol} \cdot 10^{-9} \text{cellules}$
CPR	Taux de production de $\text{CO}_2$	$\text{mM.h}^{-1}$
CTR	Taux de transfert de $\text{CO}_2$	$\text{mM.h}^{-1}$
D	Dilution de comte cellulaire	-
DCO <sub>2</sub>	Concentration en $\text{CO}_2$ dissous dans la phase liquide	$\text{mM}$
DO	Concentration en oxygène dissous	$\text{mM}$
DO*	Concentration en oxygène dissous à saturation avec l'air	$\text{mM}$
DO'	Concentration en oxygène dissous corrigée	$\text{mM}$
K	Concentration du potassium extracellulaire	$\text{mM}$

$K_i$	Concentration du potassium intracellulaire	mmol*10 <sup>-9</sup> cellules
$K_L$	Coefficient de transfert d'oxygène	mM
$K_{La}$	Coefficient volumique de transfert d'oxygène	h <sup>-1</sup>
$K_{La_g}$	Coefficient volumique global de transfert d'oxygène	h <sup>-1</sup>
$K_{La_s}$	Coefficient volumique de transfert d'oxygène à la surface	h <sup>-1</sup>
$Mn$	Concentration du manganèse extracellulaire	mM
$Mn_i$	Concentration du manganèse intracellulaire	mmol*10 <sup>-9</sup> cellules
$Mg$	Concentration du magnésium extracellulaire	mM
$Mg_i$	Concentration du magnésium intracellulaire	mmol*10 <sup>-9</sup> cellules
M.H.	Masse humide	g.L <sup>-1</sup>
M.S.	Masse sèche	g.L <sup>-1</sup>
n	Comte cellulaire	Cellules
$Na$	Concentration du sodium extracellulaire	mM
$Na_i$	Concentration du sodium intracellulaire	mmol*10 <sup>-9</sup> cellules
$NH_4$	Concentration de l'ammonium extracellulaire	mM
$NH_{4i}$	Concentration de l'ammonium intracellulaire	mmol*10 <sup>-9</sup> cellules
$NO_3$	Concentration du nitrate extracellulaire	mM

$\text{NO}_{3l}$	Concentration du nitrate intracellulaire	$\text{mmol} \cdot 10^{-9} \text{cellules}$
$\text{NO}_2$	Concentration du nitrite extracellulaire	$\text{mM}$
$\text{NO}_{2l}$	Concentration du nitrite intracellulaire	$\text{mmol} \cdot 10^{-9} \text{cellules}$
OTR	Taux de transfert d'oxygène	$\text{mM.h}^{-1}$
Our	Taux de consommation d'oxygène	$\text{mM.h}^{-1}$
$\text{PO}_4$	Concentration du phosphate extracellulaire	$\text{mM}$
$\text{PO}_{4l}$	Concentration du phosphate intracellulaire	$\text{mmol} \cdot 10^{-9} \text{cellules}$
Pi	Phosphate inorganique	
Q	Débit total des gaz	$\text{L.h}^{-1}$
$\text{SO}_4$	Concentration du sulfate extracellulaire	$\text{mM}$
$\text{SO}_{4l}$	Concentration du sulfate intracellulaire	$\text{mmol} \cdot 10^{-9} \text{cellules}$
$\tau$	Contrainte de cisaillement	$\text{Pa}$
$\eta$	Viscosité apparente	$\text{Pa.S}$

## **CHAPITRE1: INTRODUCTION**

Depuis la nuit des temps l'homme utilise les plantes pour se soigner. Déjà, au V<sup>e</sup> siècle a.v.J-C, Hippocrate conseillait aux femmes de mâcher de l'écorce de saule pour atténuer les douleurs de l'accouchement. En effet, le saule contient des dérivées de l'acide salicylique qui ont des propriétés anti-inflammatoires et analgésiques. Ces substances sont à l'origine de la découverte de l'aspirine à la fin du siècle dernier. De nos jours, on trouve l'écorce de Saule dans diverses tisanes anti-rhumatismales ainsi que dans plusieurs préparations pour le traitement des maux de tête et des douleurs articulaires.

L'aloès est une autre plante utilisée depuis longtemps par les hommes. Les feuilles d'aloès contiennent un gel clair, très efficace pour soigner les blessures et les brûlures. Ce gel accélère la cicatrisation en minimisant les risques d'infection.

### **1.1 L'intérêt commercial des plantes**

L'intérêt commercial des plantes a été reconnu Avec le temps et le développement de différentes techniques en biologie végétale. En effet les plantes produisent plus de 20 000 composés, ce qui représente 4 fois la quantité obtenue par les bactéries. Ces composés sont appelés métabolites secondaires et sont utiles à l'homme. Ils peuvent servir de colorants, de parfums, d'insecticides, d'arôme et surtout de médicaments. Aux États-Unis, plus de 25% des médicaments qui sont prescrits aux patients sont faits à partir de plantes. Chez les plantes, les métabolites secondaires jouent un rôle

important dans leur interaction avec l'environnement. Par exemple, la défense contre les animaux et les insectes.

Le tableau 1.1 donne une liste de produits qui proviennent des plantes et qui ont un intérêt commercial.

Tableau 1.1 : Produits d'intérêt commercial provenant des plantes (Scragg, 1995)

Produit	Application	source	Prix \$/kg
Ajmalicine	Anti-hypertension	<i>Catharanthus</i>	37000
Berberine	Drogue	<i>Cotis japonica</i>	3250
Artemisinin	Anti-malaria	<i>Artemesia annua</i>	n/a
Castanospermine	Inhibiteur de glycosidase	<i>Castanospermum austral</i>	n/a
Codéine	Sédative	<i>Papaver somniferum</i>	17000
Digoxin	Stimule le cœur	<i>Digitalis lanata</i>	3000
Diosgenin	Stéroïde	<i>Dioscorea deltoidea</i>	1000
Jasmin	Parfum	<i>Jasminum spp</i>	350
Morphine	Drogue	<i>Papaver somniferum</i>	340000
Quinine	Anti-malaria	<i>Cinchona ledgeriana</i>	500
Sanguinarine	Antibiotique	<i>Papaver somniferum</i>	4800
Shikonin	Anti-bactérien	<i>Lithospermum rythrorhizon</i>	4500
Taxol	Anti-cancer	<i>Taxus brevifolia</i>	0.6m
Vanille	Arôme	<i>Vanilla planifolia</i>	1000
Vincristine	Anti-leucémie	<i>Catharanthus roseus</i>	20m
Vinblastine			

La culture de cellules de plantes devient une option intéressante lorsque la plante est difficile à cultiver, a une longue période de culture, a un rendement faible en métabolites secondaires ou que la synthèse chimique de ces métabolites est problématique. La culture de cellules végétales offre plusieurs avantages : elle n'est pas dépendante des conditions environnementales, écologiques et climatiques, la prolifération des cellules est plus rapide en culture que dans la nature (Zhong et al, 1995).

Prenons l'exemple du taxol qui est utilisé dans le traitement du cancer et qui représente un candidat potentiel pour la culture de cellules de plantes à grande échelle. Le taxol était obtenu à partir de l'arbre *Taxus brevifolia* qui pousse au Nord-Ouest du pacifique. Pour obtenir 1 kg de taxol il faut abattre plus de 1000 arbres centenaires. La synthèse chimique du taxol a été rapportée par Holton et al. (1994) et Nicolaou et al. (1994). Cependant, cette synthèse n'est pas économiquement intéressante à grande échelle. Pour produire le taxol, Bristol-Myers Squibb emploie un procédé semi synthétique (utilisation des précurseurs du taxane extraits des arbres).

## 1.2 Problématique

Malgré le potentiel énorme de la culture de cellules de plantes, il existe seulement quelques procédés à l'échelle industrielle. Ces procédés, incluent la production de shikonin par *Lithospermum erythrorhizon* (Fujita, 1988), berberine par *Coptis japonica* (fujita et Tabata, 1987) et ginsenosides par *Panax ginseng* (Ushiyama, 1991). La commercialisation limitée de la technologie est attribuée à des raisons économiques qui elles sont reliées à

des facteurs biologiques et d'ingénierie. Parmi ces facteurs les plus importants sont : le temps d'opération et le rendement.

### **1.2.1 Le temps d'opération**

Le temps d'opération d'un bioréacteur est le temps nécessaire pour le lavage et la stérilisation du bioréacteur, la phase de latence, la phase de croissance des cellules et la phase de production. Les cellules de plantes ont une croissance très lente. Ceci implique un temps d'opération se situant entre 15 et 30 jours. C'est beaucoup plus long que les procédés bactériens, ce qui influence le nombre de cultures effectuées par année.

### **1.2.2 Le rendement**

La culture de cellules végétales à l'échelle industrielle est possible lorsque le coût du produit est d'au moins 400-1500 \$/kg avec un rendement de 0.3-3 g/L en bioréacteur (Verpoort, et al. 1991, Verpoort, et al. 1993).

Le tableau 1.2 donne une idée sur les rendements obtenus. La plupart des produits qui ont un intérêt commercial ont un prix deux fois supérieur à celui cité ci haut. Cependant leur rendement est très faible. Pour augmenter le rendement en métabolites, plusieurs stratégies ont été utilisées. La première est la sélection de lignées cellulaire qui ont un rendement élevé et l'optimisation du milieu de culture. La seconde approche est l'utilisation d'éliciteurs. Il existe plusieurs types d'éliciteurs dont les composés relâchés par les microbes et qui sont reconnus par les cellules de plantes, les composants de la paroi cellulaire des plantes qui sont relâchés sous l'action

d'enzymes microbiens, les composés endogènes formés et relâchés par les plantes en réponse à différents stimuli comme l'attaque d'agents pathogènes. Aujourd'hui beaucoup de chercheurs ont recours à l'ingénierie métabolique pour augmenter le rendement en métabolites secondaires. Plusieurs possibilités sont envisagées :

- Induire l'expression de gènes régulateurs
- Bloquer les voies métaboliques compétitives
- Bloquer les voies cataboliques

Tableau 1.2. Rendement en métabolites secondaires chez certaines plantes

Produit	Source	Rendement (% m.s)
Acide rosmarinique	<i>Salvia officinalis</i>	36.0 Hippolyte et al. (1992)
Acide rosmarinique	<i>Coleus blumei</i>	21.4 Ulbrich et al. (1985)
Anthraquinone	<i>Morinda citrifolia</i>	18.0 Zenk et al (1985)
Shikonine	<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	12.4 Fujita (1988)
Berbérine	<i>Thalictrum minus</i>	10.6 Kobayashi et al. (1988)
Jatrhorhizine	<i>Berberis wilsonae</i>	10.0 Breuling et al.(1985)
Anthocyanes	<i>Perilla frutescens</i>	8.9 Zhong et al. (1994)
Berberine	<i>Coptis Japonica</i>	7.5 Matsubara et al. (1989)
Disgenin	<i>Dioscorea deltoidea</i>	3.8 Sahai & Knuth (1985)
Serpentine	<i>Catharanthus roseus</i>	2.2 Zenk et al. (1977)

### **1.3 Objectif**

L'objectif principal de ce projet de recherche est le suivi et le contrôle manuel de la concentration du phosphate intracellulaire.

Pour optimiser la croissance cellulaire, il est important que les cellules ne subissent pas de limitations nutritionnelles. Dans le cas du phosphate, il est rapidement absorbé par les cellules pour être ensuite utilisé par elles et emmagasiné dans la vacuole. Pour éviter une limitation de ce nutriment, il est important de suivre l'évolution du phosphate intracellulaire et de contrôler sa concentration.

Le premier objectif est d'effectuer des cultures en cuvée alimentée en faisant le suivi du phosphate intracellulaire. Après le suivi de la concentration du phosphate intracellulaire, l'objectif suivant sera le contrôle manuel du phosphate intracellulaire à différentes concentrations.

## CHAPITRE2: REVUE DE LITTERATURE

### 2.1 La culture des cellules végétales

Un des moyens d'augmenter la productivité est d'augmenter la croissance cellulaire en biomasse sèche et en concentration cellulaire.

Les cellules de plantes contiennent une grande quantité d'eau (80-90%), ce qui donne une biomasse sèche théorique maximum se situant entre 100-200 g.L<sup>-1</sup> (Scragg, 1995). Cependant, toutes les cellules n'ont pas une forme sphérique. En pratique, ceci donne des valeurs de biomasse sèche entre 35-65 g.L<sup>-1</sup> (Matsubara et al. 1989; Lipsky 1992; Tanaka 1982). Fujita (1989) rapporte avoir obtenu une biomasse sèche de 70 g.L<sup>-1</sup> avec *Coptis japonica*. Coelho (2000) a obtenu une biomasse sèche de 20 g.L<sup>-1</sup> avec des cellules d'*Eschscholtzia californica* cultivées dans un bioréacteur HRI de 5L.

Cependant pour bien décrire la croissance cellulaire, il est important d'effectuer des comptes cellulaires. D'après Pépin (1996) le compte cellulaire décrit mieux la croissance que la biomasse. Sirois (1997) lors d'une culture d'*Eschscholtzia californica* effectuée dans un bioréacteur de type HRI opéré en cuvé alimentée a obtenu une concentration cellulaire de  $20,0 \times 10^9 \text{ c.L}^{-1}$ . Coelho (2000) a obtenu la même concentration cellulaire avec cette espèce dans un bioréacteur de type HRI opéré en mode cuvé alimentée.

## 2.2 Nutrition des Cellules végétales

### 2.2.1 Le phosphate

Le phosphate est l'un des nutriments les plus importants pour les cellules végétales. En effet, le phosphate est nécessaire pour la biosynthèse des acides nucléiques, des phospholipides, des nucléotides et des sucres phosphatés (Ashira, H et Ukaji, T, 1986). Il joue aussi un rôle essentiel dans le métabolisme de l'énergie sous forme d'ATP, d'ADP, d'AMP et de pyrophosphate.

Le phosphate contenu dans les organismes vivants provient à l'origine des molécules de phosphate qui sont absorbées par les plantes à partir du sol. Cependant, la concentration du phosphate dans le sol est très faible, elle est inférieure à 10 µM (Marschner, 1995; Schachtman et al., 1998). Les plantes doivent prendre une grande quantité de phosphate à partir d'un sol pauvre en ce nutriment. Pour cela elles maintiennent un haut niveau d'activité pour absorber le phosphate nécessaire à leur croissance.

### 2.2.2 Mesure du phosphate intracellulaire

Les cellules de plantes sont constituées d'un ou de plusieurs noyaux, de mitochondrie, de chloroplastes, d'appareil de Golgi, de cytoplasme, de vacuole, etc. Jusqu'à ce jour, on ne connaît pas la quantité de phosphate dans tous ces compartiments. La plupart des recherches sur le phosphate intracellulaire sont concentrées sur le phosphate contenu dans la vacuole, le cytoplasme et les plastides. Dans la cellule, le phosphate existe sous deux formes : comme ion inorganique et comme dérivé organique.

Le phosphate intracellulaire a été mesuré à l'aide de plusieurs techniques dont la résonnance magnétique nucléaire (RMN) (Lee et Ratcliffe, 1983; Rebeille et al, 1983; Roberts, 1984, Gmati et al, 2005). Il y a eu aussi dans certains cas, extraction mécanique de la vacuole du reste de la cellule. Il y a une grande différence entre les nombreuses estimations du phosphate intracellulaire. L'écart entre les différentes estimations peut aller de quelques mM jusqu'à 20 mM (Mimura, 1999). Les méthodes de mesure de phosphate impliquant une extraction mécanique ont tendance à surestimer le niveau de phosphate dans les cellules. Lors de l'extraction, du phosphate d'origine organique peut être relâché sous l'action d'enzymes (Mimura, 1999). De l'autre côté, le RMN peut détecter seulement la forme active du phosphate dans la cellule, la forme inactive comme le phosphate contenu dans les sels précipités ne peut pas être détectée. La concentration du phosphate inorganique (Pi) dans le cytoplasme a été estimée approximativement à 15mM (Mimura et Kirino, 1984; Takeshige et al.1992). Cette valeur est peut être surestimé en raison de la quantité de phosphate qui a pu être relâché de

la fraction organique lors de l'extraction mécanique. En 1999 Mimura donne une nouvelle estimation du phosphate cytoplasmique et qui est de 10 mM.

La concentration du Pi dans la vacuole et le cytoplasme des cellules *Acer pseudoplatanus* a été estimée en utilisant la résonance magnétique nucléaire (Rebeille et al, 1983). Les cellules *Acer pseudoplatanus* contiennent approximativement 2mM de Pi. La concentration du Pi est de 6mM dans le cytoplasme ce qui correspond à  $1\mu\text{mol/g M.H}$  et de 1.5 mM dans la vacuole ce qui correspond à  $2.3\mu\text{mol/g M.H}$ .

Des cellules appartenant à l'espèce *Catharanthus roseus* étaient cultivées dans du milieu MS (Murashige and Skooge, Annexe A.2.3) à différentes concentrations cellulaires initiales:  $4 \times 10^{+5} \text{ }\phi.\text{ml}^{-1}$ ,  $2 \times 10^{+5} \text{ }\phi.\text{ml}^{-1}$ ,  $1 \times 10^{+5} \text{ }\phi.\text{ml}^{-1}$  et  $0.5 \times 10^{+5} \text{ }\phi.\text{ml}^{-1}$  et à différentes concentrations initiales en phosphate: 1.25 mM, 2.5 mM, 5 mM et 10 mM (Sakano et al, 1995). Le phosphate intracellulaire était mesuré en utilisant la technique du RMN (Résonance magnétique nucléaire).

Dans le cas des cellules cultivées à une concentration cellulaire initiale de  $4 \times 10^{+5} \text{ }\phi.\text{ml}^{-1}$  et une concentration initiale de phosphate de 1.25 mM; le phosphate est absorbé à un taux de  $20 \text{ }\mu\text{mol.g}^{-1} \text{ M.H.h}^{-1}$ . Le phosphate intracellulaire augmente de 1 à  $31 \text{ }\mu\text{mol.g}^{-1} \text{ M.H.}$  pendant les premières deux heures et demeure à cette concentration.

Les cellules cultivées à une concentration cellulaire initiale de  $1 \times 10^{+5} \text{ c.ml}^{-1}$  et une concentration initiale de phosphate de 1.25 mM absorbent le phosphate à un taux de  $21 \mu\text{mol.g}^{-1} \text{ M.H. h}^{-1}$  pendant environ 6 h. Dépassé 6 heures le taux d'absorption diminue jusqu'à atteindre zéro ensuite il y a largage du phosphate dans le milieu de culture. Le taux d'accumulation du phosphate dans la cellule est d'environ  $16 \mu\text{mol.g}^{-1} \text{ M.H. h}^{-1}$ . Le phosphate est accumulé jusqu'à une concentration maximale de  $117 \mu\text{mol.g}^{-1} \text{ M.H.}$  Cette concentration baisse à  $105 \mu\text{mol.g}^{-1} \text{ M.H.}$  suite au largage du phosphate dans le milieu de culture.

Les cellules cultivées à une concentration initiale de  $4 \times 10^{+5} \text{ c.ml}^{-1}$  et une concentration initiale en phosphate de 5mM absorbent le phosphate à un taux d'environ  $22 \mu\text{mol.g}^{-1} \text{ M.H. h}^{-1}$  pendant 9h ensuite ce taux baisse jusqu'à atteindre le zéro. Après avoir absorbé le phosphate les cellules en relâchent une partie. Le taux d'accumulation du phosphate est de  $12 \mu\text{mol.g}^{-1} \text{ M.H. h}^{-1}$ . Le phosphate est accumulé jusqu'à une concentration maximale de  $105 \mu\text{mol.g}^{-1} \text{ M.H.}$ .

En utilisant la technique du RMN, Gmati (2005) a mesuré le phosphate intracellulaire contenu dans la vacuole et le cytoplasme des cellules *Eschscholtzia californica* cultivées en flacons dans du milieu B5. Les mesures ont été effectuées après 4h, 1jour, 5jours et 10jours de culture. Les concentrations de phosphate étaient de 0.13, 0.22, 0.016 et 0.015 mmol/g M.S après 4h, 1 jour, 5 jours et 10 jours de culture respectivement.

### 2.2.3 Transport du phosphate et sa distribution dans la cellule

Le transport du phosphate par les cellules de plantes exige une dépense énergétique de leur part puisqu'il est effectué contre un gradient électrique et un gradient de concentration (Mimura, 1999). A` pH neutre, le phosphate est porteur d'une ou de deux charges négatives alors que le potentiel négatif du cytoplasme est entre -150 et -200 mv. De plus, la concentration du phosphate dans le cytoplasme est d'environ 10 mM, alors qu'elle est dans le milieu externe aussi basse que 1 µM.

Par hypothèse, le phosphate est transporté à travers la membrane plasmique avec un H<sup>+</sup>. Lorsque, le phosphate est absorbé par les cellules, le pH extracellulaire augmente. Sakano (1990) a montré une augmentation linéaire du pH du milieu de culture de *Catharanthus roseus* lors de l'ajout de Pi, tandis que le pH cytoplasmique diminue (Ullrich et Novaky, 1990; Mimura et al. 1992; Sakano et al. 1992). Après l'épuisement du phosphate extracellulaire, le pH extracellulaire et le pH intracellulaire reviennent à leur valeur initiale (Sakano et al., 1992). L'accumulation du Pi est généralement associée à la dépolarisation de la membrane. Ullrich-Eberius et al. (1981) ont démontré la dépolarisation de la membrane chez *Lemna gibba*. Récemment, on a découvert que le Pi est cotransporté avec le Na<sup>+</sup> au lieu du H+ chez des cellules *Chara* limitées en phosphate (Reid et al., 1997). Chez *Chara*, il a été démontré que le transport du phosphate est dépendant du Na<sup>+</sup> et que le transport du Na<sup>+</sup> est dépendant du phosphate. La question qui se pose après la découverte de Reid est la suivante : Est-ce que le transport du phosphate est dépendant du Na<sup>+</sup> seulement chez Chara ? Est-il dépendant du Na<sup>+</sup> chez les autres espèces telles que *Catharanthus roseus* et *Lemna gibba*.

Le Pi qui est transporté au cytoplasme à travers la membrane plasmique est partiellement métabolisé. Une grande partie de ce Pi est ensuite transportée à travers les tonoplastes pour être emmagasinée dans la vacuole qui occupe 80% du volume de la cellule (Bielecki et Laties, 1963). Le Pi qui est emmagasiné dans la vacuole constitue une réserve pour alimenter le cytoplasme lorsqu'il y a baisse du Pi extracellulaire (Mimura, 1999). La fonction la plus importante de la vacuole est d'emmageriner l'excédant de Pi et fournir du Pi au cytoplasme en cas de limitation nutritionnelle. Les mesures au RMN ont montré qu'en cas de limitation en Pi, la vacuole agit comme un réservoir de Pi pour maintenir le Pi cytoplasmique constant (Rebeille et al., 1982, 1983; Lee et Ratcliffe, 1983; Lee et al., 1990).

Chez l'espèce *Acer pseudoplatanus* cultivée en suspension, lorsque le Pi est épuisé du milieu extracellulaire, la concentration du Pi dans la vacuole diminue durant 50h jusqu'à ce qu'elle égalise la concentration du Pi dans le cytoplasme (Rebeille et al., 1983). Lorsque le Pi est ajouté au milieu de culture, la concentration du Pi dans le cytoplasme augmente en 2h et ensuite elle augmente graduellement dans la vacuole. Smith (1966) a montré que du phosphate radio actif ajouté au milieu de culture apparaît d'abord dans le cytoplasme et ensuite dans la vacuole. Le niveau de radioactivité dans le cytoplasme augmente durant les premières heures, tandis que dans la vacuole il continue à augmenter pendant plus de 10h. Chez des cellules d'orge, les vacuoles des protoplastes étaient isolées toutes les 30 minutes après l'addition du  $^{32}\text{Pi}$  pour mesurer la radioactivité (Mimura et al., 1990). Le  $^{32}\text{Pi}$  est détecté au niveau de la vacuole au bout de 30 minutes chez les cellules limitées en Pi, cependant il a fallu plus d'une heure pour que le  $^{32}\text{Pi}$  apparaisse dans la vacuole chez les cellules riches en Pi. La vitesse

d'absorption du Pi chez les cellules déficientes en Pi est plus élevée que celle des cellules riches en Pi.

L'augmentation de la vitesse d'absorption du Pi est observée qu'en présence d'ATP. En absence d'ATP, L'influx vers la vacuole était le même pour les cellules limitées et les cellules riches en phosphate. Ces expériences ont montré que le transport du Pi vers la vacuole dépend de l'énergie cellulaire et que l'influx du Pi vers les vacuoles chez les cellules riches en Pi peut être très long.

Chez les cellules déficientes en Pi, la présence d'ATP extra vacuolaire accélère l'influx de Pi (Mimura et al., 1990). Bligny et al.(1997) en utilisant le  $^{31}\text{P}$ -RMN ont mesuré l'effet de l'anoxie sur les cellules. Ils ont remarqué que chez les cellules qui sont exposées à de faibles concentrations en oxygène, le niveau d'ATP baisse et le Pi quitte la vacuole vers le cytoplasme. Lorsque les cellules sont cultivées à une concentration élevée d'oxygène, le Pi dans le cytoplasme retourne dans la vacuole. Ils suggèrent que l'ATP joue un rôle important dans l'absorption du phosphate et pour le maintenir dans la vacuole.

Bielecki et Laties (1963) ont montré avec les radio-isotopes que le phosphate dans les cellules existe sous une forme active et sous une forme inactive. Le phosphate actif se trouve dans le cytoplasme alors que le phosphate inactif se retrouve dans la vacuole.

Toutes les expériences qui ont mesuré l'influx du Pi vers la vacuole et vers le cytoplasme ont montré que le Pi est accumulé premièrement dans le cytoplasme et ensuite dans la vacuole.

Mimura et al (1992,1996) ont mesuré le phosphate intracellulaire durant la croissance de l'orge. Ces mesures ont montré que la concentration du Pi dans le cytoplasme est toujours constante et qu'elle est indépendante de la concentration du Pi dans le milieu extracellulaire. Pour ce qui est de la concentration du Pi dans la vacuole, elle change pour garder constante la concentration du Pi dans le cytoplasme. Lorsque le Pi contenu dans la vacuole est épuisé, la concentration du Pi cytoplasmique se met à baisser (Lee et Ratcliffe;1983,1993).

Lorsque les cellules augmentent en volume ou se divisent pour donner deux cellules filles, le Pi cytoplasmique est dilué puisqu'il est utilisé pour construire la structure des nouvelles cellules. Pour compenser le Pi utilisé, le cytoplasme est alimenté en Pi à partir du milieu extracellulaire et de la vacuole (Mimura, 1999).

Chez les cellules *Acer pseudoplatanus* cultivées en suspension, une limitation en sucre induit une large accumulation du Pi dans la vacuole accompagnée d'une augmentation de la concentration du phosphate cytoplasmique (Rebeille et al., 1985). Ce phénomène est dû à la dégradation du phosphate organique.

L'épuisement du phosphate intracellulaire provoque des changements au niveau de différents procédés, comme l'activation de la consommation de phosphate, l'induction de la phosphatase et de la RNase.

Pour ce qui est de l'efflux du Pi, il se produit à trois endroits. L'efflux au niveau de la paroi cellulaire, l'efflux du cytoplasme à travers la membrane plasmique et l'efflux de la vacuole à travers les tonoplastes (Lefebvre et Clarkson, 1984; Woodrow et al, 1984).

Mc Pharlin et Bieleski (1989) ont rapporté que chez les plantes *Spirodela* et *Lemna* l'efflux du Pi égalait 10% l'influx à concentration modérée; lorsque les plantes étaient limitées en Pi, l'efflux du Pi égalait 1% l'influx. À faible concentration en Pi, l'influx est égal à l'efflux. Ce point s'appelle le point d'équilibre.

Une température basse et les inhibiteurs métaboliques comme le  $\text{NaN}_3$  et le KCN augmentent l'efflux du Pi (Mimura, 1999). Ceci cause la dépolarisation de la membrane. Cependant la dépolarisation de la membrane est supposée augmenter l'influx du Pi. Les raisons pour lesquelles les inhibiteurs métaboliques augmentent l'efflux de Pi ne sont toujours pas connues.

McPharlin et Bieleski (1989) ont observé que l'efflux et l'influx du Pi augmentent avec l'augmentation de la concentration du Pi extracellulaire.

L'efflux du Pi augmente rapidement chez les cellules *Chara* après l'addition du Pi au milieu extracellulaire (Mimura et al., 1998). L'efflux du Pi à partir de vacuoles isolées a été investigué (Martinoia et al., 1986). L'incubation des vacuoles d'orge en milieu ne contenant pas de Pi n'a pas résulté à la libération du Pi des vacuoles. Les autres ions tels que  $\text{Cl}^-$  et le  $\text{NO}_3^-$  ont été relâchés. Ces résultats sont consistants avec le fait que l'efflux du Pi à partir de la vacuole est un phénomène long.

#### 2.2.4 Régulation du transport de phosphate

Le transport des nutriments à l'intérieur de la cellule change en fonction du statut nutritionnel du nutriment et des différents facteurs environnementaux. Le contrôle du transport des nutriments peut être divisé en contrôle à long terme et à court terme. Le contrôle à court terme se produit de quelques minutes à plusieurs heures. Le contrôle à long terme est observé durant plusieurs jours à plusieurs semaines.

Le contrôle à court terme est causé par les changements des conditions extracellulaires. Le changement de température est une des conditions extracellulaires qui cause ce genre de contrôle. McPharlin et Bielecki (1989) ont montré qu'une baisse de température entre 50 et 25°C, baisse la consommation de Pi. Une basse température cause inévitablement une baisse du métabolisme et une baisse dans l'activité de la pompe à protons. Ceci explique en partie la baisse de consommation du phosphate. Le phosphate intracellulaire influence aussi la consommation du phosphate à court terme. La consommation du Pi diminue une heure après l'addition du phosphate dans le milieu de culture (Lefebvre et Glass, 1982). Comme ce temps est court pour changer la concentration du Pi cytoplasmique, ceux-ci pensent que le Pi qui est transporté du milieu de culture vers le cytoplasme affecte les transporteurs de la membrane plasmique.

Le contrôle à long terme est causé par la limitation des plantes en Pi. Lorsque les plantes sont limitées en Pi, le taux de consommation de ce nutriment augmente drastiquement (Mimura, 1999). Dans les cas les plus rapides, cette

augmentation se produit en une journée. En général, ceci se produit après deux ou trois jours (Mimura, 1999). Les analyses cinétiques, montrent que le  $K_m$  et le  $V_{max}$  changent durant une limitation ou un sevrage en Pi. Burns et Beever (1977) en utilisant *Neurospora crassa* ont montré que le  $K_m$  diminue de 0.9 à 0.3 mM lorsque le Pi extracellulaire augmente de 0.05 à 10mM.

Le contrôle à long terme est aussi causé par la croissance et la différentiation des cellules. Clarkson and Saker (1988) ont conclu qu'à faibles concentrations en Pi (les conditions normales dans la nature), la croissance et la consommation du Pi sont constantes à différentes concentrations de Pi extracellulaire. Les plantes semblent contrôler leur consommation de Pi pour garder le taux de croissance constant, indépendamment de la concentration du Pi extracellulaire.

### **2.2.5 Effets du phosphate sur la croissance cellulaire et la production de métabolites secondaires**

Le phosphate est connu pour inhiber la production d'alcaloïdes (Dougall et al, 1980, Knobloch, 1981). Les concentrations du phosphate intracellulaire et du phosphate extracellulaire ont été reliées au rendement en caféine chez des cellules de *Coffea arabica* cultivées en suspension dans du milieu Murashige et Skoog (Bramble et Graves, 1991). Les résultats montrent qu'il y a une relation inverse entre le rendement en caféine et la concentration intracellulaire du phosphate. Les résultats montrent aussi une relation directe entre la concentration initiale du phosphate dans le milieu de culture et la croissance des cellules. La croissance cellulaire en masse sèche est de 14 g/L lorsque la concentration initiale en phosphate est de 0.0 mM alors

qu'elle augmente à 21.5g/L lorsque la concentration initiale en phosphate est de 1.15 mM.

