UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

MODÉLISATION CINÉTIQUE DU MÉTABOLISME DES CELLULES VÉGÉTALES POUR DES FINS DE COMMANDE ET D'OPTIMISATION EN BIORÉACTEUR

MATHIEU CLOUTIER

DÉPARTEMENT DE GÉNIE CHIMIQUE

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

THÈSE PRÉSENTÉE EN VUE DE L'OBTENTION

DU DIPLÔME DE PHILOSOPHIAE DOCTOR (Ph.D.)

(GÉNIE CHIMIQUE)

AVRIL 2008

© Mathieu Cloutier, 2008.

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: 978-0-494-41757-7
Our file Notre référence
ISBN: 978-0-494-41757-7

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.

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.

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.

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

Cette thèse intitulée :

MODÉLISATION CINÉTIQUE DU MÉTABOLISME DES CELLULES VÉGÉTALES POUR DES FINS DE COMMANDE ET D'OPTIMISATION EN BIORÉACTEUR

présentée par : CLOUTIER Mathieu
en vue de l'obtention du diplôme de : Philosophiae Doctor
a été dûment acceptée par le jury d'examen constitué de:

M. OLIVIER Henry, Ph.D., président
M. JOLICOEUR Mario, Ph.D., membre et directeur de recherche
M. PERRIER Michel, Ph.D., membre et codirecteur de recherche
M. RIVOAL Jean, Ph.D., membre
M. HU Wei-Shou, Ph.D., membre

REMERCIEMENTS

Je tiens avant tout à remercier Evelyne, qui a été à mes côtés tout au long de ce processus parfois difficile par lequel on transforme un être humain en candidat sérieux au doctorat. Je remercie également mes parents, qui m'ont toujours encouragé et aidé à devenir ce que je voulais être.

Remerciements également à mon directeur de recherche, Mario Jolicoeur et à mon co-directeur, Michel Perrier, qui m'ont laissé beaucoup de latitude dans la réalisation de ce projet.

Merci aux gens qui ont développés les outils que j'ai utilisés durant ce projet. Cyril Tikhomiroff et Mathieu Leduc ont développé le modèle métabolique, Dora Gmati et Jingkui Chen ont mis au point le minibioréacteur à perfusion pour les mesures en RMN *in vivo* et Caroline De Dobbeleer a mis au point le bioréacteur à perfusion. Merci également à Éric Claeyssen (IRBV) pour les mesures d'activité enzymatique.

Merci également à tous les collègues, étudiants, associés de recherche, techniciens et amis que j'ai côtoyés durant ces années. Vous êtes à la fois trop nombreux et trop importants pour que je vous nomme tous, mais si vous vous reconnaissez : merci à vous.

RÉSUMÉ

L'objectif principal de ce travail est de démontrer l'applicabilité d'une approche de modélisation dynamique du métabolisme à des cellules végétales pour fins de commande et d'optimisation en bioréacteur.

La première partie de ce travail vise à démontrer qu'une modélisation des dynamiques nutritionnelles (développée lors de travaux antérieurs) peut être modifiée et appliquée autant à des racines transformées qu'à des cellules en suspension. Le modèle nutritionnel inclut les bilans de masse (intra et extracellulaires) pour les trois nutriments constitutifs majeurs des plantes (phosphate, azote, sucres). La modification majeure apportée au modèle lors des présents travaux est une description de la dynamique intracellulaire pour l'azote. Les paramètres cinétiques du modèle ont été calibrés à l'aide de données expérimentales provenant de travaux antérieurs sur les racines transformées de *Catharanthus roseus* et *Daucus carota* ainsi que de cultures en suspension d'*Eschscholtzia californica.* Le modèle permet de bien décrire les dynamiques (croissance et nutrition) observées expérimentalement. Il a donc été démontré que la base commune de modélisation nutritionnelle était applicable autant à des cultures de racines qu'à une culture en suspension. La capacité prédictive de ce modèle est également vérifiée avec succès sur des cultures en mode semi-continu de *C. roseus* et *D. carota.* Ces travaux ont permis d'émettre l'hypothèse qu'une modélisation plus élaborée

du métabolisme végétal soit applicable autant à des racines transformées qu'à des cellules en suspension et ce, sans perdre la capacité prédictive.

La seconde partie de ce travail porte sur la modélisation dynamique du métabolisme des racines transformées de *C. roseus*. Un modèle métabolique partiellement cinétique (hypothèse de régime permanent pour 11 des 26 métabolites considérés) développé lors de travaux antérieurs a été modifié pour décrire de manière purement cinétique les voies du métabolisme primaire de *C. roseus*. Cette modélisation permet une description très élaborée des voies du métabolisme primaire, ce qui n'avait pas été réalisé pour le métabolisme végétal. Puisque la modélisation complète des voies du métabolisme primaire fournit une quantité considérable de résultats de simulation, un outil de visualisation a été développé. Cet outil permet de visualiser, schématiquement, les taux de réaction métaboliques et les concentrations en métabolites. Cette visualisation a permis l'observation d'un taux élevé de circulation du phosphate entre sa forme libre et son allocation sur différents métabolites et molécules phosphatées. Les résultats de simulation ont montré que ce taux de circulation du phosphate intracellulaire pourrait être un indicateur physiologique important puisqu'il présentait une forte corrélation avec le taux de croissance spécifique.

Le modèle métabolique dynamique développé dans la deuxième partie des travaux a ensuite été modifié pour son application à des cellules en suspension d'*Eschscholtzia californica*. Les modifications ont porté essentiellement sur une description plus

élaborée du métabolisme du phosphate inorganique (Pi) et de l'influence du phosphate sur la régulation des voies métaboliques. Des données en RMN *in vivo* sur le phosphate (isotope ^{31}P) ont permis une meilleure description de la régulation reliée au Pi. Le modèle ainsi calibré a été utilisé pour développer une boucle de commande sur la concentration en phosphate cytoplasmique. La concentration extracellulaire en phosphate a été utilisée en tant que variable manipulée. Le contrôleur a été implanté expérimentalement et il a été démontré dans ces travaux qu'il est possible de contrôler la concentration en phosphate cytoplasmique des cellules végétales.

Finalement, l'approche de modélisation dynamique développée aux étapes précédentes a été appliquée à des cultures en suspension de *E. californica* en bioréacteur dans une optique d'optimisation de productivité en métabolites secondaires. Le modèle métabolique a permis de décrire le comportement cellulaire en bioréacteur autant en mode cuvée qu'en perfusion. Une analyse de sensibilité dynamique a été appliquée afin de trouver les conditions de cultures susceptibles de maximiser la productivité en métabolites secondaires. Ces conditions requièrent un maintient des réserves intracellulaires en sucres et en azote. Pour implanter cette stratégie de culture, un bioréacteur à perfusion a été utilisé avec une estimation en ligne de la biomasse. Dans cette culture, l'alimentation de milieu était proportionnelle à la consommation globale de glucose par les cellules, tel qu'estimé par la modélisation. Le modèle et la méthode d'estimation de biomasse ont donc été utilisés pour alimenter une culture en perfusion dans une optique d'optimisation de production de métabolites secondaires. Cette

approche a permis d'augmenter de 75% la productivité spécifique des cellules en alcaloïdes totaux par rapport à une culture en mode cuvée et d'augmenter de 132% la productivité volumétrique. Une concentration en alcaloïdes totaux de 0,95 $g \cdot L^{-1}$ a ainsi été obtenue en bioréacteur. L'atteinte d'une concentration en produit de l'ordre du $g \cdot L^{-1}$ représente souvent un jalon important dans le développement d'un bioprocédé.

ABSTRACT

The main objective of this work was to demonstrate the applicability of a dynamic modelling approach for plant primary metabolism in a context of bioprocess control and optimization.

In the first part of this work, a nutritional modelling basis (developed in previous works on hairy roots) was modified and applied to hairy roots and plant cells with the aim of showing that a common dynamic modelling structure can be used for both tissue and cell cultures. The nutritional model describes the mass balances (intra and extracellular) on the three major constitutive plant nutrients (phosphate, nitrogen and sugars). The major modification implemented in this work was a thorough description of nitrogen storage and utilization by the cells. The kinetic parameters are determined using experimental data from previous works on *Catharanthus roseus* and *Daucu carota* hairy roots cultures as well as suspension cell cultures of *Eschscholtzia californica*. The model accurately describes the experimental observations on growth and nutrition. This work showed that a common modelling basis can be applied to both hairy roots and suspension cultures. The predictive capacity of the model was also verified successfully with experimental data on semi-continuous cultures of *C. roseus* and *D. carota*. These results suggest that a more complete description of plant metabolism through a metabolic model could be applied to both hairy roots and suspension cells.

The second part of this work focuses on the dynamic modelling of *C. roseus* hairy roots primary metabolism. A partly kinetic metabolic model previously developed was modified to describe hairy roots primary metabolism with a purely kinetic approach. This approach allows for the description of the majors pathways of the primary metabolism. This is the first fully dynamic model for hairy roots primary metabolism presented in the literature. This modelling approach yields a lot of information, thus, a visualization tool was developed to correctly assess all the simulations outputs. This visualization is a schematic and dynamic presentation of the fluxes and metabolites levels. It allowed the observation of a significant turnover rate of inorganic phosphate (Pi) between the free form and the allocation to phosphated metabolites. Simulation results suggest that this turnover rate is an important physiological parameter since it correlate with the observed specific growth rate.

The dynamic metabolic model developed in the second part was then modified and applied to suspension cultures of *E. californica*. The modifications were essentially for a more precise description of Pi metabolism and Pi regulation in primary metabolic pathways. *In vivo* ^{31}P NMR experiments allowed obtaining data for a better calibration of Pi regulation of metabolic pathways. The calibrated model was then used to develop a control loop for cytoplasmic Pi with extracellular Pi as the manipulated variable. The controller was implemented on the system and it was shown that it is possible to control cytoplasmic Pi concentration in plant cells.

Finally, the modelling approach developed in the second and third part of this work was applied to bioreactors cultures of *E. californica* in a context of optimization of secondary metabolites production. The model described bioreactor cultures in batch and perfusion mode. A dynamic sensitivity analysis framework was developed and applied to the model in order to identify potential targets for the improvement of the bioprocess. The dynamic sensitivity results showed that a stabilization of the intracellular pools in glucose and nitrogen would lead to a significant increase in cell productivity. This culture strategy was implemented with a perfusion bioreactor. In order to feed the medium proportionally to cells requirements, a method to estimate biomass from the mass balance on dissolved oxygen was developed. The calibrated model and biomass estimator were then used to perform a perfusion culture with the aim of optimizing the alkaloids production through a stabilization of intracellular reserves. This approach allowed increasing the cells specific productivity by 75% as compared to a batch culture and the volumetric productivity was improved 2,3 fold. A total alkaloids concentration of 0,95 $g \cdot L^{-1}$ was achieved. Obtaining a product concentration in the $g \cdot L^{-1}$ range is often an important step in bioprocess development.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS iv
RÉSUMÉ v
ABSTRACT ix
TABLE DES MATIÈRES xii
LISTE DES TABLEAUX xvii
LISTE DES FIGURES xix
LISTE DES ANNEXES xxii
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS xxiii
AVANT-PROPOS xxvii
CHAPITRE 1: INTRODUCTION 1
1.1 Problématique 2
1.2 Objectifs de la recherche 5
1.3 Méthodologie et organisation 5
CHAPITRE 2: REVUE DE LA LITTÉRATURE 8
2.1 Physiologie végétale 9
2.1.1 Nutrition végétale et stockage 12
2.1.2 Glucides 12
2.1.3 Nitrate et ammonium 13
2.1.4 Phosphate 14
2.1.5 Autres éléments 15
2.2 Métabolisme végétal 16
2.2.1 Métabolisme primaire des cellules végétales non photosynthétiques 16
2.2.2 Métabolisme secondaire des cellules végétales 24
2.3 Dynamiques des cellules végétales en culture 26
2.3.1 Transport et accumulation des nutriments 26
2.3.2 Cinétiques de croissance 35
2.4 Modélisation des dynamiques de cultures végétales 37

2.4.1 Modélisation dynamique du métabolisme 41
2.4.2 Outils d'analyse du métabolisme 50
2.5 Design, opération et optimisation des bioprocédés utilisant les cellules végétales 55
2.5.1 Systèmes de culture et mode d'opération 55
2.5.2 Composition du milieu de culture 57
2.5.2 Utilisation d'un agent éliciteur 58
2.5.3 Utilisation d'une phase extractive 58
2.5.4 Dynamiques intracellulaires et conservation de la productivité 59
CHAPITRE 3 : MÉTHODOLOGIE 64
3.1 Culture et maintenance des cellules 64
3.2 Échantillonnage et traitement des échantillons 65
3.3 Cultures en bioréacteur 66
3.4 Méthodes analytiques 68
3.4.1 Mesures d'activités enzymatiques 70
3.5 Modélisation et algorithmes utilisés 72
3.6 Estimation en ligne de la biomasse et des paramètres reliés au transfert d'oxygène 74
CHAPITRE 4 : A PREDICTIVE NUTRITIONAL MODEL FOR PLANT CELLS AND HAIRY ROOTS 81
4.1 Présentation de l'article 'A predictive nutritional model for plant cells and hairy roots' 81
4.2 A PREDICTIVE NUTRITIONAL MODEL FOR PLANT CELLS AND HAIRY ROOTS 83
4.3 ABSTRACT 84
4.4 KEYWORDS 84
4.5 NOMENCLATURE 85
4.6 INTRODUCTION 88
4.7 MATERIALS AND METHODS 92

4.8 THE STRUCTURED KINETIC MODEL 96
4.9 RESULTS AND DISCUSSION 103
4.10 PREDICTIVE CAPACITY OF THE NUTRITIONAL MODEL 116
4.11 CONCLUSIONS 119
4.12 REFERENCES 121
CHAPITRE 5 : DYNAMIC FLUX CARTOGRAPHY OF HAIRY ROOTS PRIMARY METABOLISM 125
5.1 Présentation de l'artcile 'Dynamic flux cartography of hairy roots primary metabolism' 125
5.2 DYNAMIC FLUX CARTOGRAPHY OF HAIRY ROOTS PRIMARY METABOLISM 127
5.3 ABSTRACT 128
5.4 KEYWORDS 129
5.5 INTRODUCTION 130
5.6 DYNAMIC METABOLIC MODEL FOR PLANT CELLS 133
5.7 RESULTS AND DISCUSSION 149
5.8 CONCLUSION 157
5.9 REFERENCES 159
5.10 MATÉRIEL SUPPLÉMENTAIRE 163
CHAPITRE 6 : KINETIC METABOLIC MODELLING FOR THE CONTROL OF PLANT CELLS CYTOPLASMIC PHOSPHATE 164
6.1 Présentation de l'article 'Kinetic metabolic modelling for the control of plant cells cytoplasmic phosphate' 164
6.2 KINETIC METABOLIC MODELLING FOR THE CONTROL OF PLANT CELLS CYTOPLASMIC PHOSPHATE 166
6.3 ABSTRACT 167
6.3 KEYWORDS 168
6.4 INTRODUCTION 169

6.5 DYNAMIC MODELLING FOR CONTROL OF PLANT CELL METABOLISM 172
6.6 DYNAMIC METABOLIC MODEL FOR PLANT CELLS 174
6.7 DEVELOPMENT OF A CONTROLLER FOR CYTOPLASMIC PHOSPHATE 187
6.8 MATERIALS AND METHODS 189
6.9 RESULTS AND DISCUSSION 193
6.10 CONCLUSIONS 204
6.11 REFERENCES 206
CHAPITRE 7: APPLICATION DU MODÈLE MÉTABOLIQUE À DES CULTURES EN BIORÉACTEUR 210
7.1 Cultures en bioréacteur opérées en mode cuvée 212
7.1.1 Mesures d'activités enzymatiques 213
7.2 Application du modèle métabolique aux cultures en bioréacteur 214
7.2.1 Production de métabolites secondaires 214
7.2.2 Mesures d'activité enzymatique et détection de glucose 216
7.2.3 Modifications apportées au modèle 221
7.2.4 Résultats 222
7.3 Analyse de sensibilité dynamique sur la productivité 227
7.3.1 Fonctions objectif pour le métabolisme végétal 229
7.3.2 Considérations pratiques pour l'analyse de sensibilité 231
7.3.3 Sensibilité des paramètres métaboliques 235
7.3.4 Sensibilité à la composition du milieu de culture 241
7.3.5 Établissement d'une stratégie de culture 244
7.4 Implantation expérimentale 249
7.4.1 Développement de la stratégie d'alimentation 250
7.4.2 Résultats et analyse 260
7.5 Conclusions 270
CHAPITRE 8: DISCUSSION GÉNÉRALE 273

CHAPITRE 9: CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS 276
9.1 Conclusion.....276
9.2 Recommandations et perspectives de recherche.....280
9.2.1 Améliorer et utiliser la capacité descriptive du modèle 281
9.2.2 Utiliser la capacité prédictive du modèle 283
9.2.3 Utiliser le modèle métabolique en tant qu'outil d'analyse et d'organisation des connaissances disponibles.....285
RÉFÉRENCES.....289
ANNEXES 315

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1-1 CARACTÉRISTIQUES D'INTÉRÊT BIOTECHNOLOGIQUE POUR LES BACTÉRIES, LEVURES ET CELLULES VÉGÉTALES 3

TABLEAU 2-1 COMPOSITION MASSIQUE D'UNE CELLULE DE PLANTE 11

TABLEAU 2-2 TRANSPORT DES NUTRIMENTS CHEZ LES PLANTES 30

TABLEAU 2-3 LOCALISATION ET STOCKAGE DES NUTRIMENTS ET MÉTABOLITES CHEZ LES PLANTES 32

TABLEAU 2-4 MODÈLES POUR LES CINÉTIQUES NUTRITIONNELLES CHEZ LES PLANTES 40

TABLEAU 2-5 MODÈLES CINÉTIQUES POUR LE MÉTABOLISME VÉGÉTAL 43

TABLEAU 3-1 RÉSUMÉ DES CONDITIONS OPÉRATOIRES LORS DES CULTURES EN BIORÉACTEUR 67

TABLEAU 3-2 MÉTHODES ANALYTIQUES 69

TABLEAU 3-3 SOLUTIONS POUR MESURES D'ACTIVITÉS ENZYMATIQUES 71

TABLE 4-1 MODELS FOR PLANT CELLS AND HAIRY ROOTS NUTRITION 91

TABLE 4-2 MEDIA COMPOSITION 93

TABLE 4-3 EQUATIONS OF THE NUTRITIONAL MODEL 97

TABLE 4-4 PARAMETERS OF THE MODEL (CONTINUED ON NEXT PAGE) 99

TABLE 4-5 STATE VARIABLES AND INITIAL CONDITIONS 101

TABLE 5-1 REACTIONS OF THE METABOLIC MODEL (CONTINUED NEXT PAGE) 136

TABLE 5-2 BIOKINETIC EQUATIONS AND THE REGULATION OF METABOLIC FLUXES 1-22 139

TABLE 5-3 BIOKINETIC EQUATIONS AND THE REGULATION OF METABOLIC FLUXES 23-45 140

TABLE 5-4 AFFINITY CONSTANTS 145

TABLE 5-5 MAXIMUM REACTION RATES 146

TABLE 5-6 STATE VARIABLES AND INITIAL CONDITIONS 147

TABLE 6-1 REACTIONS OF THE METABOLIC MODEL 177

TABLE 6-2 BIOKINETIC EQUATIONS FOR METABOLIC FLUXES 1-23 178

TABLE 6-3 BIOKINETIC EQUATIONS FOR METABOLIC FLUXES 24-46 179

TABLE 6-4 MAXIMUM REACTION RATES (V_{MAX}) 181
TABLE 6-5 AFFINITY CONSTANTS (K_M) 182
TABLE 6-6 STATE VARIABLES DESCRIPTION AND INITIAL CONDITIONS FOR SHAKE FLASK CULTURES 183
TABLE 6-7 CONTROLLER DESIGN 201
TABLEAU 7-1 ALGORITHME PROPOSÉ POUR LA CULTURE EN PERFUSION 258
TABLEAU A-1 COMPOSITION DES MILIEUX DE CULTURE 316
TABLEAU B-1 ÉQUATIONS STOECHIOMÉTRIQUES (RÉACTIONS 1-23) 317
TABLEAU B-2 ÉQUATIONS STOECHIOMÉTRIQUES (RÉACTIONS 24-47) 318
TABLEAU B-3 ÉQUATIONS BIOCINÉTIQUES (RÉACTIONS 1-16) 319
TABLEAU B-4 ÉQUATIONS BIOCINÉTIQUES (RÉACTIONS 17-32) 320
TABLEAU B-5 ÉQUATIONS BIOCINÉTIQUES (RÉACTIONS 33-46) 321
TABLEAU B-6 TAUX DE RÉACTION MAXIMUM (RÉACTIONS 1-23) 322
TABLEAU B-7 TAUX DE RÉACTION MAXIMUM (RÉACTIONS 24-46) 323
TABLEAU B-8 CONSTANTES D'AFFINITÉ 324
TABLEAU B-9 VARIABLES D'ÉTAT ET CONDITIONS INITIALES 325
TABLEAU D-1 MESURE DES ACTIVITÉS ENZYMATIQUES 328