Les cellules qui ont été exposées à de faibles concentrations en phosphate produisent de grandes quantités de théobromine et de caféine. A une concentration initiale de 0.0 mM, le rendement en caféine était de 0.65mg/gM.S, à une concentration initiale de 1.25 mM le rendement en caféine était de 0.29 mg/gM.S. Le rendement en caféine est à peine de 0.1 mg/g M.S lorsque la concentration initiale en phosphate est de 1.5 mM.

L'effet du phosphate sur la croissance et la production de métabolites secondaires a été étudié chez les cellules de *Panax ginseng* et *Panax quinquefolium* (Liu et Zhong, 1997). Les cellules de *Panax ginseng* ont été cultivées dans du milieu MS (Murashige et Skoog) à différentes concentrations de phosphate allant de 0 à 4.17mM. Liu et Zhong ont constaté une augmentation de la biomasse sèche avec l'augmentation de la concentration initiale en phosphate. En effet, à une concentration initiale en Pi de 0mM, la croissance en biomasse sèche était de 6.95 g/L, alors qu'elle était de 10.9 g/L lorsque la concentration initiale en Pi était de 0.42 mM. Pour des concentrations initiales en Pi allant de 0.42 à 4.17 mM, la croissance en biomasse sèche avait atteint un plateau. Les cellules cultivées à de faibles concentrations en Pi (inférieure à 1.04 mM) ont atteint le maximum en biomasse 5 jours plus tard comparées à celle qui étaient cultivées à une concentration initiale en Pi allant de 1.04 a 4.17 mM. Pour les cellules de *Panax ginseng*, il était clair que la croissance était limitée lorsque la concentration initiale de Pi était inférieure à 1.04 mM. La concentration critique pour cette espèce était de 1.04 mM.

Le phosphate intracellulaire augmentait chez les cellules de *Panax ginseng* jusqu'au 8<sup>ème</sup> jour, après le huitième jour le phosphate intracellulaire se mettait à baisser. Lorsque le Pi était devenu limitant, le phosphate intracellulaire a baissé à une valeur constante de 4 mg P/g M.S. Ceci suggère que le phosphate lié chez *Panax ginseng* est d'environ 4 mg P/g M.S. La production optimale de ginseng saponin ( $21.4 \text{ mg.L}^{-1}.\text{J}^{-1}$ ) a été obtenue avec une concentration initiale en phosphate de 1.04 mM. La production optimale en polysaccharide ( $51.76 \text{ mg.L}^{-1}.\text{J}^{-1}$ ) a été obtenue avec une concentration initiale en phosphate de 0.42 mM.

Dans le cas de *Panax quinquefolium*, la concentration initiale critique du Pi est de 0.65 mM. A cette concentration la croissance en biomasse sèche avait atteint  $11.6\text{g.L}^{-1}$ . Dépassé cette concentration et jusqu'à une concentration de 1.88mM, la croissance avait atteint un plateau. En dessus de cette concentration la croissance en biomasse sèche était faible. Elle correspondait à 5g/L pour une concentration initiale en Pi de 0mM.

La production maximale de saponin ( $22.05 \text{ mg.L}^{-1}.\text{J}^{-1}$ ) et la production maximale de polysaccharides ( $41.8 \text{ mg.L}^{-1}.\text{J}^{-1}$ ) ont été obtenues avec un Pi de 1.25 mM.

Des cellules de *Panax notoginsen* ont été cultivées en flacons dans du milieu MS à différentes concentrations de Pi (0, 0.5, 1.25 et 2mM) pour étudier l'effet du Pi sur la croissance cellulaire et la production de ginsenoside saponin (Zhong et Zhu, 1994). La biomasse sèche augmentait avec l'augmentation de la concentration initiale en phosphate entre 0 et 1.25 mM. A une concentration

initiale en Pi de 0mM la biomasse sèche était de 2g/L alors qu'elle était de 10.5 g/L pour une concentration initiale en Pi de 1.25mM. L'augmentation du Pi de 1.25 à 2 mM a fait augmenter la biomasse sèche de 0.5g/L. La croissance cellulaire était calculée selon l'équation suivante :

$$\text{Croissance.cellulaire} = \frac{\text{biomasse.sec he.finale} - \text{biomasse.sec he.initiale}}{\text{biomasse.sec he.initiale} \times \text{temps}}$$

La croissance était de 0.076, 0.176, 0.276, et 0.298 ( $\text{J}^{-1}$ ) à des concentrations initiales de Pi de 0.00, 0.50, 1.25 et 2.00 mM respectivement (Zhong et Zhu, 1994). La croissance des cellules se poursuivait après la disparition du phosphate du milieu de culture. Ceci indique que les cellules utilisaient leurs réserves en phosphate pour continuer à croître. La concentration optimale en Pi pour la croissance des cellules et la production de ginsenoside saponin était de 1.25mM. A cette concentration la croissance des cellules était de 10.5  $\text{gL}^{-1}$  et la production de ginsenoside saponin était de  $45.5 \text{ mgL}^{-1}\text{J}^{-1}$ .

## CHAPITRE3: METHODOLOGIE

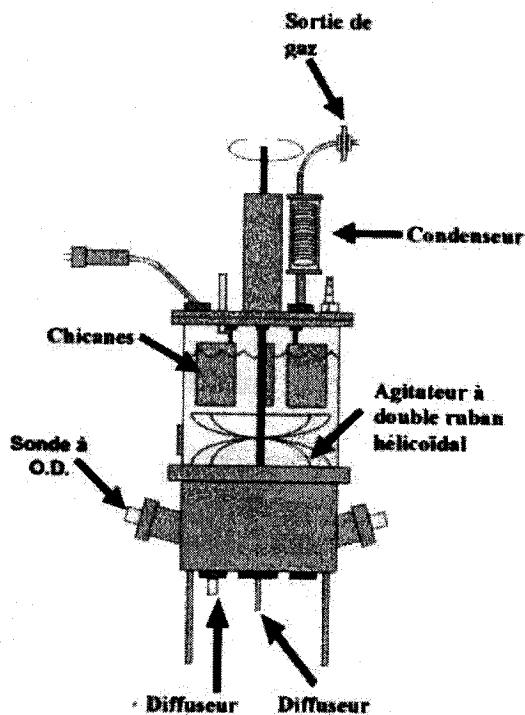
### 3.1 Lignée cellulaire et maintien

La lignée cellulaire utilisée dans le cadre de ce projet appartient à l'espèce *Eschscholtzia californica*. Cette espèce a été développée par le Dr. R. Williams de Phytobiotech. Cette lignée cellulaire était maintenue en milieu 1,5\*B5 (Annexe A.2). Le milieu 1,5\*B5 est du milieu B5 dont la concentration de chaque composant a été multipliée par un facteur de 1,5. A ce milieu était ajouté  $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$  d'acide 2-4 dichlorophenoxyacétique,  $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$  de Kinétine et  $30 \text{ g.L}^{-1}$  de glucose. Le pH du milieu était ajusté à 5,5 avant la stérilisation (20 minutes à  $121^{\circ}\text{C}$  et 1 bar de pression). Les cellules étaient cultivées dans des flacons de 500 ml contenant 80 ml de suspension cellulaire et 160 ml de milieu. Les cellules étaient transférées dans du nouveau milieu à toutes les semaines. Les suspensions sont agitées à 120 rpm à la lumière et à une température de  $25^{\circ}\text{C}$ .

## 3.2 Cultures en bioréacteurs

### 3.2.1 Description du bioréacteur de 5L à double ruban hélicoïdal

Un bioréacteur à double ruban hélicoïdal (HRI, *Helical Ribbon Impeller*) d'un volume nominal de 5L (Figure 4.1) a été utilisé dans le cadre de ces travaux. La configuration de la double hélice et des chicanes de surface a été déterminée à partir du bioréacteur original de 11 L conçu par Jolicoeur et al (1992). Le bioréacteur était équipé d'une sonde polagraphique (Ingold) pour mesurer l'oxygène dissous dans le milieu de culture. La puissance d'agitation était assurée par un moteur de 0,5 hp à vitesse réglable. Un diffuseur en acier inoxydable situé au centre du bioréacteur permettait l'aération par bullage. Le bioréacteur avait des ports d'échantillonnage, d'inoculation et d'alimentation en nutriments. Le bioréacteur était connecté à un système d'acquisition de données et de contrôle (Bioexpert inc., Québec, Canada).

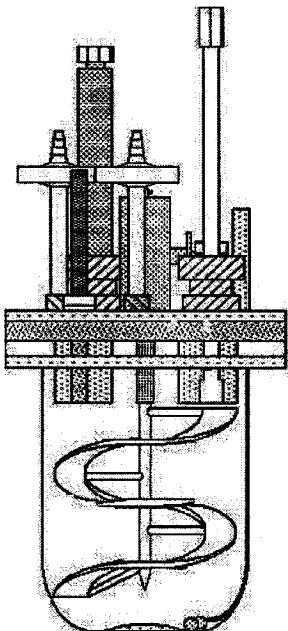


**FIGURE 3.1: Schéma du bioréacteur HRI de 5 Litres (© Dany Aubry, 1995)**

### 3.2.2 Description du bioréacteur de 3L à simple ruban hélicoïdal

Un bioréacteur d'un volume nominal de 3L a été utilisé dans le cadre de ces travaux (Figure 4.2). Ce bioréacteur était munis d'une sonde polagraphique pour le suivi en ligne de la concentration d'oxygène dissout (DO). La paroi du bioréacteur était en verre. Le bioréacteurs était scellé avec un couvercle en acier inoxydable. Les cultures étaient agitées à l'aide d'une hélice à simple ruban hélicoïdal. Cette hélice était actionnée à l'aide d'un moteur à vitesse variable. Un diffuseur en acier inoxydable situé sous les pales de l'hélice permettait l'aération par bullage du bioréacteur. Le bioréacteur avait des ports d'échantillonnage, d'inoculation et d'alimentation en nutriments. Le bioréacteur

était connecté à un système d'acquisition de données et de contrôle (Bioexpert inc., Québec, Canada).



**FIGURE 3.2: Schéma du bioreacteur HRI de 3 litres**

### **3.2.3 Préparation des cultures et inoculation des bioréacteurs**

Avant l'inoculation les bioréacteurs étaient montés et soumis à un test de bullage et un test de pression. Une fois les tests effectués, les bioréacteurs étaient stérilisés (1h, 121<sup>0</sup>C, 1bar). Le milieu de culture utilisé était du B5 (annexe A.2) avec assez de glucose, d'ammonium, de nitrate et de phosphate pour soutenir la croissance cellulaire pendant 24h selon le modèle développé par Sirois (1997). Le milieu de culture était stérilisé (20 minutes, 121<sup>0</sup>C ,1 bar).

L'inoculation suivait la stérilisation. Cette opération s'effectuait sous la hôte stérile à courant laminaire à cause de la nécessité de maintenir les cellules dans un environnement stérile. La suspension cellulaire et le milieu de culture étaient versés dans le bioréacteur par le port d'inoculation. La suspension cellulaire représentait le 1/3 du volume total contenu dans le bioréacteur. Le condenseur était ensuite connecté au port d'échantillonnage. Finalement le bioréacteur était installé sur le comptoir pour être connecté au système des gaz, d'eau et de contrôle et d'acquisition de données.

### **3.2.4 Conditions d'opération**

La vitesse d'agitation dans le bioréacteur de 5 L était de 60 rpm. Ceci correspond à un temps de mélange d'environ 20 s et un taux de cisaillement de  $30\text{ s}^{-1}$  (Aubry, 1995). La vitesse d'agitation était la même dans le bioréacteur de 3L. La concentration en oxygène dissous est maintenu à 60% de la saturation grâce à un système de contrôle de l'alimentation en air et en oxygène par variation de la pression partielle en oxygène. Le contrôle de la pression partielle était effectué en manipulant le débit d'oxygène alimenté à l'aide d'un débitmètre contrôleur (Tylan General) pour un débit total des gaz constant (Tylan General). Le débit d'air varie et s'ajuste de manière à combler la différence entre le débit total et le débit d'oxygène.

### **3.2.5 Échantillonnage et suivi**

Une culture de cellules végétales dure en moyenne entre 7 et 15 jours. Des échantillons étaient pris à toutes les 24 h ou au 48 h pour suivre la croissance des cellules et la concentration des nutriments dans le milieu de culture. Le pH

du milieu de culture était mesuré avec une sonde à pH (pHmeter, 805 MP, Fischer Scientific). L'échantillon était ensuite rincé à l'eau distillée et filtré sous vide (Glass Fiber Filter, Gelman Science). Les cellules recueillies sur le filtre étaient pesées dans le but de déterminer la concentration de biomasse humide. La biomasse humide était ensuite séchée (24 h, 80°C) et finalement pesée pour déterminer la concentration en biomasse sèche.

Un volume de 2 ml de suspension cellulaire servait à effectuer le compte cellulaire. Les cellules étaient centrifugées et le surnageant était retiré. La solution enzymatique (annexe A.1) était ajoutée jusqu'à 4 ml. Le mélange de cellules et de solution enzymatique était agité (2 h, 120 RPM) dans le but de digérer la paroi cellulosique pour dissocier les agrégats cellulaires. Pour colorer le noyau des cellules, une solution de fushine (annexe A.1) était ajoutée à quantité égale à la suspension cellulaire. Finalement, les cellules étaient comptés sous microscope (Olympus modèle CK2, grossissement final x 100) à l'aide d'un hémacytometre (Fushus-Rosenthal ultraplane, Hauser Scientific). Deux séries de 4 carreaux sur 16 étaient dénombrées. La concentration cellulaire ( $c$ ) en cellules. $\text{ml}^{-1}$  est obtenue à l'aide de l'équation suivante :

$$c = \text{moyenne}(n_1, n_2) \times D \times \frac{1}{Vc} \times 1000 \frac{\text{mm}^3}{\text{ml}} \quad (3.1)$$

Où  $n_1$  et  $n_2$  représentent les deux comptes cellulaires effectués,  $Vc$  est le volume en suspension à chaque compte (0.8  $\text{mm}^3$ ) et la dilution qui est de 4 selon le présent protocole.

### 3.2.6 Modèle de croissance et planification des ajouts

Le modèle mathématique développé par Sirois (1997) a servi à faire le suivi des cultures en bioréacteur. Ce modèle prévoit la concentration en biomasse sèche, la densité cellulaire et les besoins des cellules en hydrates de carbones, ammonium, nitrate et phosphate. Ce modèle a servi à établir une stratégie d'alimentation dans le but de maximiser la croissance cellulaire.

Sirois suggère de maintenir une concentration minimale en sucre de  $10 \text{ g.L}^{-1}$ , en nitrate de  $3 \text{ mM}$  et en ammonium de  $5 \text{ mM}$ . Pour ce qui est du phosphate il suggère de maintenir une concentration intracellulaire de  $0,05 \text{ mM}$ .

La concentration en biomasse sèche et en nombre de cellules étaient entrées quotidiennement dans le modèle. Les concentrations d'ions dans le milieu de culture étaient fournies au modèle dès que les résultats d'analyse par chromatographe en phase liquide de haute performance (HPLC) étaient disponibles. Cette approche minimisait les écarts entre le modèle mathématique et la réalité.

Chaque solution d'ajout (annexe A.2) était contenue dans un réservoir stérile connecté au bioréacteur. Ceci permettait de réajuster la composition du milieu de culture en fonction de la croissance cellulaire et de maintenir les nutriments aux concentrations fixées par Sirois.

### 3.2.7 Contrôle manuel du phosphate intracellulaire

Le modèle mathématique développé par Sirois (1997) a servis à déterminer le besoins des cellules en phosphate.

En se basant sur les cultures effectuées par Coelho (2000) et les premières cultures effectuées dans le cadre de ce projet de recherche (résultats non montrés) l'hypothèse suivante a été posée :

Le phosphate contenu dans le milieu de culture à l'inoculation et les ajouts de phosphate sont rapidement absorbés par les cellules (moins de 24 heures) et ça jusqu'à épuisement du phosphate du milieu de culture.

Une fois cette hypothèse posée il était facile de déterminer la concentration du phosphate intracellulaire par bilan de masse et ainsi le contrôler manuellement.

De plus les mesures de phosphate intracellulaire effectuées à 24 heures d'intervalle permettaient de donner une estimation plus précise de la concentration du phosphate intracellulaire.

Suites aux premières cultures effectuées dans le cadre de ce projet (résultats non montrés), il s'est avéré que la concentration du phosphate intracellulaire

se situait entre 0 et  $1 \text{ mmol} \cdot 10^{-9}$  ¢. En se basant sur ces résultats il a été convenu que le phosphate intracellulaire soit contrôlé manuellement à  $0,5 \text{ mmol} \cdot 10^{-9}$  cellules et  $1 \text{ mmol} \cdot 10^{-9}$  cellules.

### **3.2.8 Analytique**

La concentration des hydrates de carbone dans le milieu de culture (sucrose, glucose et fructose) était mesurée au moyen d'un chromatographe en phase liquide de haute performance (HPLC). Le chromatographe était composé d'une pompe (Waters modèle 6000A), d'un injecteur automatique (Gilson modèle 231/401), d'un détecteur d'indice de réfraction (Gilson modèle 132) et d'une colonne (Biorad HPX 87C). La colonne était maintenue à  $80^{\circ}\text{C}$  avec l'eau comme phase mobile. Les résultats d'analyse étaient intégrés par ordinateur à l'aide du logiciel Gilson 721.

Les ions étaient mesurés avec un chromatographe en phase liquide de haute performance (HPLC) (Dionex Canada Ltd, Oakville, Canada). Le chromatographe était équipé d'une pompe à gradient, d'un échantillonneur automatique et d'un détecteur électrochimique en mode conductivité. Les analyses étaient contrôlées par ordinateur grâce au logiciel DIONEX AI-450. Les cations et les anions étaient analysés à une température de  $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

La séparation des anions était effectuée avec une colonne 4x250mm (IONPAC AS4A-SC, Dionex) équipée d'un supresseur de cation (ASRS-1) en série pour éliminer l'interférence des cations et améliorer le rapport signal bruit.

Les cations étaient séparés dans une colonne 4x250 mm (IONPAC CS-12, Dionex) avec un supresseur d'anions (CSRS-1, Dionex) en série pour éliminer l'interférence des anions et améliorer le rapport signal bruit.

Pour la mesure des nutriments intracellulaire, 0,1 g de biomasse sèche qui était préalablement broyée dans un mortier était agitée à 120 RPM pendant 3heures dans 4 ml d'eau déionisée. Cette méthode permettait d'extraire les ions et les hydrates de carbone contenus dans les cellules. Le mélange biomasse sèche et surnageant était ensuite centrifugé. Le surnageant était analysé pour en déterminer le contenu en anions, cations et hydrates de carbone.

### 3.2.9 Mesures respirométriques

#### Mesure du taux de consommation d'oxygène et du coefficient de transfert d'oxygène

Le transfert d'oxygène des bulles de gaz jusqu'aux cellules est limité par le film liquide entourant les bulles. Le taux de transfert (OTR en mM.h<sup>-1</sup>) de la phase gazeuse à la phase liquide est défini par l'équation (4.2),  $K_L$  est le coefficient de transfert d'oxygène (m.h<sup>-1</sup>),  $\langle a \rangle$  est l'air interfaciale (m<sup>2</sup>.m<sup>-3</sup>),  $K_{La}$  (h<sup>-1</sup>) est le coefficient de transfert d'oxygène volumétrique, DO\* (mM) est la concentration d'oxygène dissous à saturation et DO (mM) la concentration en oxygène dissous mesurée. Le taux de consommation d'oxygène par les cellules (OUR en mM.h<sup>-1</sup>) est défini par l'équation (3.3),  $qO_2$  (mMO<sub>2</sub>.g M.S<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>) est le taux spécifique de consommation d'oxygène par la biomasse et X la concentration en biomasse sèche (g M.S:L<sup>-1</sup>). Le taux de variation de la concentration d'oxygène dissous dans le milieu de culture peut être défini comme le taux de transfert d'oxygène de la phase gazeuse à la phase liquide moins le taux de consommation d'oxygène par les cellules (équation 3.4).

$$OTR = K_L a(DO^* - DO) \quad (3.2)$$

$$OUR = qO_2 X \quad (3.3)$$

$$\frac{d(DO)}{dt} = OTR - OUR \quad (3.4)$$

En culture; la concentration en oxygène dissous est contrôlée à 60% de la saturation. Par conséquent, le taux de variation de la concentration en oxygène dissous ( $d(DO)/dt$ ) est égal à zéro et par conséquent l'OTR est égal à l'OUR. L'équation 3.2 devient donc :

$$OUR = K_L a(DO^* - DO) \quad (3.5)$$

L'OUR a été estimé à l'aide de la technique développée par Aubry (1996). Cette technique consiste à faire tendre le  $K_L a$  et donc l'OTR vers zéro (équation 3.2). L'équation (3.4) se simplifie et donne l'équation (3.6).

$$\frac{d(DO)}{dt} = OUR \quad (3.6)$$

La baisse de la concentration en oxygène dissous ( $d(DO)/dt$ ) mesurée par la sonde donne donc une estimation de l'OUR. Pour faire tendre le  $K_L a$  vers zéro, il faut réduire la vitesse d'agitation et couper le bullage. En pratique la vitesse d'agitation est réduite de 60 à 30 rpm. Ceci permet de maintenir les cellules en suspension et limite la perturbation sur la lecture d'oxygène dissous, tout en réduisant le coefficient de transfert d'oxygène ( $K_L a$ ). Cependant à une vitesse d'agitation de 30 rpm le transfert d'oxygène à la surface ne peut pas être considéré comme nul. Il est donc nécessaire de corriger le taux de consommation d'oxygène calculé à partir de l'équation

(3.5). Pour ce faire la concentration en oxygène dissous est ajustée à partir d'un modèle de transfert d'oxygène (équation 3.7). Ce modèle corrige la pente de la variation de la concentration en oxygène dissous (DO) mesurée en fonction du temps à l'aide du coefficient de transfert d'oxygène en aération de surface à 30 rpm, de la mesure d'oxygène dissous et de la concentration d'oxygène dans la phase liquide à saturation et à l'équilibre avec la phase gazeuse (DO\*). L'équation (3.4) devient donc :

$$\frac{d(DO')}{dt} = OUR \quad (3.7)$$

$$DO' = \left[ DO(t) - \int_0^t K_L a_s [DO^*(t) - DO(t)] dt \right] \quad (3.8)$$

Le taux de consommation d'oxygène (OUR) était estimé par régression linéaire de la pente de la mesure de la concentration en oxygène dissous corrigé en fonction du temps. Les équations (3.6) et (3.7) étaient utilisées sous forme discrépante avec une période d'échantillonnage de 10 secondes. L'arrêt de l'aération était en général d'une durée de cinq minutes. Ce délai pouvait être écourté si la concentration en oxygène dissous atteignait une valeur inférieure à 20%. Après la perturbation, le contrôleur était remis en fonction et la concentration en oxygène dissous revenait au point de consigne.

Cette technique permettait aussi d'estimer le coefficient de transfert global d'oxygène ( $K_{Lag}$ ) en faisant quelques hypothèses :

Avant la perturbation  $\frac{d(DO)}{dt} = 0$

Le taux de consommation d'oxygène (OUR) ne change pas durant la perturbation.

De plus les valeurs de DO et de DO\* étaient mesurées. Le coefficient global de transfert d'oxygène pouvait être estimé de l'équation suivante :

$$K_L a_g = \frac{OUR}{(DO^* - DO)} \quad (3.9)$$

### 3.2.9.2. Mesure du taux de production du CO<sub>2</sub>

La concentration en gaz carbonique dans les gaz de sortie a été analysée grâce à un moniteur à infrarouge (Modèle 870, Rosemount Analytical) d'une capacité de 0 à 3,6%. La calibration linéaire était effectuée à l'aide d'azote 0% et d'un gaz de calibration certifié à 1,21% en CO<sub>2</sub> (Air-liquide).

Connaissant la concentration en CO<sub>2</sub> du gaz alimenté (CO<sub>2in</sub>) au bioréacteur et celle du gaz de sortie (CO<sub>2out</sub>) il était possible d'estimer le taux de production de CO<sub>2</sub> (CPR). La concentration dans le gaz d'alimentation était calculée à partir de la composition du mélange de gaz alimenté à l'entrée du

bioréacteur en posant comme hypothèse que l'air contient 0,03% de CO<sub>2</sub> et que l'oxygène n'en contient pas. Le taux de production de CO<sub>2</sub> (CPR) était estimé selon les équations suivantes, en supposant que le transfert du CO<sub>2</sub> entre la phase liquide et la phase gazeuse est en pseudo équilibre :

$$\frac{d(DCO_2)}{dt} \approx 0 \approx CTR - CPR \quad (3.10)$$

$$CTR = \frac{Q \times (CO_{2out} - CO_{2in})}{V \times 0.0246} \approx CPR \quad (3.11)$$

DCO<sub>2</sub> est la concentration en CO<sub>2</sub> dissous dans la phase liquide (mM), CTR est le taux de transfert du CO<sub>2</sub> (mM.h<sup>-1</sup>), Q le débit volumique total de gaz (L.h<sup>-1</sup>), CO<sub>2in</sub> et CO<sub>2out</sub> le pourcentage volumique de CO<sub>2</sub> dans les gaz d'entrée et de sortie respectivement (%) et V le volume de culture (L). Le facteur 0,0246 correspond au volume de CO<sub>2</sub> à 1 atm et 26°C.

### 3.2.10 Cultures témoins en flacon

Des cultures en flacons de 500 ml contenant 250 ml de culture étaient réalisées en parallèle avec les cultures en bioréacteurs dans le but de vérifier la qualité de l'inoculum. Le même inoculum, le même milieu de culture ainsi que les mêmes conditions d'inoculation étaient utilisées.

## CHAPITRE4 : CULTURES EN BIOREACTEURS

L'objectif principal de ce projet de recherche est le suivi et le contrôle du phosphate intracellulaire dans le but d'obtenir des cultures à haute densité cellulaire.

Dans un premier temps, il fallait comparer entre le bioréacteur de 5L à ruban hélicoïdal double et le bioréacteur de 3L à ruban hélicoïdal simple afin de sélectionner le bioréacteur le plus performant pour la suite des travaux. La culture IH11 effectuée dans un bioréacteur HRI de 3L et la culture IH5-1 effectuée dans un bioréacteur HRI de 5L ont servi à comparer la performance de ces deux bioréacteurs.

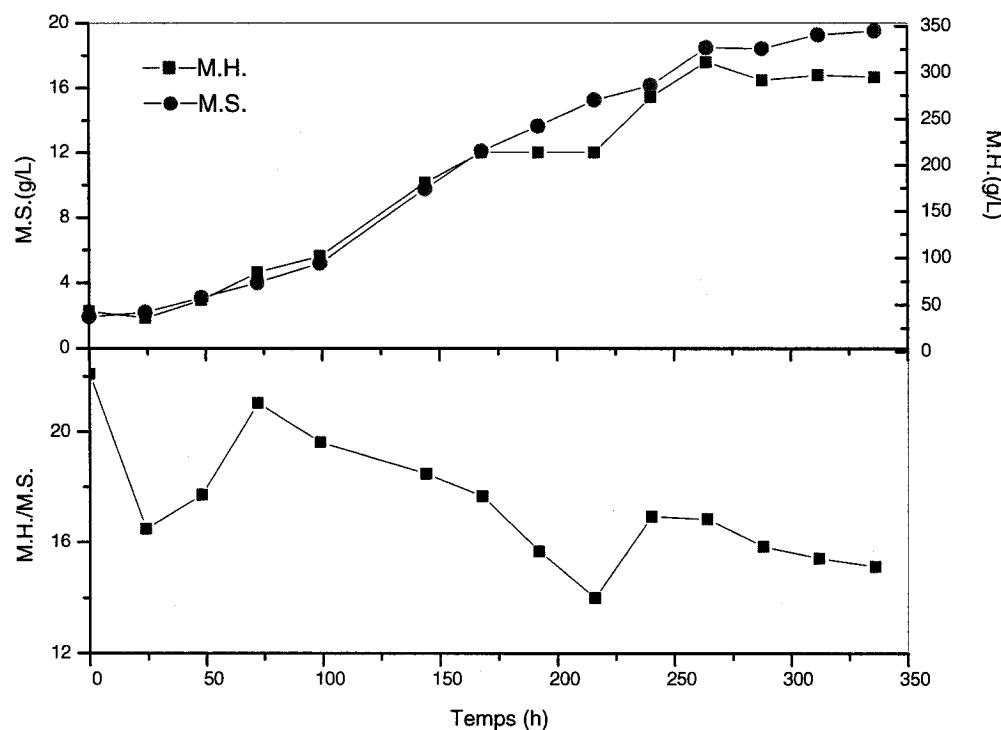
La culture IH12 effectuée dans un bioréacteur HRI de 3 L a permis de suivre l'évolution du phosphate intracellulaire.

Finalement le phosphate intracellulaire a été contrôlé à  $0,5 \text{ mmol} \cdot 10^{-9}$  cellules durant les cultures IH17 et IH18 et à  $1 \text{ mmol} \cdot 10^{-9}$  cellules durant les cultures IH24 et IH25.

#### **4.1 Comparaison entre le bioréacteur de 5 L et le bioréacteur de 3 L**

Les cultures IH-11 effectuée dans un bioréacteur HRI d'un volume nominal de 3L et IH5-1 effectuée dans un bioréacteur HRI d'un volume nominal de 5 L ont servi à comparer les performances de ces deux bioréacteurs pour choisir celui dans lequel sera effectué le reste des cultures. Ces deux cultures ont été effectuées en parallèle avec les mêmes conditions d'opération, le même milieu de culture et le même inoculum.

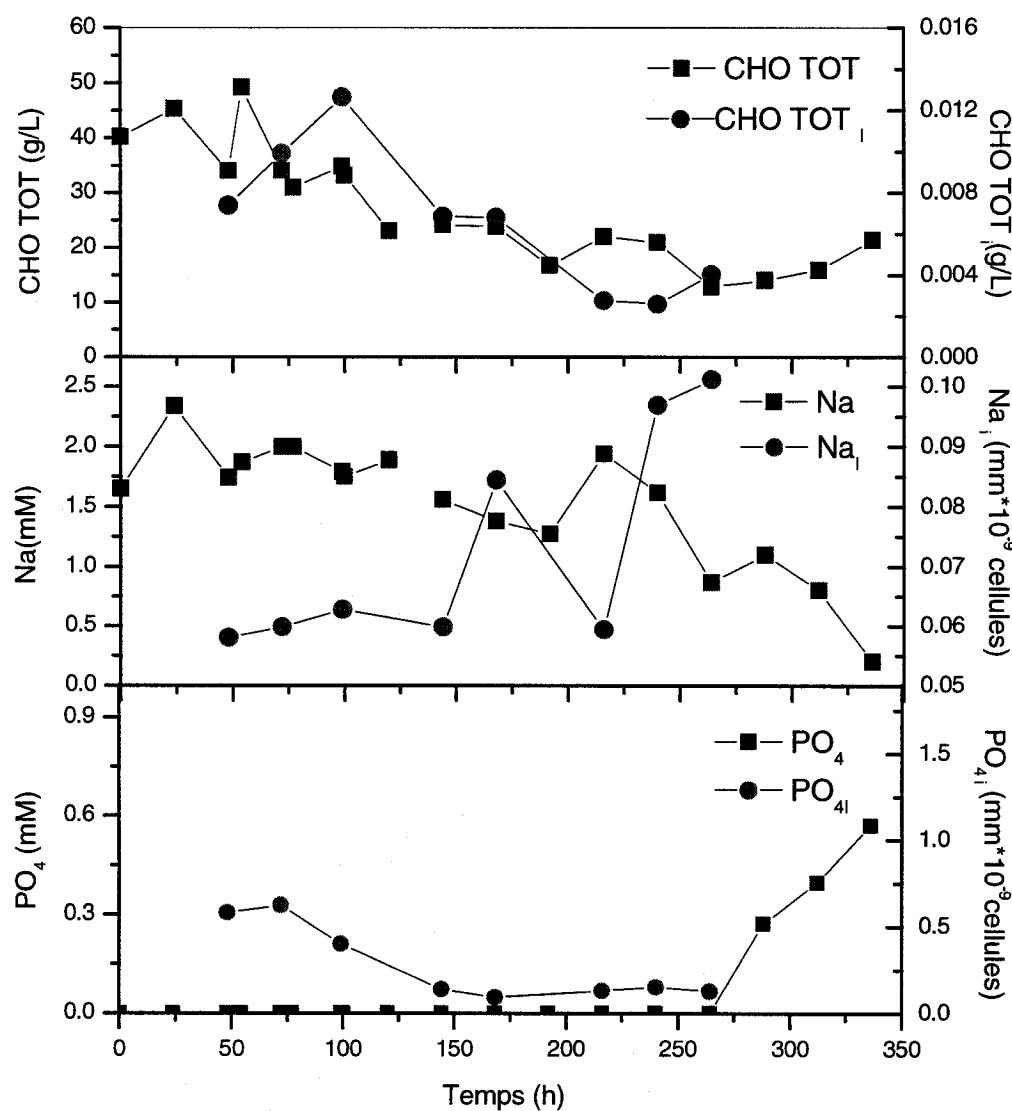
Dans le cas de la culture IH-11, une biomasse sèche de  $19,5 \text{ g M.S.} \cdot \text{L}^{-1}$  a été obtenue après 336 h de culture à partir d'un inoculum dont la biomasse sèche était de  $2,0 \text{ g M.S.} \cdot \text{L}^{-1}$  (Figure 4.1). Le taux de croissance globale en biomasse sèche était de  $0,007\text{h}^{-1}$ . Il y a eu arrêt de croissance vers 264h. En effet vers 264h, la masse humide ainsi que la masse sèche ont atteint un plateau (figure 4.1). Dans le cas de la culture IH-11 la croissance est représentée en biomasse sèche et en biomasse humide seulement. La croissance en nombre de cellules n'est pas disponible en raison de problèmes techniques qui ont invalidé les comptes cellulaires.