LISTE DES FIGURES

FIGURE 2.1 STRUCTURE D'UNE CELLULE VÉGÉTALE 9

FIGURE 2.2 PRINCIPALES VOIES DE LA GLYCOLYSE CHEZ LES PLANTES NON PHOTOSYNTHÉTIQUES 18

FIGURE 2.3 VOIE DES PENTOSES PHOSPHATES 19

FIGURE 2.4 CYCLE TCA 20

FIGURE 2.5 CHAÎNE RESPIRATOIRE 21

FIGURE 2.6 VOIES DES ALCALOÏDES BENZOPHÉNANTHRIDINES CHEZ *E. CALIFORNICA* 25

FIGURE 2.7 TRANSPORT ET ACCUMULATION DES NUTRIMENTS CHEZ LES PLANTES. 27

FIGURE 2.8 DYNAMIQUE DU PHOSPHATE CHEZ *E. CALIFORNICA* 33

FIGURE 2.9 PROFIL TYPIQUE DE CROISSANCE POUR LES CELLULES VÉGÉTALES 35

FIGURE 2.10 CLASSIFICATION DES MODÈLES BIOCINÉTIQUES 38

FIGURE 2.11 EXEMPLES DU COMPORTEMENT DE LA FONCTION SIGMOÏDE 49

FIGURE 2.12 SCHÉMATISATION D'UN BIOPROCÉDÉ UTILISANT LES CELLULES VÉGÉTALES 60

FIGURE 3.1 VUE EN COUPE DU BIORÉACTEUR À PERFUSION 66

FIGURE 3.2 SCHÈME RÉACTIONNEL POUR LA MESURE DE L'ACTIVITÉ DES HK 70

FIGURE 3.3 IDENTIFICATION DES CINÉTIQUES RELIÉES À L'O_2 DISSOUS 76

FIGURE 3.4 IDENTIFICATION DE PARAMÈTRES POUR LE TRANSFERT D'O_2 78

FIGURE 3.5 ESTIMATION DE LA BIOMASSE PAR LE BILAN SUR L'O_2 DISSOUS 80

FIGURE 4.1 SENSITIVITY ANALYSIS ON MODEL PARAMETERS 105

FIGURE 4.2 MODEL SIMULATION AND EXPERIMENTAL DATA FOR *C. ROSEUS* CULTURE .. 107

FIGURE 4.3 MODEL SIMULATION AND EXPERIMENTAL DATA FOR *D. CAROTA* CULTURE . 110

FIGURE 4.4 MODEL SIMULATION AND EXPERIMENTAL DATA FOR *E. CALIFORNICA* CULTURE 112

FIGURE 4.5 MODEL SIMULATION AND EXPERIMENTAL DATA FOR *C. ROSEUS* MEDIUM EXCHANGE CULTURE 117

FIGURE 4.6 MODEL SIMULATION AND EXPERIMENTAL DATA FOR *D. CAROTA* MEDIUM EXCHANGE SHAKE FLASK CULTURE 118

FIGURE 5.1 SCHEMATIC VIEW OF THE DYNAMIC METABOLIC MODEL 134
FIGURE 5.2 SIMULATED METABOLITES PROFILES AND EXPERIMENTAL DATA FOR A BATCH CULTURE OF *C. ROSEUS*. 150
FIGURE 5.3 CARTOGRAPHY OF SIMULATED FLUXES FOR A BATCH CULTURE 151
FIGURE 5.4 CARTOGRAPHY OF SIMULATED FLUXES FOR A BATCH CULTURE 152
FIGURE 6.1 SCHEMATIC VIEW OF THE DYNAMIC METABOLIC MODEL 175
FIGURE 6.2 NMR PERFUSION BIOREACTOR 191
FIGURE 6.3 SIMULATED METABOLITES PROFILES AND EXPERIMENTAL DATA FOR A BATCH CULTURE OF *E. CALIFORNICA* 194
FIGURE 6.4 SIMULATED METABOLITES PROFILES AND EXPERIMENTAL NMR DATA FOR A PULSE RESPONSE EXPERIMENT 196
FIGURE 6.5 SIMULATED METABOLITES PROFILES AND EXPERIMENTAL NMR DATA FOR A PULSE RESPONSE EXPERIMENT 198
FIGURE 6.6 SIMULATED METABOLITES PROFILES AND EXPERIMENTAL NMR DATA FOR A STEP RESPONSE EXPERIMENT 199
FIGURE 6.7 SIMULATED METABOLITES PROFILES AND EXPERIMENTAL NMR DATA FOR THE APPLICATION OF THE CONTROL ALGORITHM 203
FIGURE 7.1 ACTIVITÉ DES HEXOKINASES DURANT UNE CULTURE CUVÉE 217
FIGURE 7.2 ACTIVITÉ DES HEXOKINASES LORS DE L'APPLICATION D'UN ÉCHELON SUR LE GLUCOSE EXTRACELLULAIRE 219
FIGURE 7.3 CULTURE CUVÉE ÉLICITÉE EN BIORÉACTEUR SANS PHASE EXTRACTIVE. 223
FIGURE 7.4 CULTURE CUVÉE ÉLICITÉE EN BIORÉACTEUR AVEC UNE PHASE EXTRACTIVE. 225
FIGURE 7.5 PROFIL DE PRODUCTION SPÉCIFIQUE SIMULÉ POUR LA CULTURE CUVÉE AVEC RÉSINES EXTRACTIVES. 234
FIGURE 7.6 SENSIBILITÉ DES VOIES RELIÉES À L'INTÉGRATION DU GLC 236
FIGURE 7.7 SENSIBILITÉS DES VOIES RELIÉES À L'INTÉGRATION DES NUTRIMENTS 238
FIGURE 7.8 SENSIBILITÉS DES VOIES RELIÉES À LA PRODUCTION D'ALCALOÏDES 239
FIGURE 7.9 SENSIBILITÉ À LA COMPOSITION DU MILIEU DE CULTURE 242

FIGURE 7.10 EFFET DE LA STABILISATION DES NUTRIMENTS INTRACELLULAIRES 246
FIGURE 7.11 STABILISATION COUPLÉE DES NUTRIMENTS INTRACELLULAIRES 247
FIGURE 7.12 DIAGRAMME D'ÉCOULEMENT POUR LE BIORÉACTEUR À PERFUSION 251
FIGURE 7.13 TAUX DE RÉACTION POUR LE FLUX $v_1(t)$ 256
FIGURE 7.14 IMPLANTATION DE L'ALGORITHME DE CULTURE EN PERFUSION 260
FIGURE 7.16 RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX DE PRODUCTION SPÉCIFIQUE TOTALE D'ALCALOÏDES 265
FIGURE 7.17 COMPARAISON DES RÉSULTATS (EXPÉRIMENTAUX ET SIMULATIONS) POUR LA PRODUCTION TOTALE SPÉCIFIQUE. 266
FIGURE 7.18 PROFIL SIMULÉ DE $v_1(t)$ POUR LA CULTURE EN PERFUSION 269
FIGURE 9.1 DÉVELOPPEMENT DE LA MODÉLISATION EN ARBORESCENCE 286
FIGURE 9.2 DÉVELOPPEMENT DE LA MODÉLISATION À PARTIR D'UN MODÈLE ÉTALON .. 287
FIGURE C.1 TEMPS DE RÉPONSE DE LA SONDE D'O_2 DISSOUS 327

LISTE DES ANNEXES

ANNEXE A : Milieux de cultures 315
ANNEXE B : Descriptif du modèle métabolique utilisé au chapitre 7 316
ANNEXE C : Correction des données d'O_2 dissous 325
ANNEXE D : Mesures d'activité enzymatiques 327
ANNEXE E : Vérification de l'hypothèse de dilution négligeable 328

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

AA	Acides aminés intracellulaires (mmol•gDW^{-1})
ACOA	Acétyl-CoenzymeA
ADP	Adénosine diphosphate
ALK	Concentration spécifique totale d'alcaloïdes (mmol•gDW^{-1})
ATP	Adénosine triphosphate
CHO	Chorismate
CO2	Dioxyde de carbone produit par les cellules
CPi	Phosphate cytoplasmique
CTP	Cytidine triphosphate
E4P	Erythrose-4-Phosphate
EGLC	Glucose extracellulaire (mM)
ENO3	Nitrate extracellulaire (mM)
EPi	Phosphate extracellulaire (mM)
ENH4	Ammonium extracellulaire (mM)
$f(S_i)$	Fonction de régulation métabolique
FADH2	Flavine adénine dinucléotide
FCC	Coefficient de contrôle de flux
FRU	Fructose intracellulaire (mmol•gDW^{-1})
F6P	Fructose-6-Phosphate
FK	Fructokinase

GK	Glucokinase
GLC	Glucose intracellulaire (mmol•gDW^{-1})
G3P	Glyceraldéhyde-3-Phosphate
G6P	Glucose-6-Phosphate
G6PDH	Glucose-6-Phosphate déshydrogénase
GTP	Guanosine triphosphate
HA	Transporteur de haute affinité (High Affinity)
HK	Hexokinases (GK et FK)
IPP	Isopenténylpyrophosphate
k_La	Constante de transfert à l'interface liquide/gaz (h^{-1} ou j^{-1})
k_La_B	Constante de transfert par bullage dans un bioréacteur (h^{-1} ou j^{-1})
k_La_S	Constante de transfert par la surface libre dans un bioréacteur (h^{-1} ou j^{-1})
LA	Transporteur de basse affinité (Low Affinity)
LIP	Lipides totaux intracellulaires (mmol•gDW^{-1})
M	Matrice stoechiométrique du réseau métabolique
MFA	Analyse des flux métaboliques
MCA	Analyse du contrôle métabolique
NAD	Nicotinamide adénine dinucléotide (oxydé)
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide (réduit)
NADP	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (oxydé)
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (réduit)
NH4	Ammonium intracellulaire (mmol•gDW^{-1})

NO3	Nitrate intracellulaire (mmol•gDW^{-1})
OAA	Oxaloacétate
OP	Molécules organiques phosphatées (mmol•gDW^{-1})
ORA	Acides organiques totaux intracellulaires (mmol•gDW^{-1})
OXO	Oxoglutarate
O2	Oxygène dissous (mM)
O2*	Concentration de saturation en oxygène dissous (mM)
PEP	Phosphoénolpyruvate
PGI	Phosphoglucose isomérase
Pi	Phosphate intracellulaire libre (VPi + CPi)
PPi	Pyrophosphate
PYR	Pyruvate
qO2	Taux spécifique de respiration des cellules (mmol•gDW^{-1}•j^{-1})
R5P	Ribulose-5-Phosphate
RMN	Résonance magnétique nucléaire
RQ	Quotient respiratoire
S	Vecteur des espèces réactionnelles du modèle métabolique
$S_{i,t}$	Niveau seuil pour la régulation métabolique
SEC	Sécologanine
SER	Sérine
SUC	Sucrose intracellulaire (mmol•gDW^{-1})
STA	Amidon (mmol•gDW^{-1})

STH	Hexoses structuraux (mmol•gDW^{-1})
$t_{élicit}$	Moment de l'élicitation d'une culture (j)
τ_r	Temps de réponse d'une sonde d'O2 dissous (s)
TRY	Tryptamine
TYR	Tyrosine
UTP	Uridine triphosphate
VPi	Phosphate vacuolaire
ν	Flux métabolique (mmol•gDW^{-1}•j^{-1})
$\nu_{max,j}$	Taux de réaction enzymatique maximal (mmol•gDW^{-1}•j^{-1})
μ	Taux de croissance spécifique (j^{-1})
5PRPP	5-phosphate-ribosylpyrophosphate

AVANT-PROPOS

«La nécessité est la mère de l'invention»

- Platon

L'humain utilise les végétaux depuis des temps immémoriaux. Que ce soit pour se nourrir, se vêtir, s'abriter ou pour concevoir des concoctions aux propriétés médicamenteuses bien précises, il fut possible pour les humains de trouver des espèces végétales répondant à leurs besoins. Une étape importante dans l'évolution de l'humanité est la domestication des plantes et l'apparition de l'agriculture, un évènement qui se serait produit il y a environ 10 à 12 000 ans. L'humain passait, pour la première fois, du rôle d'utilisateur au rôle de manipulateur et d'expérimentateur sur le règne végétal. La sélection des lignées à fort taux de croissance et plus productives en protéines ou en glucides ainsi que l'établissement de conditions de cultures optimales furent les premiers problèmes à résoudre. Incidemment, de nos jours, les mêmes étapes sont nécessaires lorsque vient le temps d'établir une culture cellulaire en laboratoire.

La domestication des végétaux amena une révolution au niveau de l'organisation sociale. Il fallait maintenant quantifier précisément des inventaires, suivre les cycles annuels, allouer des ressources dans le temps et l'espace. L'écriture devint pratiquement

indispensable pour les sociétés agraires. Une science fondamentale, les mathématiques, allait également trouver, avec les débuts de l'agriculture, une de ses premières applications. Les systèmes numériques se sont développés indépendamment à travers la planète, mais presque invariablement, on les a vus éclore aux mêmes endroits que l'agriculture : Mésopotamie, Égypte, Amérique du Sud, Chine. Les mathématiques, peuvent, encore aujourd'hui, être alliées aux techniques expérimentales les plus pointues en biologie végétale. Le contexte dans lequel ont été réalisés les travaux présentés dans cette thèse est très différent de celui qui a vu naître l'agriculture et les mathématiques, mais l'idée restera la même qu'il y a 10 000 ans : mieux comprendre et utiliser une espèce végétale en utilisant les outils analytiques et expérimentaux disponibles.

CHAPITRE 1: INTRODUCTION

Le métabolisme secondaire des plantes est une source considérable de molécules bioactives. Pour la plante, ces molécules servent de signal chimique, de réponse à un stress ou de protection contre une agression externe. Pour l'humain, ces métabolites secondaires peuvent être utilisés pour traiter diverses maladies, infections ou inflammations. La biotechnologie permet la production de ces molécules, mais il s'agit là d'un problème relativement complexe pour lequel plusieurs solutions sont encore à découvrir.

Au niveau plus fondamental, la compréhension du métabolisme a avancé à pas de géant depuis les premiers travaux en biochimie au début du siècle et la découverte de la structure de l'ADN en 1953 par Watson et Crick. Aujourd'hui, des modèles pratiquement complets existent pour décrire les dynamiques du métabolisme bactérien (Tomita et al., 1999). Une telle approche reste limitée chez les plantes puisque le génome est beaucoup plus volumineux et donc, le métabolisme beaucoup plus complexe. Cependant, pour produire des métabolites secondaires avec des cellules ou tissus végétaux, une bonne compréhension du métabolisme est nécessaire. Et dans ce domaine, notre connaissance est encore très partielle.

1.1 Problématique

La production de métabolites d'origine végétale est extrêmement difficile, ce qui rend ces molécules parfois très coûteuses. Actuellement, la culture en champs ou en serres reste l'option la plus viable. Mais ce type de culture offre un rendement volumétrique très faible, nécessite une longue maturation des plantes et une extraction élaborée. La synthèse chimique de ces molécules n'est pas encore techniquement aisée, vu leur relative complexité, mais plusieurs molécules d'origine végétale sont maintenant synthétisées *in vitro*. Cependant, des extraits végétaux riches en bases aminés pourraient être nécessaires pour une production rapide et peu coûteuse par un procédé hybride incluant une étape de biosynthèse et une de synthèse chimique. Une autre option envisagée pour produire des métabolites secondaires est la culture *in vitro* de cellules ou de tissus végétaux. Bien que cette culture soit réalisée depuis les années 1950-60 avec des résultats intéressants (Barz et al., 1977), le succès commercial pour une telle technologie est toujours incertain. La méthode la plus courante pour obtenir de grandes quantités de biomolécules est la mise à l'échelle d'un procédé utilisant une culture en bioréacteur. Cette technologie est appliquée avec succès aux bactéries, levures et champignons depuis les années 1950. Cette approche s'est avérée relativement ardue avec les cellules et tissus végétaux. Les exemples de bioprocédés industriels utilisant les cellules végétales restent rares depuis les dernières années : *Panax ginseng* pour la production de ginseng (Wu et Zhong, 1999) et *Lithospermum erythrorhizon* pour la production de shikonine, un pigment (Yamamoto et al., 2002), sont des exemples de réussite qui ressortent. En ce qui concerne plus spécifiquement la culture à grande

échelle de cellules végétales pour obtenir des alcaloïdes, la production de berbérine par *Coptis japonica* (Mulabagal et Tsay, 2004) est rapportée dans la littérature. Le tableau 1-1 résume les différences existant entre les systèmes (bactéries/levures versus plantes) et les problèmes ainsi présents en culture. Ce tableau n'est en aucun cas une liste exhaustive de ces différences, mais il résume les écueils majeurs rencontrés lors du développement d'un bioprocédé basé sur des cellules ou tissus végétaux. Une culture de cellules végétales sera, de manière générale, de plus longue durée, plus difficile à opérer ou à optimiser et produira en moins grande quantité une molécule plus difficile à récupérer.

Tableau 1-1 Caractéristiques d'intérêt biotechnologique pour les bactéries, levures et cellules végétales

Paramètre	**Bactéries-levures**	**Cellules végétales**
Taille des cellules	1-5 µm	10-20 µm
Taux de dédoublement	≈ 1h	≈ jours
Durée de culture	1-2 jours	1-2 semaines
Sensibilité au cisaillement	Faible	Élevée
Connaissance des voies métaboliques	Entière	Partielle
Clonage	Facile	Difficile
Production de biomolécules	Associée à la croissance	Non-associée à la croissance
Accumulation du produit	Intracellulaire ou Extracellulaire	Intracellulaire
Concentration en produit	10-50 g/L	0,1-1 g/L

Chacun des problèmes mentionnés au Tableau 1-1 peut être abordé séparément ou de manière intégrée. Les solutions technologiques à ces problèmes seront présentées plus en détail dans la revue de la littérature. Dans l'optique de développer un bioprocédé efficace avec les cellules en suspension, un bioréacteur à perfusion a été mis au point par De Dobbeleer et al. (2006) dans le cadre des travaux de recherche du groupe Bio-P2. Ce bioréacteur utilise des colonnes de pompage pour séparer les cellules du milieu par sédimentation et permettre la circulation de ce dernier dans une boucle externe contenant la phase d'extraction. Bien que technologiquement au point, ce système n'a pas permis d'obtenir une bonne productivité avec des cellules de pavot de Californie (*Eschscholtzia californica*), une espèce cellulaire produisant des alcaloïdes benzophénanthridines. La stratégie d'extraction a peut-être causé cette variation de la productivité, tel qu'observé par Klvana et al. (2004). Il a également été supposé qu'une mauvaise stratégie de culture était responsable de ce problème de faible productivité. En effet, il a été démontré pour les cellules d'*E. californica* que les dynamiques d'accumulation de nutriments sont un facteur critique dans le maintient de la productivité en alcaloïdes (Lamboursain et Jolicoeur, 2005). Il existe donc un lien clair entre les métabolismes primaire et secondaire chez les cellules végétales, et une allocation inadéquate des ressources nutritionnelles entre ces voies métaboliques pourrait expliquer les problèmes observés au niveau de la productivité. Afin d'éventuellement cerner et d'optimiser les conditions critiques de culture cellulaire, des modèles ont été développés pour la nutrition (Jolicoeur et al., 2003) et le métabolisme (Leduc et al., 2006) des racines transformées de *Daucus carota* et *Catharanthus roseus*.

Les deux modèles permettent de décrire les concentrations intracellulaires en nutriments et sont donc des outils pour améliorer notre compréhension des liens entre nutrition, croissance et production. Ces modèles n'ont pas été appliqués aux cellules en suspension. D'un point de vue technologique, ces cellules sont plus faciles à cultiver en bioréacteur, notamment à cause d'une meilleure uniformité et d'une croissance plus rapide (par rapport aux racines transformées). D'autre part, bien que les modèles soient au point pour décrire les observations expérimentales, leur utilité pour des fins de prédiction, d'optimisation ou de commande de bioprocédé n'a pas été démontrée lors des travaux antérieurs.

1.2 Objectifs de la recherche

L'objectif principal de ce travail est donc d'adapter un modèle métabolique à des cultures en suspension d'*E. californica* et d'utiliser ce modèle pour des fins de commande sur les concentrations intracellulaires en nutriments. Le modèle sera également utilisé pour développer une stratégie d'alimentation en bioréacteur à perfusion dans l'optique d'améliorer la productivité en métabolites secondaires.

1.3 Méthodologie et organisation

Le corps de cette thèse comporte 6 parties. Le chapitre 2 présente une revue de la littérature sur la nutrition et le métabolisme primaire des cellules végétales ainsi que les problématiques et particularités s'y rapportant. Les dynamiques de culture particulières aux cellules végétales seront énumérées. Les recherches sur la modélisation

nutritionnelle et métabolique seront également passées en revue afin de déterminer les approches possibles autant pour la modélisation que pour les méthodes de prédiction, de modulation et d'optimisation du métabolisme. La littérature sur les stratégies de cultures pour les bioprocédés utilisant les cellules végétales sera également passée en revue. Le chapitre 3 présente les principales méthodes expérimentales et analytiques utilisées lors des travaux. Le quatrième chapitre constitue une étude sur l'applicabilité d'une base commune de modélisation nutritionnelle à des racines transformées et des cellules en suspension. La capacité de prédiction du modèle nutritionnel y est également vérifiée. Ceci a permis d'émettre l'hypothèse qu'une base de modélisation métabolique (relativement plus complexe) serait également transférable des racines aux cellules en suspension sans perdre sa capacité descriptive et prédictive. Ces travaux ont été acceptés pour publication dans la revue *Biotechnology and Bioengineering* sous le titre : '*A Predictive Nutritional Model for Plant Cells and Hairy Roots*'. Le chapitre 5 présente les premiers travaux de modélisation métabolique. Un modèle métabolique partiellement cinétique développé lors de travaux antérieurs a été modifié pour représenter de manière complètement dynamique les voies du métabolisme primaire des racines transformées de *C. roseus*. Une visualisation des voies métaboliques a également été établie afin de cerner les caractéristiques principales du système. Cette modélisation constitue une base intéressante pour décrire les voies du métabolisme primaire des espèces végétales en culture puisqu'elle ne nécessite aucune hypothèse de régime permanent. Un manuscrit contenant ces travaux, '*Dynamic flux cartography of hairy roots primary metabolism*' a été publié dans la revue *Phytochemistry*. Au chapitre 6 la suite des travaux sur la

modélisation métabolique est décrite. Le modèle métabolique dynamique présenté au chapitre précédent a été appliqué à des cultures en suspension d'*E. californica*. Des données provenant d'expériences de perturbation en RMN *in vivo* sur le ^{31}P ont permis d'établir et de calibrer des équations du modèle pour décrire certains effets régulateurs du phosphate inorganique sur le métabolisme primaire. La précision du modèle a permis de mettre au point une boucle de commande pour le phosphate cytoplasmique et cette commande a été implantée expérimentalement avec succès. Un troisième manuscrit présente ces travaux : « *Kinetic metabolic modelling for the control of plant cells cytoplasmic phosphate* ». Cet article a été soumis à la revue *Metabolic Engineering*. Finalement, le septième chapitre présente une application de la modélisation métabolique à des cultures en bioréacteur dans une optique d'optimisation de la production en métabolites secondaires. Le modèle métabolique a donc été soumis à une analyse de sensibilité dynamique afin d'identifier les facteurs critiques dans l'établissement d'une stratégie de culture. L'implémentation expérimentale d'une stratégie prometteuse a été effectuée et les résultats concordent avec les prédictions du modèle.