**FIGURE 4.1: Courbes de croissance, évolution du rapport masse humide/masse sèche pour la culture IH11**

Le milieu utilisé pour la culture IH11 était du 1,5\*B5. Un milieu qui a les mêmes composants que le milieu B5 mais dont la concentration des composants a été multipliée par un facteur 1,5.

Selon Sirois (1997) la concentration en hydrates de carbone devait être maintenue au-dessus de  $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ . Cette condition a été respectée tout le long de la culture (Figure 4.2).



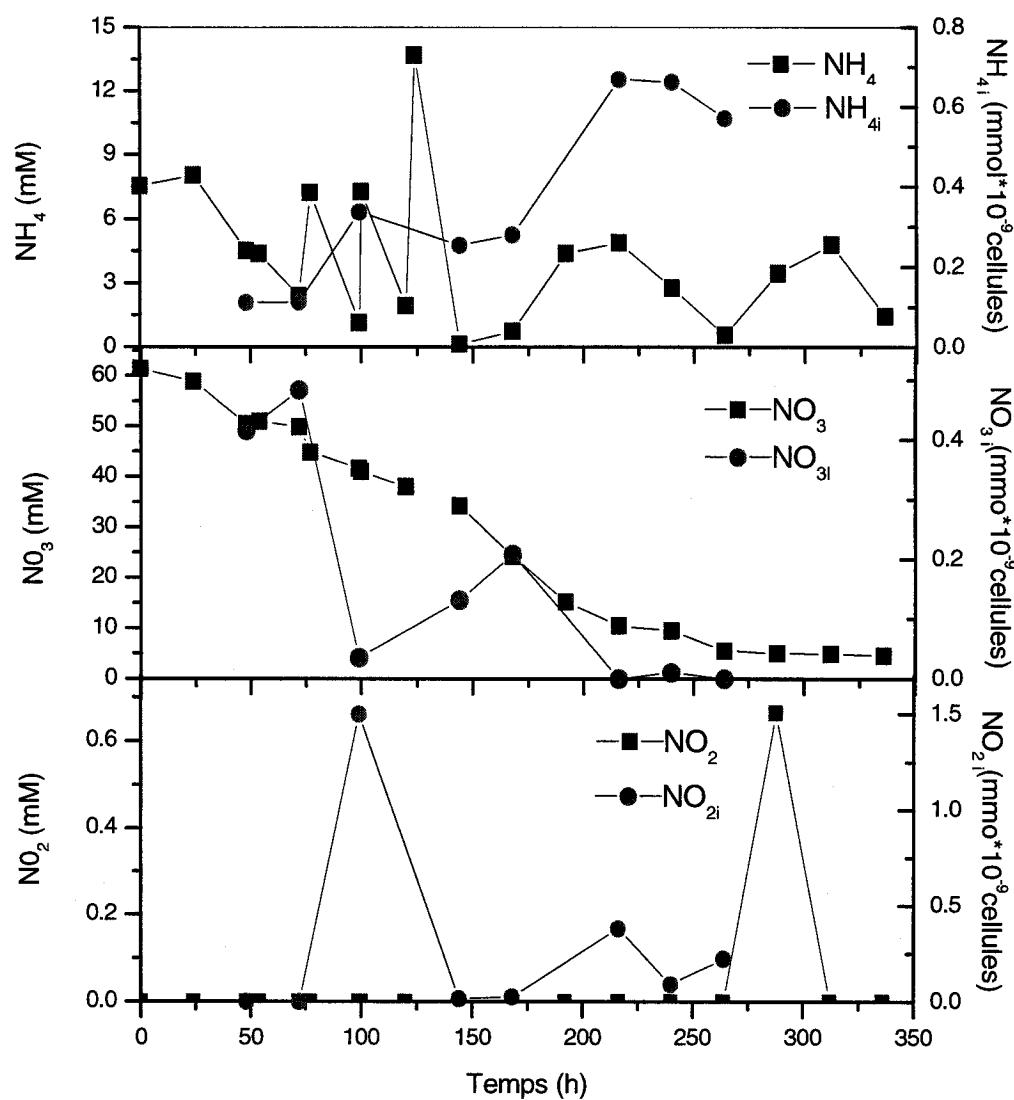
**Figure 4.2: Courbes de consommation du glucose, du sodium et du phosphate pour la culture IH11**

Le phosphate est rapidement absorbé pendant les premières 24 h de culture et après l'ajout effectué à 198 h. Vers 288 h, il y a eu largage du phosphate

(Figure 4.2). Le largage du phosphate a été observé aussi avec les cellules *Catharanthus roseus* cultivées dans du milieu MS (Sakano et al; 1995). En effet les cellules appartenant à l'espèce *Catharanthus roseus* cultivées à une concentration cellulaire initiale de  $4.10^{+5}$  cellules. $\text{mL}^{-1}$  et une concentration initiale en phosphate de 5 et 10 mM larguent le phosphate 10 h après le début de culture et ça pendant environ 2 jours. Ces mêmes cellules larguent le phosphate moins de deux jours après le début de la culture lorsqu'elles sont cultivées à une concentration cellulaire initiale de  $1.10^{+5}$  cellules. $\text{mL}^{-1}$  et  $0.5.10^{+5}$  cellules. $\text{mL}^{-1}$  dans du milieu MS contenant une concentration initiale en phosphate de 1.25 mM.

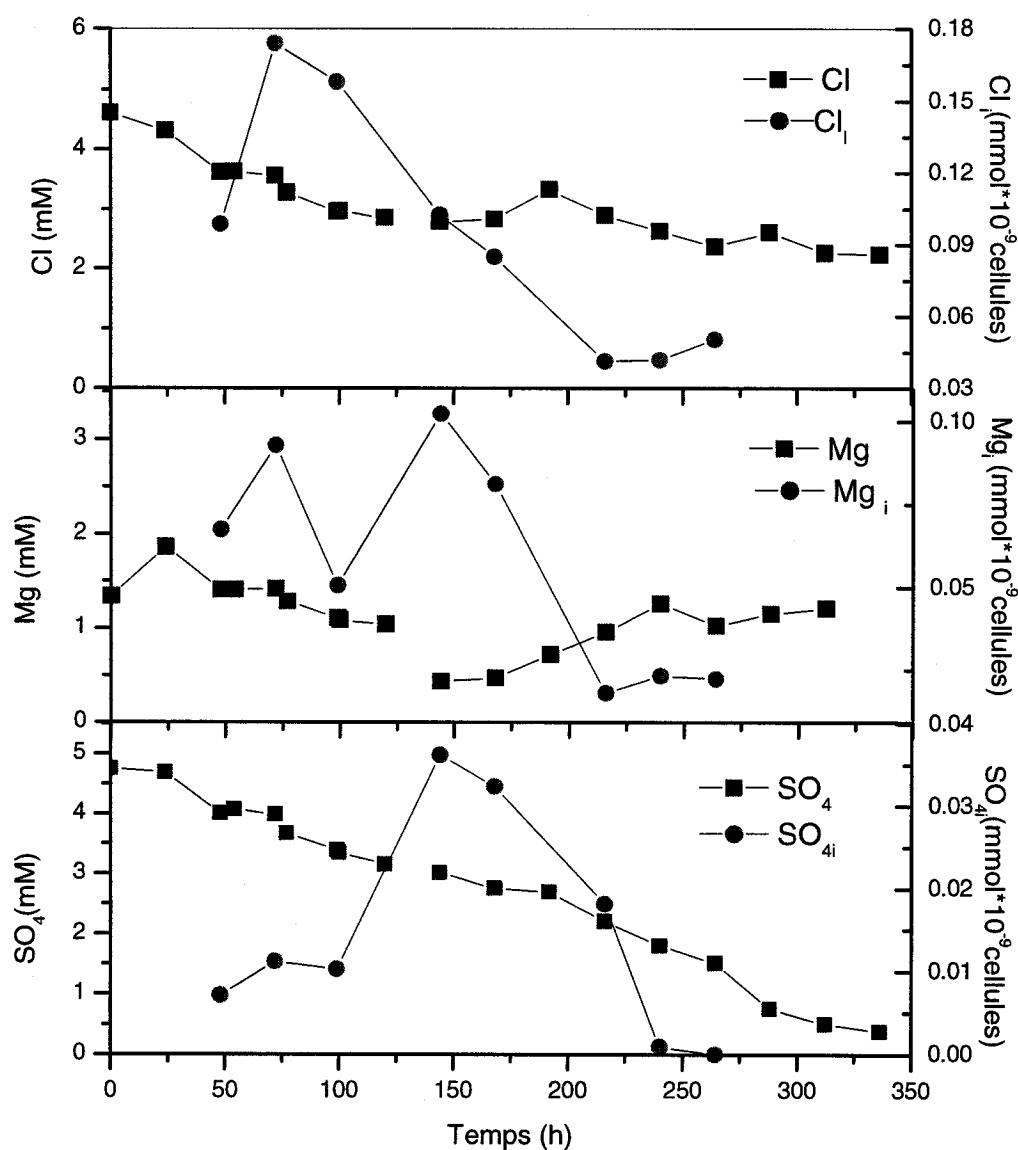
La concentration du phosphate extracellulaire était à zéro jusqu'à 288 h lorsqu'il y a eu largage de ce nutriment par les cellules. La concentration du phosphate intracellulaire variait entre 0.1 et  $0.6 \text{ mmol} * 10^{-9}$  cellules.

La concentration initiale de nitrate (figure 4.3) était de 60 mM. Cette concentration est supérieure à la concentration du nitrate dans le milieu utilisé lors de cette culture ( $1,5 * \text{B5}$ ) et qui est de 37,5 mM. Une concentration initiale de 60 mM a été probablement causée par une erreur de mesure survenue lors de la préparation du milieu de culture. Le nitrate a été maintenu au-dessus du seuil fixé par Sirois (1997) et qui est de 3 mM. Le seuil fixé par Sirois dans le cas de l'ammonium est de 5 mM (Sirois, 1997). La concentration de ce nutriment était en dessous du seuil de consigne vers 144 h et vers 264 h (figure 4.3). L'ammonium pourrait être à l'origine de l'arrêt de croissance survenue vers 264h.

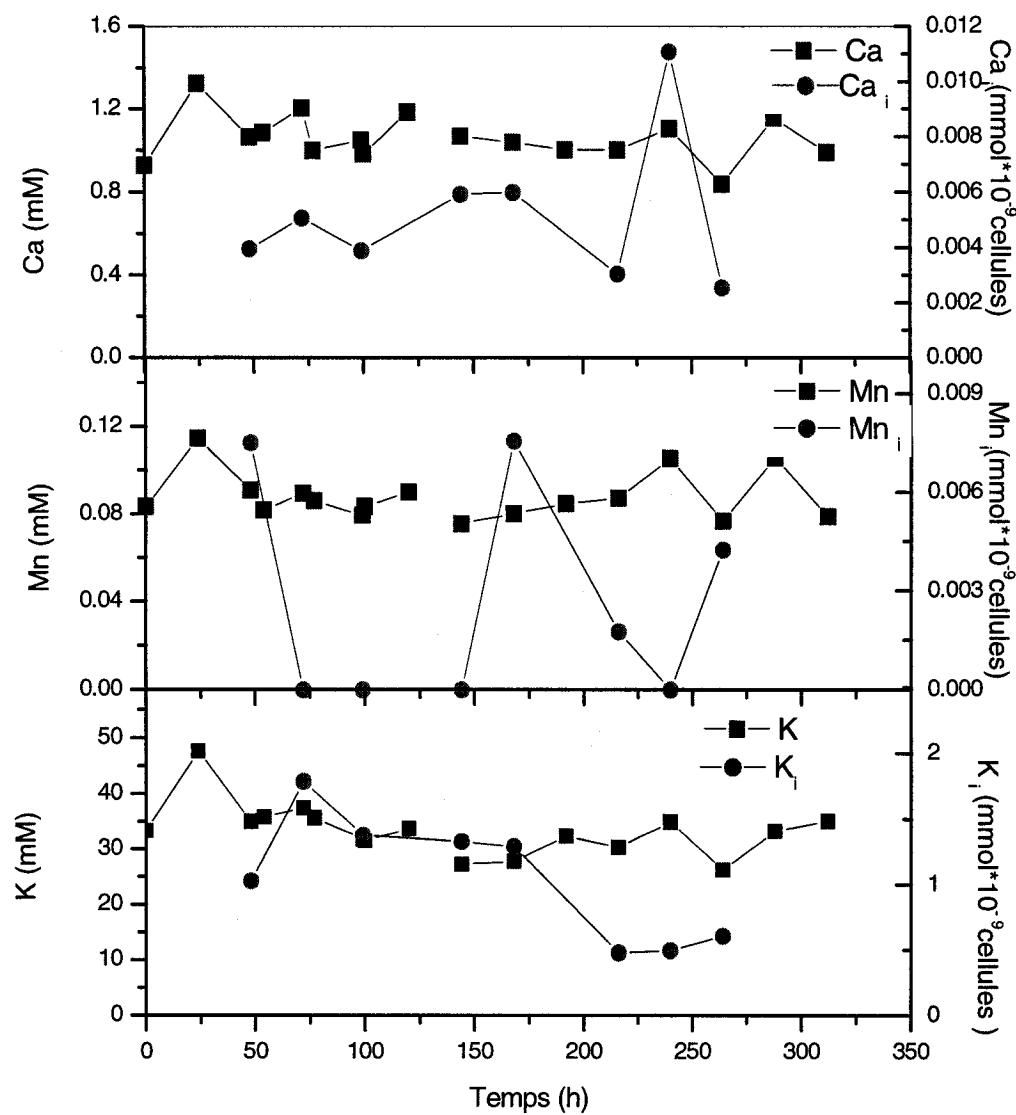


**Figure 4.3: Courbes de consommation de l'ammonium, du nitrate et du nitrite pour la culture IH11**

Le chlore (figure 4.4), le magnésium (figure 4.4) le sulfate (figure 4.4) et le calcium (figure 4.5) étaient disponibles durant toute la culture. Le niveau du potassium était élevé (figure 4.5), il variait entre 30 et 50 mmol\*L<sup>-1</sup>. Le potassium était ajouté comme contre ion avec le nitrate. La concentration élevée du nitrate explique la concentration élevée du potassium.

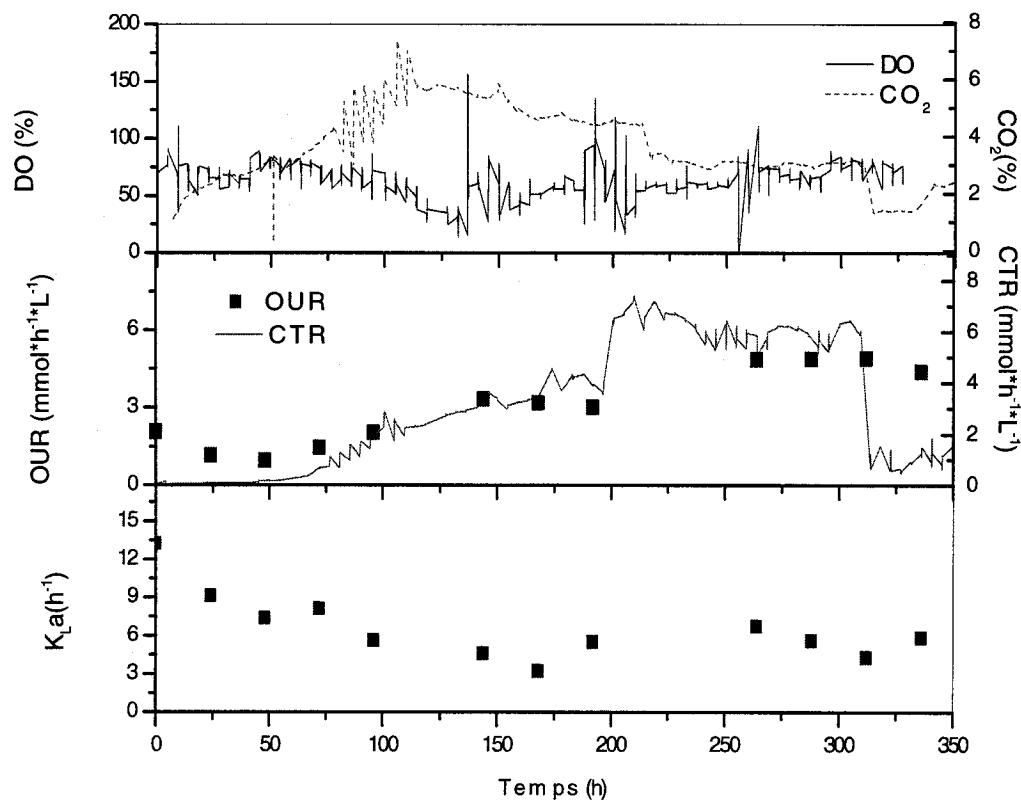


**Figure 4.4: Courbes de consommation du chlore, du magnésium et du sulfate pour la culture IH11**



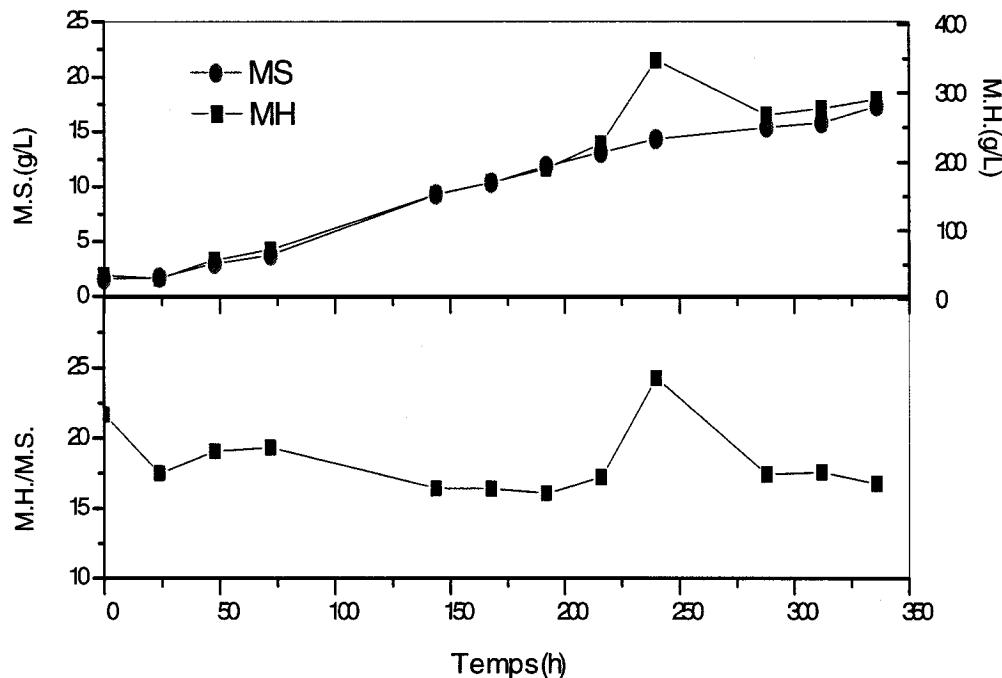
**Figure 4.5: Courbes de consommation du calcium, du manganèse et du potassium pour la culture IH11**

Les  $k_{La}$  du bioréacteur de 3 L variaient entre  $3,5$  et  $8,8 \text{ h}^{-1}$  (figure 4.6). Cependant dans le cas de la culture IH11, l'hypothèse selon laquelle  $\frac{d(DO)}{dt} = 0$  avant la perturbation n'est pas satisfaite ce qui occasionne probablement un manque de précision dans l'estimation du  $k_{La}$ . Malgré le problème de contrôle d'oxygène dissous, il est possible de constater que la concentration d'oxygène dissous variait autour du seuil fixé et qui est de 60% (figure 4.6).



**Figure 4.6: Taux de respiration et coefficient de transfert d'oxygène pour la culture IH11**

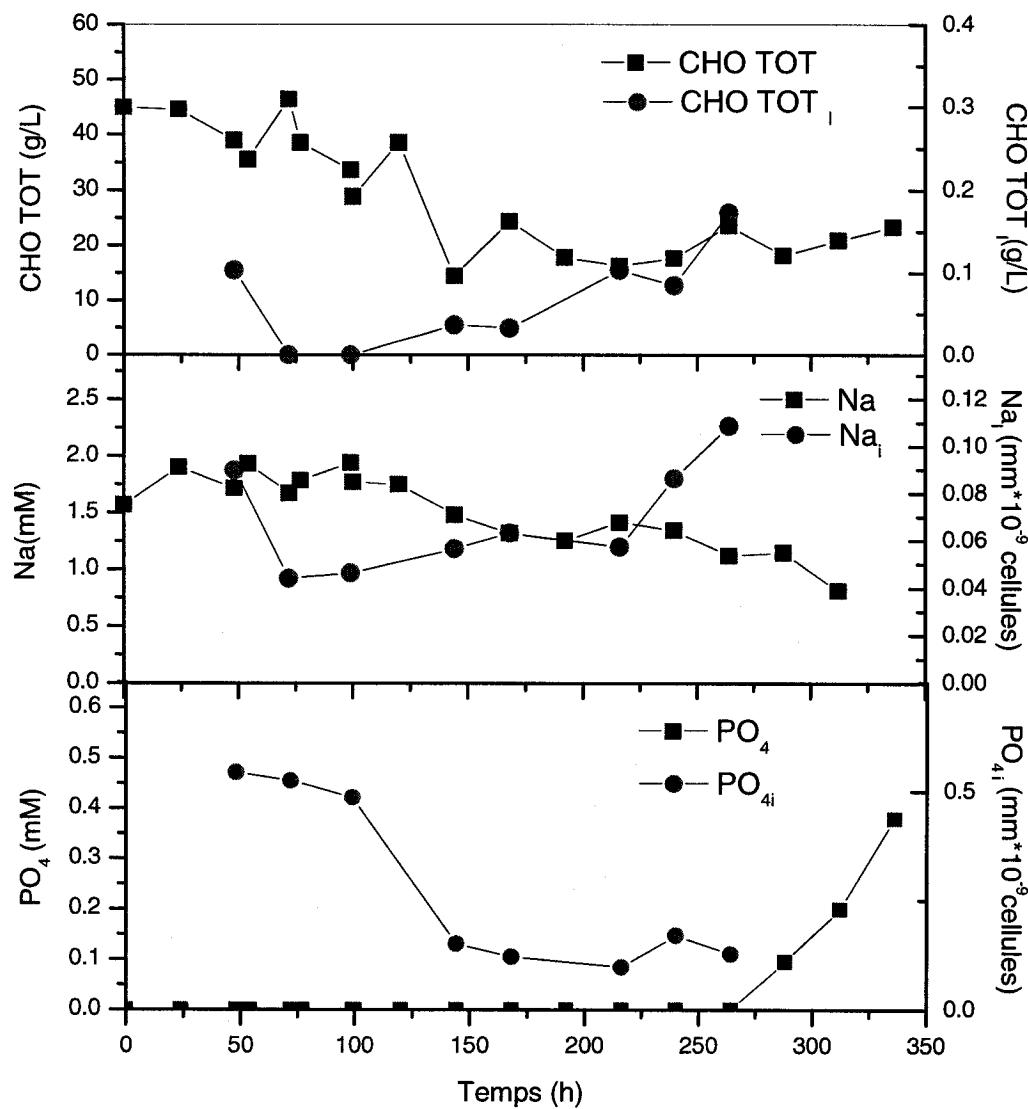
Dans le cas de la culture IH5-1, une biomasse sèche de  $17,3 \text{ g M.S.} \cdot \text{L}^{-1}$  a été obtenue après 336 h de culture et à partir d'un inoculum dont la biomasse sèche était de  $1,6 \text{ g M.S.} \cdot \text{L}^{-1}$ (Figure 4.7). Le taux de croissance globale en biomasse sèche était de  $0,0082 \text{ h}^{-1}$ . Dans le cas de la culture IH5-1 la croissance est représentée en biomasse sèche et en biomasse humide seulement. La croissance en nombre de cellules n'est pas disponible en raison de problèmes techniques qui ont invalidé les comptes cellulaires.



**Figure 4.7: Courbes de croissance, évolution du rapport masse humide/masse Pour la culture IH5-1**

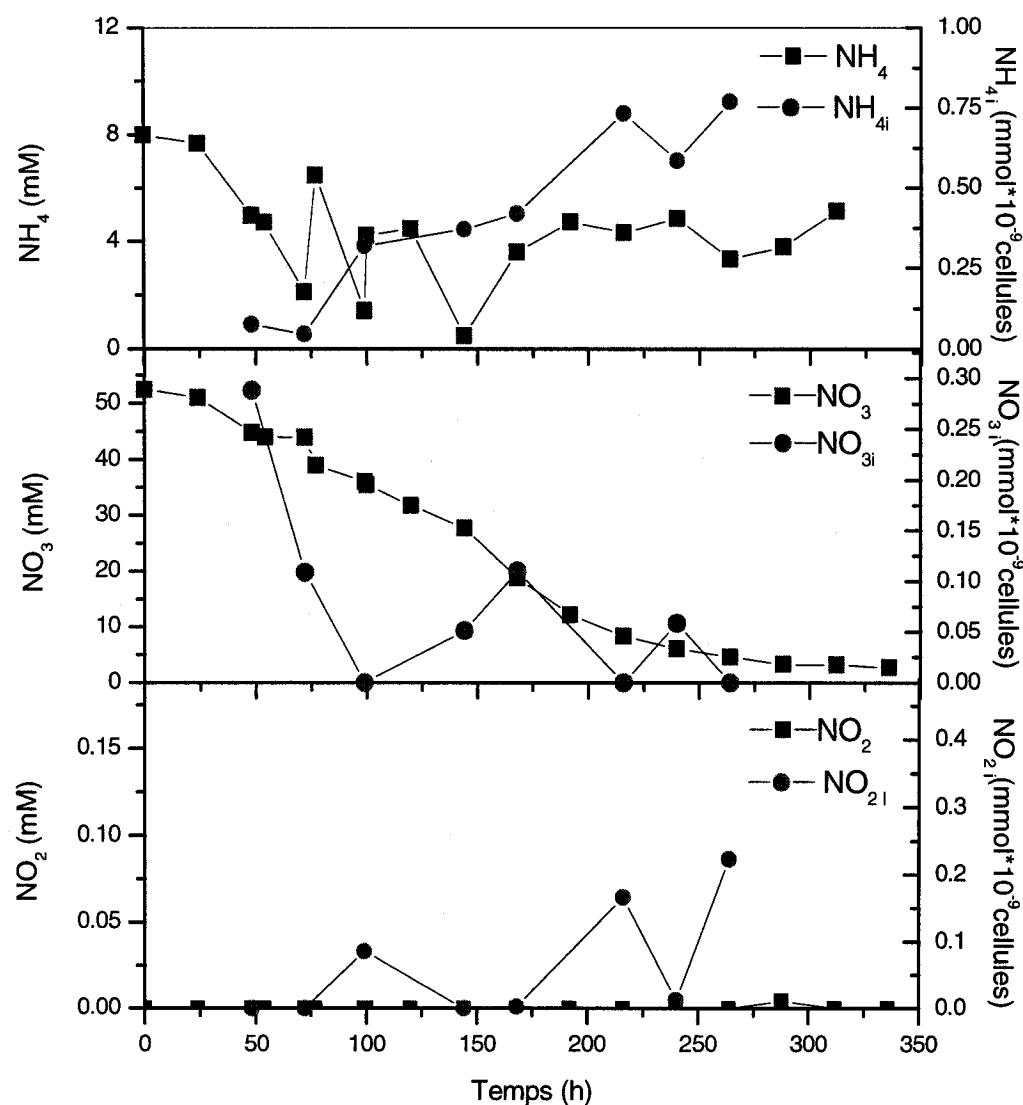
Le milieu utilisé pour la culture IH5-1 était du 1,5\*B5. Les hydrates de carbone ont été maintenus au dessus de  $10\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  tout le long de la culture (Figure 4.8). Par conséquent il n'y a pas eu de limitation dans le cas de ce nutriment.

Le phosphate est rapidement absorbé après l'inoculation et l'ajout effectué à 198h (figure 4.8). Il y a eu largage du phosphate environ 240 h après le début de la culture. La concentration du phosphate extracellulaire était à zéro tout le long de la culture. La concentration du phosphate intracellulaire variait entre 0.1 et 0.5 mmol\* $10^{-9}$  cellules.



**Figure 4.8: Courbes de consommation du glucose, du sodium et du phosphate pour la culture IH5-1**

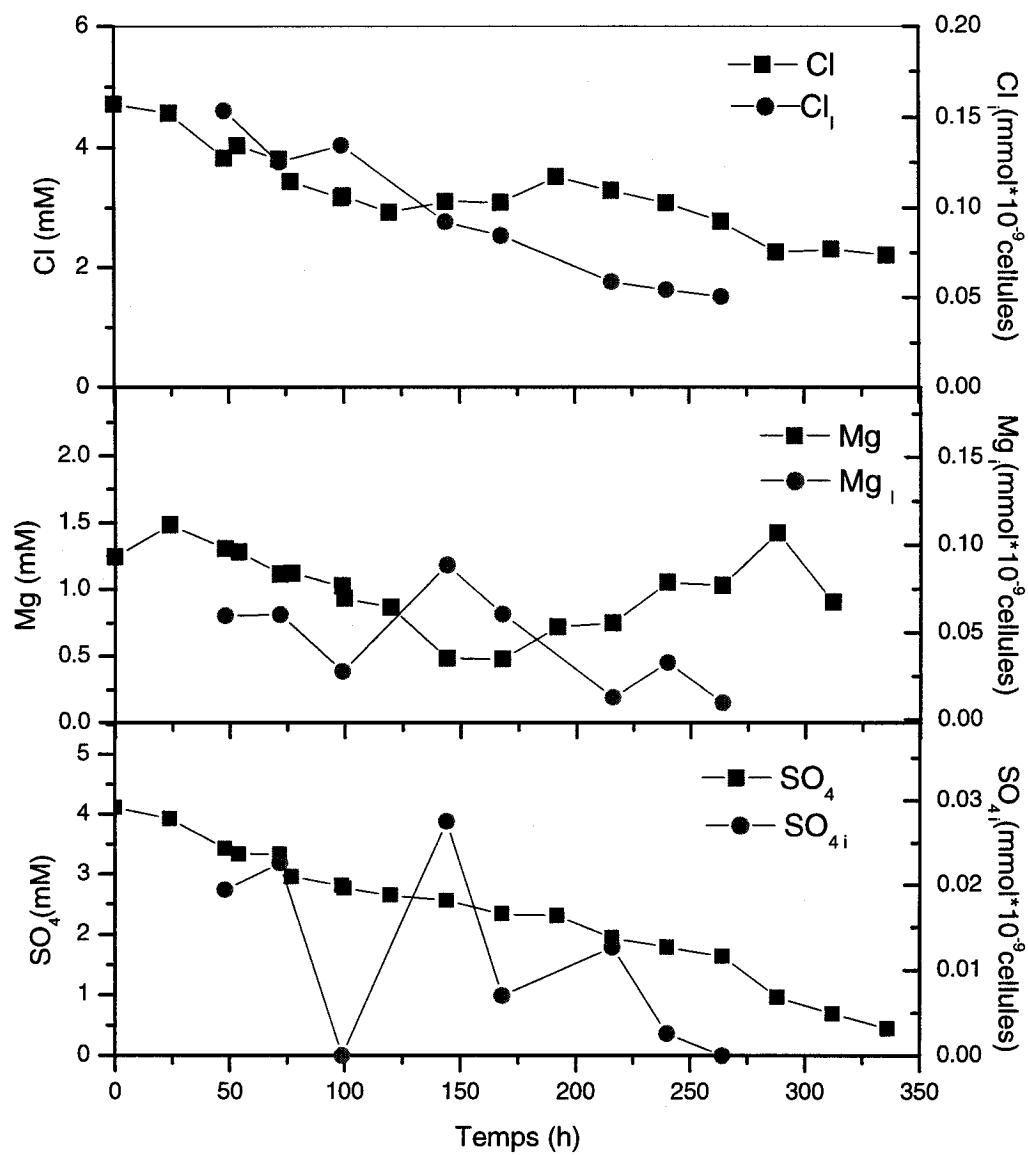
L'ammonium était en dessous de 5mM vers 72, 99 et 144 h (Figure 4.9) ce qui peut occasionner des limitations dans le cas de ce nutriment.



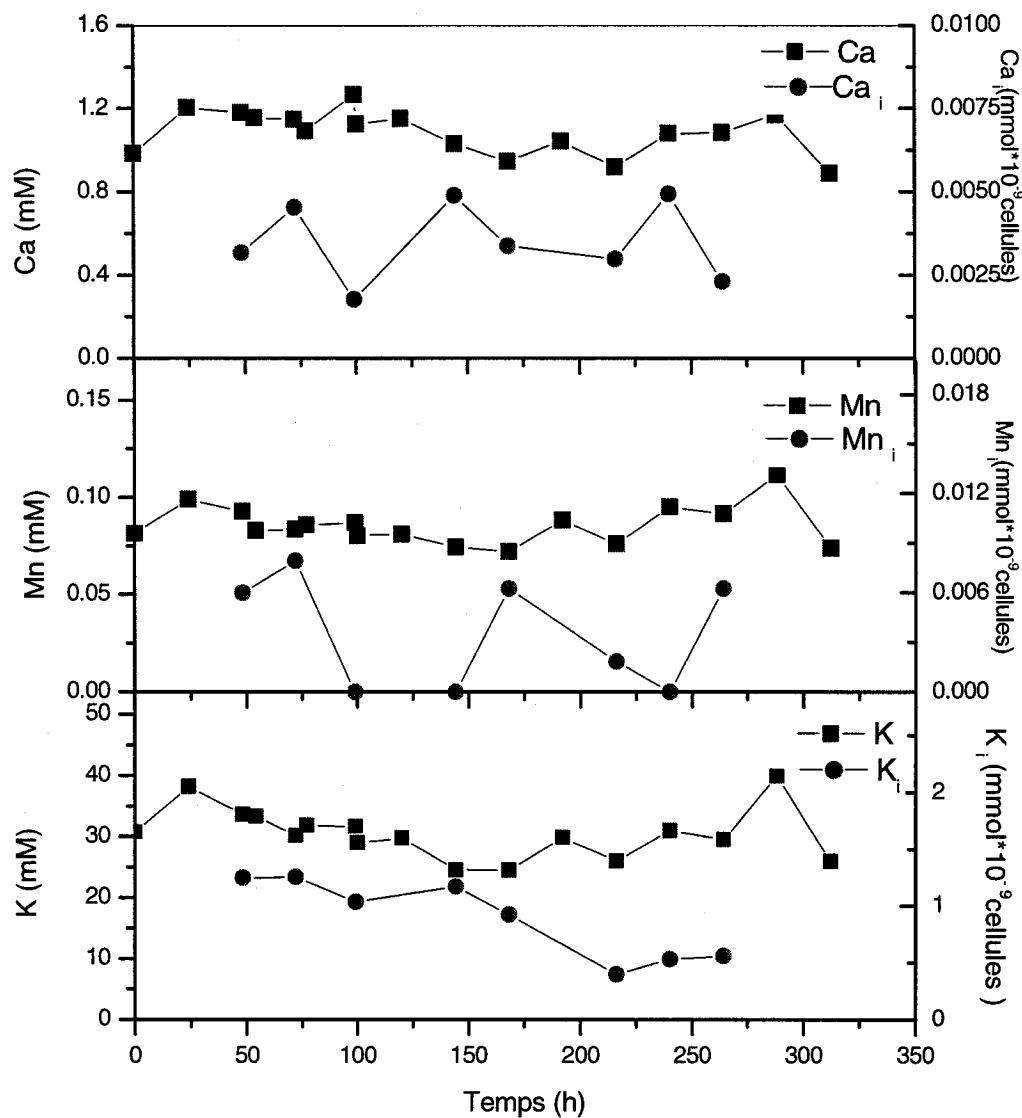
**Figure 4.9: Courbes de consommation de l'ammonium, du nitrate et nitrite pour la culture IH5-1**

Le sodium (figure 4.8), le sulfate (figure 4.10), le chlore (Figure 4.10), le magnésium (figure 4.10) et le calcium (figure 4.11) étaient disponibles durant

toute la culture. La concentration du potassium était élevée et variait entre 25 et 45 mmol\*L<sup>-1</sup> (figure 4.11).



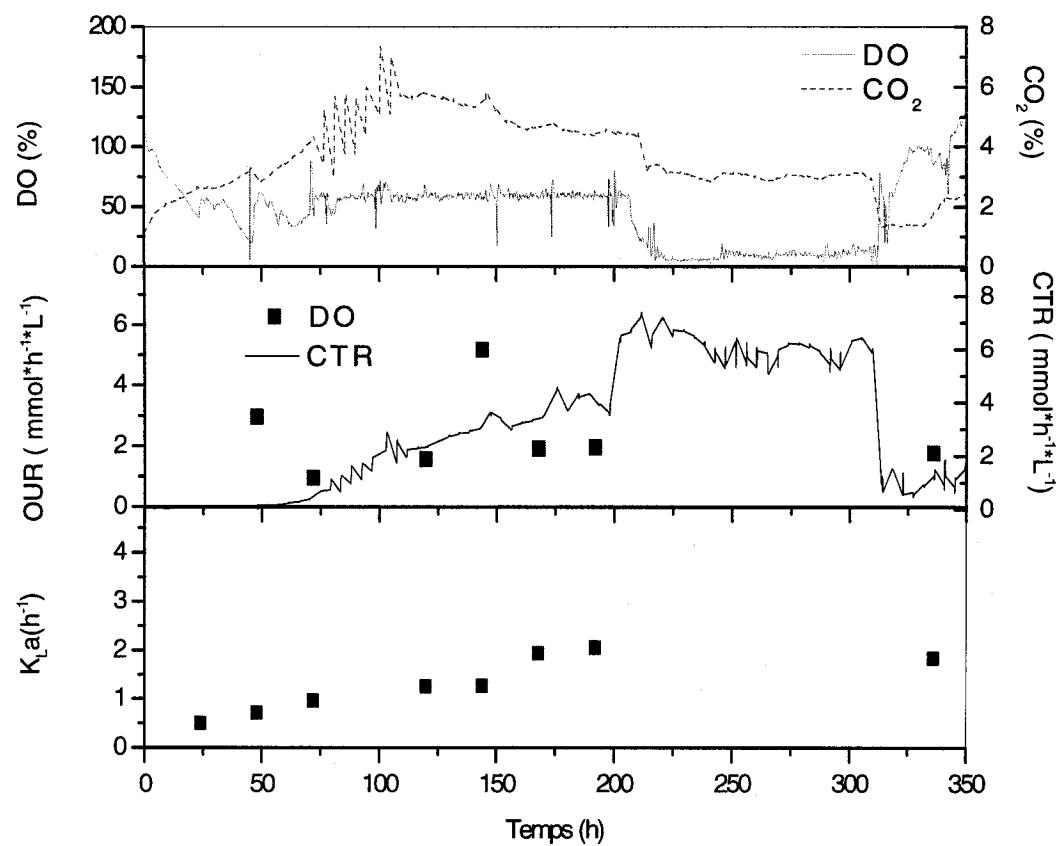
**Figure 4.10: Courbes de consommation du chlore, du magnésium et du sulfate pour la culture IH5-1**



**Figure 4.11: Courbes de consommation du calcium, du manganèse et du potassium pour la culture IH5-1**

Des estimations de  $k_{La}$  ont permis de constater que le coefficient de transfert dans le cas de cette culture variait entre  $2,9$  et  $5,2 \text{ h}^{-1}$  (Figure 4.12). Ces valeurs sont inférieures à celles obtenues avec la culture IH11.

A partir de 220 h la concentration d'oxygène dissous était inférieur à 10%. Il y a probablement eu une limitation en oxygène dans le cas de la culture IH5-1. Cette probable limitation est survenue lorsque la biomasse sèche avait atteint 13,13 g M.S. $\cdot$ L $^{-1}$  et la biomasse humide 226,40 g M.H. $\cdot$ L $^{-1}$ .



**Figure 4.12: Taux de respiration et coefficient de transfert d'oxygène pour la culture IH5-1**

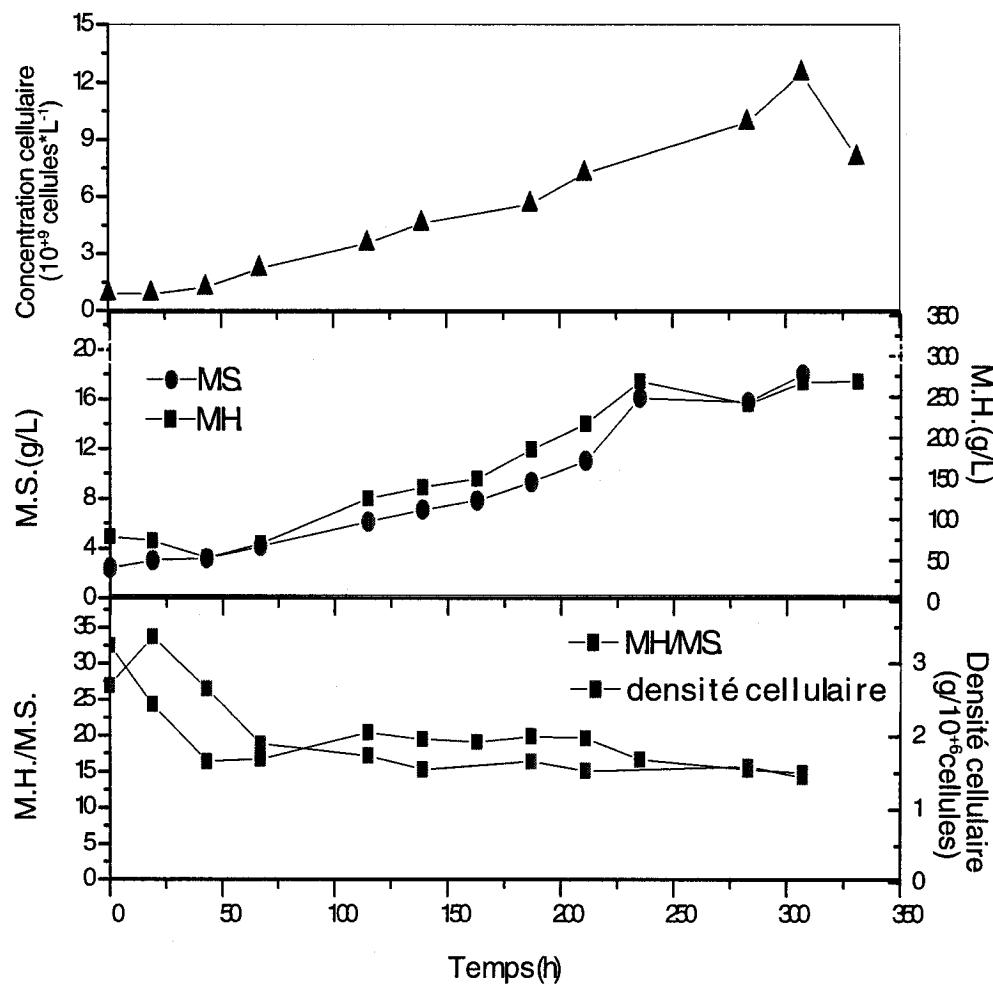
Dans le cas des cultures IH11 et IH5-1 le taux de croissance globale était calculé en biomasse sèche et non pas en nombre de cellules. Des problèmes techniques ont invalidés les comptes cellulaires par conséquent le taux de croissance globale en nombre de cellules ainsi que le temps de division cellulaire ne sont pas disponibles. Le temps de division cellulaire aurait permis de comparer la performance des deux bioréacteurs. En l'absence de ces résultats le choix d'un bioréacteur a été effectué en se basant sur le transfert des gaz.

Les cultures IH11 et IH5-1 ont permis de constater que le bioréacteur HRI de 3 L permet un meilleur transfert de gaz que le bioreacteur HRI de 5 L. Dans le cas de la culture IH5-1 la concentration d'oxygène dissous était en dessous de 10% à partir de 220h alors que dans le cas de la culture IH11 la concentration d'oxygène dissous variait autour de 60% et ceci malgré le problème de contrôle survenu lors de cette culture. Après ces deux cultures le choix s'est porté sur le bioréacteur HRI de 3 L pour la suite des travaux.

#### **4.2 Suivi du phosphate intracellulaire**

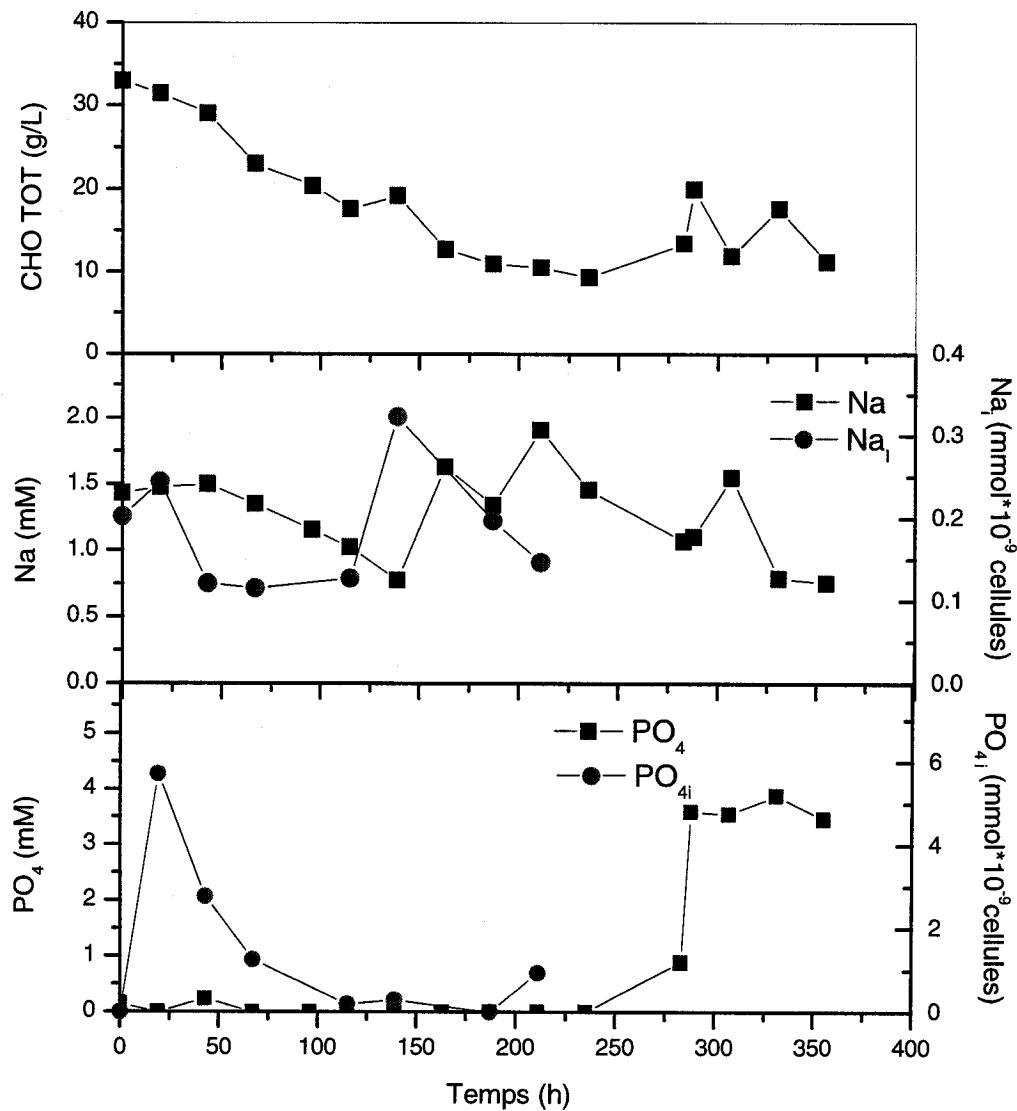
La culture IH12 effectuée dans un bioréacteur de 3L muni d'une hélice à ruban hélicoïdal simple a servi à raffiner le suivi du  $\text{PO}_4$  intracellulaire. Une biomasse sèche de  $18,0 \text{ g M.S}^{-1}\text{L}^{-1}$  et une concentration cellulaire de  $12,5 \times 10^9 \text{ cellules.L}^{-1}$  ont été obtenues à partir d'un inoculum dont la biomasse sèche était de  $2,4 \text{ g M.S.L}^{-1}$  et la concentration cellulaire de  $0,9 \times 10^9 \text{ cellules L}^{-1}$  (Figure 4.13). L'arrêt de croissance est survenu vers 235h. Vers 235h la croissance en biomasse sèche ainsi qu'en biomasse humide

avaient atteint un plateau (Figure 4.13). Le taux de croissance globale en concentration cellulaire était de  $0,008 \text{ h}^{-1}$  ce qui correspond à un temps de division de 87 h. Le taux de croissance globale en biomasse sèche était de  $0,007 \text{ h}^{-1}$ .



**Figure 4.13: Courbes de croissance, évolution du rapport masse humide/masse sèche et densité cellulaire pour la culture IH12**

Le milieu utilisé dans le cas de la culture IH12 était du 1,5\*B5. La concentration en hydrates de carbone était de  $33 \text{ g.L}^{-1}$  en début de culture et a été maintenue au dessus de  $10 \text{ g.L}^{-1}$  durant toute la culture (Figure 4.14). Par conséquent les cellules n'ont pas été limitées en hydrates de carbone.

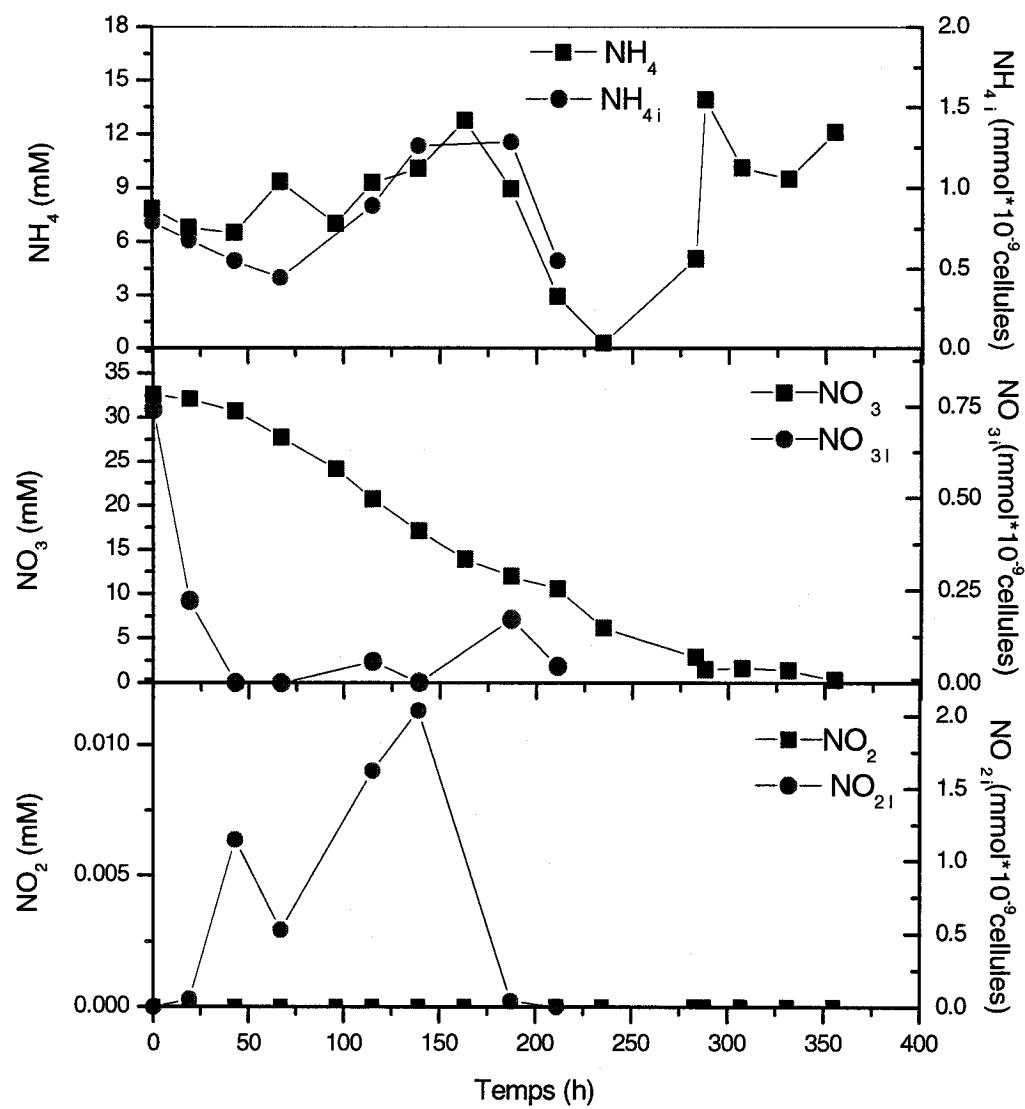


**Figure 4.14: courbes de consommation des hydrates de carbone, du sodium et du phosphate pour la culture IH12**

Le phosphate est absorbé durant les premières 24 h qui suivent l'inoculation et après l'ajout de 1.27 mM effectué à 145 h et l'ajout de 1.34 mM effectué à 194 h (Figure 4.14). Malgré les ajouts, la concentration du phosphate dans le milieu de culture était restée à zéro (Figure 4.14). Le largage du phosphate par les cellules dans le milieu a débuté vers 283 h de culture.

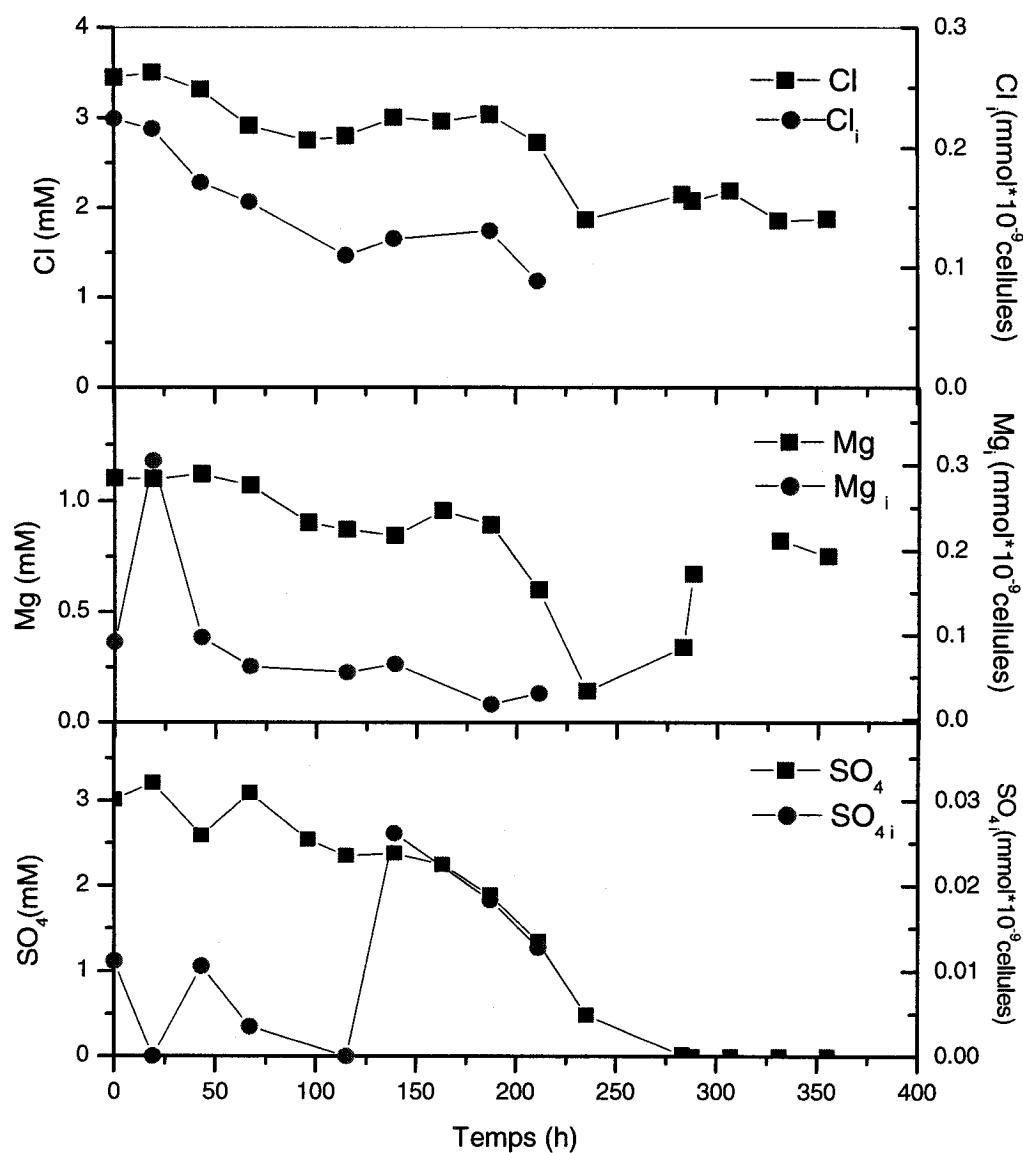
Pour ce qui est du phosphate intracellulaire, les cellules qui constituaient l'inoculum n'avaient plus de phosphate en réserve. Pendant les premières 24 h de cultures, les cellules ont absorbé le phosphate ce qui a fait augmenter la concentration du phosphate intracellulaire. Dépassé 24 h, la concentration du phosphate intracellulaire s'est mise à baisser pour atteindre zéro vers 115h. La baisse du phosphate intracellulaire est une preuve de son utilisation par les cellules. Malgré l'ajout de phosphate dans le milieu de culture à 145 h, la concentration du phosphate extracellulaire ainsi que la concentration du phosphate intracellulaire demeurent à zéro. Ceci montre que les cellules utilisent rapidement le phosphate après l'avoir absorbé. Le deuxième ajout de phosphate a été effectué à 194 h. Après cet ajout la concentration du phosphate intracellulaire a augmenté de 0 à  $0,94 \text{ mmol} \cdot 10^{-9}$  cellules. En conclusion des ajouts plus fréquents et plus importants de phosphate sont nécessaires pour éviter que le phosphate extracellulaire et le phosphate intracellulaire ne soient à zéro au même temps et éviter des limitations dans le cas de ce nutriment.

Entre 211 et 235 h l'ammonium était probablement limitant puisque sa concentration était en dessous de 5 mM (figure 4.15). Ceci pourrait être à l'origine de l'arrêt de croissance. A partir de 288 h et jusqu'en fin de culture la concentration du nitrate est en dessous de 3 mM (figure 4.15).

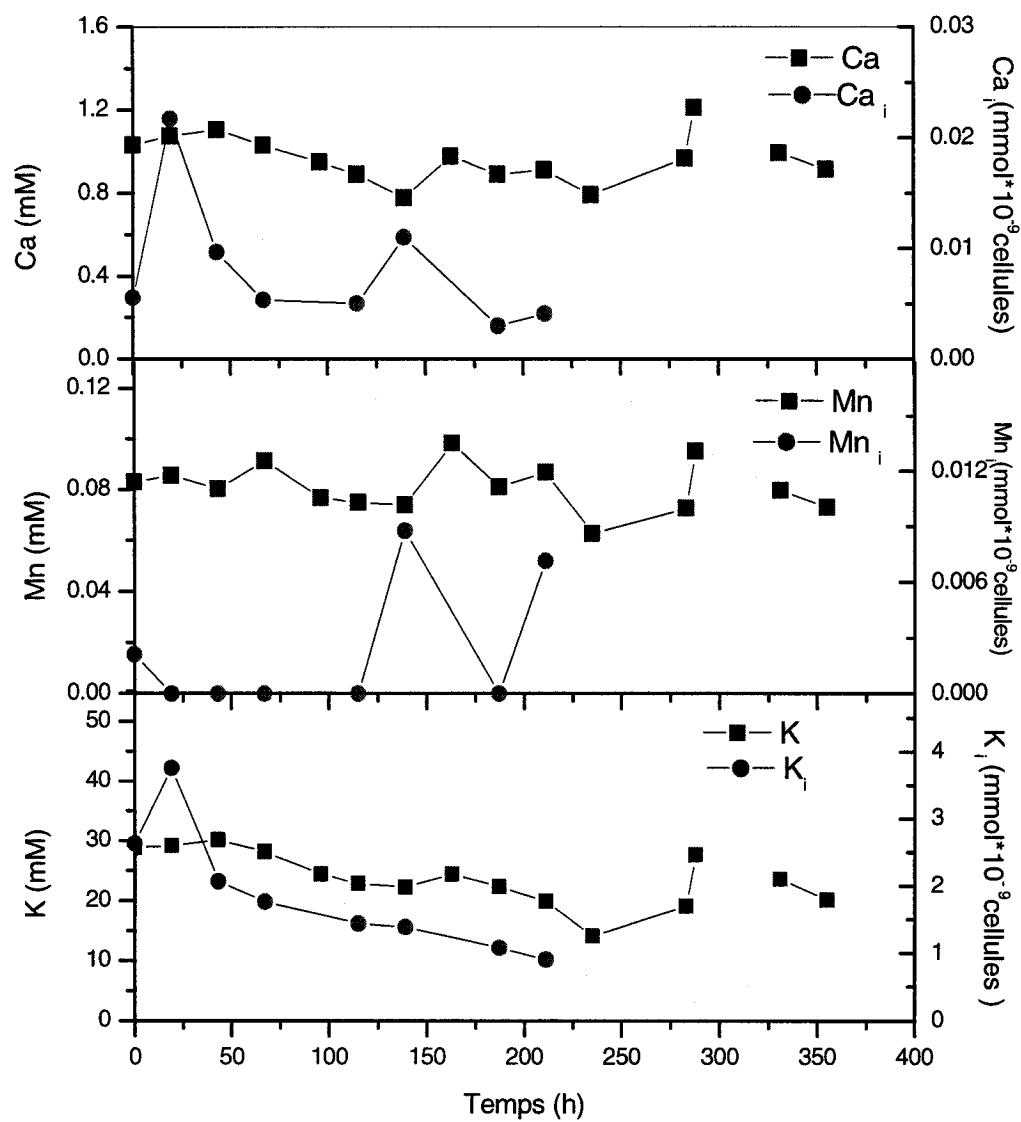


**Figure 4.15: Courbes de consommation de l'ammonium, du nitrate et du nitrite pour la culture IH12**

Le chlore, le magnésium, le sulfate (figure 4.16), le sodium (figure 4.14), le calcium, le manganèse et le potassium (Figure 4.17) étaient disponibles durant toute la culture.



**Figure 4.16: Courbes de consommation du chlore, du magnésium et du sulfate pour la culture IH12**



**Figure 4.17: courbes de consommation du calcium, du manganèse et du potassium pour la culture IH 12**

#### **4.3 Contrôle manuel du phosphate intracellulaire à $0,5 \text{ mmol} \cdot 10^{-9} \text{ cellules}$**

Suite aux résultats obtenus avec la culture IH12 où il y a eu un suivi du phosphate intracellulaire, le contrôle de celui ci s'avère important. Ceci afin d'éviter que phosphate intracellulaire ainsi que le phosphate extracellulaire ne soient à zéro au même temps et par conséquent éviter une limitation dans le cas de ce nutriment.