CHAPITRE 2: REVUE DE LA LITTÉRATURE

Une bonne compréhension du métabolisme des cellules végétales nécessite forcément des connaissances de base sur les aspects physiologiques, physico-chimiques et nutritionnels des plantes. Les principales voies du métabolisme végétal étudiées dans ce travail seront également passées en revue, puisqu'elles constituent le système que l'on cherchera à émuler via la modélisation. L'aspect dynamique du comportement des cellules végétales en culture est également incontournable pour arriver à une bonne compréhension du système à l'étude, parce que les plantes ont des dynamiques très particulières que l'on ne retrouve pas toujours chez les autres types de cellules. La régulation métabolique chez les plantes présente également quelques particularités importantes, comme l'influence critique des concentrations en nutriments et métabolites dans la modulation de l'activité enzymatique de plusieurs voies. Pour décrire ces dynamiques, plusieurs outils de modélisation sont disponibles, ils seront également passés en revue. Vu la relative rareté des modèles métaboliques pour les cellules végétales, une connaissance générale des outils d'analyse du métabolisme sera fort utile et riche en applications possibles. Ces différents angles de vue (physiologie végétale, dynamiques de culture, régulation et modélisation métabolique) se recouperont lorsque viendra le temps d'émettre des hypothèses, d'utiliser et d'adapter un modèle mathématique ou tout simplement lorsque viendra le temps de développer et d'implémenter une application dudit modèle. Puisque la finalité technologique de ce

projet reste une culture productive en bioréacteur, la littérature sur les différentes approches de culture sera également passée en revue.

2.1 Physiologie végétale

Les cellules de plante sont des eucaryotes possédant une structure complexe. La Figure 2.1 présente cette structure.

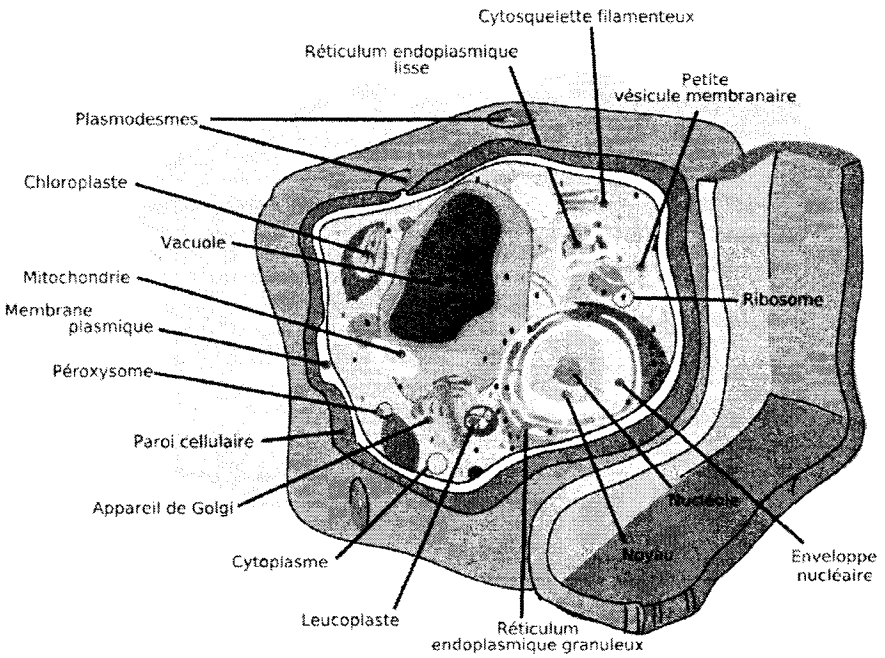


Figure 2.1 Structure d'une cellule végétale

La paroi des cellules végétales est rigide et composée de cellulose, un polymère de glucides. Cette paroi a, avant tout, un rôle structurel, en donnant sa forme et sa rigidité à la cellule végétale. Les cellules végétales possèdent également une membrane plasmique faite d'une double couche de phospholipides. Les glycolipides peuvent également

s'intégrer dans la structure des cellules végétales. La paroi cellulaire contient, dans une moindre mesure, des protéines. Il s'agira principalement de protéines structurelles et de complexes transporteurs pour les nutriments. Les lipides et protéines composent aussi les parois des différents compartiments cellulaires. Les compartiments majeurs de la cellule végétale sont le cytoplasme, la vacuole, les plastes (chloroplastes, leucoplastes), les mitochondries et le noyau. Le cytoplasme est conventionnellement divisé en deux parties : le cytosol et les autres organelles et compartiments. Le cytosol est le fluide emplissant l'espace intracellulaire et où se produisent la majorité des réactions reliées au fonctionnement de base de la cellule : voies du métabolisme primaire, transcription des protéines etc. Cependant, chez les cellules végétales, la compartimentation fait en sorte que plusieurs réactions peuvent avoir lieu tant dans le cytosol que dans un autre compartiment, comme la vacuole ou les plastes. La vacuole est utilisée principalement pour le stockage des nutriments (phosphate, azote, sucres), des ions (potassium, chlore) et de certains déchets intracellulaires. De plus, la vacuole peut aider à contrôler la quantité d'eau présente dans la cellule. Cette fonction est très importante puisque les cellules végétales ont un contenu en eau très élevé. La masse des cellules végétales est constituée de 90 à 95% d'eau, ce qui implique que la biomasse occupe un volume considérable dans une culture de cellules végétales. Si cette particularité n'est pas prise en compte, il peut en résulter des erreurs significatives dans la performance d'un modèle ou dans l'évaluation des paramètres physiologiques de la culture (Zhang et al., 1998). Dépendamment des lignées cellulaires et des conditions de culture, la vacuole va occuper de 30 à 90% du volume intracellulaire. Les plastes, plus particulièrement les

chloroplastes, sont les organelles responsables de la photosynthèse chez les plantes entières. Pour des cellules végétales en culture (donc non photosynthétiques), les amyoplastes servent pour le stockage des saccharides et polysaccharides, comme l'amidon. Les mitochondries sont les organelles où se produisent les réactions de la voie des acides tricarboxyliques (cycle TCA) et la respiration aérobique. Ces réactions sont responsables de la majeure partie de l'apport énergétique de la cellule, via l'oxydation du pyruvate pour générer des molécules de NADH qui a leur tour vont être utilisées pour la régénération d'ATP à partir d'ADP et de Pi via la phosphorylation oxydative. Le noyau, quant à lui, contient le matériel génétique de la cellule et il participera ainsi au contrôle de l'activité des voies enzymatiques via les divers mécanismes de régulation génétique. Le tableau 2-1 présente la composition massique moyenne d'une cellule de plante (Epstein, 1972).

Tableau 2-1 Composition massique d'une cellule de plante

Composant	**Proportion (%)**
Carbone	45
Oxygène	45
Hydrogène	6
Azote	1,5
Potassium	1
Calcium	0,5
Phosphate	0,2
Magnésium	0,2
Soufre	0,1
Silicium	0,1
manganèse, zinc, fer, nickel, bore, cuivre, molybdène, chlore	traces

2.1.1 Nutrition végétale et stockage

Trois nutriments constitutifs majeurs sont utilisés par les cellules végétales non photosynthétiques : les glucides, l'azote et le phosphate. L'oxygène n'est pas considéré ici comme un nutriment constitutif, bien qu'il soit assimilé par le milieu extracellulaire et serve pour les fonctions respiratoires de base de la cellule. L'oxygène ainsi utilisé n'a cependant pas de rôle structurel. Son influence cruciale sur le métabolisme sera cependant considérée dans cette revue de littérature. La capacité de stockage de nutriments est un élément fondamental de la nutrition chez les plantes, puisque ce sont des cellules qui doivent sans cesse s'adapter à un environnement très variable. Les différents mécanismes de stockage seront donc passés en revue à la section 2.3.

2.1.2 Glucides

Les glucides, plus précisément le glucose (GLC) et le fructose (FRU) sont la principale source de carbone chez les plantes non photosynthétiques. Ils alimentent la voie de la glycolyse et des pentoses phosphate. Ils peuvent provenir du saccharose ('sucrose', SUC), via son hydrolyse par les invertases (Sturm, 1999) ou via la saccharose synthase qui, sous certaines conditions physiologiques, transforme le saccharose en fructose et en UDP-Glucose (Huber et Huber, 1996). Le SUC présent dans un milieu extracellulaire pourra donc être converti et acheminé vers le cytoplasme. Les cellules végétales sont donc capables d'assimiler directement le GLC et FRU par le milieu extracellulaire. Des transporteurs à simple affinité (avec symport de proton) permettent de transférer les

hexoses extracellulaires dans le cytoplasme (Tanner et Caspari, 1996). Les glucides peuvent êtres accumulés intracellulairement, mais leur phosphorylation par les hexokinases est généralement rapide. Divers mécanismes de stockage permettent donc à la plante d'accumuler les glucides. Ils peuvent être stockés sous forme d'amidon dans les plastes et sous forme de saccharose dans la vacuole. Lors d'une limitation en glucides, l'amidon peut être canalisé vers la glycolyse via l'action de l'amidon phosphorylase. Le stockage d'amidon à partir de glucose-6-phospate (G6P) permet également de produire du pyrophosphate (PPi) qui peut à son tour servir de source de Pi et de source d'énergie. En effet, lors d'une limitation en Pi, le PPi peut remplacer l'ATP dans certaines réactions de la glycolyse (Plaxton, 1998). Les hexoses sont également utilisés pour produire la cellulose, un constituant des parois cellulaires. Le flux de carbone vers la production d'hexoses structuraux peut même être, sous certaines conditions, un efflux majeur de carbone du métabolisme (Delmer et Haigler, 2002).

2.1.3 Nitrate et ammonium

Le nitrate et l'ammonium sont les sources d'azote pour la synthèse des acides aminés et donc ultimement, pour la synthèse des protéines, nucléotides et facteurs de croissance. Le nitrate n'est pas incorporé directement dans les voies métaboliques, mais il est plutôt réduit en nitrite et ensuite en ammoniaque par les nitrates réductases et les nitrites réductases. Puisque le pH cytoplasmique est d'environ 7 et que le pKa du couple ammonium/ammoniaque est de 9,25, l'équilibre est fortement dirigé vers l'ion ammonium. Cet ion ammonium, provenant soit de l'assimilation du nitrate ou de

l'accumulation directe par le milieu extracellulaire, peut ensuite être incorporé par fixation sur le 2-oxoglutarate, un intermédiaire du cycle TCA. Le produit de cette réaction est le glutamate, un acide aminé qui est utilisé par transamination pour produire les autres acides aminés (Michal, 1999).

2.1.4 Phosphate

Le phosphate est utilisé principalement chez les plantes sous forme de phosphate inorganique (Pi) ou de pyrophosphate (PPi). Le phosphate se retrouve dans les phospholipides, constituants majeurs des membranes cellulaires, dans les nucléotides et dans les navettes énergétiques (ATP, UTP, CTP, GTP). De plus, le phosphate joue un rôle primordial dans la régulation du métabolisme par la phosphorylation/déphosphorylation des enzymes. Le phosphate intervient dans plusieurs réactions du métabolisme primaire, que ce soit de façon directe ou indirecte, par la phosphorylation de métabolites. Par exemple, la phosphorylation des hexoses est un mécanisme extrêmement important pour la glycolyse. Cette première étape, compromettante puisque très endothermique, fixe un atome de phosphate sur le glucose. Cet atome de phosphate sera libéré lors de la conversion du phosphoénolpyruvate en pyruvate. C'est donc dire que les intermédiaires métaboliques de la glycolyse contiennent pratiquement tous une molécule de phosphate, bien que celle-ci ne soit pas « fixée » de manière permanente dans une structure cellulaire (paroi, membrane etc.). Une limitation en Pi aura donc, inévitablement, un effet marqué sur la glycolyse. Dans des conditions naturelles (plantes entières) le phosphate est généralement l'élément limitant,

présent à des concentrations de l'ordre de 1 µM dans le sol (Schachtman et al., 1998). Pour les cultures in vitro, le phosphate est évidemment présent à des concentrations plus élevées, de l'ordre de 0,1 à 1 mM, mais il est tout de même l'élément limitant dans la plupart des milieux de culture. Les plantes possèdent divers mécanismes d'adaptation physiologique et métabolique aux limitations en Pi. Physiologiquement, les plantes peuvent exsuder des agents chélateurs pour solubiliser le Pi extracellulaire (Delucia et al., 1997; Schatchman et al., 1998), de plus, les plantes possèdent des mécanismes d'activation des transporteurs à haute affinité pour augmenter leur capacité de transfert en Pi dans des conditions limitantes (Clarkson et al., 1978; Lee et al., 1990; Liu et al., 1998). Au niveau métabolique, plusieurs réactions du métabolisme primaire peuvent utiliser le PPi au lieu du Pi lors d'une limitation, ce qui permet une meilleure utilisation des ressources phosphatées (Plaxton, 1998). Il est reporté dans la littérature qu'une limitation en Pi peut induire une dégradation des nucléotides (Abel et al., 2000), ce qui aurait pour but de ralentir la croissance et/ou de réallouer du Pi pour des fonctions cellulaires de maintenance. Le Pi, comme plusieurs autres nutriments, peut également être stocké par les plantes, un sujet qui sera revu à la section 2.3.

2.1.5 Autres éléments

D'autres macronutriments sont présents chez les cellules végétales, comme le potassium qui se retrouve à des concentrations cytoplasmiques de 100 mM (Clarkson et Hanson, 1980) et dont le rôle est de participer à la régulation du potentiel transmembranaire. Le chlore sert de contre ion pour assurer l'électroneutralité de l'espace cytosolique. Le

magnésium a un rôle important dans l'activation des enzymes impliquées dans les voies de la respiration, de la photosynthèse et de la synthèse d'ADN et d'ARN (Taz et Zeiger, 1998).

2.2 Métabolisme végétal

Les travaux présentés dans cette thèse portent essentiellement sur la modélisation du métabolisme primaire des cellules végétales. Les voies enzymatiques principales du métabolisme primaire seront donc présentées dans cette section. Les voies du métabolisme secondaire de *E. californica* seront également présentées. Bien que la modélisation du métabolisme secondaire ne fasse pas partie des objectifs de ce travail, une bonne compréhension des liens entre métabolismes primaire et secondaire est importante afin de bien saisir les problématiques encourues.

2.2.1 Métabolisme primaire des cellules végétales non photosynthétiques

La glycolyse est la principale source d'agents réducteurs, tel le pyruvate, chez les cellules végétales. Elle produit, de manière nette, 2 molécules d'ATP et 2 molécules de nicotinamide adénine dinucléotide réduit (NADH) pour chaque molécule de glucose oxydée en 2 molécules de pyruvate. Cependant, la glycolyse peut tout de même être limitée par une carence énergétique, puisque les premières étapes demandent un apport d'ATP. La Figure 2.2 (adapté de Plaxton, 1996 et Plaxton, 1998) présente les principales voies de la glycolyse chez les plantes. Puisque le G6P peut provenir aussi bien de la

phosphorylation du glucose ou de la dégradation de l'amidon, les réactions, à partir du glucose-1-P, peuvent se produire autant dans le cytosol que dans les plastes. En limitation de phosphate, les réactions de la glycolyse pourront tout de même être favorisées par des enzymes non dépendantes du Pi ou de l'ATP/ADP (Plaxton, 1996; Plaxton, 1998). Ces mécanismes d'adaptation doivent être considérés lors de l'étude de la régulation métabolique chez les plantes.

Une autre voie importante pour le métabolisme du carbone est celle des pentoses phosphates (Figure 2.3). Cette voie, qui peut se produire en parallèle avec la glycolyse (les deux voies partagent plusieurs intermédiaires), sert essentiellement à réduire la nicotinamide adénine dinucléotide phospahte ($NADP^+$) en NADPH. Les squelettes à 4 ou 5 carbones sont également produits par cette voie et alloués à diverses fonctions cellulaires, comme la synthèse des acides nucléiques (Bramley, 1997) ou des acides aromatiques. De plus, cette voie est inhibée lorsque le ratio NADPH/NADP est élevé.

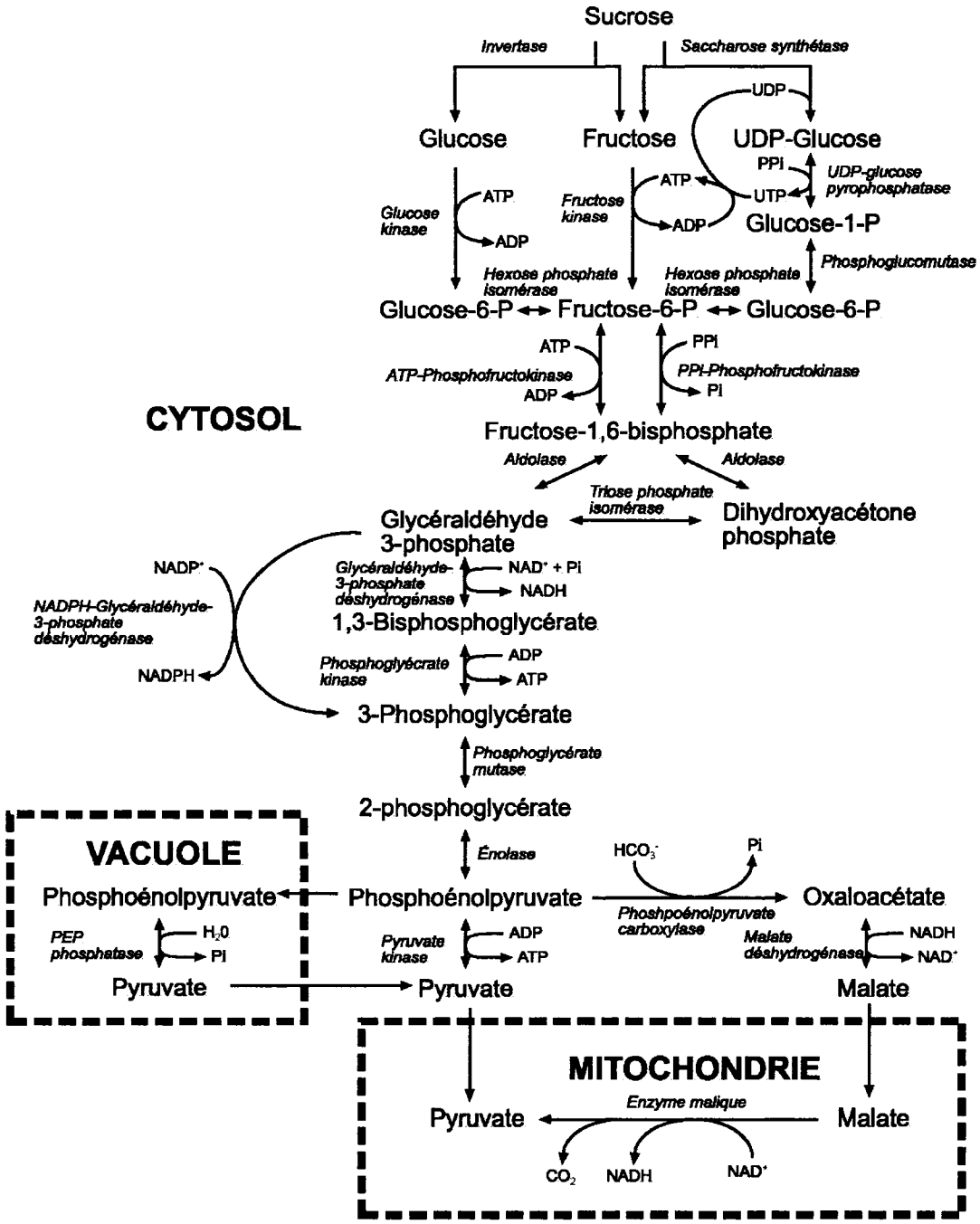


Figure 2.2 Principales voies de la glycolyse chez les plantes non photosynthétiques (adapté de Plaxton, 1996, avec la permission de Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, Volume 47, ©1996, www.annualreviews.org).