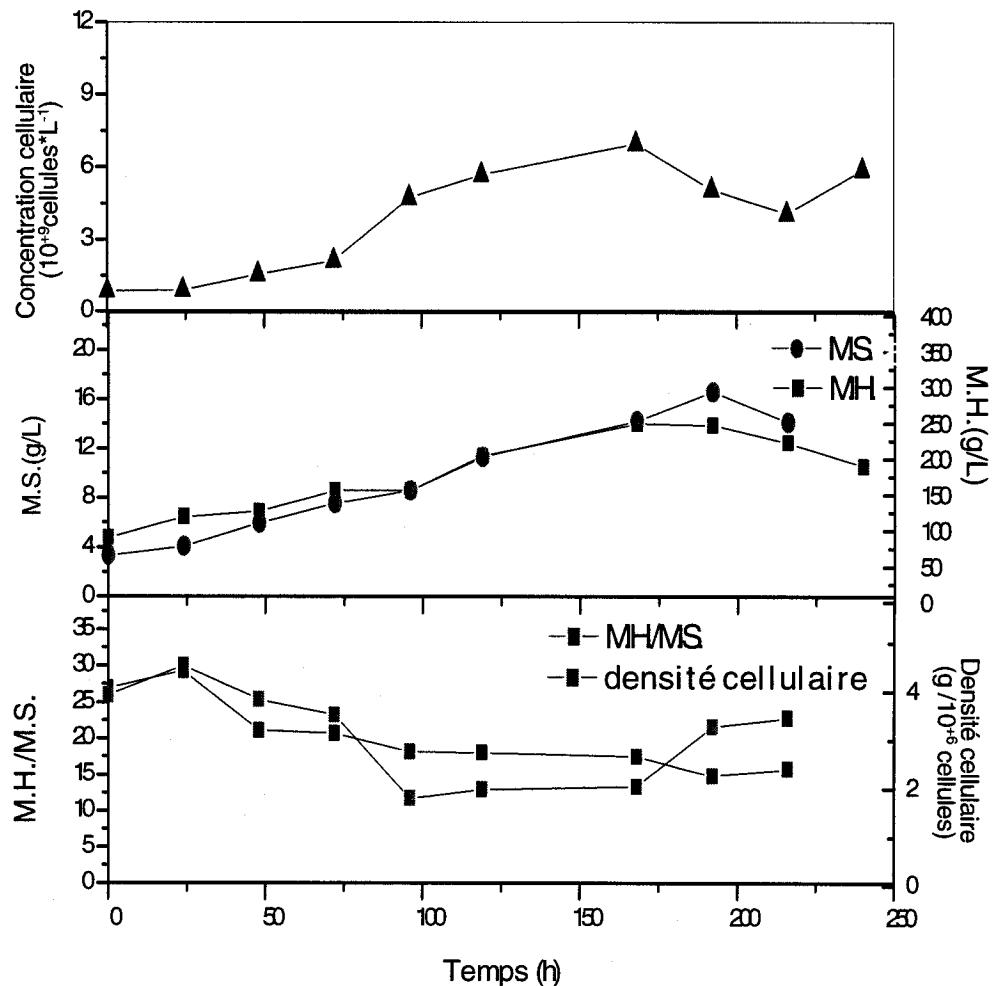
Les cultures IH17 et IH18 ont été effectuées en même temps avec le même inoculum et dans les mêmes conditions d'opération. La concentration du  $\text{PO}_4$  intracellulaire a été contrôlée à  $0,5 \text{ mmol} \cdot 10^{-9} \text{ cellules}$  dans le cas de ces deux cultures.

Le milieu de culture utilisé pour les cultures IH17 et IH18 est différent de celui utilisé pour les cultures précédentes. La concentration de glucose a été baissée à moins de  $20 \text{ g.L}^{-1}$ . Même si dans la littérature aucun lien n'a été établi entre la formation de mousse et la concentration de sucre dans le milieu de culture, les cultures précédentes ont permis de constater qu'il y a formation de mousse dès les premières heures de culture dans le cas de milieux contenant une concentration élevée de sucre. Il y a aussi formation de mousse dans les heures qui suivent un ajout important de ce nutriment. La concentration de nitrate a été baissée à  $10 \text{ mM}$ . Selon Sirois (2000), la consommation de nitrate par les cellules est proportionnelle à sa concentration dans le milieu de culture. Comme le nitrate représente une des deux sources d'azote dans le milieu de culture, une grande consommation de nitrate peut provoquer une diminution dans la consommation d'ammonium. Il n'est pas

souhaitable que le nitrate devienne la source principale d'azote pour les cellules parce que selon Sirois (1997) et Coelho (2000) c'est l'ammonium qui maintient les cellules en division active et les empêche les cellules de grossir.

Pour la culture IH17, une biomasse sèche de  $16,6 \text{ g M.S}^{-1}\text{L}^{-1}$  et une concentration cellulaire de  $7,0 \times 10^{+9} \text{ cellules.L}^{-1}$  ont été obtenues à partir d'une biomasse de  $3,6 \text{ g M.S}^{-1}\text{L}^{-1}$  et d'une concentration cellulaire de  $0,85 \times 10^{+9} \text{ cellules.L}^{-1}$  (Figure 4.18). Le taux de croissance globale en concentration cellulaire était de  $0,013 \text{ h}^{-1}$  ce qui correspond à un temps de division de 53,3 h. Le taux de croissance globale en biomasse sèche était  $0,0083 \text{ h}^{-1}$ . A` partir de 192 h le nombre de cellules ainsi que la biomasse humide avaient commencé à baisser. La croissance en biomasse sèche avait commencé à baisser à partir de 216 h.

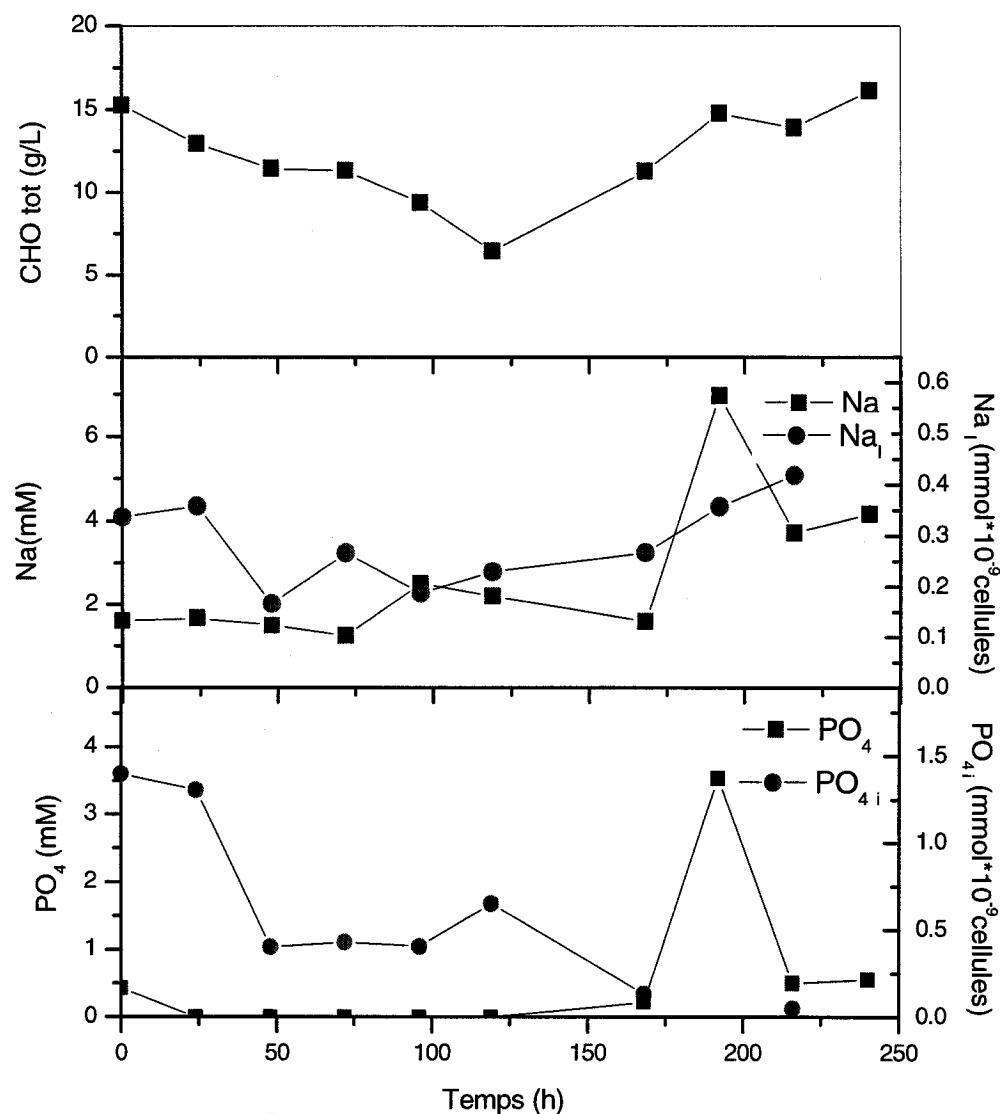
Pour le glucose, il fallait maintenir la concentration au-dessus de  $10 \text{ g.L}^{-1}$ . Vers 96 h le glucose était à  $9,4 \text{ g.L}^{-1}$  (figure 4.19). Malgré un ajout de ce nutriment le glucose est resté en dessous de  $10 \text{ g.L}^{-1}$  jusqu' à environ 168h heure à laquelle la concentration du glucose était remontée au-dessus du point de consigne pour être à  $11,3 \text{ g.L}^{-1}$ . Le glucose a peut être été limitant entre 96 et 168 h et par conséquent à l'origine de l'arrêt de croissance.



**Figure 4.18: Courbes de croissance, évolution du rapport masse humide/masse sèche et densité cellulaire pour la culture IH17**

La figure 4.19 montre l'évolution du phosphate extracellulaire et intracellulaire pour la culture IH17. Comme c'était le cas pour les cultures précédentes, le phosphate est absorbé rapidement durant les premières 24 h de culture et

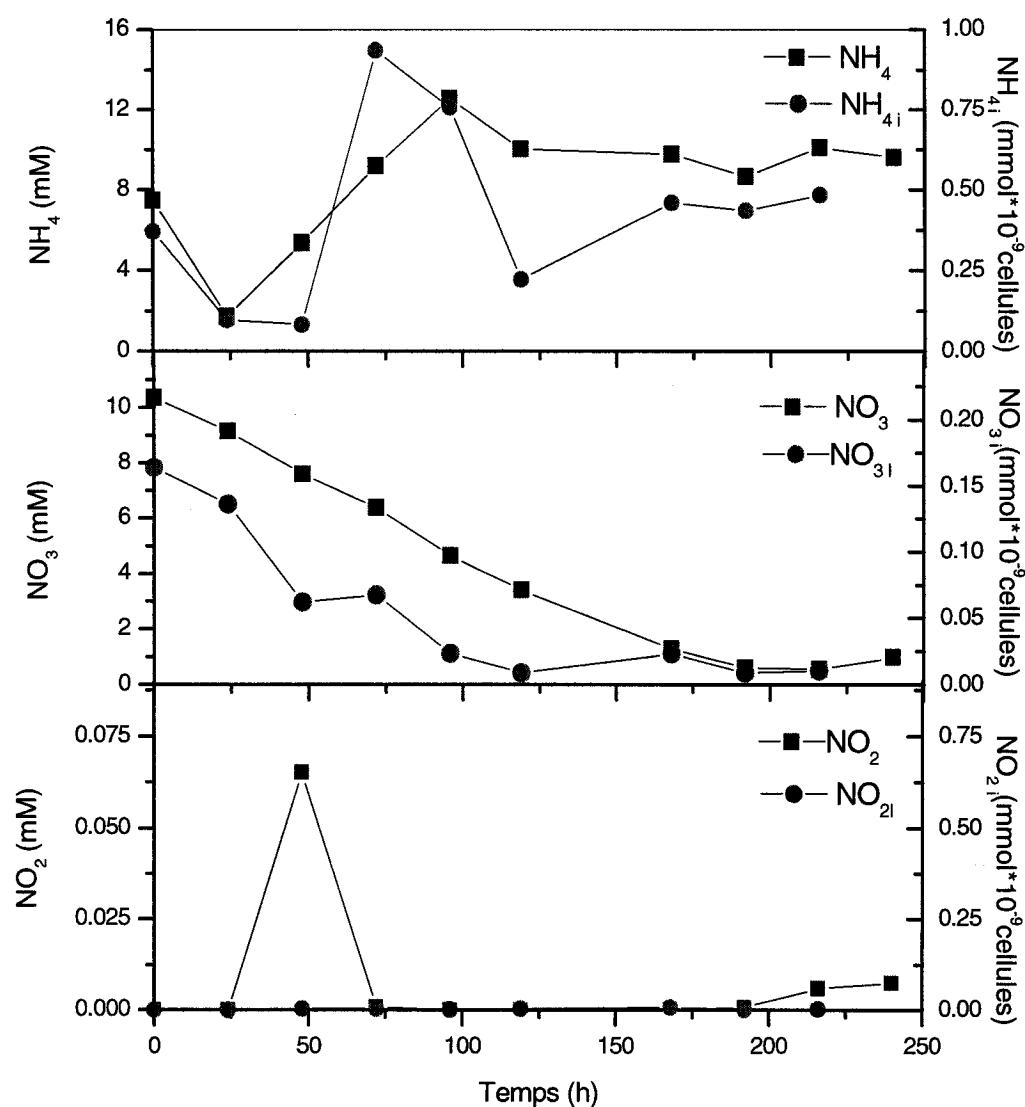
après chaque ajout. Les premières 24 h de culture le phosphate intracellulaire était de  $1,4 \text{ mmol} \cdot 10^{-9}$  cellules. Après 24 h de culture le phosphate intracellulaire s'est mis à baisser pour atteindre une concentration de  $0,4 \text{ mM} \cdot 10^{-9}$  cellules. Grâce à des ajouts fréquents de phosphate, la concentration du phosphate intracellulaire a été maintenue à environ  $0,5 \text{ mmol} \cdot 10^{-9}$  cellules entre 48 et 119 h. Vers 168 h la concentration du phosphate intracellulaire a baissé presque à zéro.



**Figure 4.19: Courbes de consommation du glucose, du sodium et du phosphate pour la culture IH17**

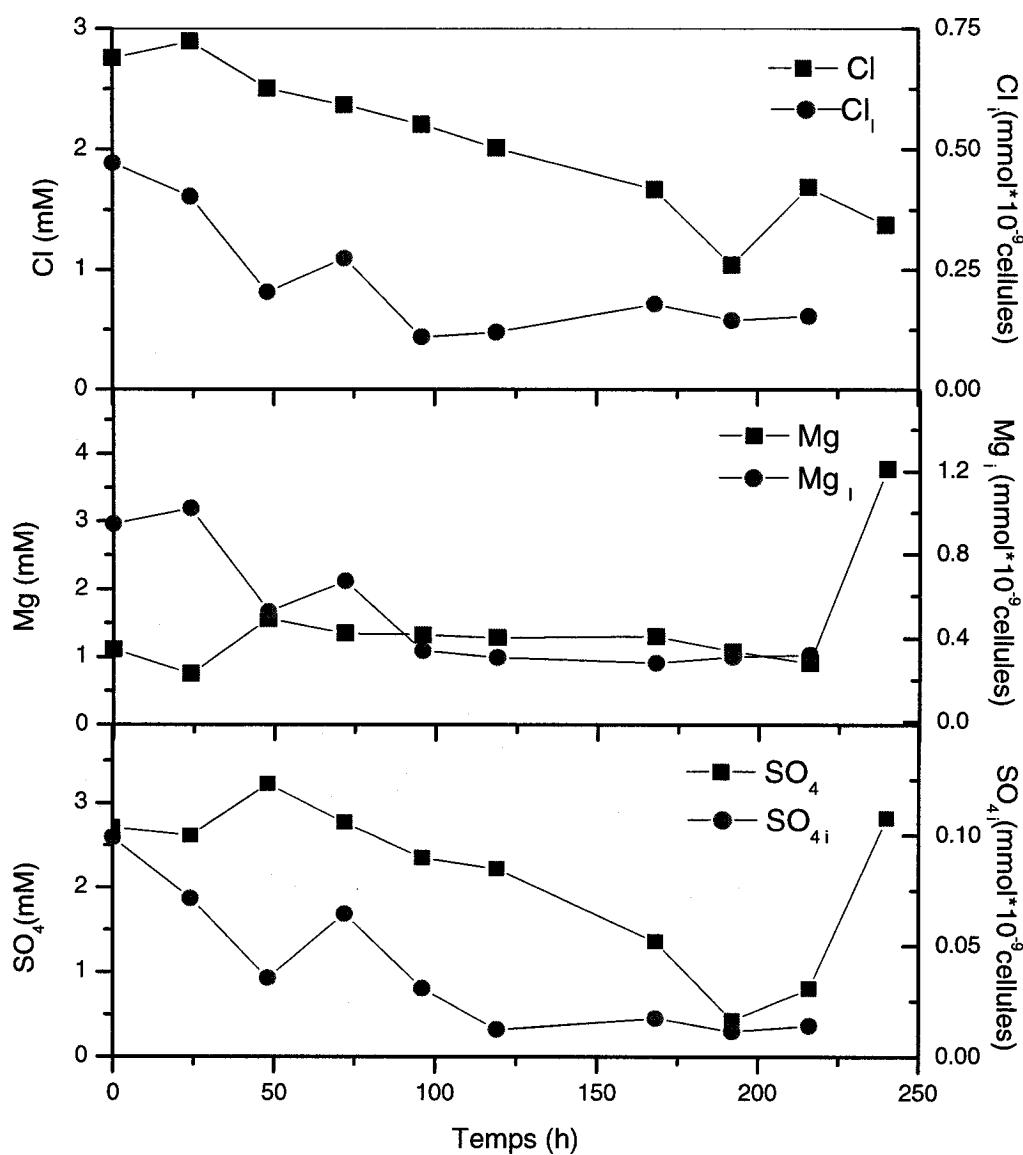
A partir de 168 h et jusqu'à l'arrêt de culture, la concentration du nitrate était en dessous de 3 mM (Figure 4.20). Ceci pourrait être à l'origine de l'arrêt de

croissance. Pour ce qui est de l'ammonium (figure 4.20), sa concentration était de 1.7 mM 24 h après le début de culture. Par la suite, des ajouts fréquents de ce nutriment ont permis de maintenir sa concentration au-dessus de 5 mM.

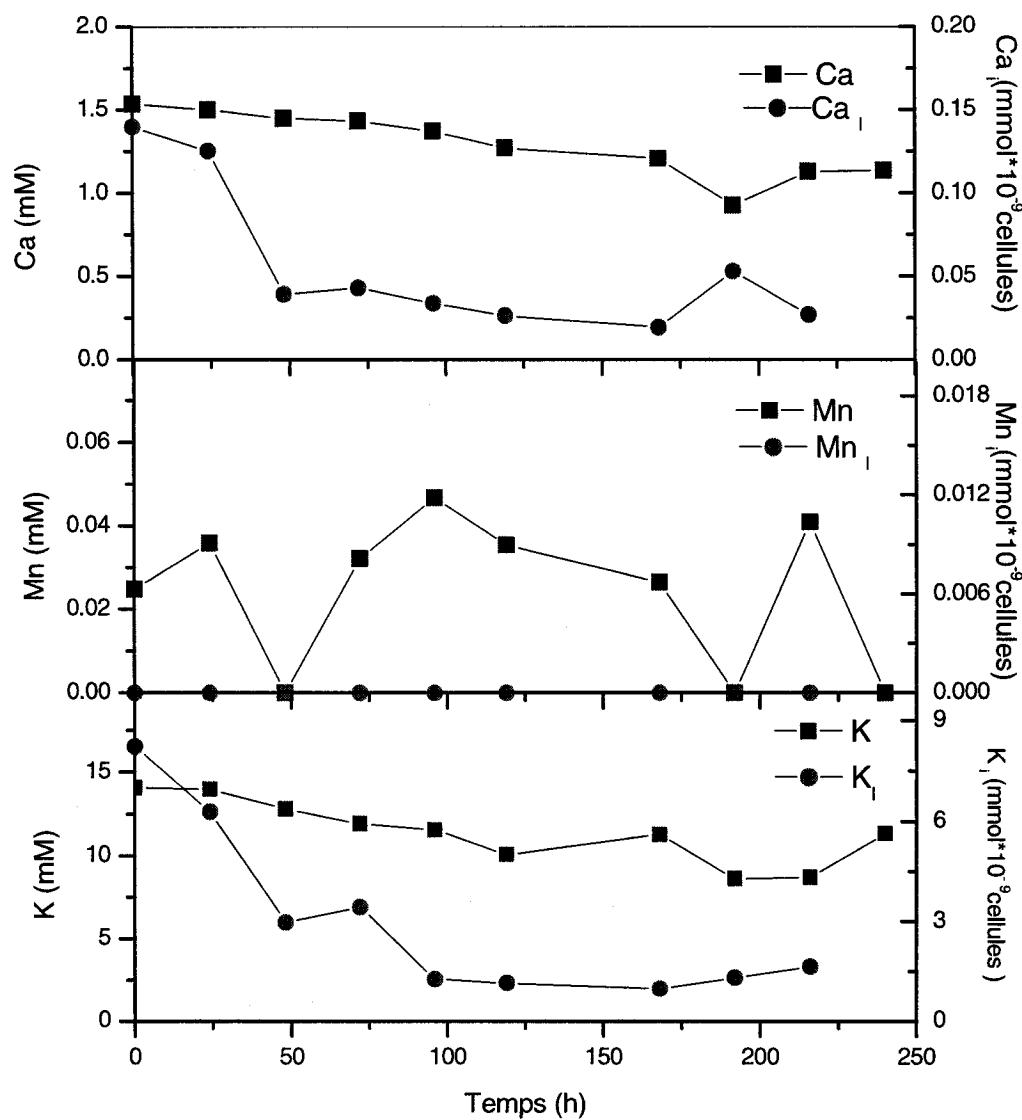


**Figure 4.20: Courbes de consommation de l'ammonium, du nitrate et du nitrite pour la culture IH17**

Le chlore, le magnésium, le sulfate (figure 4.21) et le calcium (Figure 4.22) étaient disponibles durant toute la culture. La concentration du potassium était plus basse comparée à celle des cultures précédentes (Figure 4.22). Elle était de 14,10 mM en début de culture comparé à une concentration se situant autour de 30,00 mM lors des cultures précédentes. Le potassium est ajouté comme contre ion avec le nitrate. Comme la concentration du nitrate a été baissée pour la culture IH17, il en résulte une baisse de la concentration du potassium.



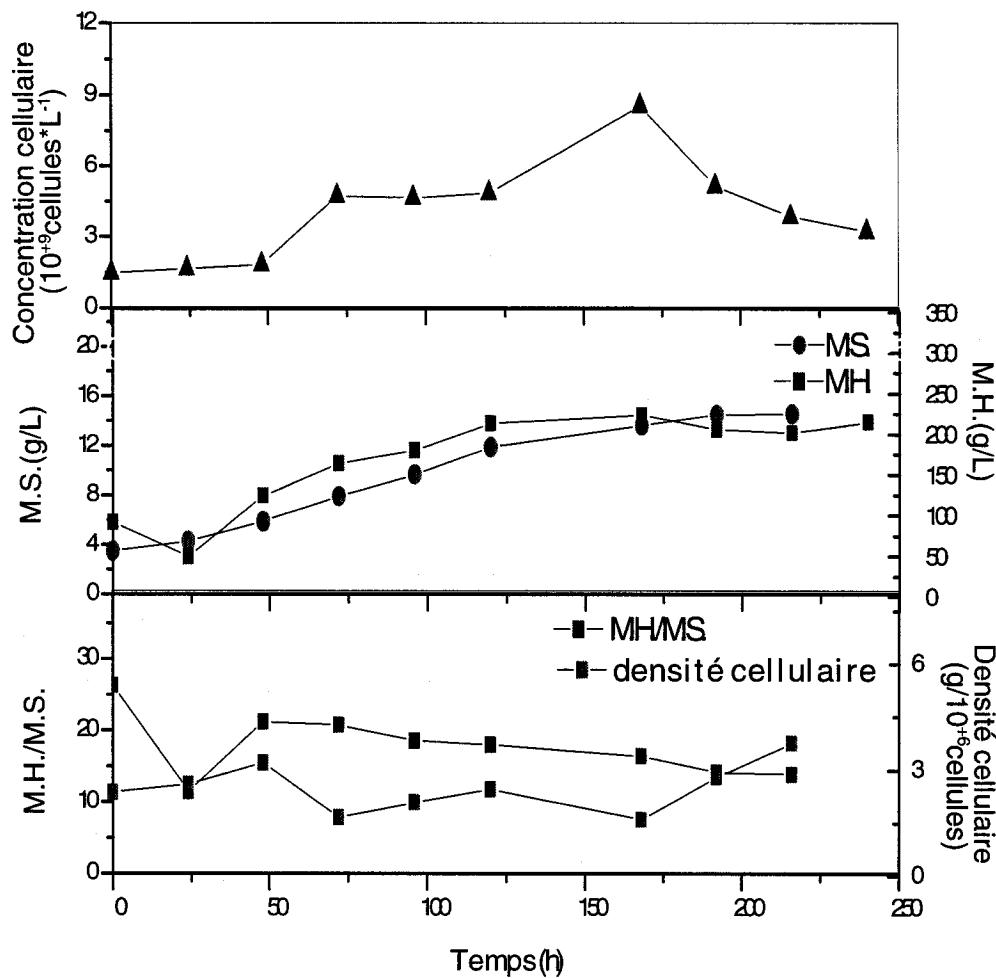
**Figure 4.21: Courbes de consommation du chlore, du magnésium et du sulfate pour la culture IH 17**



**Figure 4.22: Courbes de consommation du calcium, du manganèse et du potassium pour la culture IH 17**

Pour la culture IH18, une biomasse sèche de  $14,5 \text{ g M.S.L}^{-1}$  et une concentration cellulaire de  $8,5 \cdot 10^{10} \text{ cellules.L}^{-1}$  ont été obtenues à partir d'un

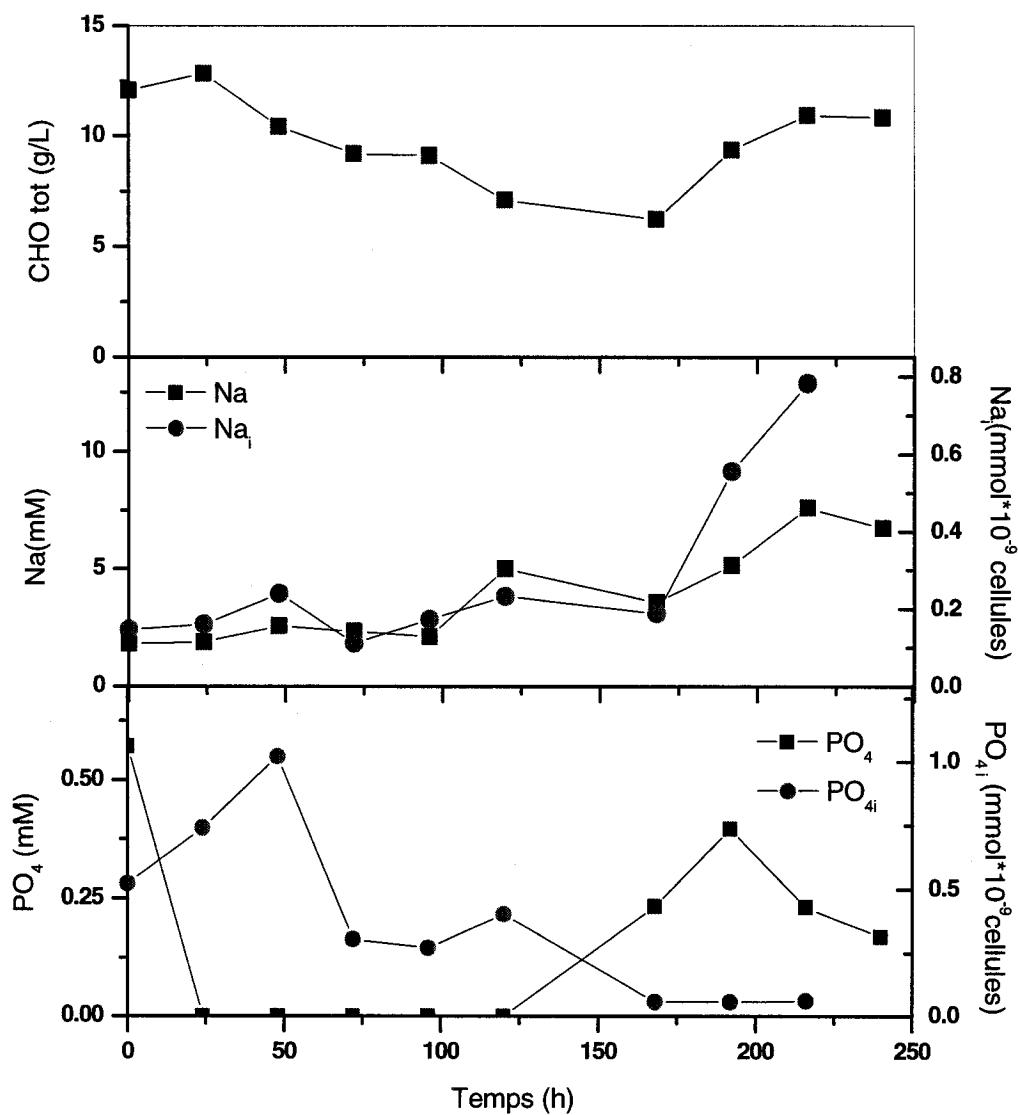
inoculum dont la biomasse sèche était de  $3,5 \text{ g M.S.L}^{-1}$  et la concentration cellulaire était de  $1,8 \cdot 10^{+9} \text{ cellules.L}^{-1}$  (Figure 4.23). La croissance globale en concentration cellulaire était de  $0,010 \text{ h}^{-1}$  ce qui correspond à un temps de division de 69 h. La croissance globale en biomasse sèche était de  $0,0066 \text{ h}^{-1}$ . Après 170 h de culture la concentration cellulaire avait commencé à baisser.