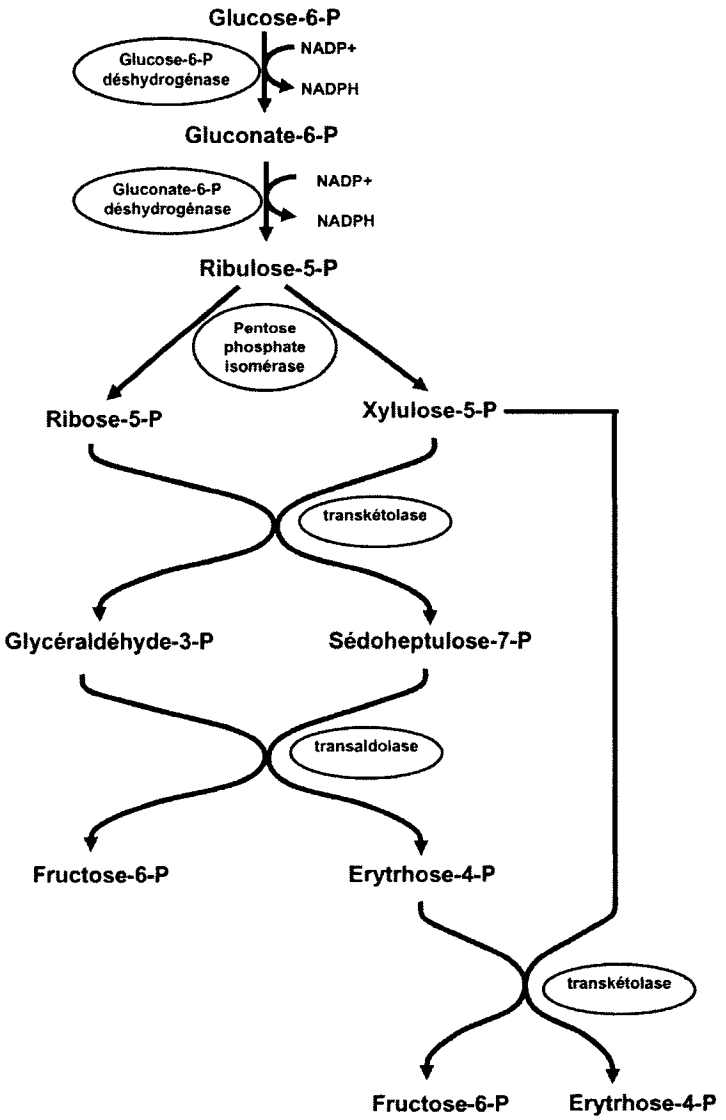


Figure 2.3 Voie des pentoses phosphates

Finalement, le cycle de l'acide citrique (TCA, Figure 2.4) permet d'oxyder le pyruvate provenant de la glycolyse afin de produire des agents réducteurs (NADH) pour la chaîne respiratoire. Les intermédiaires du cycle TCA peuvent également être utilisés dans la synthèse de diverses molécules, comme les acides aminés (voir section 2.1.1.2). Le

cycle TCA est également la source principale de production de dioxyde de carbone (CO2), qui est excrété chez les plantes non photosynthétiques. L'équilibre entre la production de CO2 par le TCA et la consommation d'oxygène fait en sorte que le ratio molaire de production de CO2 et de consommation d'oxygène est de 1, du moins pour la glycolyse en mode aérobie. Ce ratio, le quotient respiratoire (RQ), est un paramètre physiologique très important puisqu'il permet de détecter certains changements métaboliques, comme par exemple une limitation en glucose.

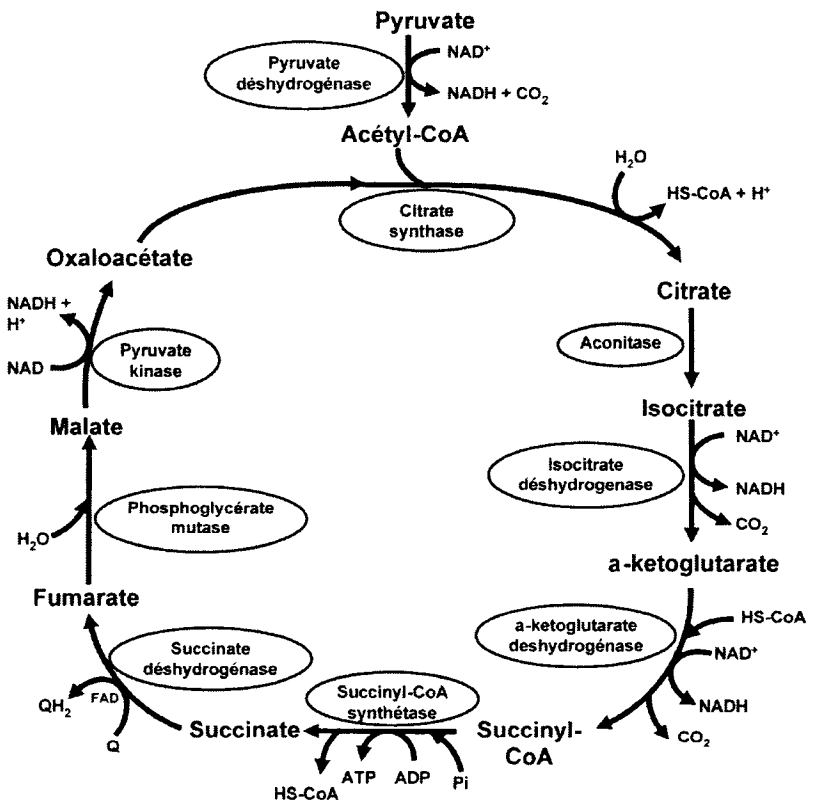


Figure 2.4 Cycle TCA

La chaîne respiratoire (Figure 2.5) chez les cellules eucaryotes se produit également dans les mitochondries. Par ce mécanisme, des électrons sont transférés de donneurs (NADH et dans une moindre mesure, $FADH_2$) au principal agent oxydant, l'O2, avec formation d'eau. Les complexes d'oxydoréductases (I à IV) permettent le transfert graduel des électrons entre l'espace intermembranaire (cytosol) et l'espace mitochondrial. Ceci cause une augmentation de la concentration en électrons dans les mitochondries et le gradient électrochimique ainsi induit fournit à l'ATP synthétase l'énergie nécessaire pour phosphoryler une molécule d'ADP. De plus, le transfert graduel par les complexes permet une meilleure utilisation du potentiel du NADH. Généralement, l'oxydation d'une molécule de NADH permettra de régénérer approximativement 2,5 molécules d'ATP (Brownleader et al., 1997b).

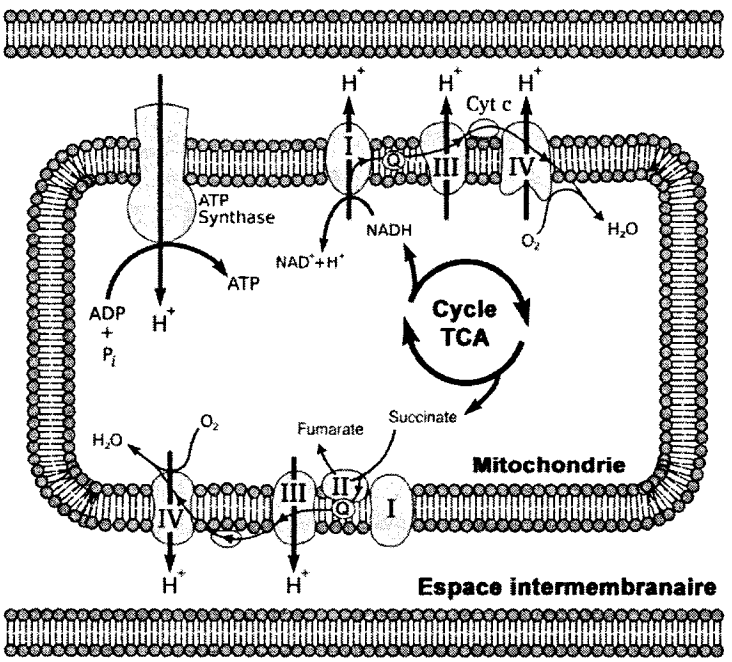


Figure 2.5 Chaîne respiratoire

Finalement, le métabolisme primaire fournit les squelettes moléculaires pour les voies du métabolisme secondaire. Pour les espèces utilisées lors des présents travaux, la sécologanine, le tryptophane et la tyrosine sont des intermédiaires clés entre le métabolisme primaire et les voies de synthèses des alcaloïdes. Le tryptophane et la tyrosine sont des acides aminés qui proviennent du chorismate, qui lui est synthétisé par la voie des acides shikimiques (Michal, 1999; Hermann et Weaver, 1999). La voie des acides shikimiques utilise le phosphoénolpyruvate (PEP) et l'érythrose-4-phosphate (E4P) pour synthétiser du chorismate (CHO). La réaction globale de biosynthèse du chorismate est la suivante :

$$2\ PEP + E4P + ATP + NADH \longrightarrow CHO + 2\ Pi + NAD^{+} + ADP$$

Et le chorismate est ensuite converti en tryptophane via l'anthranilate. Les réactions utilisent du glutamate (GLU), du 5-P-Ribosyl-pyrophosphate (5PRPP) et de la sérine (SER) pour produire du tryptophane, du pyrophosphate (PPi), du pyruvate (PYR) et du glycéraldéhyde-3-P. La réaction globale s'écrit comme suit :

$$CHO + GLU + 5PRPP + SER \longrightarrow Tryptophane + PPi + G3P + 2\ PYR$$

Le tryptophane alimentera la tryptophane décarboxylase (Noé et al., 1984), ce qui produira de la tryptamine (TRY), un précurseur important du métabolisme des

alcaloïdes chez *C. roseus*. La tryptophane décarboxylase est fortement activée en cas de réponse à une attaque externe par des éléments pathogènes (Menke et al., 1999). Le chorismate peut également être converti en tyrosine, un acide aminé qui est le précurseur des alcaloïdes benzophénanthridines chez *E. californica*. La réaction globale est la suivante :

$$CHO + GLU + NAD^{+} \rightarrow TYR + OXO + NADH + CO2$$

La tyrosine peut ensuite être convertie par les enzymes du métabolisme secondaire pour former les alcaloïdes benzophénanthridines, dont les voies seront vues à la section suivante. L'autre précurseur pour le métabolisme secondaire de *C. roseus* est la sécologanine (SEC). La sécologanine provient de l'isopentényl pyrophospahte (IPP) qui lui est synthétisé par la voie de l'acide mévalonique, une voie qui utilise l'acétyl-Coenzyme A et le NADPH via plusieurs réactions enzymatiques (Taiz et Zeiger, 1998). L'IPP est ensuit converti en sécologanine via une série de réactions enzymatiques (Meehan et Cocsia, 1973; Yamamoto et al., 2000). La réaction globale de synthèse de la sécologanine à partir de métabolites primaires peut donc s'écrire comme suit :

$$3\ ACOA + 2\ NADPH + 3\ ATP \rightarrow SEC + 2\ NADP + 3\ ADP + 3\ Pi$$

La sécologanine et le tryptophane sont ensuite condensés par la strictosidine synthétase (McKnight et al., 1990) pour former la strictosidine, qui alimentera le métabolisme des

alcaloïdes indoles chez *C. roseus*. Tout comme pour la tryptophane décarboxylase, la strictosidine synthétase est activée par les mécanismes de défense cellulaire (Menke et al., 1999).

2.2.2 Métabolisme secondaire des cellules végétales

Les voies du métabolisme secondaire sont très différentes d'une espèce végétale à l'autre. Chez les plantes entières, les métabolites secondaires peuvent servir pour la signalisation chimique, pour la défense contre une agression externe (herbivores, pathogène) ou pour la pigmentation. Les métabolites secondaires d'intérêt produits par les cellules d'*E. californica* et *C. roseus* font partie de la famille des alcaloïdes, des molécules aux nombreuses propriétés d'intérêt pharmacologique. Les alcaloïdes produits par *E. californica* sont les alcaloïdes benzophénanthridines, dont les voies de biosynthèse sont présentées à la Figure 2.6 (Klvana et al., 2004). Tel que vu à la section 2.2.1, ils proviennent de la tyrosine, un acide aminé issu de la voie du chorismate.

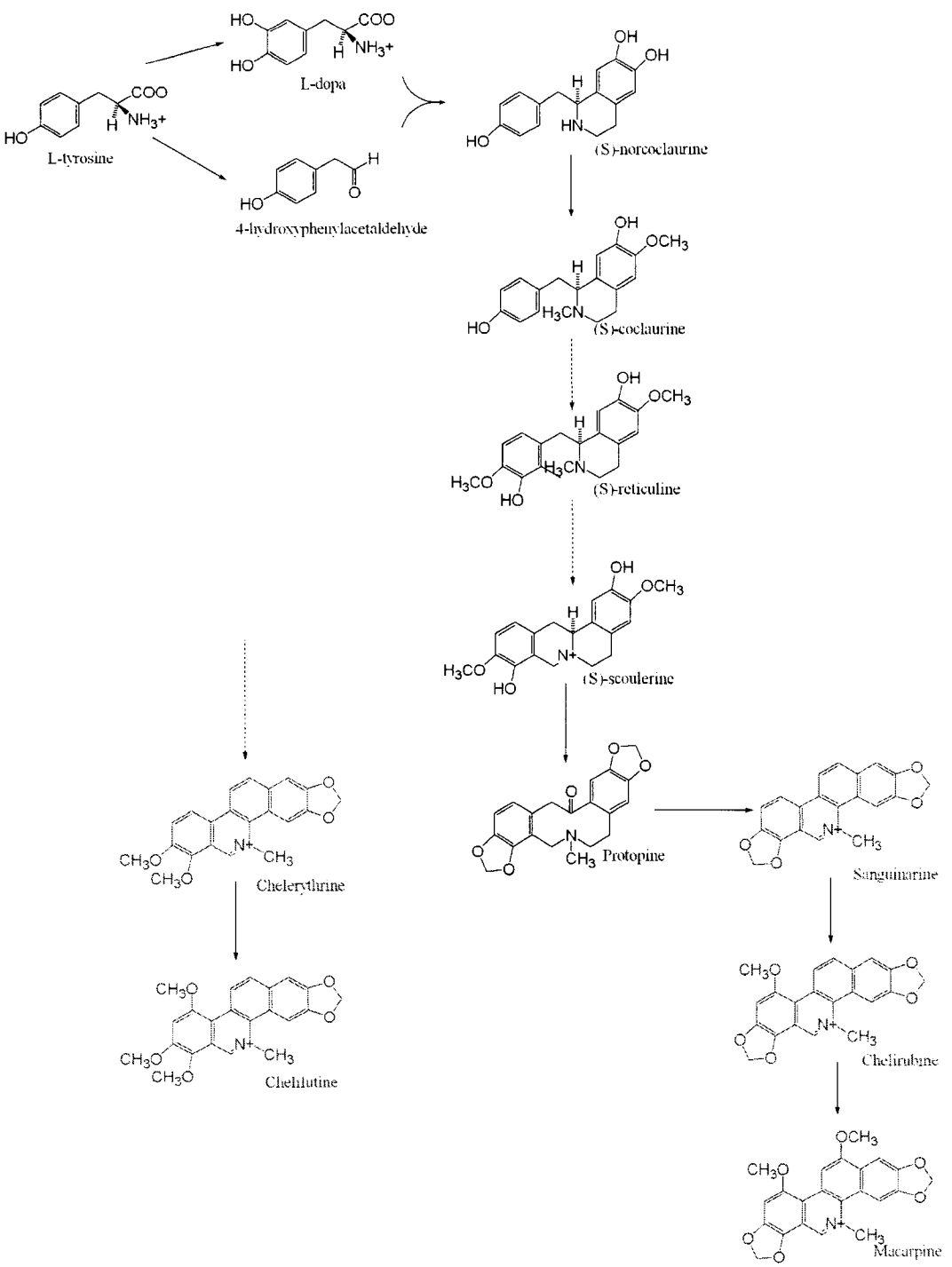


Figure 2.6 Voies des alcaloïdes benzophénanthridines chez *E. californica*

2.3 Dynamiques des cellules végétales en culture

De par leur croissance lente et leur capacité d'accumuler des nutriments et de compartimenter des réactions, les cellules végétales possèdent des dynamiques de culture très particulières qui les différencient des autres cultures cellulaires. Les principaux phénomènes dynamiques caractéristiques aux cellules végétales seront donc passés en revue.

2.3.1 Transport et accumulation des nutriments

Dans un environnement naturel, les cellules végétales ont besoin de plusieurs mécanismes d'adaptation physiologique et métabolique afin de préserver leurs fonctions de base malgré un environnement changeant (cycle circadien, pluie, sécheresse, appauvrissement du sol etc.). Un des exemples de cette capacité d'adaptation par le stockage est la fixation du CO_2 sous forme de sucres par la photosynthèse (jour) et la réutilisation de ces sucres en l'absence de lumière (nuit). La cellule végétale maintient ainsi son métabolisme en fonction, malgré que sa principale source d'énergie ne soit pas toujours disponible. Les cellules utilisées dans ces travaux ne sont pas en mode photosynthétique, mais le même phénomène d'accumulation de nutriments est tout de même observé en culture. Cependant, la dynamique est différente puisque les cellules en culture accumulent les nutriments par le milieu extracellulaire. De plus, cette accumulation n'est pas limitée aux sucres, mais elle inclut également le phosphate et l'azote. Ces mécanismes requièrent donc une grande capacité de transport, à la fois actif et passif, ainsi que des structures intracellulaires pour stocker les nutriments et les

réutiliser de manière optimale. La Figure 2.7 schématise (partiellement) ces phénomènes de transport et stockage chez les cellules végétales :

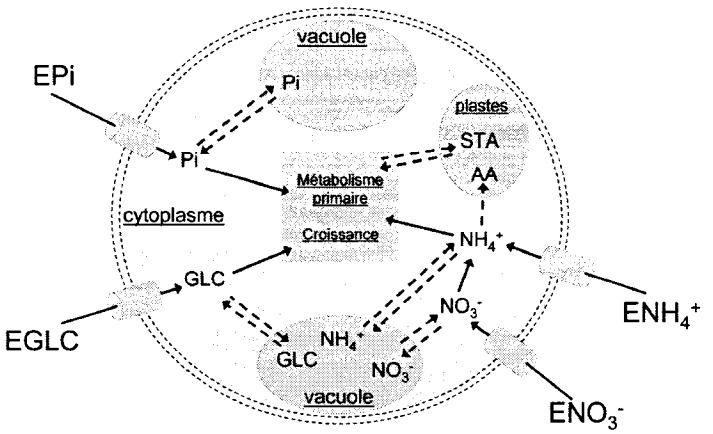


Figure 2.7 Transport et accumulation des nutriments chez les plantes.

Par simplicité, seul le transport du glucose est montré, mais les mêmes phénomènes s'appliquent au fructose et au saccharose, bien que le saccharose ne soit pas toujours transporté intracellulairement, tel qu'observé par Jolicoeur et al. (2003) pour des racines transformées de *Daucus carota*. Dans ce cas, comme pour les racines de *C. roseus*, le saccharose est hydrolysé par les invertases apoplastiques et les unités de glucose et fructose sont transportées à l'intérieur de la cellule. Les phénomènes de stockage sont très nombreux et seuls les plus importants d'un point de vue métabolique et constitutif seront considérés ici. Les transporteurs de nutriments sont des enzymes situées sur les parois cellulaires qui facilitent l'entrée des nutriments dans l'espace cytoplasmique. Cet échange, s'il est actif, s'accompagne d'un échange de proton (symport) par les H^+-

ATPases. Le flux de nutriment transféré dans la cellule peut être décrit par une cinétique de Michaelis-Menten :

$$v(S_i) = \frac{V_{max,i} \cdot S_i}{K_{Si} + S_i} \qquad 2.1$$

où v*(Si)* est la vitesse de transport du nutriment S_i : EPi, ENO3, ENH4, EGLC ou autre. Cette cinétique reste la façon la plus courante de décrire les taux de réactions enzymatiques, bien que des comportement plus complexes soient observés (Hill et al., 1977). Dans le cas des transporteurs actifs, le transport sera également modulé par la concentration en ATP dans la cellule. On peut donc préciser le transport en ajoutant un terme, toujours selon la cinétique de Michaelis-Menten :

$$v(S_i) = \frac{V_{max,i} \cdot S_i}{K_{Si} + S_i} \cdot \frac{ATP}{K_{ATP} + ATP} \qquad 2.2$$

Ainsi, phénoménologiquement, le transport est modulé à la fois par la concentration extracellulaire en nutriment et par la concentration intracellulaire en ATP (activation du symport de proton). En supposant que l'affinité des symports pour l'ATP soit invariante, chaque transporteur a donc deux paramètres cinétiques : un taux maximum d'accumulation ($v_{max,i}$) et une constante d'affinité (K_{Si}). Chez les plantes, on recense dans la littérature des systèmes de transport à basse affinité (LA) et à haute affinité (HA) pour

le Pi, l'ammonium et le nitrate. Les systèmes à haute affinité sont généralement induits par des faibles concentrations extracellulaires, tandis que les transporteurs à basse affinité sont constitutifs, voire basés sur des phénomènes diffusifs. Ceci explique en partie que les transporteurs à basse affinité ne soient pas toujours bien définis cinétiquement dans la littérature (v_{max} non identifié). Ces différents mécanismes de transport (inductible, constitutif, HA, BA et diffusif) permettent à la plante de « moduler » l'effort investi dans le transport des nutriments et de s'adapter à son environnement. Les sucres, eux, sont généralement assimilés par des transporteurs à simple affinité. Le tableau 2-2 résume les systèmes de transport utilisés par les plantes.

Tableau 2-2 Transport des nutriments chez les plantes

Nutriment	Transport	Paramètres cinétiques	Co-transport	Références
Pi	HA	$v_{max} \approx 0,05\text{-}20$ µmol•g^{-1}•h^{-1} $K_m \approx 2\text{-}5$ µM	2-4 H^+	Mimura et al., 1990 Mimura, 1999 Raghothama, 1999 Jolicoeur et al., 2003
	BA	$v_{max} \approx 0,1\text{-}40$ µmol•g^{-1}•h^{-1} $K_m \approx 0,05\text{-}1$ mM	„	Furihata et al., 1992 Ulrich-Eberius et al., 1981 Beever et Burns, 1980 Chrispeels et al., 1999 Schmidt et al., 1992
NO3	HA	$v_{max} \approx 0,3\text{-}0,82$ µmol•g^{-1}•h^{-1} $K_m \approx 5\text{-}200$ µM	2 H^+	Crawford et Glass, 1998 Williams et al., 2000
	HA inductible	$v_{max} \approx 3\text{-}8$ µmol•g^{-1}•h^{-1} $K_m \approx 20\text{-}100$ µM	„	Forde, 2000 Kronzucker et al., 1999 Cerezo et al., 1997
	BA	$v_{max} \approx 3 - 8$ µmol•g^{-1}•h^{-1} $K_m \approx 0,1\text{-}50$ mM	„	Filleur et Daniel-Vedele, 1999 Chrispeels et al., 1999 Glass et al., 2002
NH4	HA	$v_{max} \approx 5$ µmol•g^{-1}•h^{-1} $K_m \approx 50$ µM	---	Kronzucker et al., 1999 Britto et al., 2001
	BA	$v_{max} \approx$ n. d. $K_m > 500$ µM	---	
Sucres	Saccharose	$v_{max} \approx 5$ µmol•g^{-1}•h^{-1} $K_m \approx 0,14 - 2$ mM	H^+	Lemoinde, 2000 Jolicoeur et al., 2003 Leduc et al., 2006 Williams et al., 2000
	Glucose	$v_{max} \approx 0,17$ µmol•g^{-1}•h^{-1} $K_m \approx 5$ mM	H^+	
	Fructose	$v_{max} \approx 0,17$ µmol•g^{-1}•h^{-1} $K_m \approx 5$ mM	H^+	

Après leur entrée dans la cellule, les nutriments peuvent être utilisés directement dans le cytoplasme pour les réactions du métabolisme primaire ou ils peuvent être stockés dans les différents compartiments cellulaires, compartiments où peuvent également se produire certaines réactions métaboliques. Le cytoplasme agit également comme un premier réservoir pour ces nutriments puisque des variations considérables en concentrations cytoplasmiques sont rapportées dans la littérature. Sans entrer dans les

détails biomoléculaires du stockage de chaque nutriment, notons que ces mécanismes et compartiments servent généralement à maintenir des conditions relativement constantes pour les réactions du métabolisme primaire face à un environnement extracellulaire variable. De plus, la compartimentation peut également aider à diminuer l'effet d'une molécule toxique, comme un métabolite secondaire ou les déchets cellulaires, qui sont accumulés dans la vacuole. Pour chaque nutriment, il existe également des systèmes d'efflux vers le milieu extracellulaire afin d'éviter l'accumulation à des niveaux qui pourraient être toxiques. Ces systèmes ne sont pas passés en revue ici puisque le corps des travaux de cette thèse ne traitera pas de ce sujet. Le tableau 2-3 résume les différentes possibilités de stockage pour les nutriments et métabolites et les mécanismes impliqués.

Tableau 2-3 Localisation et stockage des nutriments et métabolites chez les plantes

Élément	Compartiment cellulaire	Concentrations	Particularités	Références
Pi	cytoplasme vacuole	5 - 30 µM 0 - 120 µM	Le transport dans la vacuole peut être actif et régulé par le Pi cytoplasmique	Plaxton, 1998 Mimura et al., 1990 Raghothama, 1999
NO3	cytoplasme vacuole	10 - 40 mM 0 - 100 mM	Un apport d'énergie est nécessaire pour transporter le nitrate dans la vacuole	Miller et Smith, 1992 Crawford et Glass, 1998 Kronzucker et al., 2000
NH4	cytoplasme vacuole	4 - 20 mM 0-5 mM	La synthèse d'acides aminés peut se produire dans les plastes	Kronzucker et al., 2000 Fischer et al., 1998 Roberts et Pang, 1992
Sucres	cytoplasme vacuole plastes	0,4 - 6 mM 0,02 - 20 mM 0,1 - 14mM	Les sucres sont stockés sous forme d'amidon dans les plastes	Rontein et al., 2002 Lemoinde 2000 Avigad et Dey, 1997 Leidreiter et al., 1995 Winter et al., 1994 Heineke et al., 1994
Alcaloïdes	vacuole	2-5 µM	La compartimentation et l'exsudation diminuent les effets cytotoxiques	Blom et al. 1990

La dynamique de gestion entre les nutriments extracellulaires et les bassins intracellulaires déterminera le comportement nutritionnel et métabolique des cellules en culture. Un exemple important à ce chapitre est la dynamique du phosphate. Pour une culture en suspension, le phosphate extracellulaire est généralement épuisé du milieu de culture après quelques heures et les bassins intracellulaires vont sustenter la croissance pendant plusieurs jours. La Figure 2.8 montre une telle dynamique pour des cellules de *E. californica* en suspension (données expérimentales de Lamboursain et Jolicoeur, 2005).

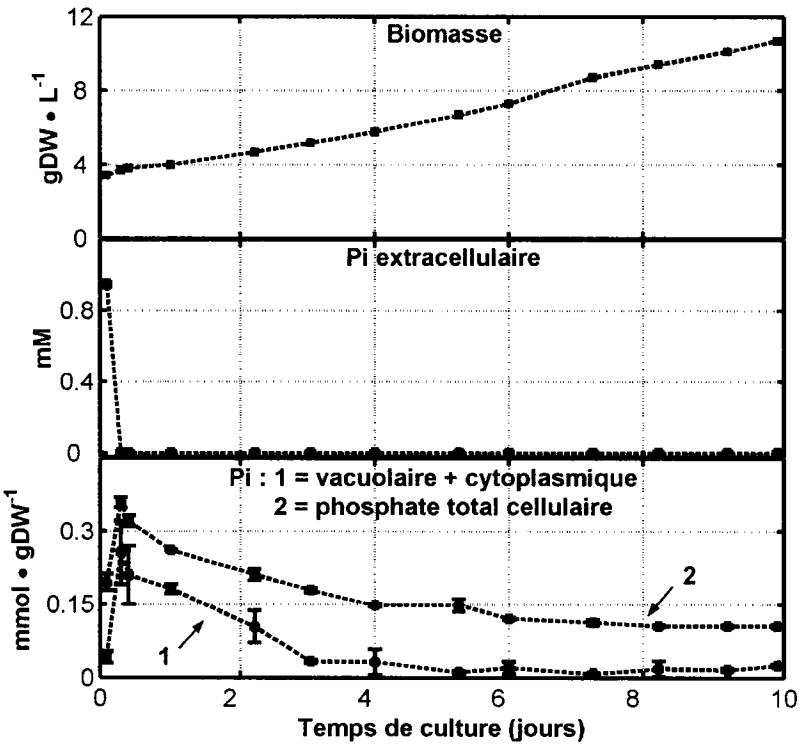


Figure 2.8 Dynamique du phosphate chez *E. californica* en culture cuvée

La Figure 2.8 montre que le Pi extracellulaire est rapidement assimilé (4h pour une culture de 10 jours), ce qui cause une nette augmentation des réserves intracellulaires. Ces réserves permettront à la cellule de bâtir les bassins de métabolites nécessaires à la croissance : nucléotides, phospholipides, sucres phosphatés etc. On remarque cependant que les réserves de Pi libre (cytoplasmique + vacuolaire) atteignent un minimum après 3 jours. En effet, la mesure de Pi libre après 3 jours est indifférenciée, statistiquement, des mesures pour les jours subséquents. Et pourtant, la croissance continue bien après ces 3 premiers jours. Il y a donc fort probablement une allocation dynamique des ressources en phosphate dans les voies du métabolisme primaire. L'étude du métabolome des

cellules végétales (Fernie, 2003; Fiehn, 2006) montre que les intermédiaires métaboliques des voies du métabolisme primaire peuvent exhiber des variations significatives de concentration dans le temps ou selon les compartiments cellulaires. Puisque plusieurs de ces intermédiaires contiennent une molécule de phosphate (suite à la phosphorylation du glucose ou du fructose) et que ces groupements phosphate sont réalloués lors de la conversion du phosphoénolpyruvate en pyruvate, on pourrait en conclure que les intermédiaires de la glycolyse constituent en eux-mêmes un bassin d'accumulation du Pi. Cette hypothèse de circulation et d'accumulation du phosphate par la glycolyse est très peu quantifiée dans la littérature, si ce n'est pour des réactions spécifiques. Alonso et al., (2005) ont observé un haut taux de circulation entre le glucose et le glucose-1-phosphate, mais leur étude était limitée à la dynamique d'une seule réaction enzymatique. Ce phénomène est similaire aux cycles futiles connus, comme celui du saccharose (Dieuaide-Noubhani, 1995), mais ferait intervenir le Pi, qui est souvent l'élément limitant la croissance. De plus, les dynamiques de gestion intracellulaire des nutriments présentent beaucoup d'interactions entre les 3 nutriments majeurs (carbone, azote, phosphate). Lamboursain et Jolicoeur (2005) ont observé des dynamiques nutritionnelles et des compositions cellulaires très différentes entre des cellules cultivées sur des milieux limités en azote ou en Pi. Des cellules limitées en Pi ou en azote accumulaient respectivement deux et trois fois plus de carbone total que des cellules cultivées sur un milieu standard. Ce phénomène a également été observé par Abu Qamar et al. (2005) qui ont observé une influence directe de la composition en Pi du milieu de culture sur le métabolisme du carbone et de l'azote. Dans leur étude, des

cellules de *Medicago sativa* ont été cultivées sur des milieux de cultures contenant entre 0 et 10 mM de Pi et des effets significatifs ont été observés à la fois sur les réserves de carbone et d'azote. Les cellules cultivées sur des milieux contenant plus de 2,5 mM de Pi accumulaient moins de sucres, d'amidon et d'acides aminés.

2.3.2 Cinétiques de croissance

Comme le montre la Figure 2.8, les cellules végétales ont des cinétiques nutritionnelles bien particulières et ceci peut se refléter sur la croissance (généralement mesurée en $gDW \cdot L^{-1}$). Contrairement aux autres cellules, la croissance exponentielle n'est pas courante chez les cellules végétales. Le profil suivant est souvent observé :

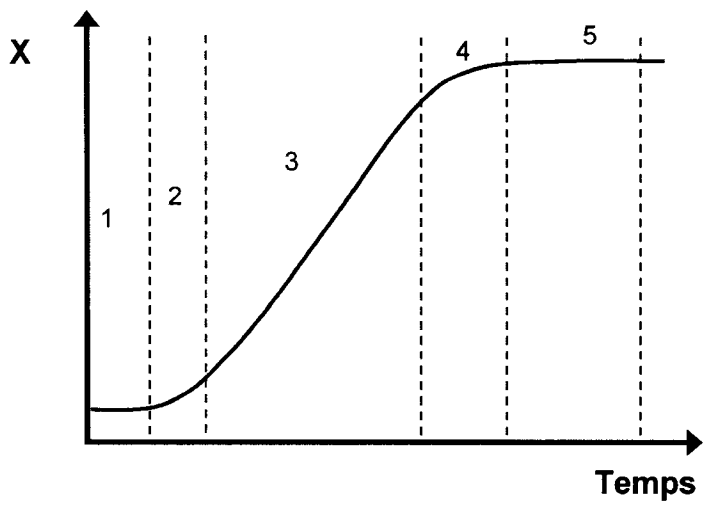


Figure 2.9 Profil typique de croissance pour les cellules végétales. 1 : latence; 2 : phase exponentielle courte; 3 : croissance linéaire; 4 : phase de décélération; 5 : phase stationnaire.

Ce profil de croissance avec une phase linéaire dominante est observé abondamment dans la littérature. Pour ne citer que quelques exemples : Curtis et al., (1991), Sirois (1997), Lee et Shuler (2000), Steward et al., (1999), Williams et al., (1999), Verpoortee et al., (2001), Su et al., (2002), Yan et al., (2005), Lamboursain et Jolicoeur (2005), Leduc et al., (2006), De Dobbeleer et al., (2006) ont tous observé une phase de croissance linéaire importante, que ce soit en mode cuvée ou même semi-continu. La Figure 2.8 (Lamboursain et Jolicoeur, 2005) montre même une croissance linéaire sur pratiquement toute la durée de la culture, ce qui est également observé dans certains des exemples mentionnés ci-haut. Ce phénomène pourrait avoir deux causes principales. Premièrement, une limitation en oxygène pourrait induire une croissance linéaire, puisque les cellules seraient ainsi limitées par un substrat qui est alimenté de manière constante (l'oxygène est continuellement alimenté par diffusion avec la phase gazeuse). Ce phénomène de croissance linéaire par limitation en oxygène est connu et répertorié chez les bactéries (Johnson et al., 1997). De plus, la croissance linéaire pourrait s'expliquer par un état intracellulaire variable en nutriments. Puisque les cellules croissent en s'alimentant sur leurs réserves intracellulaires (voir Figure 2.8), ces réserves (nucléotides, acides aminés, hexoses structuraux etc.) se trouvent à diminuer proportionnellement à la croissance. Donc, phénoménologiquement, plus la biomasse serait importante, plus le taux de croissance spécifique diminuerait. Ceci pourrait résulter en une croissance linéaire. Un phénomène de rétro-inhibition dû à une trop grande concentration en biomasse n'est pas en cause ici puisque aucun des exemples

cités précédemment ne présentait une concentration en biomasse élevée au point d'induire des inhibitions. De plus, il importe de mentionner que des exemples de croissance exponentielle soutenue se retrouvent également dans la littérature (Tanaka, 2000), mais ils sont beaucoup moins fréquents que les courbes de croissance avec une phase linéaire dominante. Curtis et al. (1991) ont été les premiers à mettre en équations, phénoménologiquement, cette croissance linéaire. Incidemment, leur approche faisait intervenir une diminution des réserves intracellulaires en nutriments comme facteur déterminant dans la diminution du taux de croissance spécifique.

2.4 Modélisation des dynamiques de cultures végétales

Depuis que Curtis et al. (1991), aient réussi à modéliser la croissance linéaire en considérant l'état intracellulaire, plusieurs modèles cinétiques utilisant cette approche ont été développés pour les cellules végétales. Cette approche est dite structurée, par opposition aux modèles qui ne considèrent pas l'état intracellulaire. La Figure 2.10 résume la classification des modèles pour décrire les cinétiques des micro-organismes (Fredrickson, 1970; Bailey, 1998).

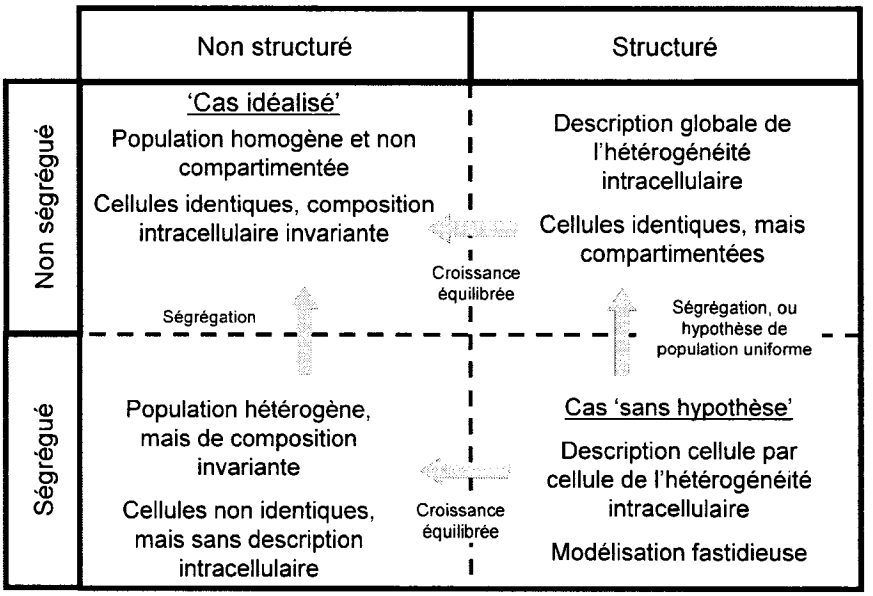


Figure 2.10 Classification des modèles biocinétiques selon Bailey (1998) et Fredrickson (1970).

Les dynamiques décrites précédemment classent automatiquement les cellules végétales dans une catégorie à modéliser de manière structurée. Bien que des approches de modélisation non-structurées aient été considérées dans la littérature (Drapeau, 1986; Taticek, 1990), les approches structurées sont beaucoup plus présentes (voir tableau 2-4). De plus, les approches de modélisation métabolique, qui seront présentées à la section suivante, pourraient être considérées comme étant de la modélisation structurée. La plupart des modèles pour les cellules végétales sont non-ségrégués, mais on trouve des exemples de modèles ségrégués dans la littérature. Par exemple, Bailey (1989) a modélisé la croissance et la production de cellules végétales en considérant une population non-homogène (cellules en croissance et cellules en phase stationnaire). Ces

modèles de population (ségrégués) ont été moins développés, notamment parce qu'ils requièrent beaucoup de puissance de calcul et des données expérimentales sur les diverses populations, donc une explosion au niveau des échantillons à traiter et au niveau du temps requis pour simuler le système. Cependant, il est permis de croire que l'avancement des méthodes expérimentales à haut débit (génome, métabolome, protéome, transcriptome) et la plus grande accessibilité à des ordinateurs de plus en plus puissants va permettre l'émergence de modèles de population dans un avenir relativement rapproché. Le tableau 2-4 résume les modèles cinétiques que l'on retrouve dans la littérature pour la croissance et les dynamiques nutritionnelles des cellules végétales.

Tableau 2-4 Modèles pour les cinétiques nutritionnelles chez les plantes

Référence	Phénomènes décrits	Type de modèle	Dimensions	
			Équations	Paramètres
Drapeau (1986)	Croissance Maintenance	non structuré non ségrégué	2	3
Taticek (1990)	Croissance Maintenance	non structuré non ségrégué	2	3
Bailey (1989)	Croissance Production Mortalité et lyse	structuré	5	7
de Gunst (1990)	Croissance Arrêt de croissance	ségrégué	2	2
Curtis et al. (1991)	Assimilation du Pi Croissance	structuré	2	2
Hooker et Lee (1992)	Assimilation des nutriments Croissance Respiration Maintenance Production	structuré	8	9
van Gulik et al. (1992)	Croissance Métabolisme sec. maintenance	structuré	5	7
van Gulik et al. (1993)	Assimilation du Pi Croissance Amidon Maintenance Lyse	structuré	7	11
Shibasaki et al. (1993)	Croissance Production Mortalité Lyse	structuré	4	6
Guardiola (1995)	Croissance Maintenance Production	non structuré	5	6
Schlatmann et al. (1999)	Consommation et accumulation des sucres Croissance Production de CO2	structuré	6	11
Zhang et Su (2002)	Croissance Assimilation du Pi Respiration	structuré	5	13
Jolicoeur et al. (2003)	Croissance Assimilation des sucres Assimilation du Pi Symbiose fongique	structuré	11	51

Ces modèles permettent tous de décrire des phénomènes nutritionnels et la croissance des cellules ou tissus végétaux. La description de phénomènes intracellulaires est incluse dans 9 de ces 13 modèles. Il apparaît donc évident qu'une meilleure description des évènements intracellulaires est une approche efficace pour améliorer notre compréhension de ces systèmes. La modélisation des voies métabolique fait partie de ces approches.

2.4.1 Modélisation dynamique du métabolisme

La modélisation du métabolisme des cellules végétales est un problème relativement peu couvert dans la littérature, surtout si l'on compare à l'avancement des travaux à ce chapitre pour les bactéries et levures. Ce retard s'explique peut-être, en partie, parce que le génome des plantes a été caractérisé plus tard que celui des bactéries. D'ailleurs, le premier modèle métabolique « à génome complet », c'est-à-dire incluant la transcription de tous les gènes connus d'une espèce, a été mis au point pour *Mycoplasma genitalium*, un organisme ayant un des codes génétiques les plus simples (Tomita et al., 1999). Fait à noter, ce modèle métabolique a été soumis pour publication seulement 3 ans après que le génome de *M. genitalium* soit séquencé. Les travaux de construction du modèle avaient fort probablement commencé avant que le génome ne soit complètement connu. Une connaissance, même partielle, des voies métaboliques, de la régulation et des cinétiques enzymatiques peut être mise en équations pour améliorer la compréhension du système à l'étude. L'application de modèle à l'échelle génomique a été réalisée pour *Escherichia coli* (Edwards et Palsson, 2000) et *Saccharomyces cerevisiae* (Forster et al., 2004;

Duarte et al., 2004) et ces modèles ont permis de prédire certaines propriétés des cellules à l'étude : réponse à une mutation ou un stress, croissance optimale dans divers milieux de culture etc. Pour le métabolisme végétal, des modèles complets ne sont pas encore disponibles, mais certaines voies en particulier ont été bien étudiées par la modélisation métabolique. Une emphase particulière a été portée sur les voies photosynthétiques, pour lesquelles ont retrouve le plus de travaux dans la littérature. D'autres parties du métabolisme végétal ont cependant été modélisées : respiration, biosynthèse d'amidon, de lipides, d'acides aminés ou de cellulose. Le tableau 2-5 résume les principaux modèles métaboliques cinétiques recensés dans la littérature pour les cellules végétales. Les modèles pour la photosynthèse ne sont pas tous inclus dans le tableau 2-5 puisque les travaux présents ne portent pas sur ces voies. Cependant, une revue de ces modèles est présentée dans Rios-Estepa et Lange (2007).

Tableau 2-5 Modèles cinétiques pour le métabolisme végétal

Référence	Espèce / Culture	Phénomènes ou compartiments étudiés	Nombre de réactions
Nungesser et al. (1984)	Plantes entières	Cycles des acides crassulacées	8
Petterson et al. (1988)	Plantes entières	Cycle de Calvin/chloroplates	13
Krab (1995)	Plantes entères	Respiration mitochondriale	4
Daae et al. (1999)	Plantes entières	Biosynthèse de copolymère	3
Fridlyand et Scheibe (1999)	Plantes entières	Cycle de Calvin	11
Poolman (2000)	Plantes entières	"	20
Rohwer et Botha (2001)	Canne à sucre (plante entière)	Saccharose	11
Delmer et Haigler (2002)	Plantes entières	Biosynthèse de la cellulose	10
Curien et al. (2003)	*Arabidopsis thaliana*	Acides aminés	3
Schwender et al. (2003)	*Brassica napus* (graines)	Glycolyse, voie des pentoses phosphate	8
Leduc et al. (2006)	*C. roseus* (racines transformées)	Métabolisme primaire central	45
Heinzle et al. (2007)	Pomme de terre	Métabolisme secondaire	7
Zhu et al. (2007)	Plantes entières	Photosynthèse et biosynthèse de saccharose/amidon	42

Seulement deux modèles cinétiques dans la littérature portent sur le métabolisme primaire central : celui développé par Leduc et al. (2006), qui sera adapté et utilisé dans cette thèse, et un modèle décrivant les flux (mais non les concentrations) pour les voies de la glycolyse et des pentose phosphate chez des graines de *Brassica napus* (Schwender et al., 2003). On constate donc qu'il reste énormément de travail à faire au

niveau de la modélisation des voies du métabolisme primaire central, que ce soit pour les tissus ou les plantes entières et surtout pour les cellules en suspension. On remarque également que les modèles plus récents (Leduc et al., 2006; Zhu et al., 2007) tendent vers une augmentation du nombre de voies métaboliques décrites. Si l'on se fie aux développements qui ont eu lieu ces 10 dernières années pour les bactéries et levures, la tendance à aller vers des modèles plus élaborés pour le métabolisme végétal sera probablement conservée dans un futur rapproché. D'autant plus que des outils très élaborés, autant au niveau expérimental qu'informatique, sont maintenant disponibles pour étudier le génome de plantes modèles comme *Arabidopsis thaliana.*

2.4.2 Régulation métabolique chez les plantes

Tel que mentionné précédemment, la régulation du métabolisme végétal est un problème extrêmement vaste et complexe. Les plantes sont les organismes ayant le code génétique le plus long de tout le règne vivant. Ceci leur confère une très grande capacité d'adaptation, ce qui se reflète sur leur métabolisme. Une particularité fondamentale dans le métabolisme végétal est l'influence majeure que peuvent jouer les nutriments et métabolites.