**Figure 4.23: Courbes de croissance, évolution du rapport masse humide/masse sèche et densité cellulaire pour la culture IH18**

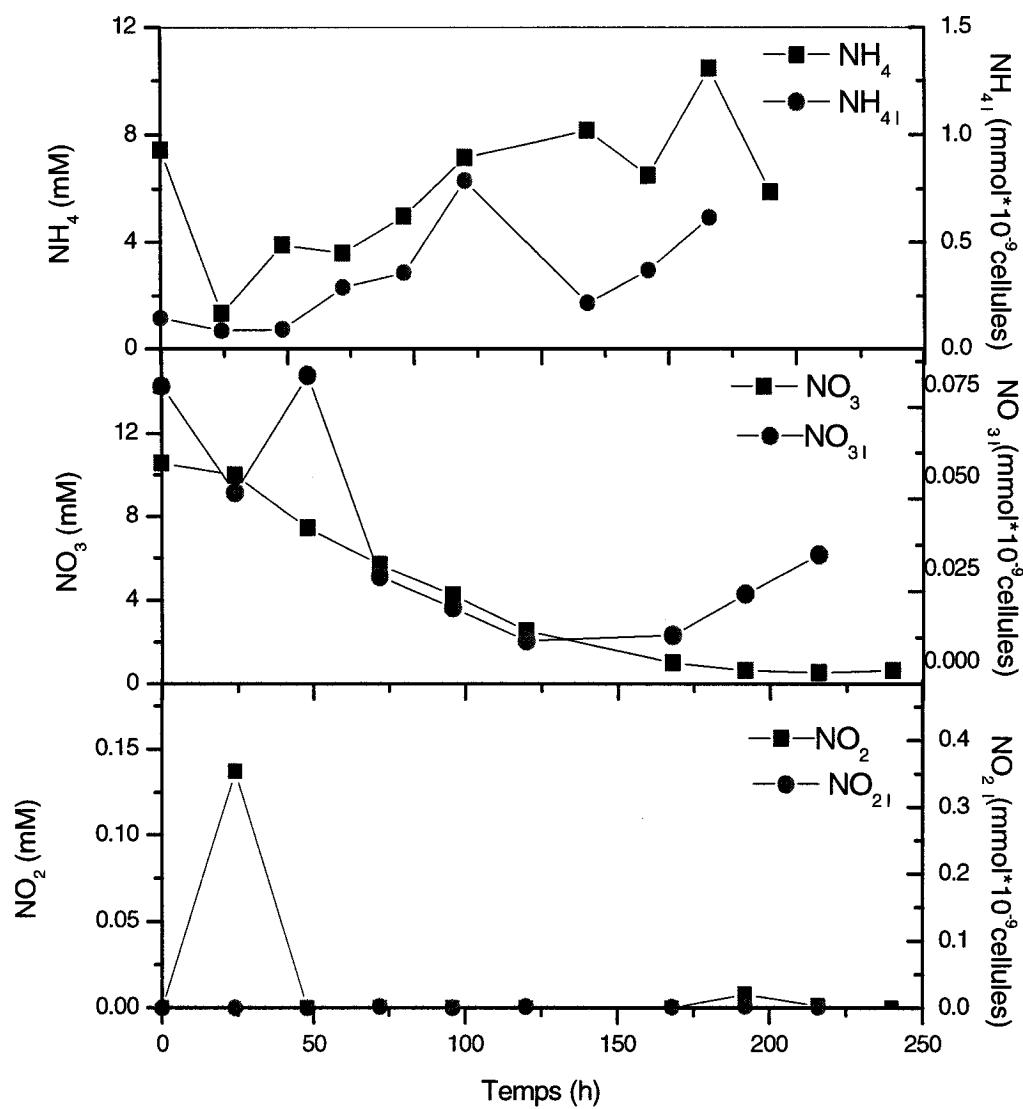
La concentration du glucose était en dessous de  $10 \text{ g.L}^{-1}$  entre 72 et 192 h (Figure 4.24). Ceci pourrait être à l'origine de l'arrêt de croissance survenu après 168 h de culture.

Le phosphate est absorbé rapidement durant les premières 24 h de culture et après chaque ajout de ce nutriment (Figure 4.24). L'inoculum contenait 0,57 mmol phosphate. $10^{-9}$  cellules. Avec le phosphate contenu dans le milieu frais et qui a été absorbé rapidement en début de culture, le phosphate intracellulaire a augmenté jusqu'à 1 mmol. $10^{-9}$  cellules. Dépassé 48 h, il a baissé pour se stabiliser à environ 0,5 mmol. $10^{-9}$  cellules. Entre 72 et 120 h, le phosphate intracellulaire a été maintenu à environ 0,5 mmol. $10^{-9}$  cellules grâce à des ajouts fréquents de ce nutriment. Vers 168 h et jusqu'en fin de culture, le phosphate intracellulaire était à zéro.



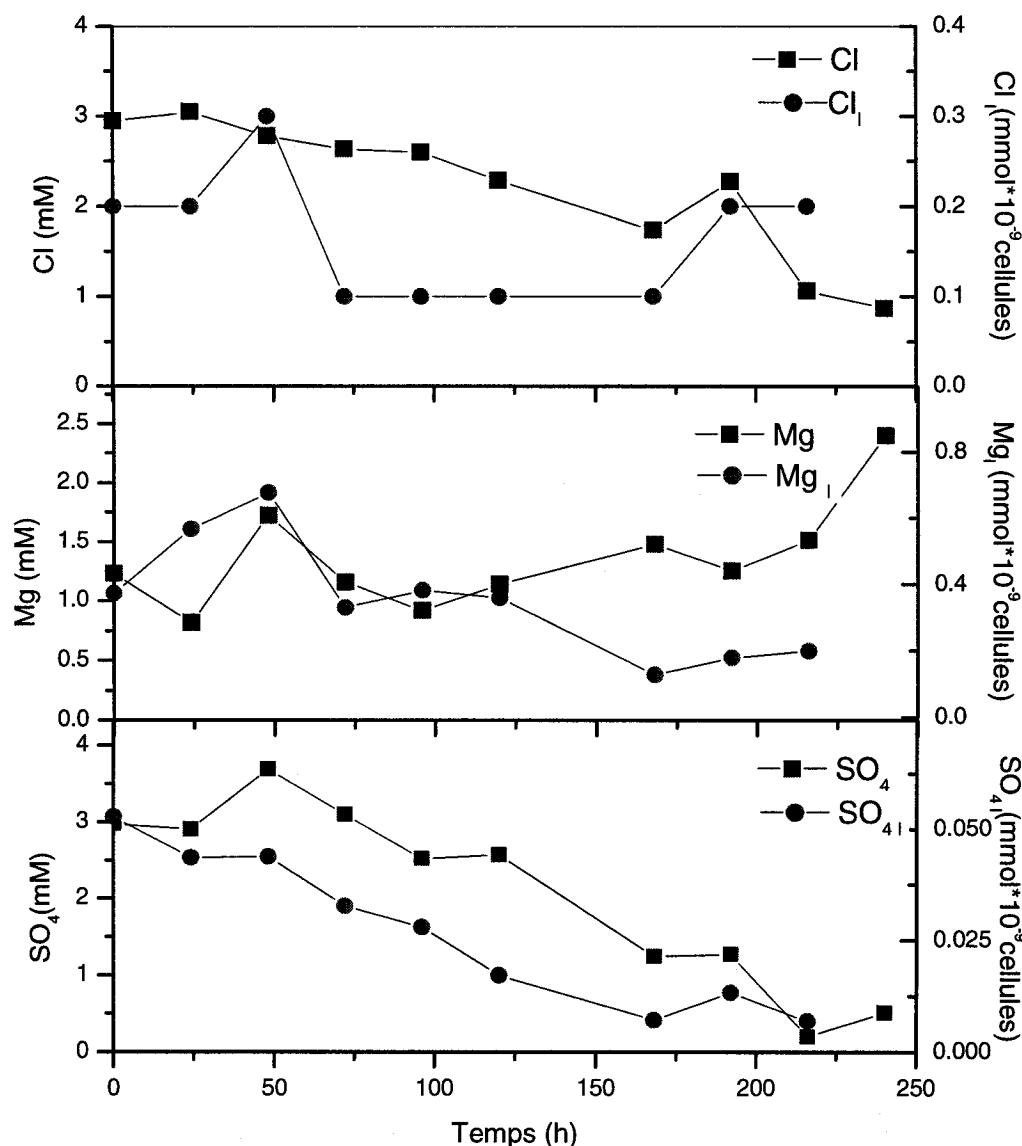
**Figure 4.24: Courbes de consommation du glucose, du sodium et du phosphate pour la culture IH18**

La concentration du nitrate était en dessous de 3 mM à partir de 120h jusqu'à l'arrêt de la culture (Figure 4.25). Malgré les ajouts quotidiens du nitrate, ce nutriment est resté en dessous du point de consigne qui est de 3 mM. Ceci pourrait être à l'origine de l'arrêt de croissance qui s'est produit vers 168h. La concentration de l'ammonium était en dessous de 5 mM à partir de 24 h jusqu'à environ 72 h de culture (Figure 4.25). Ceci pourrait être aussi la cause de l'arrêt de croissance cellulaire.



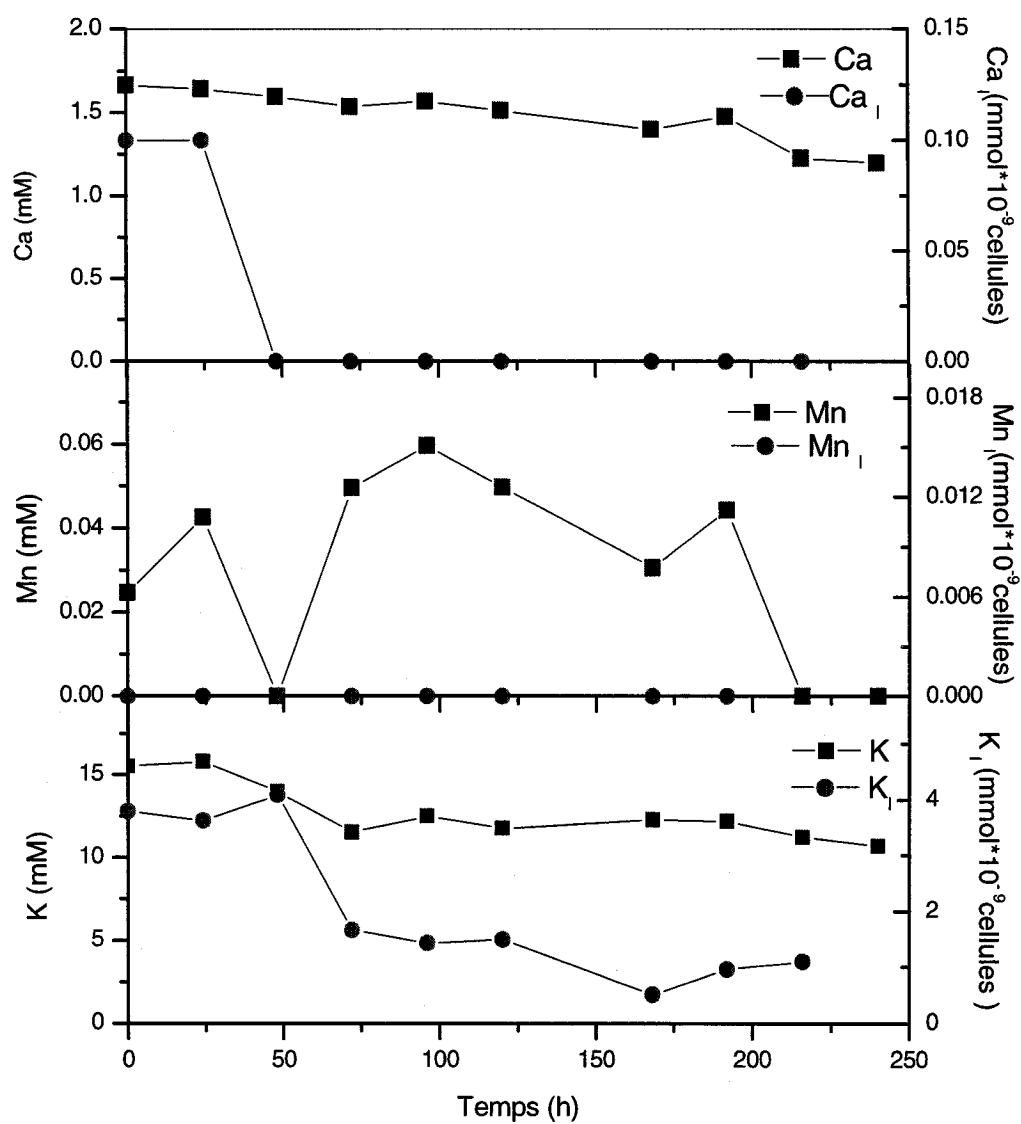
**Figure 4.25: Courbes de consommation de l'ammonium, du nitrate et du nitrite pour la culture IH18**

Le chlore, le magnésium, le sulfate (figure 4.26) et le calcium (figure 4.27) étaient présents dans le milieu durant toute la culture.



**Figure 4.26: Courbes de consommation du chlore, du magnésium et du sulfate pour la culture IH 18**

Comme pour la culture IH17 la concentration du potassium pour la culture IH18 était plus basse comparée à celle des cultures précédentes (Figure 4.27). Le potassium est ajouté comme contre ion avec le nitrate. Baisser la concentration du nitrate dans le cas de la culture IH17 et IH 18 a eu pour résultat une baisse de la concentration du potassium.

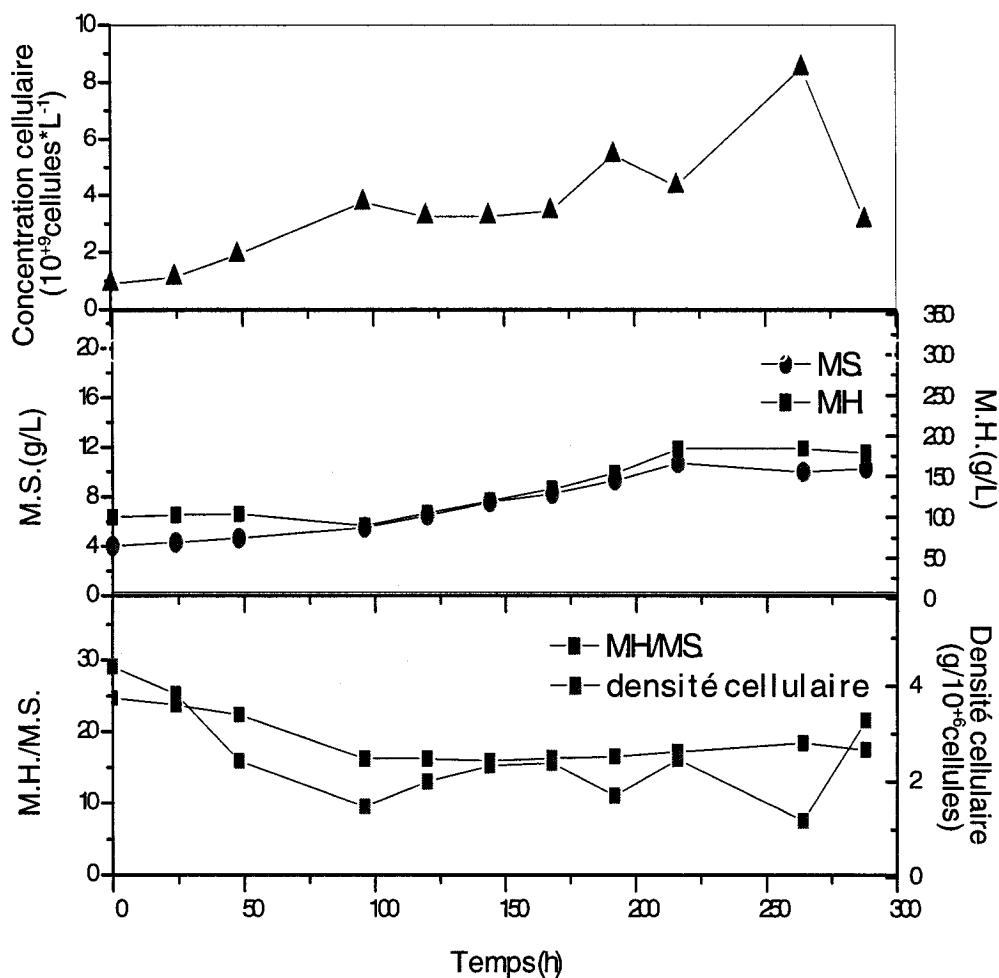


**Figure 4.27: Courbes de consommation du calcium, du manganèse et du potassium pour la culture IH 18**

#### 4.4 Contrôle manuel du phosphate intracellulaire à $1 \text{ mmol} \cdot 10^9 \text{ cellules}$

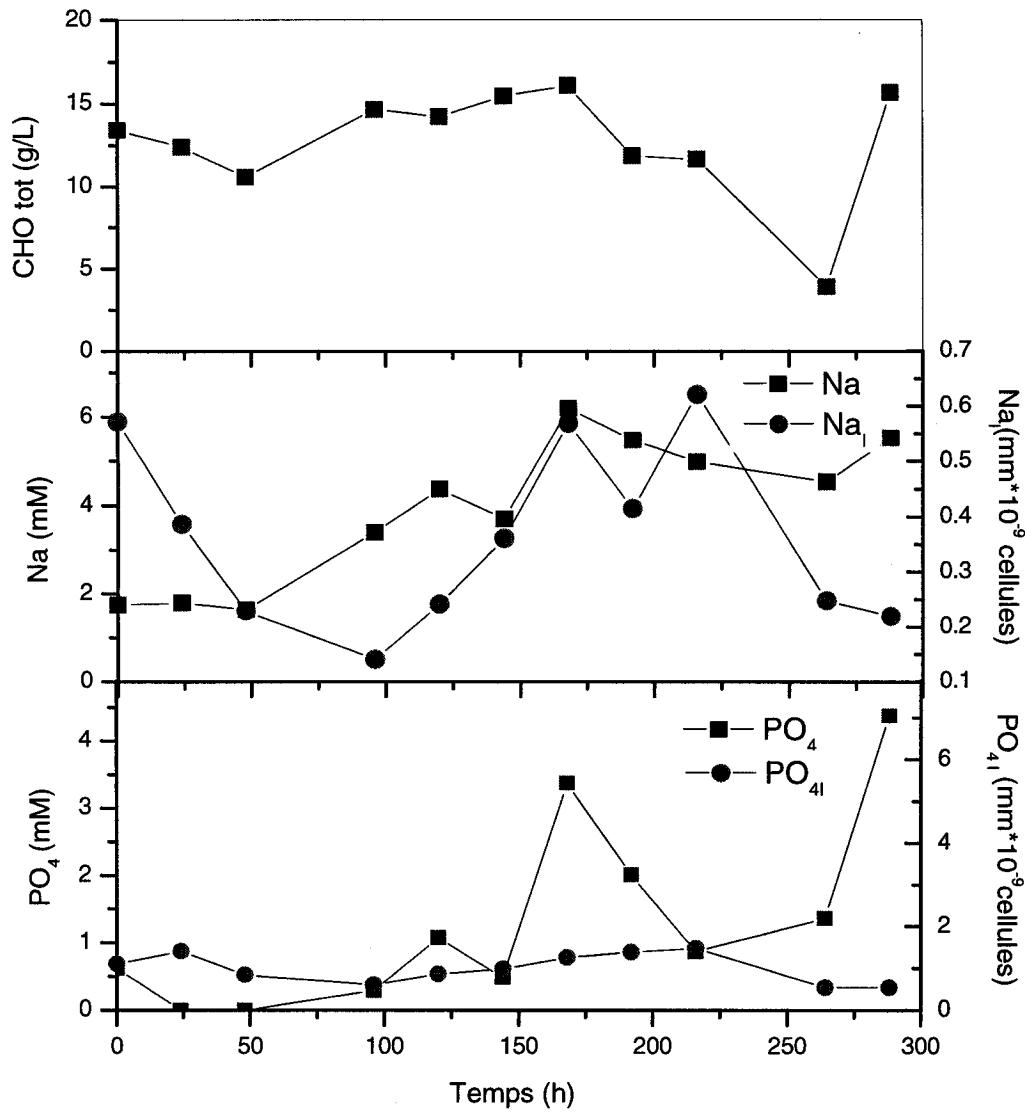
Les cultures IH24 et IH25 ont été effectuées en même temps et avec les mêmes conditions d'opération. Le milieu de culture utilisé pour ces deux cultures est le même que celui utilisé pour les cultures IH17 et IH18. Pour les cultures IH24 et IH25 les ajouts de nutriments ont été effectués en se basant sur les mesures de la concentration des nutriments dans le milieu de culture. Après chaque mesure par HPLC des ajouts étaient effectués au besoin pour maintenir le glucose à  $10 \text{ g.L}^{-1}$ , le nitrate à  $3 \text{ mM}$ , l'ammonium à  $5 \text{ mM}$  et le phosphate intracellulaire à  $1 \text{ mmol} \cdot 10^6 \text{ cellules}$ . La concentration des autres nutriments tel que le magnésium, le sulfate, le chlore, etc était maintenue au-dessus de  $0 \text{ mM}$ .

Pour la culture IH24, une biomasse sèche de  $10,1 \text{ g M.S.L}^{-1}$  et une concentration cellulaire de  $8,5 \cdot 10^9 \text{ cellules.L}^{-1}$  ont été obtenues à partir d'un inoculum dont la biomasse sèche était de  $4,1 \text{ g M.S.L}^{-1}$  et la concentration cellulaire était de  $0,90 \cdot 10^9 \text{ cellules.L}^{-1}$  (Figure 4.28). Le taux de croissance globale en concentration cellulaire était de  $0,0090 \text{ h}^{-1}$  ce qui représente un temps de division de 77 h. Le taux de croissance globale en biomasse sèche était de  $0,0045 \text{ h}^{-1}$ . La croissance en biomasse sèche et la croissance en biomasse humide avaient atteint un plateau à partir de 216 h quant au nombre de cellules, il a commencé à baisser après 264 h de culture.



**Figure 4.28: Courbes de croissance, évolution du rapport masse humide/masse sèche et densité cellulaire pour la culture IH24**

La concentration du glucose a été maintenue au dessus de  $10 \text{ g.L}^{-1}$  sauf en fin de culture à 264 h, où la concentration a baissé à  $4 \text{ g.L}^{-1}$  (Figure 4.29). Ceci pourrait être à l'origine de la baisse du nombre de cellules qui est survenu en même temps.



**Figure 4.29: Courbes de consommation du glucose, du sodium et du phosphate pour la culture IH24**

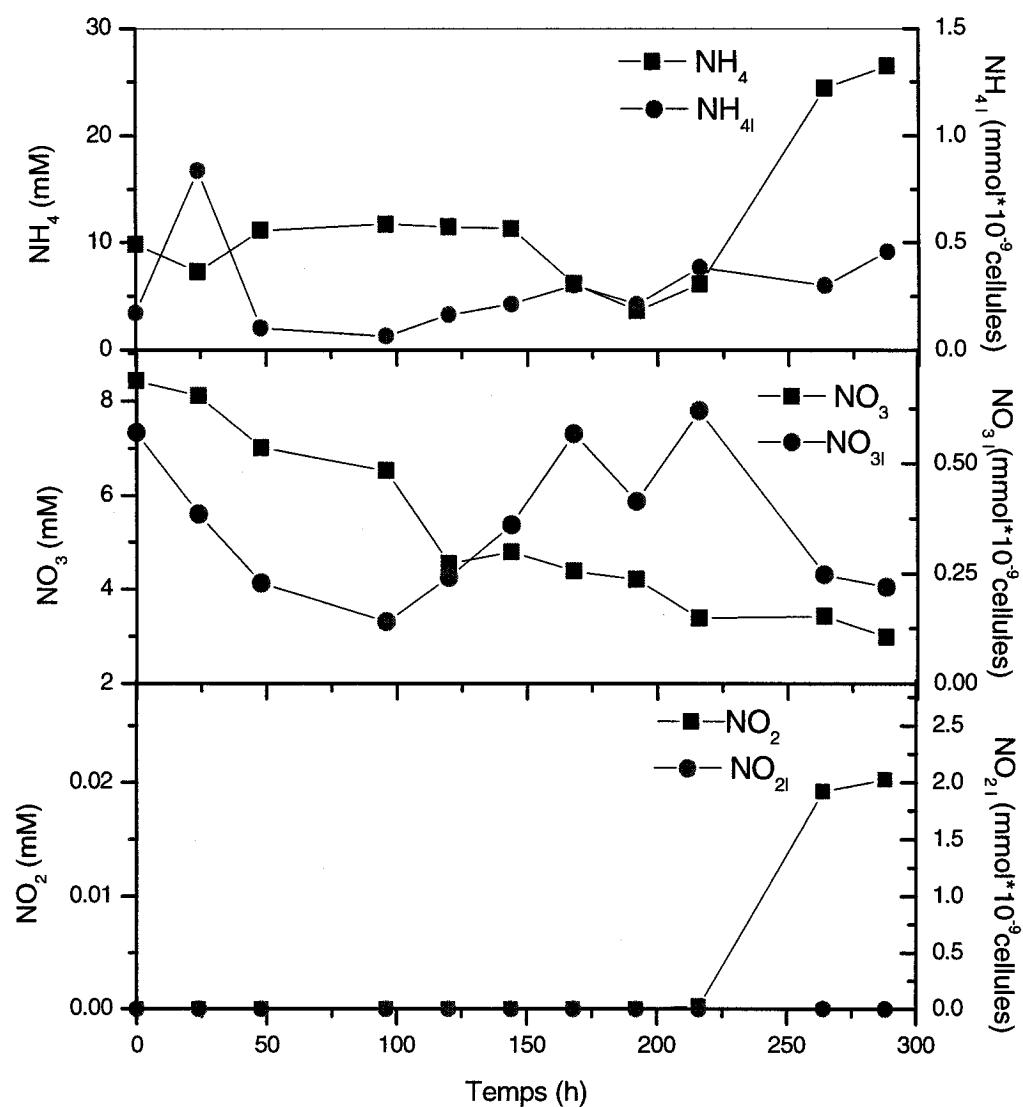
La figure 4.29 montre l'évolution du phosphate extracellulaire et intracellulaire pour la culture IH24. Le phosphate est absorbé rapidement durant les premières 24h de culture. Cependant, la concentration du phosphate dans le milieu n'est pas toujours à zéro comme c'était le cas avec les cultures précédentes. En effet une partie du phosphate demeure dans le milieu de culture 48h après un ajout important de ce nutriment comme c'est le cas à 144h où un ajout de 4,14 mM a été effectué.

Sakano et al (1995) ont remarqué que dans certaines conditions le phosphate n'est pas entièrement absorbé par les cellules et qu'une partie demeure dans le milieu de culture. En effet ils ont constaté que le phosphate est absorbé jusqu'à épuisement par les cellules appartenant à l'espèce *Catharanthus roseus* cultivées à une concentration cellulaire initiale de  $4 \cdot 10^{+5}$  cellules.ml<sup>-1</sup> dans du milieu MS contenant des concentrations initiales en phosphate de 1.25 mM et 2.5 mM. Cependant une partie du phosphate demeure dans le milieu de culture lorsque ces cellules sont cultivées dans les mêmes conditions mais à des concentrations initiales en phosphate de 5 mM et 10 mM.

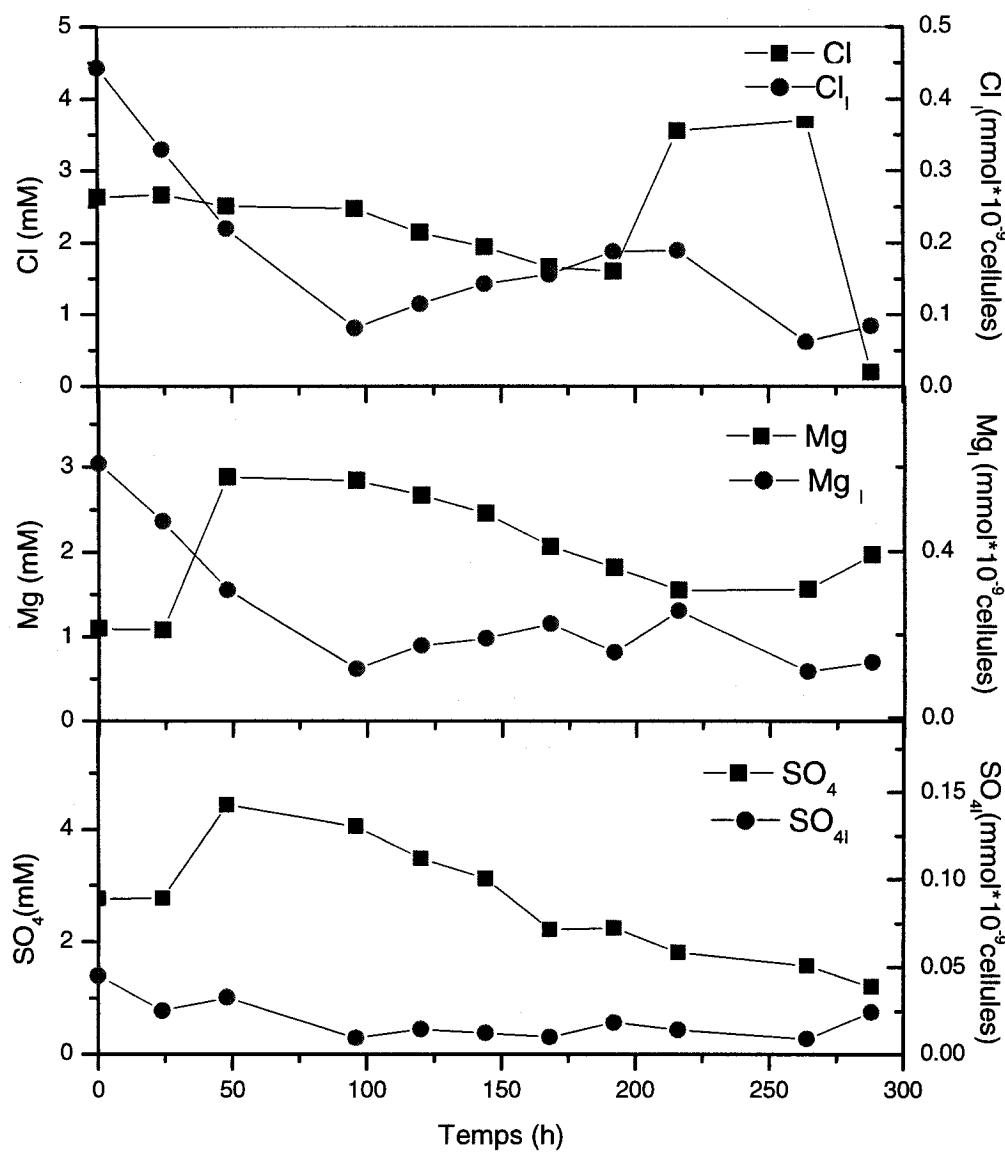
Les deux sources d'azote, le nitrate ainsi que l'ammonium étaient maintenues au-dessus du point de consigne tout le long de la culture (Figure 4.30). L'alimentation de l'ammonium à l'aide d'une pompe a permis de respecter le point de consigne dans le cas de ce nutriment.

La concentration du sulfate et celle du magnésium ont été augmentées à 3 mM dans le milieu de culture (figure 4.31). Ceci a été effectué comme

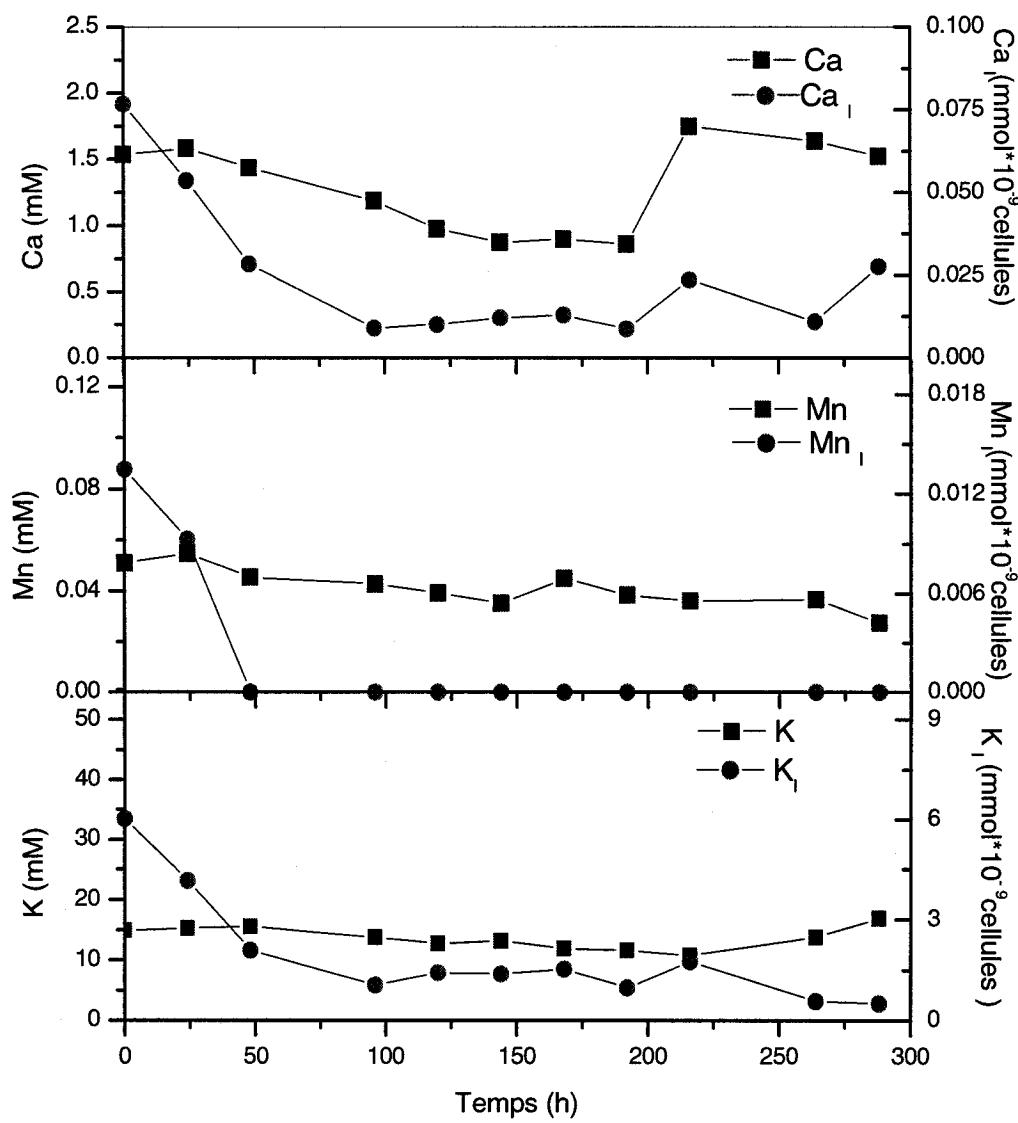
mesure préventive pour éviter l'épuisement de ces deux nutriments. Le sodium (figure 4.29), le chlore (figure 4.31) et le calcium (figure 4.32) étaient disponibles durant toute la culture. La concentration du potassium (figure 4.32) était plus basse comparée aux cultures IH11 et IH5-1. Elle variait autour de 15 mM.