Premièrement, tel que défini par Plaxton (1996) pour la glycolyse végétale, la régulation peut être autant au niveau génétique (brute) que purement biochimique (fine). Dans le cas d'une régulation au niveau génétique, la plante va moduler son expression d'un ou plusieurs enzymes afin de maintenir constant un paramètre (flux, concentration,

rendement...) dans ses voies métaboliques. Cette régulation se produit sur plusieurs heures, voire généralement sur plusieurs jours, le temps que la plante puisse activer un ou des gènes (suite à un stress ou une perturbation) et transcrire les enzymes concernées.

En premier lieu, la gestion cellulaire des bassins de glucides et de sources d'azote est un facteur déterminant dans la régulation brute des enzymes du métabolisme central. Farrar et al. (2000) ont relevé plusieurs phénomènes de régulation brute en réponse à des changements dans les ratios carbone/azote dans la nutrition des plantes. Dans les plantes limitées en carbone mais non en azote, on note une activation de gènes reliés aux voies photosynthétiques (assimilation de carbone) ainsi qu'une activation de voies permettant la remobilisation des ressources carbonées (amidon, lipides), le tout couplé à une régulation positive des voies d'utilisation de l'azote (synthèse de protéines). Dans le cas inverse, soit avec des plantes limités en azote mais non en carbone, la priorité va à l'assimilation de l'azote et son utilisation optimale et le stockage de carbone est favorisé. Au niveau de la glycolyse plus particulièrement, Jang et Sheen (1994) ont observé que la phosphorylation des hexoses chez *Arabidopsis* induit une cascade de signalisation pour réguler positivement les voies glycolytiques. On voit donc ici que les hexoses n'ont pas seulement un rôle structurel ou métabolique, car ils peuvent être impliqués dans des cascades de signalisation. La régulation brute peut également impliquer le Pi. Abel et al. (2000) ont observé que des cellules de tomates en limitation de Pi présentaient une induction significative d'une phosphodiesterase qui dégradait des débris extracellulaires de nucléotides, afin de réutiliser de manière optimale le Pi. Wu et

al. (2003) ont également observé que 29% des gènes chez *Arabidopsis thaliana* pouvaient voir leur transcription affectée par une déficience en Pi. Dans ce cas ci, les gènes régulés négativement appartenaient à plusieurs groupes fonctionnels, dont la photosynthèse et l'assimilation de l'azote. Une limitation en Pi peut donc avoir des conséquences (au niveau de l'expression génétique) sur tout le fonctionnement cellulaire. Finalement, des exemples de régulation brute sont trouvés pour la glycolyse chez les plantes suite à un stress anaérobique (Rivoal et al., 2004 et références citées). Dans tous les cas, la régulation des enzymes glycolytiques est positive, ce qui permet d'augmenter la production d'ATP par la voie glycolytique. Ce mécanisme, couplé à une diminution des voies anaboliques, permet à la cellule de mieux gérer son bilan énergétique (Gibbs et Greenway, 2003).

Mis à part les mécanismes de régulation brute, les cellules de plantes ont également plusieurs mécanismes de régulation fine par l'activation ou la désactivation des enzymes suite à un changement de concentration en métabolite (Plaxton, 1996). Cette régulation se produit beaucoup plus rapidement que la régulation brute, puisqu'elle est essentiellement de nature biochimique et ne nécessite pas la transcription d'enzymes. À ce chapitre, la régulation fine par le Pi est très importante. La glycolyse végétale possède des voies alternatives pour utiliser le PPi plutôt que le Pi en cas de limitation. L'intégration du saccharose peut se faire par les invertases, mais également par la saccharose synthase, auquel cas une molécule de PPi est consommée pour régénérer une molécule d'UTP. La phosphofructokinase (PFK) utilise l'ATP pour fixer une molécule

de Pi sur le fructose-6-phosphate (F6P). En cas de limitation, une voie alternative, la phosphofructokinase-PPi-dépendante utilisera plutôt le PPi pour fixer un phosphate sur le F6P et libérer un Pi. Ces deux réactions alternatives confèrent à la glycolyse une grande flexibilité en cas de limitation en phosphate. De plus, tous les substrats utilisés lors de réactions enzymatiques régulent au moins une voie, soit celle qu'ils alimentent, via une cinétique réactionnelle (Michaelis-Menten ou autre). Chez les bactéries ou les levures, on néglige généralement l'effet des concentrations en métabolites en supposant un régime permanent. Chez les plantes, cette hypothèse n'est pas toujours vérifiée. Quelques cas de vois métaboliques contrôlées par les concentrations en métabolites sont rapportés dans la littérature. Borland et al. (1999) ont observé que la concentration intracellulaire en malate exerce un contrôle important sur la voie des acides crassulacéens. Carrari et al. (2003) ont noté que la régulation du cycle TCA chez les plantes pouvait être significativement influencée par les concentrations des intermédiaires métaboliques. De plus, comme pour toutes les cellules, le métabolisme végétal possède plusieurs mécanismes de rétro-action qui inhibent certaines voies afin d'éviter l'accumulation d'un produit ou d'une macromolécule (métabolite, amidon, nucléotides) dans la cellule. Il faut donc tenir compte de ces diverses régulations du métabolisme végétal lors de la construction d'un modèle. Évidemment, ceci est possible seulement si on modélise les concentrations en métabolites, une approche que l'on retrouve dans les modèles cinétiques pour le métabolisme. Même si ces estimations de métabolites sont approximatives, elles permettent de décrire globalement les phénomènes de régulation par les intermédiaires des voies métaboliques. En plus de la

cinétique de Michaelis-Menten, qui a été vue à la section 2.3.1, il est possible d'utiliser diverses fonctions pour représenter les cinétiques de régulation biologique. Parmi celles-ci, la fonction sigmoïde suivante :

$$f(S_i) = \frac{1}{1 + e^{-\alpha (S_i - S_{i,t})}} \qquad 2.3$$

Dans cette fonction, l'activité ($f(S_i)$) peut être modulée (entre 0 et 1) avec différents profils selon les paramètres 'α' et '$S_{i,t}$'. Tel que présenté à la Figure 2.11, cette fonction produit un profil lisse, modulable (par le paramètre 'α') et sans discontinuité. De plus, elle présente un avantage en ce que les paramètres ont une signification physiologique facilement interprétable. Le paramètre 'α' est proportionnel à la « pente » de la régulation exercée par le métabolite S*i*, c'est-à-dire qu'une pente élevée requiert seulement un petit changement de concentration pour produire un effet marqué. Le paramètre '$S_{i,t}$' représente une concentration « seuil » pour laquelle la régulation sera égale à 50% de la valeur maximale. La fonction peut facilement être multipliée, divisée ou additionnée afin de produire différents effets de régulation. L'utilisation la plus courante est de la multiplier à un taux de réaction afin d'activer ou de désactiver ce taux selon l'état du système (S_i).

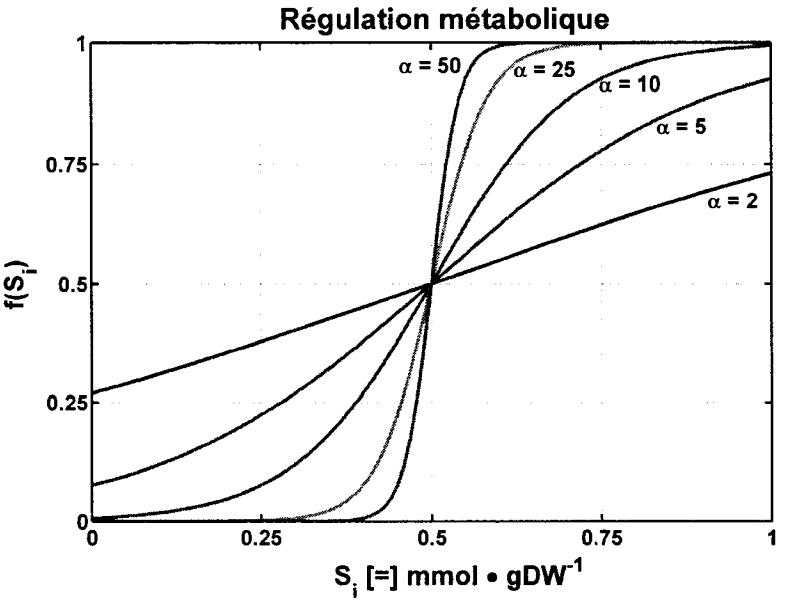


Figure 2.11 Exemples du comportement de la fonction sigmoïde avec Si,t = 0,5 et différentes valeurs pour le paramètre α.

Le type de profil obtenu est beaucoup plus représentatif des comportements biologiques qu'une simple fonction de décision binaire. Cette fonction sigmoïde a été utilisée avec succès par Leduc et al. (2006) pour décrire les phénomènes de régulation dans les voies du métabolisme primaire de *C. roseus*. Lors de ces travaux, diverses utilisations de cette fonction ont permis de bien décrire les phénomènes de régulation, y compris les niveaux d'accumulation maximums de métabolites, nutriments et macromolécules. Un des désavantages de cette fonction est qu'elle n'est pas continuellement différentiable. Cette propriété pourrait être nécessaire dans l'éventualité d'une analyse mathématique pointue.

2.4.2 Outils d'analyse du métabolisme

L'outil le plus commun du génie métabolique est la quantification des flux par l'Analyse de Flux Métaboliques (MFA, Stephanopoulos et al., 1998). La quantification des flux permet de savoir précisément où sont canalisés les substrats d'une voie métabolique, ce qui permet souvent d'identifier les étapes critiques pour améliorer le fonctionnement cellulaire. Le MFA est un bilan en régime permanent sur les intermédiaires métaboliques d'un réseau (la glycolyse, par exemple), ce qui permet de réduire le système à un ensemble d'équations algébriques que l'on peut résoudre à la condition d'avoir assez d'information. Si l'on formule le bilan sur un système métabolique comme suit :

$$\frac{dS}{dt} = M \bullet v - \mu \bullet S \qquad 2.4$$

où S représente un vecteur de concentrations en métabolites, M est la matrice stoechiométrique du système, v est le vecteur des flux métaboliques et μ est le taux de croissance, qui dilue les métabolites intracellulaires. En supposant que la dynamique de croissance est négligeable par rapport aux flux, et que les métabolites sont en régime permanent ou pseudo-permanent, c'est-à-dire que les concentrations ne vont pas varier significativement, on peut simplifier le système :

$$M \bullet v = 0 \qquad 2.5$$

Une représentations équivalente, en algèbre linéaire, à un système de 'm' équations avec 'n' inconnues. Ici, les inconnues sont les flux métaboliques (les éléments du vecteur v) et les équations sont les bilans en régime permanent sur les métabolites (les rangées de la matrice M). Tel que présenté par Stephanopoulos et al. (1998), il est très simple de solutionner ce système si l'on connaît 'n - m' flux et que la matrice est de rang plein (les 'm' équations sont indépendantes). Cette méthode permet ainsi de quantifier précisément les flux métaboliques. D'autres méthodes sont également possibles pour y arriver, comme l'utilisation de traceurs isotopiques (Roscher et al., 2000). Les méthodes de MFA ont été appliquées aux cellules végétales. Rontein et al. (2002) ont quantifié les flux du métabolisme primaire central de cellules de tomates et ont noté une grande stabilité dans les flux cataboliques élevés (glycolyse, TCA) ainsi que dans le cycle futile du saccharose et des variations marquées ont été mesurées dans les flux anaboliques, qui sont également plus faibles en valeur absolue. Ceci confère au métabolisme végétal une certaine stabilité, couplée à une capacité d'adaptation par la modulation des voies anaboliques. Sriram et al. (2004) ont quantifié les flux du métabolisme central dans des embryons de fèves de soya en utilisant du saccharose marqué au ^{13}C et une technique de RMN à 2 dimensions (^{13}C et ^{1}H) pour quantifier la compartimentation des flux. La même approche a été appliquée à des racines de *C. roseus* (Sriram et al., 2007). L'observation de stabilité du métabolisme central a également été faite par Spielbauer et al. (2006) à l'aide de traceurs, mais leur approche considérait uniquement les distributions isotopiques et non les flux métaboliques.

D'autres méthodologies que le MFA sont également possibles pour déterminer des flux métaboliques. Heinzle et al. (2007) ont mesuré les flux du métabolisme secondaire de tubercules de pommes de terre à l'aide d'une méthode dynamique impliquant la quantification de traceurs isotopiques après une impulsion. Cette méthode, qui implique une description sommaire de la dynamique du système, est très prometteuse pour les applications du génie métabolique avec les cellules végétales puisqu'il est souvent difficile, voire impossible, de faire des expériences en régime permanent avec les cellules végétales. Les méthodes dynamiques et en régime permanent ont d'ailleurs été comparées par Ratcliffe et Sharar-Hill (2006). L'approche dynamique consistant à mesurer la réponse d'un système métabolique suite à une perturbation est d'ailleurs utilisée de plus en plus fréquemment dans la littérature pour l'identification de systèmes métaboliques. Un numéro spécial de la revue Phytochemistry paru en 2007 contenait 8 articles (sur 21) présentant des approches dynamiques pour mesurer des flux métaboliques sur des cellules ou tissus végétaux.

Une autre approche très importante pour analyser un réseau métabolique est l'Analyse du Contrôle Métabolique (MCA). Cette méthode est une analyse de la sensibilité en régime permanent des flux et des concentrations suite à un changement dans un niveau d'enzyme. Le formalisme mathématique de cette méthode a été présenté pour la première fois par Kacser et Burns (1973). Cette publication rejetait l'idée préconçue selon laquelle les réseaux métaboliques sont régulés par une étape dite limitante. Ils suggéraient plutôt une méthode pour quantifier la contribution de chaque élément

(enzyme ou substrat) sur le contrôle de chaque réaction (flux) du système métabolique. Cette idée de contrôle distribué avait été émise en premier par Higgins (1963) pour les réactions séquentielles, mais Kascer et Burns (1973) ont été les premiers à établir le formalisme de la méthode pour pouvoir l'appliquer aux systèmes biologiques. Le MCA permet de calculer les coefficients de contrôle de flux (FCC), c'est-à-dire le pourcentage de variation que l'on devrait observer sur un flux suite au changement d'un enzyme. Selon ce formalisme, une étape limitante aurait donc un FCC près de 1. Malgré que l'idée initiale ait été reçue avec scepticisme par la communauté scientifique, le MCA est mentionné régulièrement dans la littérature scientifique depuis les années 1990. Dans une revue de la littérature sur les approches de modélisation du métabolisme végétal, Rios-Estepada et Lange (2007) n'ont noté aucun article traitant de MCA avant 1989 et 17 articles traitant de ce sujet après 1990. Malgré que les travaux initiaux de Kacser et Burns (1973) eurent un certain impact, quelques éléments en sont restés mal interprétés, notamment le fait que le formalisme du MCA est limité à l'application de faibles changements de niveaux enzymatiques. Ceci est nécessaire pour éviter de perturber le système métabolique, ce qui en changerait les propriétés. Donc, l'identification par MCA d'une étape qui a un FCC élevé n'implique pas nécessairement qu'une grande variation de cette enzyme augmentera le flux dans la voie métabolique. La raison de cette limitation est que le MCA étudie les propriétés d'un réseau métabolique en tant que structure et non pas en tant qu'une suite d'étapes individuelles. Donc, un changement considérable du niveau d'un seul enzyme du système change la structure dudit système et la distribution des FCC. C'est pourquoi Kacser et Burns (1973) avaient

limité l'approche MCA à de faibles perturbations. Vingt ans plus tard, Kacser et Acerenza (1993) ont donc proposé une méthodologie pour modifier un système métabolique de façon rationnelle en identifiant un groupe d'enzymes qui, si on en augmente la quantité, vont permettre d'augmenter un flux dans une voie tout en minimisant les perturbations sur le reste du réseau métabolique.

Bien que les méthodes du MCA n'aient pas été directement utilisées dans les travaux présents, leur connaissance est fondamentale à l'établissement de certaines méthodologies qui seront d'une importance critique. Les chapitres 6 et 7 de cette thèse porteront sur la modulation du comportement intracellulaire en utilisant les variables extracellulaires. Ceci nécessite que les flux et concentrations intracellulaires présentent non seulement une sensibilité aux variations de niveaux enzymatiques, mais également une sensibilité aux concentrations extracellulaires. Ce point a été observé par Mauch et al. (1997) pour un système métabolique générique. Dans leurs travaux, ils ont présenté une approche théorique pour quantifier, de manière dynamique, comment une variation en substrat (extracellulaire) affecte la distribution des FCC au niveau intracellulaire. Leur approche, très générale, incluait le calcul dynamique de tout le contrôle métabolique (FCC) suite à un changement de paramètre sur le système : niveau enzymatique, concentration intra ou extracellulaire, débit entrant de nutriment etc. Ce type d'analyse a ensuite été raffiné et appliqué sur des systèmes métaboliques simples par Ingalls et Sauro (2003). Ces approches sont extrêmement intéressantes pour l'étude du métabolisme végétal pour deux raisons : les cellules sont rarement en régime

permanent au niveau intracellulaire et, puisqu'elles accumulent rapidement les nutriments, les flux de transports de ces nutriments seront fort probablement importants dans le fonctionnement des cellules. Ces flux auront donc une grande importance sur le fonctionnement cellulaire et leur modulation par les concentrations extracellulaires pourrait permettre de moduler le fonctionnement intracellulaire de manière significative.

2.5 Design, opération et optimisation des bioprocédés utilisant les cellules végétales

Plusieurs approches sont possibles pour mettre au point un bioprocédé utilisant les cellules végétales à des fins de production de métabolites secondaires. Ces approches seront brièvement passées en revue dans cette section. Par soucis de concision, cette section sera limitée aux éléments clés qui permettront de mettre en contexte les travaux présents.

2.5.1 Systèmes de culture et mode d'opération

Le bioréacteur, malgré qu'il soit parfois difficile à opérer pour les cellules végétales, reste la plate-forme de choix pour mettre au point un bioprocédé. Plusieurs configurations ont été étudiées. Wagner et al. (1977) avaient suggéré l'utilisation d'un bioréacteur air-lift pour maximiser la productivité des cellules de *Morinda citrofolia* tout en évitant les problèmes de cisaillement. L'implantation d'un tel système est cependant problématique pour les suspensions qui forment beaucoup de mousse en surface. Un trop grand taux d'aération pourrait également altérer négativement la concentration de certains gaz en solution (CO_2 ou autre), ce qui diminuerait la productivité (Schlatmann

et al., 1995). Les systèmes agités mécaniquement offrent de nombreux avantages, dont une bonne capacité de mélange et un transfert accru avec la phase gazeuse. Cependant, la sensibilité des cellules au cisaillement et la rhéologie variable de la suspension font en sorte qu'il est difficile d'opérer avec des équipements standard comme les turbines Rushton ou l'hélice marine. Le problème du cisaillement peut être grandement réduit par l'utilisation d'un ruban hélicoïdal (Jolicoeur et al., 1992), qui permet de maintenir un bon mélange et une bonne capacité de transfert (k_La) tout au long d'une culture. Le faible taux de respiration des cellules végétales permet d'ailleurs d'opérer un bioréacteur avec un faible taux d'aération (0,1 volume de bioréacteur par minute), ce qui permet de minimiser les problèmes de mousse ou de dégazage excessif. La culture des cellules végétale n'est pas limitée au mode cuvée, bien que ce type de culture soit très présent dans la littérature. Des cultures en cuvée alimentée (Matsubara et al., 1989; Yan et al., 2005), perfusion (Su et al., 2003; De Dobeleer et al., 2006) ou en mode continu (Park et al., 1990; van Gulik et al., 1993) sont rapportées dans la littérature. La culture en perfusion offre de nombreux avantages, dont la conservation de la biomasse active dans le bioréacteur et la possibilité d'alimenter en continu les nutriments aux cellules. Il a été relevé par Di Cosmo et Misawa. (1995) que l'alimentation adéquate en nutriments était probablement le facteur le plus important dans le maintient de la productivité cellulaire. Cependant, leur étude était limitée à la composition du milieu et non aux méthodes d'alimentation (cuvée-alimentée, perfusion). Yan et al., (2005) ont montré qu'une stratégie de culture en mode semi-continu permet d'augmenter à la fois la productivité spécifique et de stimuler la croissance. Park et al. (1990) ont comparé la productivité de

C. roseus sous différents modes de culture (cuvée, cuvée alimentée et continu) et ont observé une meilleure productivité en catharantine dans le cas de la culture en continu. Il semblerait donc que l'alimentation adéquate de milieu de culture soit une option à considérer pour optimiser la productivité des cellules végétales, bien que le phénomène ne soit pas encore décrit de manière phénoménologique, c'est-à-dire que les nutriments limitants ou leur distribution entre métabolisme primaire et secondaire n'est pas bien définie dans la littérature.

2.5.2 Composition du milieu de culture

Plusieurs études démontrent que la composition du milieu est un facteur crucial pour stimuler à la fois la croissance et la productivité des cellules végétales (DiCosmo et Towers, 1984). Le principal problème dans ce cas est de donner aux cellules les ressources nécessaires à la croissance, tout en considérant que le métabolisme secondaire est plus facilement activé en phase stationnaire. Afin de réconcilier ces deux objectifs (croissance et production), un milieu de culture sans phosphate peut être utilisé pour la phase de production (Lamboursain et Jolicoeur, 2005). Cependant, il faut également garder en tête que la productivité n'est pas reliée à la présence ou l'absence d'un seul nutriment. Weathers et al. (1997) ont observé que la croissance et la productivité de tissus racinaires pouvaient être influencés par des effets d'interactions significatifs entre les éléments majeurs du milieu de culture (Pi, azote, glucides).

2.5.2 Utilisation d'un agent éliciteur

Afin de stimuler le métabolisme secondaire, il est possible d'utiliser un agent éliciteur pour simuler l'attaque d'un pathogène. En effet, une attaque sur les parois cellulaires des cellules végétales peut déclencher une cascade de signalisation menant à une augmentation de la concentration intracellulaire en acide jasmonique. L'acide jasmonique va ensuite induire les voies du métabolisme secondaire (Sembler et Parthier, 1993). Avec les cellules de *E. californica*, l'utilisation de chitine comme agent éliciteur permet de stimuler significativement les voies des alcaloïdes benzophénanthridines (Archambeault et al., 1996; Klavana et al., 2004 ; De Dobeleer et al., 2006). Il existe également d'autres méthodes pour stimuler le métabolisme secondaire. Wu et Lin (2002) ont réussi à obtenir une induction du métabolisme secondaire des cellules de *Panax ginseng* par une simple stimulation aux ultrasons. Dans leur étude, il a été démontré que le stress causé par les ultrasons induisait la même réponse chez les cellules que ne le ferait un éliciteur chimique comme la chitine. Puisqu'il est possible de moduler l'énergie transmise par ultrasons, cette approche pourrait s'avérer très intéressante, notamment dans une optique d'optimisation du processus d'élicitation.

2.5.3 Utilisation d'une phase extractive

Les alcaloïdes sont des molécules toxiques que la cellule accumule dans les vacuoles. Ces molécules sont excrétées très lentement dans le milieu extracellulaire, ce qui cause une rétro-inhibition sur les voies de production. Afin de contrer cette inhibition, il est possible d'utiliser une phase extractive pour retirer les alcaloïdes du milieu de culture.

Les résines polymériques (Amberlite XAD7) peuvent être utilisées pour les suspensions de cellules végétales. Williams et al. (1992) ont observé pour *Papaver somniferus* que l'utilisation d'une phase extractive XAD7 permettait de lever les inhibitions dues à l'accumulation d'alcaloïdes pour ainsi augmenter significativement la productivité. De plus, ceci permet de séquestrer le produit, ce qui facilite son éventuelle purification.

2.5.4 Dynamiques intracellulaires et conservation de la productivité

À la lumière des différents phénomènes mentionnés dans cette revue de littérature, une constatation s'impose : bien que plusieurs aspects biologiques, nutritionnels et métaboliques soient bien caractérisés chez les plantes, leur utilisation dans des bioprocédés reste tout de même marginale et ce, à cause de faibles productivités des cellules en culture. Il n'a évidemment pas été démontré que cette faible productivité est intrinsèque aux suspensions végétales et qu'il sera impossible d'y remédier un jour. Puisque Lamboursain et Jolicoeur (2005) ont observé que le statut nutritionnel des cellules végétales influence le maintient de la productivité et que Di Cosmo et al., (1995) mentionnent que la composition du milieu de culture est probablement le facteur le plus important à ce chapitre, il apparaît évident qu'une meilleure description des dynamiques nutritionnelles et métaboliques aidera à faire le lien entre nutrition et productivité. De plus, Rijhwani et Shanks (1998) ont observé qu'un changement dans le cycle de sous-culture de *C. roseus* (sous-cultures de 2, 3 ou 4 semaines) pouvait affecter la productivité en alcaloïdes et même le taux spécifique de croissance. Cette étude montre bien l'importance des variations que l'on peut observer entre l'état initial et

l'état final des cellules végétales en culture. Schématiquement (voir la Figure 2.12), on peut résumer le problème de ce bioprocédé en considérant les cellules comme un système de type « boîte noire ». On alimente un milieu de culture (M_0) aux cellules alors qu'elles sont dans un état initial (E_0). Durant la culture, les cellules montreront un potentiel de production (P) et un état nutritionnel et métabolique (E) qui pourront varier dans le temps.

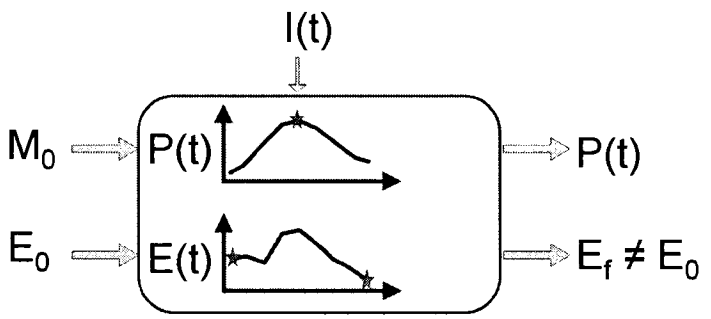


Figure 2.12 Schématisation d'un bioprocédé utilisant les cellules végétales

L'état nutritionnel et métabolique est ici défini de manière très large. Ce peut être autant une ou des concentrations en nutriments intracellulaires, tout comme ce pourrait être un flux métabolique à travers une voie spécifique. Sans le définir clairement à ce point ci des travaux, on peut poser l'hypothèse que cet état, quel qu'il soit, est important dans le maintient de la productivité. Ceci concorderait avec les observations de Rajhwani et Shanks (1998), ainsi que celles de Lamboursain et Jolicoeur (2005). Le problème, d'un point de vue bioprocédé, pourrait se résumer à trouver le meilleur milieu (M_0) et la meilleure stratégie d'induction du métabolisme secondaire (I). C'est souvent ce qui est effectué dans le cas des cultures bactériennes, pour lesquelles on suppose un état

cellulaire invariant, du moins durant la phase de croissance. Cependant, le problème majeur qui limite l'applicabilité d'une telle approche avec les cellules végétales tient au fait que l'état cellulaire peut varier énormément dans le temps (voir Figure 2.8), ce qui ne garantit pas que l'état final (E_f) sera équivalent à l'état initial (E_0). Lors d'un passage cellulaire, ceci peut induire une déviation au niveau des conditions initiales du système puisque E_0, qui est équivalent à E_f du passage précédent, peut changer d'une sous-culture à l'autre. Le problème serait potentiellement diminué par une cryopréservation des cellules, mais plusieurs espèces végétales restent sensibles à un tel procédé. De plus, des sous-cultures sont toujours nécessaires pour obtenir un inoculum de bioréacteur (1-10L, voire plus) à partir d'un vial de cryopréservation (≈10-50 mL). Immanquablement, il y a un risque que les sous-cultures produisent une déviation au niveau des conditions initiales. Cette perte de précision au niveau des conditions initiales peut résulter en un changement du profil de productivité des cellules, ce qui affectera la performance du bioprocédé. Donc, une stratégie de culture « invariante » (culture en mode cuvée ou cuvé alimenté avec débit constant, par exemple) pourra résulter en une perte de productivité. Cette perte de productivité est d'ailleurs rapportée dans la littérature (Shuler et Kargi, 2001) et elle est parfois attribuée à une potentielle dérive génétique, mais certains travaux pointent également vers l'importance de la nutrition et des dynamiques de passage cellulaire dans cette perte de productivité (Dicosmo et Misawa, 1995; Rajhwani et Shanks, 1998; Lamboursain et Jolicoeur, 2005).

Cette formulation du problème, qui est présenté ici d'un point de vue dynamique, est très peu présente dans la littérature. Le sujet est abordé dans les travaux de Lamboursain et Jolicoeur (2005), mais en considérant seulement la composition du milieu et des ajouts ponctuels comme variables manipulées sur le bioprocédé. Les stratégies de culture en semi-continu ou continu présentées dans la littérature (Park et al., 1990; Zhong, 2001) sont généralement « invariantes » en ce sens qu'aucune adaptation n'est faite pour suivre l'évolution nutritionnelle ou métabolique des cellules. Matsubara et al. (1989) ont présenté des cultures en mode semi-continu avec un milieu adapté à l'inoculum et à la composition cellulaire, ce qui a permis d'augmenter significativement le rendement en berbérine. Cependant, leur approche se limitait à changer la composition du milieu et à considérer seulement la densité de l'inoculum et non la densité en cours de culture. Donc, avec des conditions initiales définies, leur mode d'opération devenait également invariant, quoique sensiblement adapté à l'état initial du système. De plus, un problème fondamental pourrait survenir avec cette approche présentée par Matsubara et al. (1989). Si le milieu est adapté à la composition cellulaire, ceci a pour effet de balancer les sources de nutriments (C, N, P), ce qui ne permet pas de définir clairement lequel de ces nutriments sera limitant. Puisque l'identité du nutriment limitant influence la productivité (Lamboursain et Jolicoeur, 2005 et références citées), cette approche pourrait éventuellement induire une variabilité non désirée.

Le paradigme d'opération basé sur des protocoles « invariants » est évidemment expliqué par les exigences règlementaires des différents organismes qui approuvent les

bioprocédés dans le domaine pharmaceutique (Food and Drug Administration, Santé Canada). Cependant, l'émergence de l'approche PAT (Process Analytical Technologies[1]) en validation de procédés pharmaceutiques mène à penser qu'il sera éventuellement possible pour la biotechnologie végétale de faire valider non pas un protocole de culture, mais bien un « algorithme » incluant des estimations en ligne, commandes et prises de décisions. Ceci pourrait potentiellement réduire la variabilité et la perte de productivité des bioprocédés utilisant les cellules végétales. L'approche PAT a été appliquée avec succès aux cultures de bactéries et levures (Kaiser et al., 2007; Luttmann et al., 2007).

[1] http://www.fda.gov/cder/OPS/PAT.htm consulté le 22 janvier 2008

CHAPITRE 3 : MÉTHODOLOGIE

Ce chapitre présente les principales méthodes expérimentales utilisées pour générer les données présentées dans cette thèse. Les méthodes spécifiques à chaque partie du projet seront présentées en détail dans les chapitres s'y rapportant.

3.1 Culture et maintenance des cellules

Les cellules utilisées dans cette thèse sont des cellules d'*Eschscholtzia californica* (pavot de Californie) cultivées en suspension. Le modèle métabolique dynamique a été développé à partir de racines transformées de *Catharanthus roseus* (pervenche de Madagascar), mais aucune expérience n'a été effectuée avec cette espèce au cours des présents travaux. Une description plus approfondie de la culture et des méthodes expérimentales pour *C. roseus* se trouve dans Tikhomiroff (2001) et Leduc et al. (2006).

La lignée cellulaire de *E. californica* a été établie tel que décrit dans Lamboursain et al. (2002) par une culture aseptique de graines d'*E. californica* et le transfert d'explants sur un milieu B5 (Gamborg et al., 1968) solide pour démarrer une croissance en cals. Les cals ont ensuite été mis en suspension, toujours dans le même milieu B5, dont la composition complète est présentée en Annexe 1. Une fois la lignée établie, les cellules sont maintenues par un passage en flacons Erlenmeyer de 500 mL tous les 10-11 jours, soit lorsque la suspension a un volume cellulaire après sédimentation (5 minutes) de 70-80%. Le transfert est effectué sous une hôte à flux laminaire horizontal en transférant

80 g de suspension dans 160 g de milieu B5 frais. Les flacons sont ensuite placés sur un agitateur orbital tournant à 120 RPM et maintenu à 25°C ±1°C dans des conditions d'éclairage de laboratoire constantes.

3.2 Échantillonnage et traitement des échantillons

Des cultures en flacons agités (chapitre 6) et en bioréacteur (chapitre 7) ont été effectuées pour caractériser le comportement nutritionnel et métabolique des cellules d'*E. californica*. Ces cultures sont décrites plus en détail dans les chapitres s'y rapportant. L'échantillonnage était effectué de manière quotidienne pour toute la durée des cultures (entre 10 et 15 jours). Dans le cas des flacons, l'échantillonnage se faisait de manière destructive. La biomasse (humide et sèche) est mesurée en filtrant 10 mL de suspension sur un filtre en fibre de verre et en rinçant les cellules à l'eau déionisée avant de procéder à la pesée. Pour obtenir la masse sèche, les cellules sont placées au four à 80°C pendant 24h. Le reste de la suspension contenue dans le flacon est également filtré pour séparer les cellules du milieu. Le milieu filtré est gardé à -20°C pour analyses ultérieures. Les cellules sont rapidement transférées dans l'azote liquide et réduites en poudre à l'aide d'un mortier et d'un pilon. Les cellules sont ensuite gardées dans l'azote liquide avant d'être lyophilisées. Après lyophilisation, les cellules sèches sont conservées à -20°C et utilisées pour toutes les analyses de nutriments et métabolites. La section 3.4 résume les méthodes utilisées pour ces analyses.

3.3 Cultures en bioréacteur

Le système de bioréacteur utilisé lors des présents travaux est décrit en détail dans De Dobbeleer et al. (2006). Il s'agit d'un bioréacteur à perfusion de 3 L agité mécaniquement par un double ruban hélicoïdal. Un schéma du bioréacteur (adapté de De Dobbeleer et al., 2006) est présenté à la Figure 3.1.

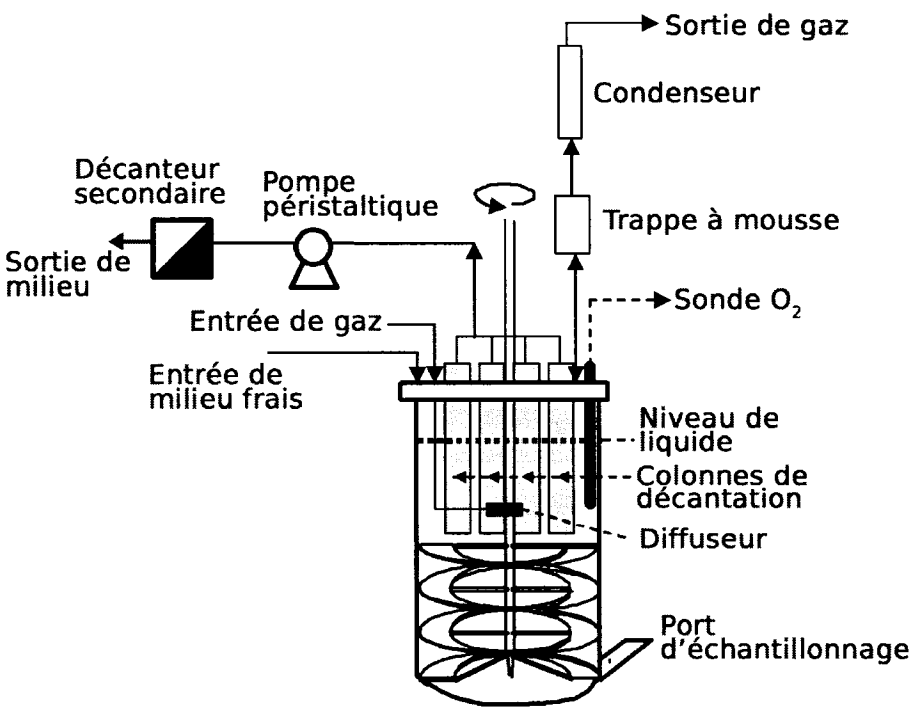


Figure 3.1 Vue en coupe du bioréacteur à perfusion.

Le tableau 3-1 résume les conditions d'opération utilisées lors des expériences de bioréacteur.

Tableau 3-1 Résumé des conditions opératoires lors des cultures en bioréacteur

Paramètre	Valeur	Unités - Détails
Agitation	40-60	RPM
Aération (mélange air-O_2)	100 - 400	mL • min^{-1}
Pression de gaz à l'entrée	1	atmosphère (relative)
Température	25 ± 1	°C
Luminosité	nulle	Le bioréacteur est couvert pour protéger les alcaloïdes
Oxygène dissous	40-60	% de la saturation en air à 1,1 atm
Milieu de culture	1,8	L (B5, voir annexe 1)
Inoculum	0,9	L (suspension de 10-11 jours)
Concentration initiale en biomasse	3,5 ± 0,5	gDW • L^{-1}
Élicitation	3,3	g chitine • L^{-1} (ajout ponctuel)
Phase extractive (résines)	60-85	g résine • L^{-1} (ajout ponctuel)

L'échantillonnage du bioréacteur était effectué de manière quotidienne en prélevant aseptiquement entre 50 et 75 mL de suspension par un port d'échantillonnage (Figure 3.1). Par la suite, l'échantillon est traité de la même façon que le sont les échantillons de culture en flacons (section 3.2). Des cultures en mode cuvée ont également été réalisées. Lors de ces cultures, un bioréacteur similaire était utilisé. La différence majeure dans ce système (par rapport au bioréacteur de la Figure 3.1) était l'absence de colonnes de décantation et la position du diffuseur au bas du bioréacteur.

3.4 Méthodes analytiques

Les méthodes analytiques utilisées pour obtenir les données nutritionnelles et métaboliques ainsi que les données de culture (biomasse, oxygène dissous) sont décrites en détail dans les chapitres 4 et 6. Le tableau 3-2 résume les variables d'état mesurées lors des cultures, les méthodes analytiques et les références s'y rapportant. Les mêmes méthodes analytiques ont été utilisées pour les échantillons provenant des cultures en flacons (chapitres 4 et 6) et des cultures en bioréacteur (chapitre 7). Des mesures d'activité pour les enzymes du métabolisme primaire ont également été effectuées. Les résultats pour les hexokinases ont été utilisés au chapitre 7, la méthode de mesure pour ces enzymes est donc brièvement présentée ici.

Tableau 3-2 Méthodes analytiques

Variables	Méthode	Références
Extracellulaires		
Glucose	kit enzymatique	Sigma #G3293
PO_4^-	HPLC	Lamboursain et Jolicoeur (2005) De Dobbeleer et al. (2006)
NO_3^-	HPLC	
NH_4^+	HPLC	
NH_4^+	kit enzymatique	Sigma #AA0100
Alcaloïdes totaux	Absorbance 343nm	Klvana et al. (2006)
O_2 dissous	Sonde polarographique	Mettler-Toledo (InPro 6800)
Intracellulaires		
Glucose	Extraction EtOH 80% kit enzymatique	Sigma #G3293
PO_4^-	Extraction TCA 5% HPLC	Lamboursain et Jolicoeur (2005) De Dobbeleer et al. (2006)
NO_3^-	Extraction TCA 5% HPLC	
NH_4^+	Extraction TCA 5% HPLC	
NH_4^+	Extraction TCA 5% kit enzymatique	Sigma #AA0100
Amidon	Hydrolyse par amyloglucosidase + kit enzymatique	Leduc et al., (2006) Sigma #A7420 Sigma #G3293
Saccharose-Fructose	Extraction EtOH 80% HPLC	De Dobbeleer et al. (2006)
Alcaloïdes totaux	Extraction MeOH acide absorbance 343nm	Lamboursain et Jolicoeur (2005) De Dobbeleer et al. (2006) Klvana et al. (2006)
Lipides	Extraction acétone-acide sulfosalicylique mesure par absorbance	Elkhaoui et al. (2004)
phosphomonoesters ATP, ADP Pi cytoplasmique et vacuolaire	^{31}P RMN	Gmati et al. (2004) Chen (2004)
Autre		
Alcaloïdes totaux extraits par les résines	Extraction MeOH acide absorbance 343nm	Lamboursain et Jolicoeur (2005) De Dobbeleer et al. (2006) Klvana et al. (2006)

3.4.1 Mesures d'activités enzymatiques

L'activité des hexokinases (HK : glucokinase et fructokinase) est mesurée par un protocole basé sur les travaux de Martinez-Barajas et Randall (1998). Les hexokinases sont extraites dans une solution tampon à partir de cellules fraîches et leur activité est mesurée *in vitro* par couplage avec la phosphoglucose isomérase (PGI) et la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH). Puisque la G6PDH produit du NADH, il suffit de mesurer l'absorbance de l'échantillon à 340 nm pour avoir le taux de réaction des hexokinases (qui sont les réactions limitantes dans les conditions de test). La Figure 3.2 résume ce schème réactionnel.

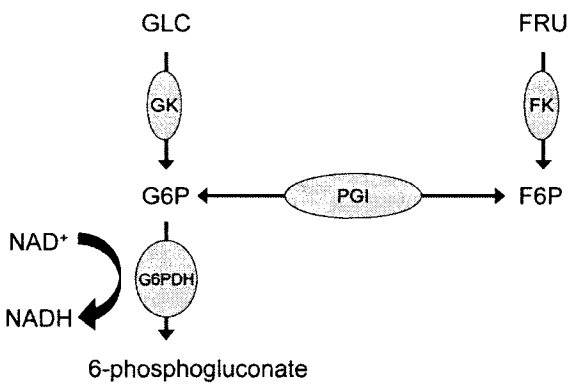


Figure 3.2 Schème réactionnel pour la mesure de l'activité des HK

Le tableau 3-3 donne la composition des différents tampons utilisés pour extraire, désaler et mesurer l'activité des hexokinases.

Tableau 3-3 Solutions pour mesures d'activités enzymatiques

Tampon d'extraction		**Tampon de désalage**		**Tampon de mesure**	
Composant	Concentration	Composant	Concentration	Composant	Concentration
Hepes-KOH, pH 7.5	30 mM	Hepes-KOH, pH 7.5	30 mM	Tris-HCl pH 8.0	50 mM
$MgCl_2$, 6 H_2O	5 mM	$MgCl_2$, 6 H_2O	5 mM	KCl	50 mM
KCl	100 mM	KCl	100 mM	$MgCl_2$, 6 H_2O	5 mM
EDTA	1 mM	EDTA	1 mM		
EGTA	1 mM	EGTA	1 mM		
glycérol	20%	glycérol	20%		
PVPP	5% (w/v)	DTT	1 mM	DTT	5 mM
DTT	5 mM			NAD^+	0.3 mM
ε-CA	5 mM			Tris- ATP	1 mM
benzamidine	1 mM			Fru / Glc*	5 mM
Triton X-100	0.1%			G6PDH*	1.4 $U.mL^{-1}$
leupeptin	1 $mg.L^{-1}$			PGI	6.7 $U.mL^{-1}$
PMSF	2 mM			H_2O	
H_2O				Extrait/tampon	20/180 (µL)

*Le fructose et la G6PDH sont ajoutés seulement pour mesurer l'activité de la FK
EDTA: acide éthylènediaminotétraacétique; EGTA: acide éthylèneglycol-bis-(aminoéthyléther)-tétraacétique; PEG: ; PVPP: polyvinylpolypyrrolidone; ε-CA: acide ε-amino caproïque; PMSF: fluorure de phénylméthylsulfonyl;

Les cellules congelées (1 gFW) sont donc extraites dans 2 mL de tampon d'extraction. Le désalage se fait sur des colonnes PD-10 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) en chargeant l'extrait et en éluant avec du tampon de désalage. Cet extrait est ensuite mélangé avec le tampon de mesure dans un ratio 20/180 (µL) et l'absorbance à 340 nm est mesurée sur un lecteur de mico-plaques VersaMax (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Lors de tous les tests, une plage linéaire de production de NADH était observée. La pente est donc proportionnelle au taux de réaction des hexokinases et permet ainsi de calculer le taux de réaction maximal observé.