**Figure 4.30: Courbes de consommation de l'ammonium, du nitrate et du nitrite pour la culture IH 24**

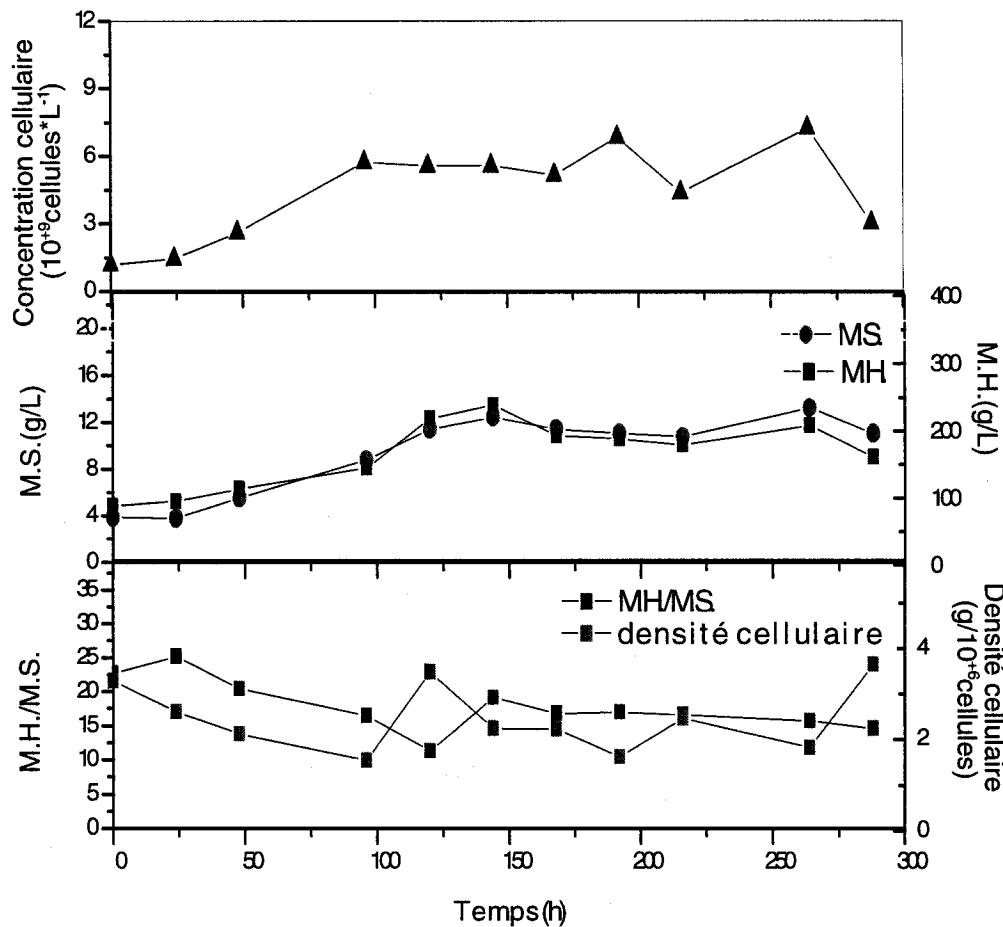


**Figure 4.31: Courbes de consommation du chlore, du magnésium et du sulfate pour la culture IH 24**



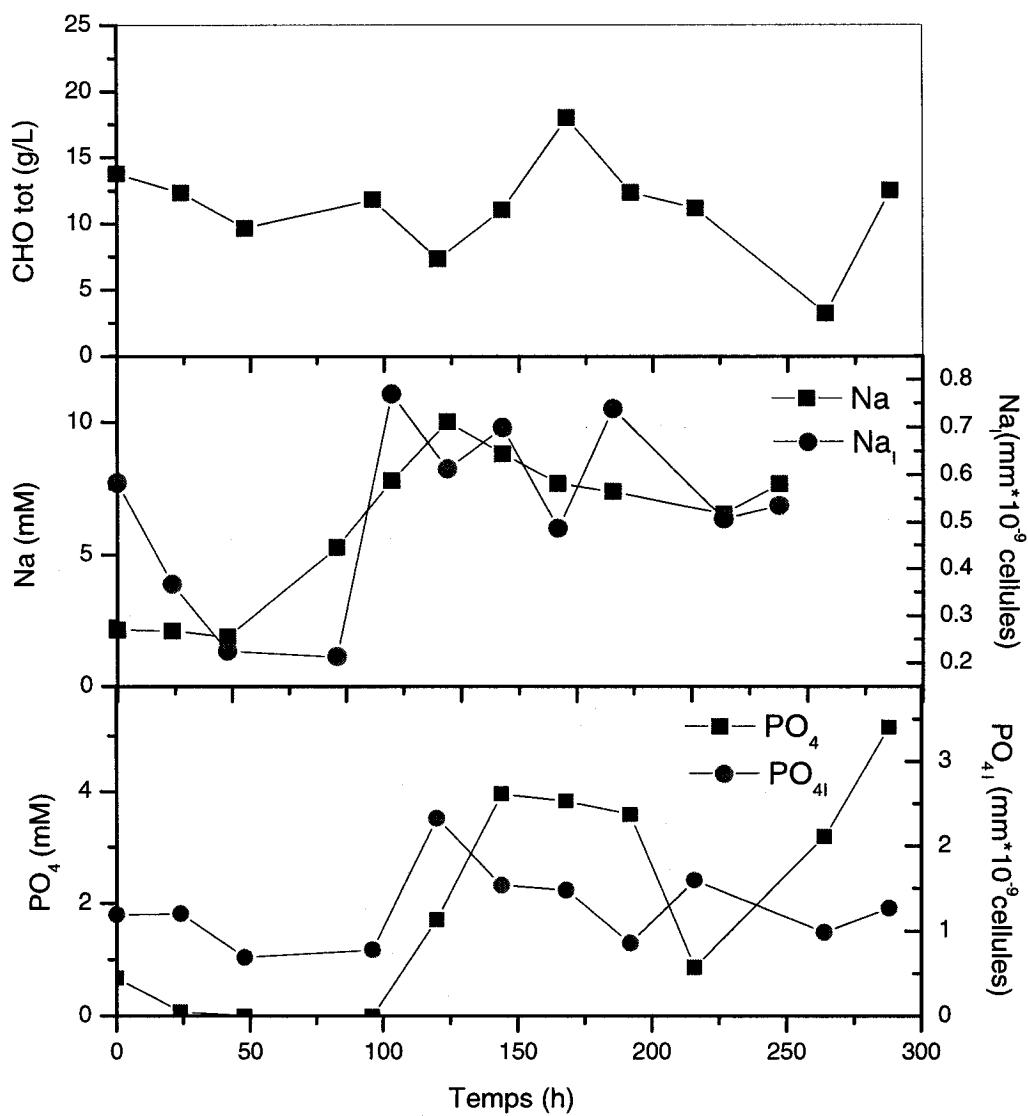
**Figure 4.32: Courbes de consommation du calcium, du manganèse et du potassium pour la culture IH 24**

Pour la culture IH25, une biomasse sèche de  $19,3 \text{ g M.S.L}^{-1}$  et une concentration cellulaire de  $7,2 \cdot 10^9 \text{ cellules.L}^{-1}$  ont été obtenues à partir d'un inoculum dont la biomasse était de  $3,9 \text{ g M.S.L}^{-1}$  et la concentration cellulaire était de  $1,2 \cdot 10^9 \text{ cellules.L}^{-1}$  (Figure 4.33). Le taux de croissance globale en concentration cellulaire était de  $0,007 \text{ h}^{-1}$  ce qui représente un temps de division de 99 h. Le taux de croissance globale en biomasse sèche était de  $0,046 \text{ h}^{-1}$ .



**Figure 4.33: Courbes de croissance, évolution du rapport masse humide/masse sèche et densité cellulaire pour la culture IH25**

La concentration du glucose a été en dessous du point de consigne vers 48, 120 et 264 h (4.34). Ceci pourrait être à l'origine de l'arrêt de croissance cellulaire.



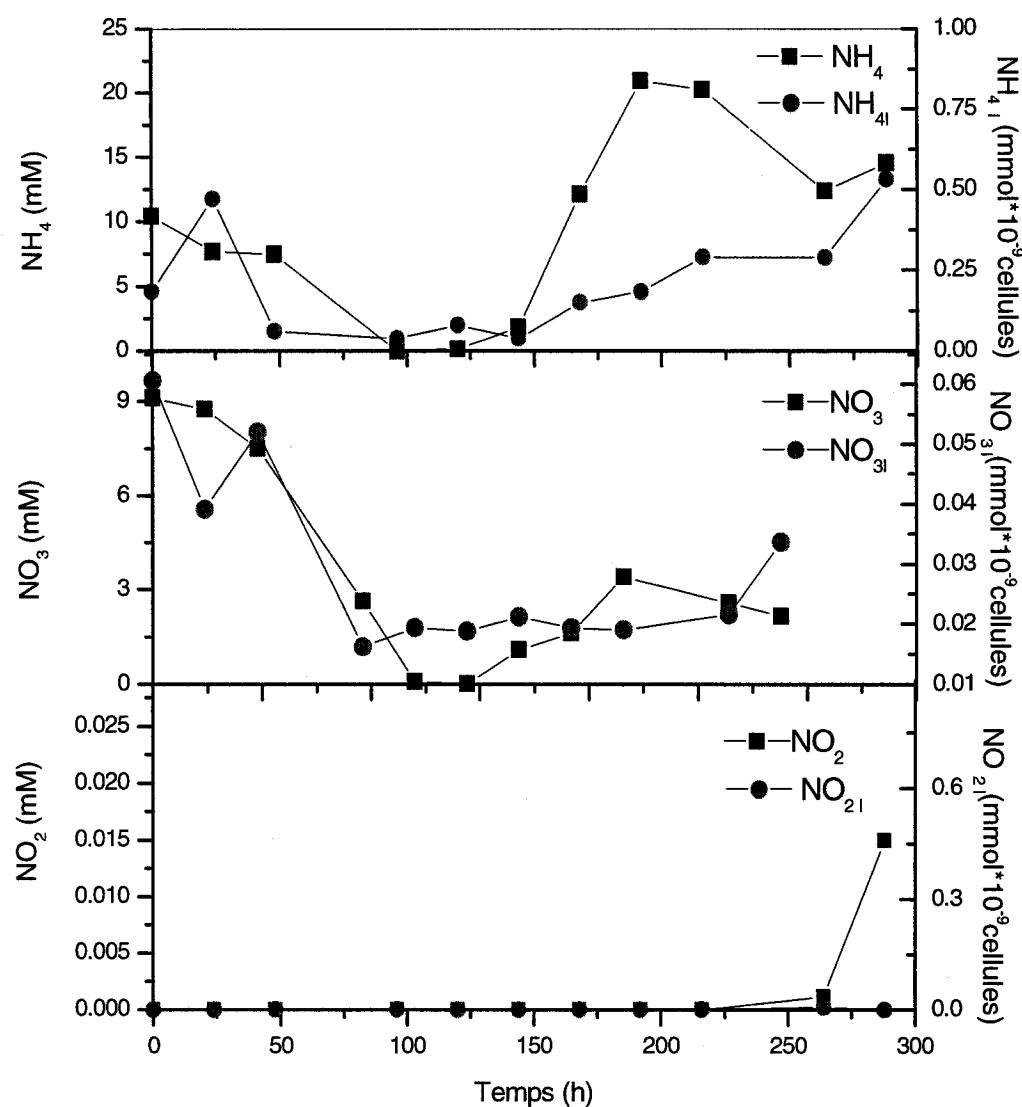
**Figure 4.34: Courbes de consommation du glucose, du sodium et du phosphate pour la culture IH25**

La figure 4.34 montre l'évolution du phosphate extracellulaire et intracellulaire pour la culture IH25. Le phosphate est absorbé rapidement durant les premières 24 h de culture. La concentration de ce nutriment demeure à zéro

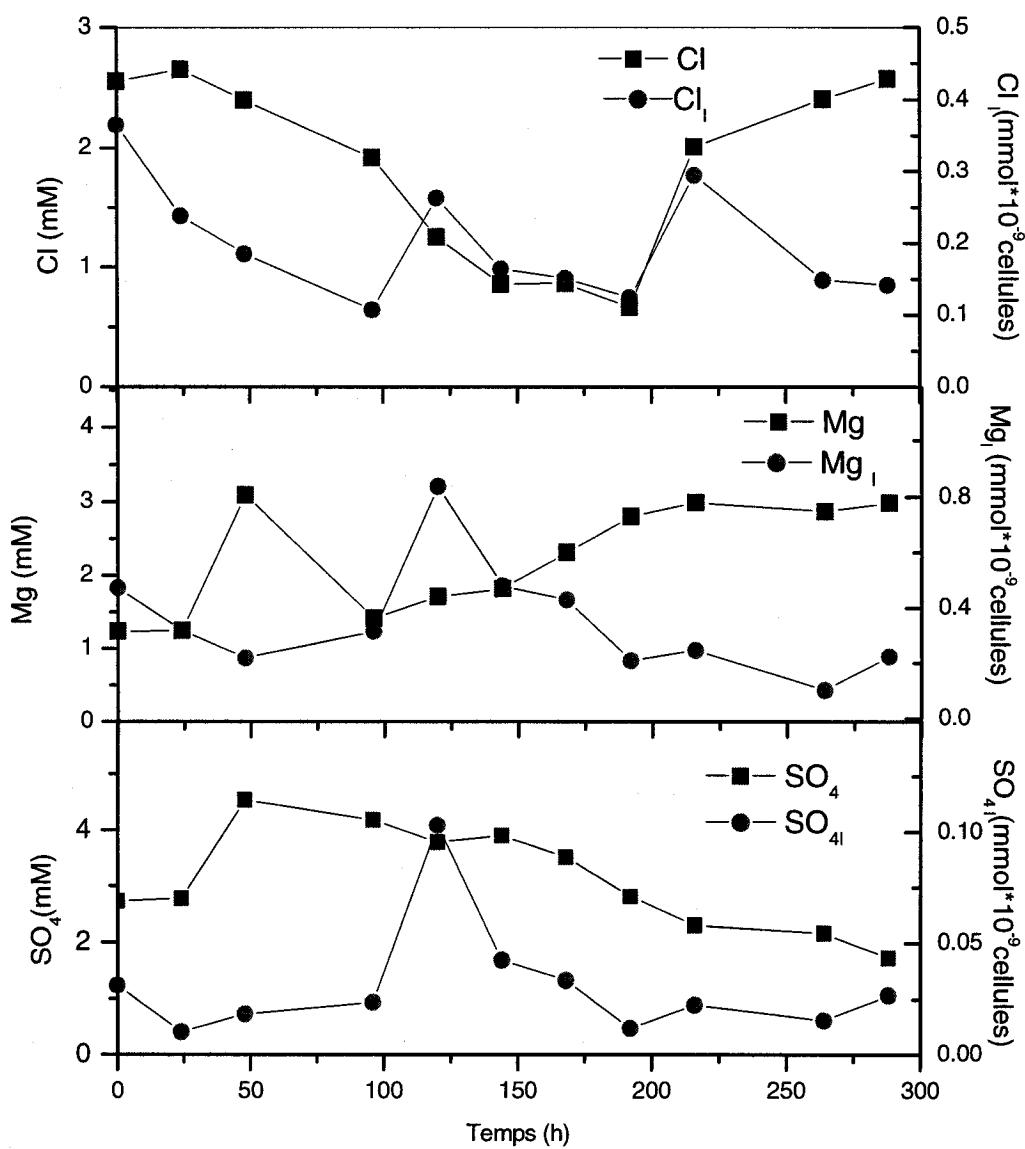
jusqu'à 96 h. A` 120 h, la concentration du PO<sub>4</sub> dans le milieu de culture était à 1,71 mM. Ceci s'est produit après un ajout de 5,7mM de PO<sub>4</sub> effectué à 96h. Cet ajout est important comparé aux ajouts effectués lors des cultures précédentes.

Pour la culture IH-25, l'ammonium était en dessous du point de consigne entre 96 et 144h (figure 4.35). En effet de 96h jusqu'à 144h, la concentration de l'ammonium variait entre 0mM et 1.84mM. Pour ce qui est du nitrate, sa concentration était en dessous de 3 mM à partir de 96 h jusqu'en fin de culture (Figure 4.35). Les deux sources d'azote pourraient être à l'origine de l'arrêt de croissance.

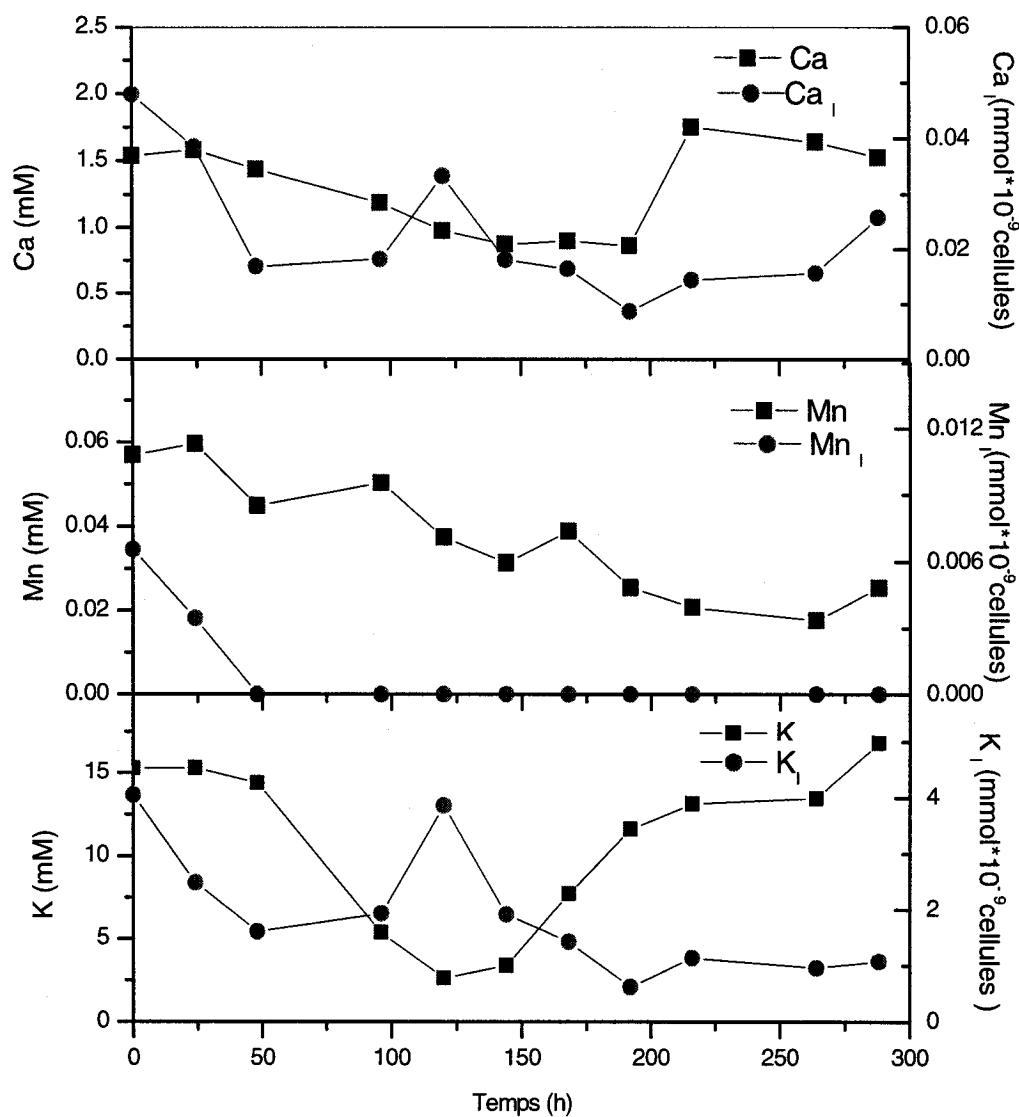
Le chlore, le magnésium, le sulfate (figure 4.36) ainsi que le calcium (figure 4.37) étaient disponibles durant toute la culture. La concentration du potassium était plus basse comparée aux cultures précédentes (figure 4.37). Ceci est normal puisque le potassium est ajouté comme contre ion avec le nitrate et que la concentration du nitrate a été baissée pour cette culture.



**Figure 4.35: Courbes de consommation de l'ammonium, du nitrate et du nitrite pour la culture IH 25**



**Figure 4.36: Courbes de consommation du chlore, du magnésium et du sulfate pour la culture IH 25**



**Figure 4.37: courbes de consommation du calcium, du manganèse et du potassium pour la culture IH 25**

## CHAPITRE5 : DISCUSSION SYNTHESE

Ce projet de recherche a permis de constater qu'il était possible de suivre et de contrôler manuellement le phosphate intracellulaire pour le maintenir à des niveaux fixes. Le phosphate intracellulaire a été contrôlé manuellement à  $0.5 \text{ mmol} \cdot 10^{-9}$  cellules lors des cultures IH17 et IH18 et à  $1.0 \text{ mmol} \cdot 10^{-9}$  cellules lors des cultures IH24 et IH25.

Il était plus facile de contrôler manuellement le phosphate intracellulaire à  $1 \text{ mmol} \cdot 10^{-9}$  cellules que de le contrôler manuellement à  $0.5 \text{ mmol} \cdot 10^{-9}$  cellules. Le phosphate intracellulaire a été maintenu à  $1 \text{ mmol} \cdot 10^{-9}$  cellules sur toute la durée des cultures IH24 et IH25. Il a été maintenu à  $0.5 \text{ mmol} \cdot 10^{-9}$  cellules pendant environ 71 h dans le cas de la culture IH17 et pendant environ 120 h dans le cas de la culture IH18.

En utilisant la technique du RMN, Gmati (2005) a mesuré le phosphate intracellulaire contenu dans la vacuole et le cytoplasme des cellules *Eschscholtzia californica* cultivées en flacons dans du milieu B5. Les valeurs obtenues par Gmati variaient entre 0.015 et 0.22 mmol/g M.S.

Calculé sur une base de biomasse sèche le phosphate intracellulaire variait entre 0.014 et 0.35 mmol/g M.S pour la culture IH 17, entre 0.016 et 0.37 mmol/g M.S pour la culture IH 18. Pour les cultures IH 24 et IH 25, il variait entre 0.17 et 0.81 mmol/g M.S, 0.33 et 0.69 mmol/g M.S respectivement. Ses valeurs sont en générale supérieures a celles obtenus par Gmati (2005).

La différence entre les concentrations de phosphate intracellulaire obtenu dans le cadre de ce projet de recherche et les valeurs obtenues par Gmati (2005) peut s'expliquer par la différence des techniques de mesure. Les méthodes de mesure de phosphate impliquant une extraction mécanique comme c'est le cas dans ce projet ont tendance à surestimer le niveau de phosphate dans les cellules. Lors de l'extraction, du phosphate d'origine organique peut être relâché sous l'action d'enzymes (Mimura, 1999).

De plus à cause des ajouts, le milieu des cultures IH17, 18, 24 et 25 était plus riche en phosphate que le milieu B5 standard. Par conséquent les cellules avaient consommé plus de phosphate que les cellules cultivées en flacons dans du milieu B5 standard.

Contrairement à Coelho (2000) et à Sirois (1997) qui ont obtenu une concentration cellulaire de  $20,0.10^{+9}\text{ }\mu\text{L}^{-1}$  lors de cultures optimales avec l'espèce *Eschscholtzia californica*, la plus haute concentration cellulaire obtenue dans le cadre de ce projet de recherche était de  $12,5.10^{+9}\text{ }\mu\text{L}^{-1}$ . Cette concentration cellulaire a été obtenue lors de la culture IH12 pendant laquelle il y a eu un suivi du phosphate intracellulaire. Dans le cas des cultures IH17 et IH18 pendant lesquelles le phosphate intracellulaire a été contrôlé à  $0,5\text{ mmol}.10^{+9}\text{ }\mu\text{L}$ , la concentration cellulaire maximale était de  $7,0.10^{+9}\text{ }\mu\text{L}^{-1}$  et de  $8,5.10^{+9}\text{ }\mu\text{L}^{-1}$  respectivement. Quant aux cultures IH24 et IH25 pendant lesquelles le phosphate intracellulaire a été contrôlé à  $1,0\text{ mmol}.10^{+9}\text{ }\mu\text{L}$ , la concentration cellulaire maximale était de  $8,5.10^{+9}\text{ }\mu\text{L}^{-1}$  et  $7,2.10^{+9}\text{ }\mu\text{L}^{-1}$ .

L'impossibilité de maintenir certains nutriments tels le glucose, l'ammonium et le nitrate aux concentrations fixées par Sirois (1997) tout le long des cultures a probablement eu un effet négatif sur la croissance cellulaire et a empêché d'atteindre de hautes concentrations cellulaires.

Pour contrôler le phosphate intracellulaire à  $1 \text{ mmol} \cdot 10^{-9}\%$ , il a fallu des ajouts fréquents et importants de phosphate. Dans ces conditions le phosphate aurait pu être toxique et inhibé la croissance cellulaire.

Sakano et al (1995) ont montré l'effet toxique que peut avoir le phosphate sur les cellules. Ils ont constaté que des cellules appartenant à l'espèce *Catharanthus roseus* cultivées dans du milieu MS contenant une concentration initiale en phosphate de 5mM accumulaient le phosphate jusqu'à une concentration maximale de  $105 \mu\text{mol g}^{-1}\text{M.H}$ . Plus de la moitié des cellules cultivées dans ces conditions mourraient avant le deuxième jour de culture. Par microscope, ils ont observé que les cellules doublaient de volume et perdaient les granules d'amidon contenus dans le cytoplasme. De plus beaucoup de débris cellulaire étaient observés dans le milieu de culture. Ces débris étaient causés par la rupture des cellules. L'inhibition de la croissance cellulaire est expliquée par une absorption excessive du phosphate due à un manque apparent de contrôle du processus d'absorption par les cellules. Durant l'évolution les plantes n'ont pas été dans des milieux aussi riches en phosphate et n'ont donc pas développé un système de contrôle pour l'absorption du phosphate.

## CHAPITRE6 : CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

L'objectif principal de ce projet de recherche est le suivi et le contrôle du phosphate intracellulaire dans le but d'obtenir des cultures à haute densité cellulaire, les objectifs qui découlent de cet objectif principal sont :

Le suivi du phosphate intracellulaire lors de cultures effectuées en bioréacteurs en mode cuvé alimentée.

Le contrôle manuel du phosphate intracellulaire à  $0,5 \text{ mmol} \cdot 10^{-9}$  cellules et à  $1 \text{ mmol} \cdot 10^{-9}$  cellules.

La culture IH12 a permis d'affiner le suivi du phosphate intracellulaire et de constater l'importance du contrôle de celui-ci.

Pour les cultures IH17 et IH18 le phosphate intracellulaire a été contrôlé manuellement à  $0,5 \text{ mmol} \cdot 10^{-9}$  cellules. Pour les cultures IH24 et IH25 le phosphate intracellulaire a été contrôlé à  $1 \text{ mmol} \cdot 10^{-9}$  cellules. Il a été plus facile de contrôler le phosphate intracellulaire à  $1 \text{ mmol} \cdot 10^{-9}$  cellules que de le contrôler à  $0,5 \text{ mmol} \cdot 10^{-9}$  cellules. En effet le phosphate intracellulaire a été contrôlé à  $1 \text{ mmol} \cdot 10^{-9}$  cellules sur toute la durée des cultures IH 24 et IH 25 alors qu'il a été contrôlé à  $0,5 \text{ mmol} \cdot 10^{-9}$  cellules pendant une courte durée des cultures IH17 et IH18.

La plus haute concentration cellulaire obtenue dans le cadre de ce projet de recherche était de  $12,5 \cdot 10^{+9} \text{ mol.L}^{-1}$ . Certaines limitations nutritionnelles ainsi que les ajouts fréquents et importants de phosphate peuvent expliquer l'impossibilité d'atteindre des concentrations cellulaires aussi élevées que celles obtenues par Sirois (1997) et Coelho (2000).

Les limitations nutritionnelles ont probablement eu un effet négatif sur la croissance et ont affecté le métabolisme cellulaire. Par conséquent, il est difficile de tirer des conclusions claires et précises sur l'effet du phosphate sur le métabolisme des cellules.

Il serait intéressant d'étudier le profil de consommation du phosphate lorsque ce dernier est contrôlé manuellement à des concentrations intracellulaires situées entre  $0,5 \text{ mmol} \cdot 10^{-9} \text{ cellules}$  et  $1 \text{ mmol} \cdot 10^{-9} \text{ cellules}$ .

Les effets du contrôle manuel du phosphate intracellulaire à différentes concentrations sur la croissance des cellules *Eschscholtzia californica* et la production de sanguinarine pourraient être investigués dans le cadre d'un autre projet de recherche.

Pour la mesure du phosphate intracellulaire, la technique utilisée était l'extraction mécanique. Il existe d'autres techniques telles que la résonnance magnétique nucléaire, les rayons X. Chaque technique a des limitations, il est donc préférable d'utiliser plusieurs techniques à la fois pour avoir une estimation plus juste du phosphate intracellulaire.

## CHAPITRE7 : BIBLIOGRAPHIE

ASHIHARA, H. et UKAJI, T. (1986). Inorganic phosphate absorption and its effects on the adenosine 5-triphosphate level in suspension cultured cells of *Catharanthus roseus*. J. Plant Physiol., 124, 77-85.

AUBRY, D. (1995). Développement et commande d'un bioprocédé de production de sanguinarine à partir de la culture en suspension de cellules de plantes. Mémoire de maîtrise, Ecole Polytechnique de Montréal, Canada.

BAILY, J. E. et OLLIS, D. F. (1986). Biochemical engineering fundamantals, New-York, 2e édition, McGraw-Hill, 984p.

BALLICA, R et RYU, D.D.Y. (1993). Effects of rheological properties and mass transfer on plant cell bioreactor performance: production of tropane alkaloids, Biotechnology and Bioengineering., 42, 1181-1189.

BALLICA, R et RYU, D.D.Y.(1992). Rheological properties of plant cell suspension. Biotechnology and Bioengineering, 8, 413-420.

BEEVER, R.E. et Burns, D.J. W. (1977). Adaptive changes in phosphate uptake by the fungus *Neurospora crassa* in response to phosphate supply. J. Bacteriol., 132, 520-525.

BIELESKI, R. L. et Latie, G. G. (1963). Turnover rates of phosphate esters in fresh and aged slices of potato tuber tissue. Plant Physiol., 38, 586-594.

BLEVINS, D.G. et REINBOTT, T.M. (1998). Impact of phosphorus nutrition on magnesium, calcium, and water status of plants. Phosphorus in Plant Biology: Regulatory Roles in Molecular, Cellular, Organismic, and Ecosystem Process, J.P. Lynch, J. Deikman, eds, , p. 168-177.

BLIGNY, R., E., Kaiser, W., Heber, U., Walker, D et Douce, R. (1997). pH regulation in acid stressed leaves of pea plant grown in the presence of nitrate or ammonium salt: studies involving  $^{31}\text{P}$ -NMR spectroscopy and chlorophyll fluorescence. Biochim. Biophys. Acta, 1320, 142-152.

BRAMBLE, J.L. et GRAVES, D.J. (1991). Calcium and phosphate effects on growth and alkaloid production in *Coffea arabica*: experimental results and mathematical model. Biotechnology and Bioengineering, 37, 859-868.

BURNS, D. J. W. et Beever, R. E. (1977). Kinetic characterization of the two phosphate uptake systems in the fungus *Neurospora crassa*. J. Bacteriol., 132, 511-519.

CLARKSON, D.T. et HANSON, J.B. (1980). The mineral nutrition of higher plants. Plant Physiology, 31, 239-298.

CLARKSON, D. T. et Saker, L. (1988). The regulation of ion transport in roots: a role for phloem transport. Proceedings of the International Congress of Plant Physiology, 1199-1206, New Delhi, India.

COELHO, H. (2000). Développement d'un procédé pour la culture à haute concentration de cellules végétales. Mémoire de maîtrise, Ecole Polytechnique de Montréal, Canada.

CRAWFORD, N.M. (1995). Nitrate: nutrient and signal for plant growth. The Plant Cell, 7, 859-868.

DEDALDECHAMP, F et al. (1995). Enhancement of anthocyanin synthesis and dihydroflavonol reductase (DFR) activity in response to phosphate deprivation in grape cell suspension. Phytochemistry, 40, 1357-1360.

CHI BAO, D et CORMIER, F. (1991). Effect of high ammonium concentrations on growth and anthocyanin formation in grape (*Vitis vinifera L.*) cell suspension cultured in a production Medium. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 27, 169-174.

DOUGALL, D.K.(1980).Growth and anthocyanin production by carrot suspension cultures grown under chemostat conditions with phosphate as the limiting nutrient. Biotechnology and Bioengineering, 22, 337-352

DUNLOP, E.H et Pradyumna K. N. (1994). Effect of fluid shear forces on plant cell suspensions. Chemical Engineering Science, 49, 2263-2276.

FUJITA,Y. (1988). Industrial production of shikonin and berberine. Applications of Plant Cell and Tissue Culture, 137, 228-238.

Gmati, D et al. (2005). Development of a small-scale bioreactor: Application to in vivo NMR measurement. Biotechnology and Bioengineering, 89, No. 2, 138-147.

JESSUP, W. et FOWLER, M. W. (1976). Interrelationship between carbohydrate metabolism and nitrogen assimilation in cultured plant cells. Planta, 132, 125-129.

JOLICOEUR, M. et al. (1992). Development of a helical-ribbon impeller bioreactor for high-density plant cell suspension culture. Biotechnology and Bioengineering, 39, 511-521.

KANDARAKOV, O et al. (2000). Additional phosphate stabilises uninterrupted growth of a *Dioscorea deltoidea* Cell Culture. Plant Science, 157, 209-216.

KIERAN, P.M. et al. (1995). Fluid shear effects on suspension cultures of *Morinda citrifolia*. Biotechnology and Bioengineering, 45, 415-425.

KNOBLOCH, K.H. (1981). Phosphate mediated regulation of cinnamoyl putrescine biosynthesis in cell suspension cultures of *Nicotiana tabacum*, *Planta medica*. Journal of Medicinal Plant Research, 42, 167-172.

LEE, R. B. et RATCLIFFE, R. G. (1983). Phosphate nutrition and the intracellular distribution of inorganic phosphate in pea root tips: a quantitative study using <sup>31</sup>P-NMR. J. Exp. Bot., 34, 1222-1224.

LEE, R. B; RATCLIFFE, R. G. et SOUTHON, T. E. (1990). <sup>31</sup>P-NMR measurements of the cytoplasmic and vacuolar pi content of mature maize roots: relationship with phosphorus status and phosphate fluxes. J. Exp. Bot., 41, 1063-1078.

LEE, R. B., Ratcliffe, R. G. (1993). Subcellular distribution of inorganic phosphate and levels of nucleotides triphosphate, in mature maize roots at low external phosphate concentrations: measurements with  $^{31}\text{P}$ -NMR. J. Exp. Bot., 44, 587-598.

LEFEBVRE, D. D et Clarkson, D. T. (1984). Compartmental analysis of phosphate in roots of intact barley seedlings. Can. J. Bot., 62, 1076-1080.

Lefebvre, D. D et Glass, A. D. M. (1982). Regulation of phosphate influx in barley roots: effects of phosphate deprivation and Reduction of Influx with provision of Orthophosphate. Physiol. Plant., 54, 199-206.

LIU, S et ZHONG, J.J. (1997). Simultaneous production of Ginseng Saponin and polysaccharide by suspension cultures of *Panax ginseng*: nitrogen effects. Enzyme and Microbial Technology, 21, 518-524.

LIPSKY, A.Kh. (1992). Problems of optimization of plant cell culture processes. Journal of Biotechnology, 26, 83-97.

MARSCHNER, H. (1995). Mineral nutrition of higher plants. Academic Press, 2<sup>nd</sup> ed.

MARTINOIA, E., SCHRAMM, M. J., Kaiser, G. et Heber, U. (1986). Transport of anions in isolated barley vacuoles; permeability to anions and evidence for a Cl<sup>-</sup> uptake system. Plant Physiol., 80, 895-901.

MATSUBARA, Koichi et al. (1989). High density culture of *Coptis japonica* cells increases berberine production. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 46, 61-69.

MC PHARLIN, I. R. et BIELESKI, R. (1989). Pi efflux and influx by p-adequate and p-deficient Spirodela and Lemna. Aust. J. Plant Physiol., 16, 391-399.

MIMURA, T. (1999). Regulation of phosphate transport and homeostasis in plant cells. International Review of Cytology, 191, 149-198.

MIMURA, T. et KIRINO, Y. (1984). Changes of cytoplasmic pH measured by <sup>31</sup>P-NMR in cells of *Nitellopsis obtusa*. Plant Cell Physiol., 25, 813-820.

Mimura, T., Reid, R. J. ET SMITH, F. A. (1998). Control of phosphate transport across the plasma membrane of Chara coralline. J. Exp. Bot., 49, 13-19.

MIMURA, T., SAKANO, K. et Shimmen, T. (1996). Studies on distribution, re-translocation and homeostasis of inorganic phosphate in barley leaves. Plant Cell Environ; 19, 311-320.

MIMURA, T., Yin, Z.H., Wirth, E. et Dietz, K.J. (1992). Phosphate transport and apoplastic phosphate homeostasis in barley leaves. Plant Cell Physiol, 33, 563-568.

SEKI, M et al. (1997). Taxol production using free and immobilized cells of *Taxus cuspidate*. Biotechnology and Bioengineering, 53, 214-219.

TSUKASA, M. et SAKURAI, M. (1994). Production of anthocyanin from strawberry cell suspension cultures; effects of sugar and nitrogen. Journal of food science, 59, 588-593.

NAMDEV, P. K. et DUNLOP, E. H. (1995). Shear sensitivity of plant cells in suspensions: present and future. Applied Biochemistry and Biotechnology, 54, 109-131.

PÉPIN, M.F. (1996). Étude de l'étape de croissance de cellules de *Vitis vinifera*Cultivées en bioréacteurs pour la production d'anthocyanes. Thèse de doctorat, École Polytechnique de Montréal, Canada.

PLAXTON, W.V. (1998). Metabolic aspects of phosphate starvation in plants, phosphorus in plant biology: regulatory roles in molecular, cellular, organismic, and ecosystem processes, J.P. lynch, J. Deikman, eds., 229-241.

REBEILLE, F., Bligny, R. et Douce, R. Regulation of pi uptake of *Acer pseudoplatanus* cells. Arch. Biochem. Biophys., 219, 371-378.

REBEILLE, F et al. (1983). Relationship between the cytoplasm and vacuole phosphate pool in *Acer pseudoplatanus* cells. Arch. Biochem. Biophys., 225, 143-148.

REBEILLE, F et al. (1985). Effect of sucrose starvation on sycamore (*Acer pseudoplatanus*) cell carbohydrate and pi status. Biochem J., 226 (3), 679-684

REID, R.J. et al. (1997). Voltage Control of Calcium Influx in Intact Cells. Aust. j. Plant Physiol., 24, 805-810

ROBERTS, J.K. M. (1984). Study of plant metabolism in vivo using NMR spectroscopy. Annu. Rev. Plant physiol., 35, 375-386.

SANO, T. et al. (1999). Phosphate as a limiting factor for the cell division of Tobacco BY-2 cells. Plant Cell Physiol., 40, 1-8.

SAKANO, K et al. (1992). Cytoplasmic acidification induced by inorganic phosphate uptake in suspension cultured *Catharanthus roseus* cells. Plant Physiol, 99, 672-680.

SAKANO, K et al. (1995). Inorganic phosphate as a negative conditioning factor in plant cell culture. Plant Science, 107, 117-124.

SAKANO, K et al. (1995). Lack of control of inorganic phosphate uptake by *Catharanthus roseus* (L.) G. Don cells. Plant Physiol, 108, 295-302.

SCHACHTMAN, D.P. et al. (1998). Phosphorus uptake by plants: from soil to cell. Plant physiol, 116, 447-453.

SCHLATMANN, J.E. et al. (1994). Effect of oxygen and nutrient limitation on Ajmalicine production and related enzyme activities in high density cultures of *Catharanthus roseus*. Biotechnology and Bioengineering, 44, 461-468.

SCHLATMANN, J.E. et al. (1995). Relation between dissolved oxygen concentration and ajmalicine production rate in high-density cultures of *Catharanthus roseus*. Biotechnology and Bioengineering, 45, 435-439.

SRAGG, A.H. (1995). The problems associated with high biomass levels in plant cell suspensions. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 43, 163-170.

SIROIS, J. (1997). Optimisation de la croissance des cellules d'Eschscholtzia californica en bioréacteur. Mémoire de maîtrise, École Polytechnique de Montréal, Canada.

SU, W.W. (1995). Bioprocessing technology for plant cell suspension cultures. Patents and Literature Review, 50, 189-230.

TAKEDA, T. et SEKI, M. (1994). Hydrodynamic damage of cultured cells of *Carthamus tinctorius* in a stirred tank reactor. Journal of Chemical Engineering of Japan, 27, 466-471.

TAKESHIGE, K. (1992). Role of cytoplasm inorganic phosphate in light-induced activation of H<sup>+</sup>-pumps in the plasma membrane and tonoplast of *Chara corallina*. Planta, 186, 466-472.

TANAKA, H. (1981). Technological problems in cultivation of plants cells at high density. Biotechnology and Bioengineering, 23, 1203-1218.

Tanaka, H. (1982). Oxygen transfer in broths of plant cells at high density.

Biotechnology and Bioengineering, 24, 425-442.

Ullrich-Eberius et al. (1981). Relationship between energy-dependent phosphate uptake and the electrical membrane potential in *Lemna gibba* G1.  
Plant Physiol, 67, 797-801.

VELIKY, I.A. et ROSE, D. (1973). Nitrate and ammonium as nitrogen nutrients for plant cell cultures. Canadian Journal of Biotechnology, 51, 1837-1844.

VERPOORTE, R. ET AL. (1993). Plant cell biotechnology for the production of alkaloids: present status and prospects. Journal of Natural Products, 56, 86-207.

VERPOORTE, R. et VAN DER HEIJDEN, R. (1994). Plant cell biotechnology for the production of secondary metabolites. Plant Cell Biotechnology, 66, 2307-2310.

WONGSAMUTH, R. et DORAN, P.M. (1994). Foaming and cell flotation in suspended plant cell cultures and the effects of the chemical antifoams.  
Biotechnology and Bioengineering, 44, 481-488.

WOODROW, I.E. (1984). Compartmentation and fluxes of inorganic phosphate in photosynthetic cells. Planta, 161, 525-530.

ZHONG, J.J. et al. (1992). Rheological characteristic of cell suspension and cell cultures of *Perilla frutescens*. Biotechnology and Bioengineering, 40, 1256-1262.

ZHONG, J.J et al. (1994). A Quantitative analysis of shear effects on cell suspension and cell culture of *Perilla frutescens* in bioreactors. Biotechnology and Bioengineering, 44, 649-654.

ZHONG, J.J. et Zhu Q.X. (1994). Effect of initial phosphate concentration on cell growth and ginsenoside saponin production by suspended cultures of *Panax notoginseng*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 55, 241-247.

ZHONG, J.J. et al. (1995). Recent advances in plant cell cultures in bioreactors. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 11, 461-467.

## **ANNEXES**

### **Annexe.1 Solutions pour les comptes cellulaires**

#### **Solution enzymatique**

Dissoudre 175 mg de cellulase (6,3 unités enzymatiques par mg, Sigma) et 230 mg d'hémicellulase (0,013 unités enzymatiques par mg, Sigma) dans 100 ml de tampon citrate. Ajouter 1,1 ml de pectinase (445 unités enzymatiques par ml, Sigma)

#### **Solution de carbol fuschine**

Solution A : Dissoudre 3g de Fuschine basique dans 100 ml d'éthanol 70%

Solution B : Ajouter 10 ml de la solution A à 90 ml d'une solution de phénol à 5%

Mélanger 45 ml de la solution B avec 6 ml d'acide acétique glaciale et 6 ml de formaldéhyde à 37%.

Conserver cette solution à 40C dans un contenant en verre foncé.

## Annexe.2 Milieux de cultures

### Annexe.2.1 Composition du milieu B5

Tableau A.1 Composition du milieu B5

<b>Macronutriments</b>	Mg.L <sup>-1</sup>	mM
KNO <sub>3</sub>	2500	25
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	150	1,0
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	834	3,34
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	134	1,0
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	150	1,1
<b>Micronutriments</b>		µM
KI	0,75	4,5
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3,0	50
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	10	60
ZnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	2,0	7,0
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,25	1,0
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,025	0,1
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,025	0,1
EDTA-Ferrique	43,0	100
<b>Vitamines</b>		-
Myo-Inositol	100	-
Acide nicotique	1,0	-
Pyridoxine HCl	1,0	-
Thiamine HCl	10,0	-
<b>Hormones</b>		-
Kinétine	0,33	-
Acide 2-4 dichlorophénoxyacétique	0,66	-
pH	5,5	-

Référence : Wetter, L.R. & Contabel, F. (1982) Plant tissue culture methods,

2nd edition, NRCC.

En plus du milieu de culture, quatre solutions d'ajouts étaient préparées. Ces solutions sont :

Glucose : 300g/L

$\text{KNO}_3$  : 800 mM

Ammonium citrate : 250 mM

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  : 114 mM

Dans le cas des cultures IH11, IH12 et IH5-1, les solutions d'ajouts étaient préparées dans l'eau déminéralisée.

Pour les cultures IH17, IH18, IH24 et IH25, les solutions d'ajouts étaient préparées dans la solution du tableau A.2.2

### Annexe.2.2 Composition du milieu d'ajouts

Tableau A.2 -Solution de nutriments utilisée pour préparer les solution d'ajouts pour les cultures

<b>Macronutriments</b>	Mg.L <sup>-1</sup>	mM
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	834	3.34
<b>Micronutriments</b>		µM
KI	0,75	4,5
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3,0	50
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	10	60
ZnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	2,0	7,0
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,25	1,0
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,025	0,1
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,025	0,1
EDTA-Ferrique	43,0	100
<b>Vitamines</b>		-
Myo-Inositol	100	-
Acide nicotique	1,0	-
Pyridoxine HCl	1,0	-
Thiamine HCl	10,0	-
<b>Hormones</b>		-
Kinétine	0,33	-
Acide 2-4 dichlorophenoxyacétique	0,66	-
pH	5,5	-

Référence : Wetter, L.R. & Contabel, F. (1982) Plant tissue culture methods, 2 nd edition, NRCC.

### Annexe.2.3 Composition du milieu Murashige-Skooge

Tableau A.3- Composition du milieu Murashige-Skooge

<b>Macronutriments</b>	<b>Mg.L<sup>-1</sup></b>	<b>mM</b>
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	20,6
KNO <sub>3</sub>	1900	18,8
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	440	3,0
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370	1,5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	1,2
<b>Micronutriments</b>		<b>µM</b>
KI	0,83	5
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2	100
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	22,3	100
ZnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	8,6	30
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,25	1,0
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,025	0,1
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,025	0,1
EDTA-Ferrique	43,0	100
<b>Vitamines</b>		-
Myo-Inositol	100	-
Acide nicotique	0,5	-
Pyridoxine HCl	0,5	-
Thiamine HCl	0,1	-
<b>Hormones</b>		-
Kinétine	0,1	-
Acide 2-4 dichlorophenoxyacétique	0,2	-
Sucrose	30 g/L	-
pH	5,5	-

Référence : Wetter, L.R. & Constabel, F. (1982) Plant tissue culture methods,

2<sup>nd</sup> Edition, NRCC

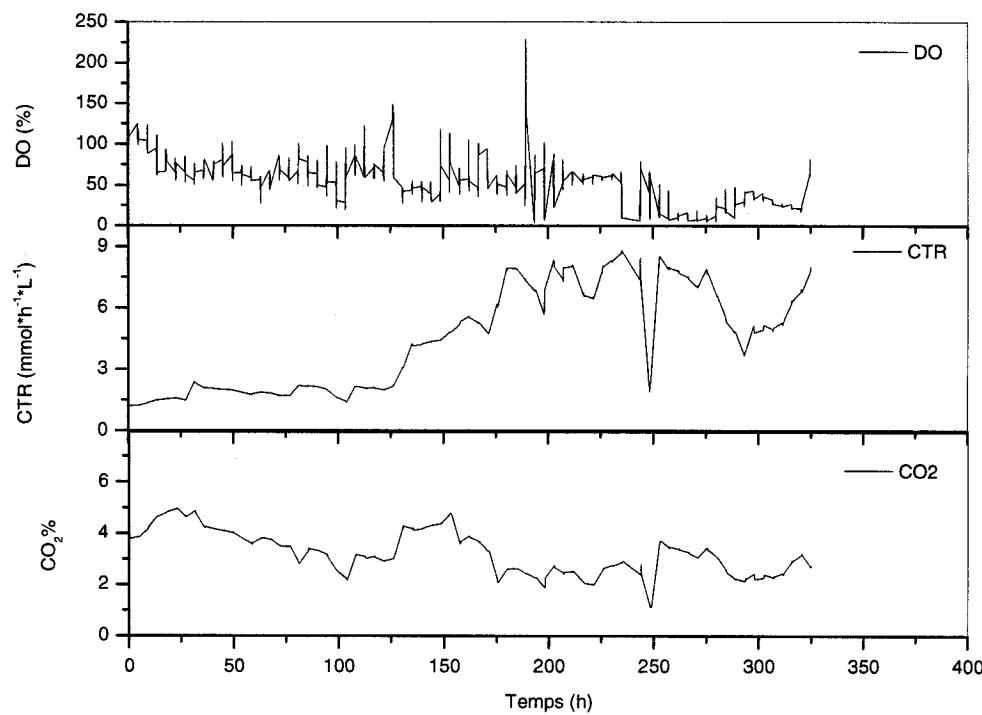
**Annexe.3 Résultats des cultures en bioréacteurs****A.3.1 Culture IH12**

Figure A.6 : Taux de respiration et coefficient de transfert d'oxygène pour la culture IH12

### A.3.2 Culture IH17

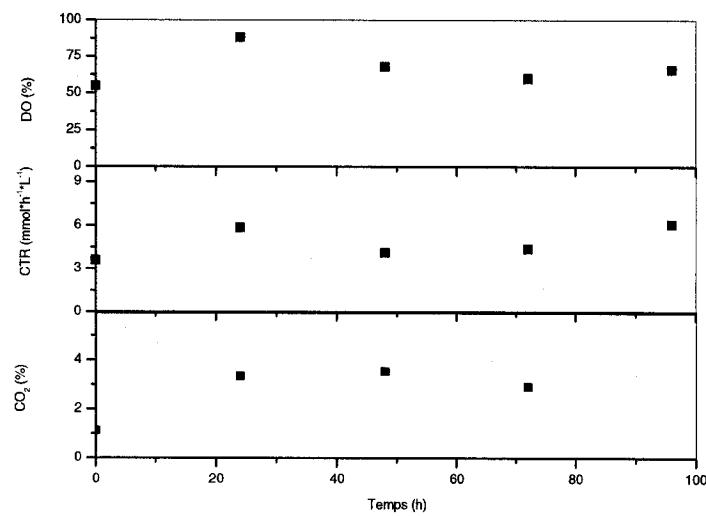


Figure A.9 : Taux de respiration et coefficient de transfert d'oxygène pour la culture IH17

## A.3.3 Culture IH18

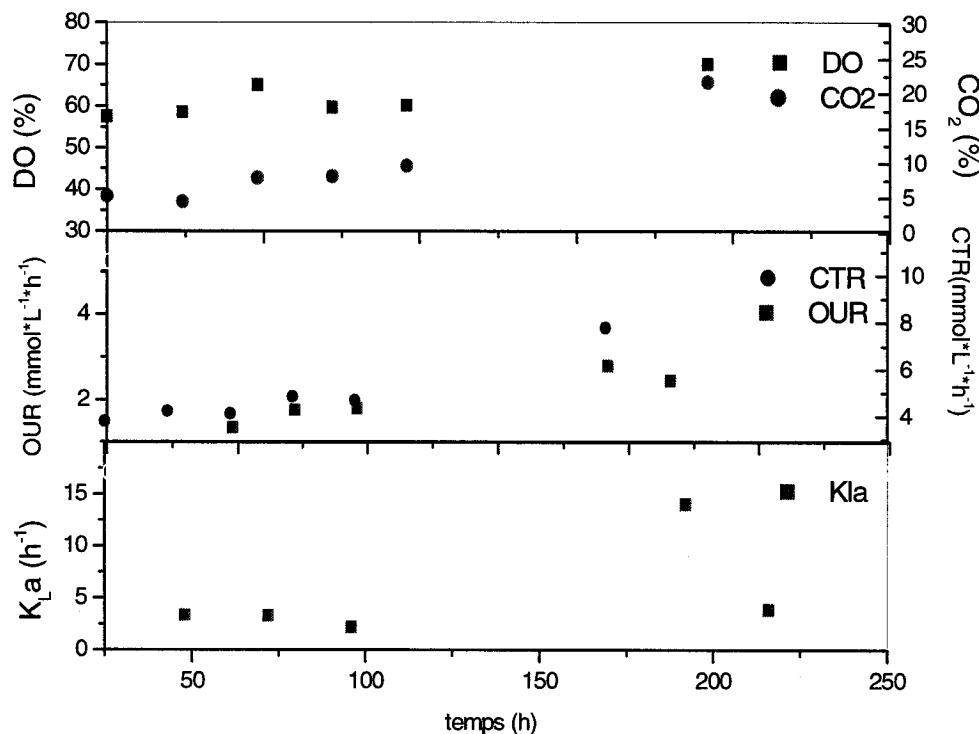


Figure A.12 Taux de respiration et coefficient de transfert d'oxygène pour la culture IH18

### A.3.6 Culture IH24

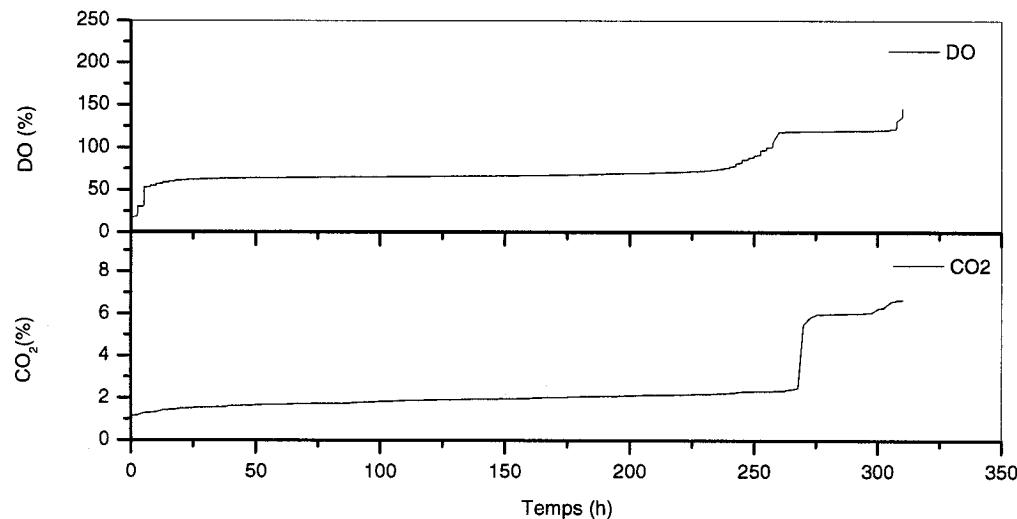


Figure A.15– Taux de respiration et coefficient de transfert d'oxygène pour la culture IH24

### A.3.7 Culture IH25

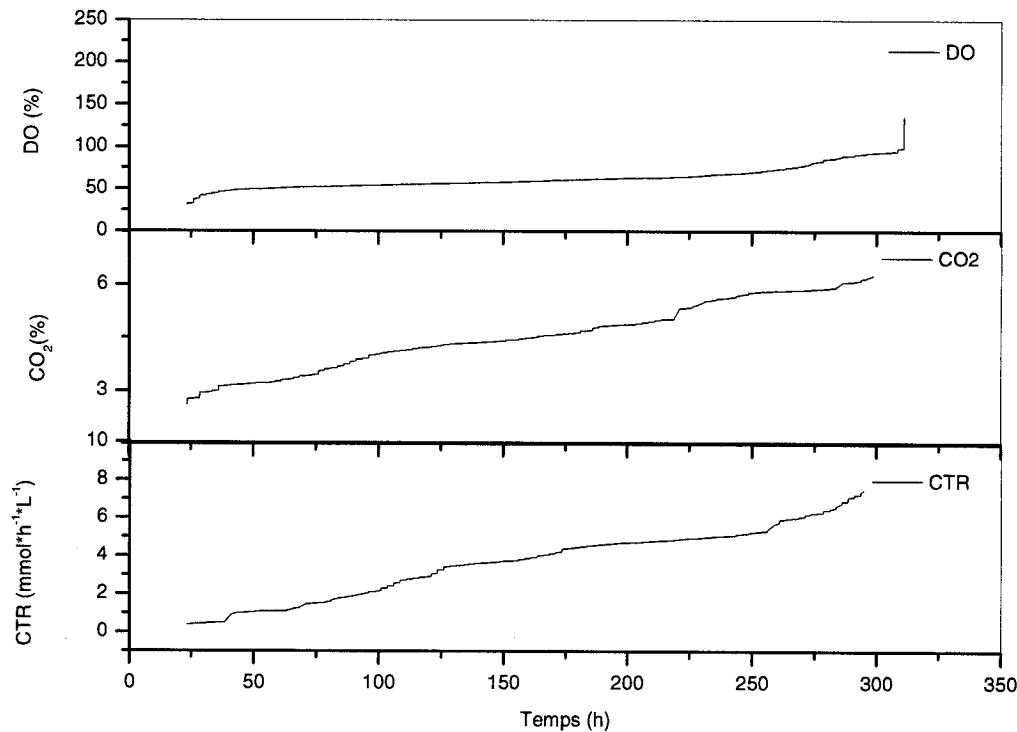


Figure A.18 : Taux de respiration et coefficient de transfert d'oxygène pour la culture IH25

#### **Annexe.4. Ajouts**

Tableau A.4.1 Ajouts effectués pendant la culture IH11

TEMPS (H)	GLUCOSE (G)	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (MMOL)	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CITRATE (MMOL)	KNO <sub>3</sub> (MMOL)
46			1.00	
70			3.80	
96	6.00		4.33	
120			3.50	
144			1.50	
146			3.00	
149	15.00			
150			1.28	
168			1.13	
170			6.00	
172	9.00		3.00	
174			2.50	
192			6.00	
195			2.88	
198	12.00	2.28	2.50	
216			4.00	
222	12.00		4.50	28.00
240			2.50	
243	9.00		3.75	36.00
264	9.00		1.60	
253	15.00		5.00	48.00
288	13.50		5.00	48.00
301			3.75	
315	15.00		2.00	64.00
324			5.00	
325			1.70	
340	18.90		3.75	60.00
360	3.00		2.70	60.00

Tableau A.4.2 Ajouts effectués pendant la culture IH5-1

TEMPS (H)	GLUCOSE (G)	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (MMOL)	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CITRATE (MMOL)	KNO <sub>3</sub> (MMOL)
46			2.38	
70			9.40	
96	39.00		12.50	
120			8.75	
144			2.50	
149	18.00		11.25	
150			3.38	
168			3.38	
170			1.50	
172	4.50		4.50	
174			1.25	
192			6.00	
195			6.00	
198	18.00	3.42	2.50	
216			4.75	
219	25.50		12.50	8.00
240	36.00		5.50	
243	9.00		10.00	24.00
264			4.75	
267	36.00		10.00	32.00
288	24.00		15.00	48.00
300			10.00	
301			7.50	
315	24.00		8.00	36.00
324			12.50	
325			7.75	
340	12.00		7.75	48.00
360			7.50	

Tableau A.4.3 Ajouts effectués pendant la culture IH12

TEMPS (H)	GLUCOSE (G)	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (MMOL)	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CITRATE (MMOL)	KNO <sub>3</sub> (MMOL)
21			2.30	
45			3.15	
49			3.15	
80			3.00	
96			5.00	
116			2.85	
122	6.00		1.50	
129			2.70	
145		1.27		
139			2.55	
144	6.00			
188	13.50		1.60	
194		1.34	1.25	
213	15.00		5.85	
235	22.50		2.50	4.00
237			4.50	
244			6.25	
258	30.00		5.00	12.00
284			1.40	
287				20.00
289			3.75	
309			2.40	
313	23.40		3.00	
333			1.40	
337	23.40		2.25	16.00
354			1.30	

A 287 h ajout de 177 ml de milieu 1,5\*B5 pour augmenter le volume du milieu dans le bioréacteur.

Tableau A.4.4 Ajouts effectués pendant la culture IH17

TEMPS (H)	GLUCOSE (G)	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (MMOL)	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CITRATE (MM/J)	KNO <sub>3</sub> (MMOL)	MgSO <sub>4</sub> (MMOL)
24	4.50		13.00		1.00
48	10.50		26.00		
72	9.00	3.65	24.00	8.00	
96			16.73		
100	12.00		0.00	8.00	
120	43.50		16.27	24.00	
170	24.00	6.84	8.00	16.00	
192	12.00		8.61	16.00	
216	12.00	1.94	0.00	24.00	1.00

Tableau A.4.5 Ajouts effectués pendant la culture IH18

TEMPS (H)	GLUCOSE (G)	NAH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (MMOL)	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CITRATE (MM/J)	KNO <sub>3</sub> (MMOL)	MgSO <sub>4</sub> (MMOL)
24	3.00	2.28	13.00		1.00
48	10.50		17.43		
72	18.00		21.00	8.00	
96	18.00	5.70	20.91	12.00	
120	45.00		19.96	34.40	
170	24.00	17.10	13.00	24.00	
192	21.00		13.62	24.00	
216	24.00		0.00	36.00	2.00

Tableau A.4.6 Ajouts effectués pendant la culture IH24

TEMPS (H)	GLUCOSE (G)	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (MMOL)	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CITRATE (MM/J)	KNO <sub>3</sub> (MMOL)	MgSO <sub>4</sub> (MMOL)	CaCl <sub>2</sub> (MMOL)
17			5.45		2.00	
41	13.20	2.00	6.67	8.00		
89	7.40	1.87	6.67	3.00		
113	11.10		6.67	13.00		
144	8.50	4.14	6.67	10.00		
161			6.67	10.00		
185	9.00		0.00	10.00		1.00
209	12.00		13.00	22.00		
257			0.00	11.00		

Tableau A.4.7 Ajouts effectués pendant la culture IH25

TEMPS (H)	GLUCOSE (G)	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (MMOL)	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CITRATE (MM/J)	KNO <sub>3</sub> (MMOL)	MgSO <sub>4</sub> (MMOL)	CaCl <sub>2</sub> (MMOL)
17			3.49		2.00	
41	28.20	4.00	7.51	8.00		
96	12.00	5.70	13.31	12.00	2.00	
113	30.00	7.00	19.10	20.00	1.00	
137	28.00		20.00	20.00		
161			25.00			
185	9.50		0.00	18.00		1.00
209	26.60		4.00	28.00		
257			0.00	12.00		