3.5 Modélisation et algorithmes utilisés

Tel que mentionné dans la revue de littérature (Équation 2.4), les bilans de masse sur un système métabolique peuvent être écrits sous forme d'équations différentielles (équation 2.4). Dans le cadre des présents travaux, une approche de simulation dynamique sera utilisée pour résoudre ce bilan. Cette approche consiste à décrire le vecteur v des flux avec des équations cinétiques (équations 2.1, 2.2 et 2.3). Ces équations doivent représenter le plus fidèlement possible les cinétiques enzymatiques connues ou observées. Lorsque les paramètres cinétiques ($v_{max,i}$, $K_{m,i}$, α, $S_{i,t}$) sont définis, le système peut être résolu comme un système d'équations différentielles ordinaires. Le problème majeur ici consistera à trouver des paramètres physiologiquement réalistes pour décrire les comportements observés en culture.

Les simulations présentées dans cette thèse ont été effectuées dans l'environnement Matlab (The Matworks Inc.). Le système d'équations différentielles (Équation 3.1) est résolu numériquement à l'aide des fonctions ode15s et ode23s. La fonction ode15s est basée sur l'algorithme NDF (numerical differential formula) et ode23s est basée la formule de Rosenbrock d'ordre 2 (Shampine et Reichelt, 1997). Le modèle métabolique simule des dynamiques très rapides (respiration, consommation d'ATP) qui ont des temps caractéristiques de l'ordre de la seconde ou de la minute, ainsi que des dynamiques plus lentes (croissance, production de macromolécules). Le système d'équations différentielles est donc considéré comme étant «raide» (stiff). En conséquence, le choix du bon algorithme pour résoudre le système est important. Les

algorithmes choisis ont été conçus pour les problèmes d'équations différentielles «raides» (Shampine et Reichelt, 1997).

L'ajustement des paramètres cinétiques est très important afin d'avoir un modèle réaliste. Plusieurs paramètres peuvent être trouvés dans la littérature ou directement calculés à partir des données expérimentales. Cependant, le modèle doit représenter des cinétiques enzymatiques *in vivo*, alors que la plupart des études sur les cinétiques enzymatiques sont plutôt effectuées *in vitro*. De plus, le modèle inclut plusieurs réactions métaboliques, dont certaines sont parallèles (c'est-à-dire qu'elles ont des substrats et produits communs), il n'est donc pas acquis qu'une identification univoque est possible pour tous les paramètres. Dans ce cas-ci, une méthode de minimisation des moindres carrés entre les courbes simulées et les données expérimentales est très efficace pour trouver des paramètres produisant un comportement le plus réaliste possible. Pour ce faire, deux fonctions de l'environnement Matlab ont été utilisées : fminsearch et lsqcurvefit. La fonction fminsearch implémente une méthode de recherche directe basée sur l'algorithme du simplex (Nelder et Mead, 1985). Cette fonction n'utilise donc par de gradient numérique ou analytique et peut résoudre des problèmes contenant des discontinuités. Cet algorithme n'est pas le plus efficace pour résoudre les problèmes de moindres carrés non-linéaires tel que le problème étudié ici, mais sa versatilité et sa robustesse sont très utiles pour faire une optimisation des paramètres lorsque l'estimé initial est loin de la solution. L'autre algorithme utilisé pour l'optimisation des paramètres cinétiques du modèle est celui de Levenberg-Marquardt

(Moré, 1978) implémenté par la fonction lsqcurvefit. Cet algorithme permet de résoudre les problèmes de régression non linéaire (au sens des moindres carrés), ce qui le rend très utile pour optimiser des paramètres sur des systèmes biologiques (enzymes, cellules etc.) dont les cinétiques sont fortement non linéaires. Cependant, cet algorithme utilise parfois les dérivées (numériques), ce qui le rend plus susceptible de buter sur des discontinuités. Bien que les équations du modèle ne contiennent pas de discontinuités, il ne faut pas perdre de vue que la résolution numérique d'équations différentielles donne, par définition, une solution discontinue.

3.6 Estimation en ligne de la biomasse et des paramètres reliés au transfert d'oxygène

Au chapitre 7 des présents travaux, des résultats de cultures en bioréacteur sont présentés. Lors d'une de ces expériences, un estimateur de biomasse a été intégré dans une stratégie de culture nécessitant une alimentation proportionnelle à la biomasse.

L'estimation en ligne de la biomasse a été faite à l'aide du bilan sur l'O_2 dissous, avec une correction à chaque prise d'échantillon (mesure directe de biomasse). Le bilan sur l'O_2 dissous pour un bioréacteur peut s'écrire comme suit :

$$\frac{\partial O_2}{\partial t} = \left(k_L a_B + k_L a_S\right) \bullet \left(O_2^{*} - O_2\right) - q_{O2} \bullet X \qquad 3.1$$

Pour un bioréacteur à perfusion (voir section 3.3) ce bilan néglige l'apport d'oxygène par le débit entrant de liquide, mais cet apport est négligeable, puisque les taux de dilution sont faibles par rapport au taux de transfert ($D \approx 0.05\text{-}0.5\ j^{-1}$ et $k_La \approx 3\text{-}8\ h^{-1}$). De plus, le taux de transfert d'oxygène est séparé en deux composantes : une composante due au bullage (k_La_B) et une due au transfert avec la surface libre dans la partie supérieure du bioréacteur (k_La_S). Généralement, on néglige le transfert par la surface puisqu'il est relativement faible par rapport au transfert par bullage. On se retrouve donc avec un seul terme pour le transfert, au lieu de deux, ce qui simplifie l'analyse. Pour le bioréacteur utilisé dans ces travaux, cette hypothèse n'est pas toujours vérifiée. Un bioréacteur à l'échelle de laboratoire (3L) avec un ruban hélicoïdal et une agitation entre 30 et 60 RPM aura un k_La_S de l'ordre de $1\ h^{-1}$. Tel qu'observé par De Dobbeeler et al. (2006) pour le bioréacteur à perfusion utilisé ici, le taux de transfert par bullage est de l'ordre de $3\text{-}8\ h^{-1}$, tout dépendamment de la vitesse d'agitation et du débit de gaz alimenté. Il n'est donc pas acquis que le transfert par la surface sera négligeable lorsque l'alimentation en gaz est arrêtée pour de courtes périodes de temps.

Une méthode d'analyse basée sur le bilan (équation 3.1) a donc été développée pour tenir compte de ce phénomène. Il existe plusieurs méthodes pour estimer le taux de respiration spécifique et les taux de transfert en O_2. Puisque le bioréacteur utilisé lors des présents travaux est équipé d'une sonde à oxygène dissous, une méthode dynamique a été appliquée. Cette méthode consiste à interrompre l'alimentation en gaz pendant un certain temps, afin d'observer la consommation d'oxygène par les cellules (durant cette

période, le k_La par bullage est nul). L'alimentation en air est ensuite redémarrée et l'oxygène dissous revient au niveau antérieur au test. La Figure 3.3 présente des données expérimentales obtenues lors d'un tel test.

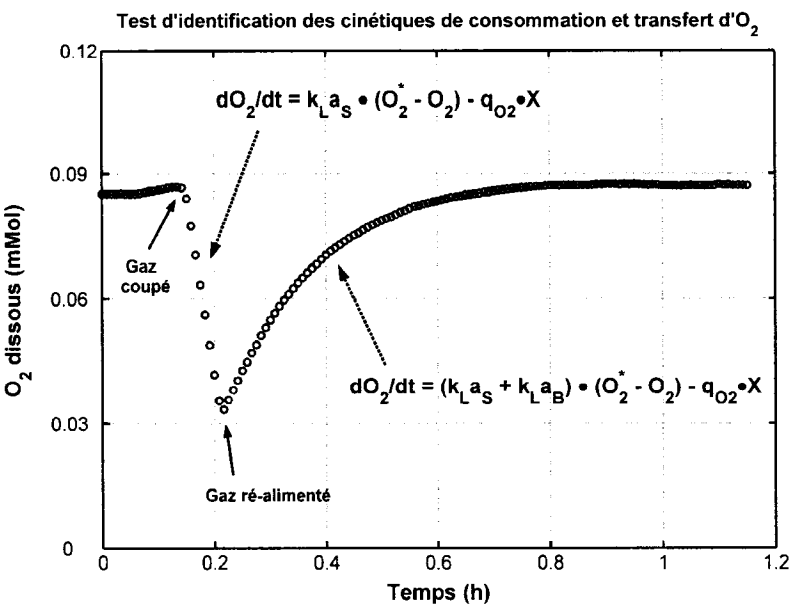


Figure 3.3 Identification des cinétiques reliées à l'O_2 dissous

Lorsque le terme de transfert par la surface est négligé, l'analyse devient triviale puisque durant la phase de non alimentation en gaz, la dérivée de l'O_2 dissous est tout simplement égale au terme q_{O2}•X. Quand ce terme est connu, il est possible de résoudre analytiquement le bilan pour la phase de remontée en O_2 dissous et ainsi trouver le k_La. Ici, afin de tenir compte du fait que l'aération par la surface n'est pas toujours négligeable, le bilan sur l'O_2 dissous a été résolu numériquement dans l'environnement Matlab et la courbe simulée a été comparée aux données expérimentales. L'algorithme

de Levenberg-Marquardt a été utilisé pour effectuer une régression non-linéaire et trouver les paramètres cinétiques optimaux pour décrire les données expérimentales d'O_2 dissous. Les paramètres suivants sont identifiés par cette analyse : k_La_B, k_La_S, q_{O2}. La concentration de saturation en O_2 (O_2^*) est définie par l'équation de Henry sur la solubilité des gaz. Cependant, les milieux de culture contiennent des ions qui peuvent affecter la solubilité des gaz. La solubilité de l'O_2 dans du milieu B5 en équilibre avec de l'air est de 0,21 mMol (Lamboursain et al., 2002). Il faut également considérer ici que le paramètre O_2^* variera dans le temps puisque l'O_2 dissous est contrôlé en enrichissant le gaz d'alimentation avec de l'oxygène pur (section 3.3). Cependant, puisque le composition du gaz alimenté est connue, on peut aisément calculer la valeur de O_2^* dans le temps afin de considérer la bonne valeur dans les calculs. Pour que le bilan de l'équation 3.1 soit résolu, on doit également connaître la concentration en biomasse (X). Les tests d'identification sont donc idéalement effectués juste après qu'un échantillon ait été prélevé sur le bioréacteur. Finalement, les données brutes d'O_2 ont été corrigées pour tenir compte du temps de réponse de la sonde. Le détail de cette correction est donné en Annexe C.

La Figure 3.4 présente un exemple de résultat obtenu avec cette approche d'identification.

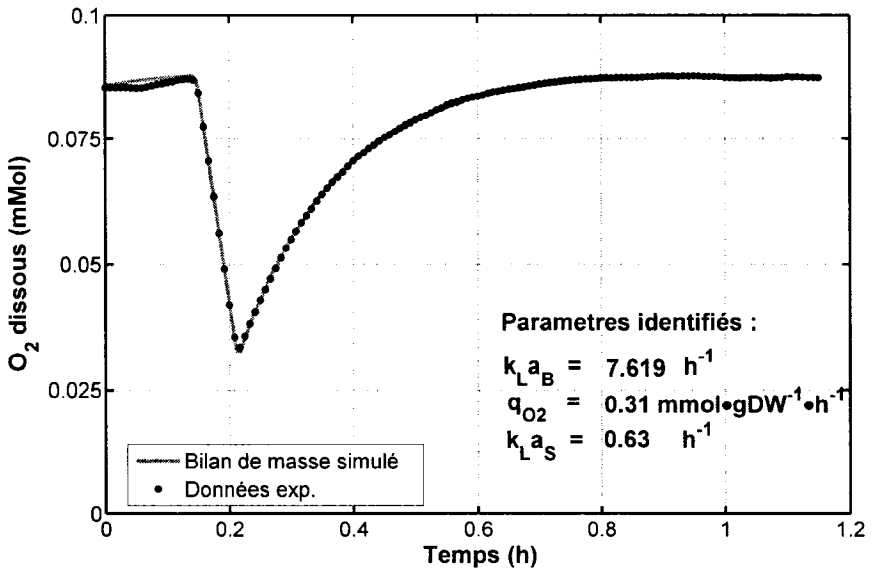


Figure 3.4 Identification de paramètres pour le transfert d'O_2

Les résultats de la Figure 3.4 nous montrent que le transfert par la surface n'est effectivement pas négligeable. Dans ce cas-ci, on observe que le k_La_S équivaut à 8,2% du k_La_B. Avec les paramètres du système bien identifiés, il est possible de réorganiser le bilan sur l'O_2 dissous (équation 3.1) afin de décrire la biomasse dans le temps. Lorsqu'un contrôleur sur l'oxygène dissous est utilisé, la dérivée de l'O_2 dans le temps est nulle et nous avons donc l'égalité suivante :

$$\left(k_L a_B + k_L a_S\right) \bullet \left(O_2^{*} - O_2\right) = q_{O2} \bullet X \qquad 3.2$$

Les variables q_{O2}, O_2, O_2^*, k_La_S et k_La_B, sont maintenant soit des variables estimées par le test de respiration, soit des variables directement mesurées (O_2) ou connues (O_2^*). On peut donc estimer la biomasse en tout temps avec l'équation suivante :

$$\hat{X} = \frac{\left(\hat{k}_L a_B + \hat{k}_L a_S\right) \bullet \left(O_2^* - O_2\right)}{\hat{q}_{O2}} \qquad 3.3$$

Les variables O_2 et O_2^* peuvent être continuellement mises à jour (i.e. à chaque seconde ou minute, soit beaucoup plus rapidement que les dynamiques de culture). Les paramètres estimés peuvent être mis à jour à chaque fois qu'un échantillon est prélevé et qu'un test de respiration est effectué. Cette mise à jour a été effectuée de manière quotidienne, puisque les échantillons étaient prélevés à cette fréquence. L'estimateur de biomasse a été testé sur une culture en perfusion avec un débit d'alimentation exponentiel de milieu B5 (données non montrées). La Figure 3.5 présente la comparaison entre les données expérimentales et l'estimation de la biomasse par le bilan sur l'O_2 dissous.

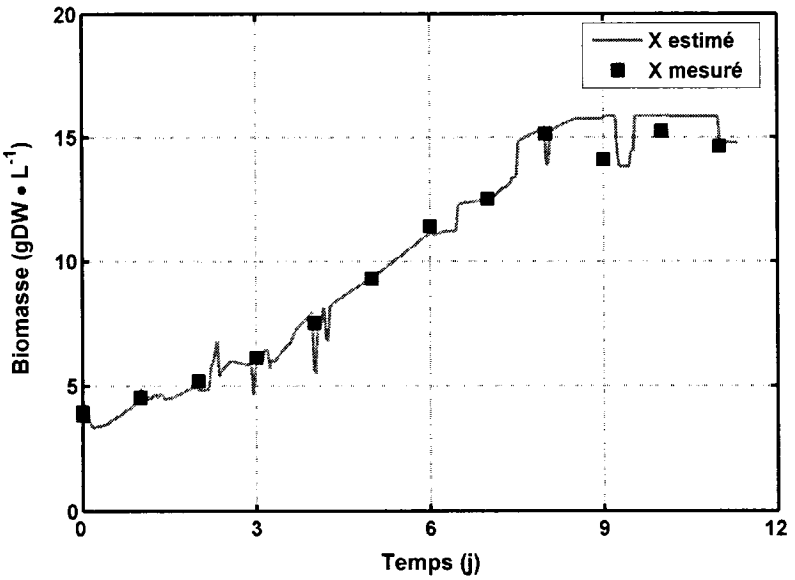


Figure 3.5 Estimation de la biomasse par le bilan sur l'O_2 dissous

L'estimateur de biomasse semble donc adéquat pour fournir des valeurs de biomasse entre les prises d'échantillons, puisqu'il suit bien les tendances expérimentales observées de la phase de croissance et de la phase stationnaire.

CHAPITRE 4 : A PREDICTIVE NUTRITIONAL MODEL FOR PLANT CELLS AND HAIRY ROOTS

4.1 Présentation de l'article 'A predictive nutritional model for plant cells and hairy roots'

Cette section reprend l'article intitulé ***A predictive nutritional model for plant cells and hairy roots***. L'article a été accepté pour publication dans la revue *Biotechnology and Bioengineering* (Vol. 99, No. 1, p.189-200).

Cet article vise à démontrer qu'il est possible de modéliser les dynamiques nutritionnelles des cultures végétales (cellules ou tissus) avec une structure commune de bilans de masse et d'équations cinétiques. Le modèle proposé dans cet article est une continuation de travaux antérieurs sur la modélisation de la symbiose mycorhizienne (Jolicoeur et al., 2003). Le modèle présenté ici décrit l'assimilation et la gestion intracellulaire des trois nutriments majeurs (sucres, azote, phosphate) pour les cultures végétales. Le modèle a été appliqué à deux lignées de racines (*D. carota* et *C. roseus*), ainsi qu'à une culture en suspension de *E. californica*. Le modèle permet d'identifier les paramètres reliés au transport des nutriments et à la croissance. De plus, la capacité prédictive du modèle a été vérifiée à l'aide de cultures en mode semi-continu (changement de milieu). Puisque la base de modélisation nutritionnelle s'est avérée

transposable entre différentes espèces cellulaires, ceci laisse supposer qu'il sera possible d'effectuer la même transposition pour un modèle métabolique.

4.2 A PREDICTIVE NUTRITIONAL MODEL FOR PLANT CELLS AND HAIRY ROOTS

M. Cloutier, É. Bouchard-Marchand, M. Perrier and M. Jolicoeur*

Canada Research Chair on the Development of Metabolic Engineering Tools,

Bio-P^2, Department of Chemical Engineering, Ecole Polytechnique de Montreal,

P.O. Box 6079, Station Centre-ville, Montreal, Quebec, Canada, H3C 3A7

***Corresponding Author**

Mario Jolicoeur, P.Eng., Ph.D.

Professor

Tel: 514-340-4711 ext. 4525

Fax: 514-340-4159

E-mail: mario.jolicoeur@polymtl.ca

4.3 ABSTRACT

A structured nutritional model proposed previously for the description of the symbiotic association of hairy roots and mychorrizal fungi was further developed to describe growth and nutritional behaviour of *Eschscholtzia californica* suspension cells and *Catharanthus roseus* and *Daucus carota* hairy roots in *in vitro* culture. The model describes the cells specific growth rate from intracellular nutrients such as inorganic phosphate (Pi), nitrogen sources (NO_3^- and NH_4^+) and sugars. Two-level Michaelis-Menten kinetics is used to describe Pi and NO_3^- uptake and a single Michaelis-Menten kinetic is used to describe sugars uptake. Model parameters for each cell line were calibrated using data from batch cultures and the predictive capacity of the model was tested using data from medium exchange hairy root cultures. The model describes growth and nutritional behaviour for the cell and hairy root lines. A sensitivity analysis was performed to identify critical model parameters and effect of initial conditions. The cell and hairy roots lines were also compared from their kinetic parameters. This work thus presents a kinetic model efficient for describing and predicting growth and nutritional behaviours of suspension cells and hairy roots.

4.4 KEYWORDS

Modeling, Plant Cells, Hairy Roots, Cell Nutrition, Kinetic Model

4.5 NOMENCLATURE

DWr: Dry-to-wet weight ratio converting the cell mass increase in medium water loss

Evap: Evaporation rate measured in Petri dish liquid cultures [mL•d^{-1}]

inhiP: Growth inhibition index on extracellular Pi

$K_{I,NH4}$: High affinity constant for the transport of NH_4^+ [mmol NH_4^+•L^{-1}]

$K_{II,NH4}$: Low affinity constant for the transport of NH_4^+ [mmol NH_4^+•L^{-1}]

$K_{I,NO3}$: High affinity constant for the transport of NO_3^- [mmol $NO3^-$•L^{-1}]

$K_{II,NO3}$: Low affinity constant for the transport of NO_3^- [mmol $NO3^-$•L^{-1}]

$K_{I,P}$: High affinity constant for the transport of Pi [mmol Pi•L^{-1}]

$K_{II,P}$: Low affinity constant for the transport of Pi [mmol Pi•L^{-1}]

$K_{I,S}$: Affinity constant for the transport of sugars [g sugar•L^{-1}]

K_N: Growth rate constant associated with intracellular nitrogen [g DW•mmol^{-1} N_c]

K_P: Growth rate constant associated with intracellular Pi [g DW•mmol^{-1} P_c]

K_{pp}: Growth inhibition constant on extracellular Pi [mmol Pi•g^{-1} DW]

K_S: Growth rate constant associated with intracellular sugars [g DW•g^{-1} sugar]

m_N: Hairy root maintenance rate related to N [mmol N_c• g^{-1} DW• d^{-1}]

m_P: Hairy root maintenance rate related to Pi [mmol P_c•g^{-1} DW•d^{-1}]

m_S: Hairy root maintenance rate related to sugars [g sugar•g^{-1} DW•d^{-1}]

N_c: Intracellular nitrogen concentration [mmol^{-1} N_c• g DW]

$N_{c,crit}$: Critical intracellular nitrogen concentration [mmol N_c• g DW^{-1}]

$N_{c,min}$: Minimum intracellular nitrogen concentration [mmol N_c• g DW^{-1}]

NH_4^+: Extracellular NH_4^+ concentration [mmol NO_3^-•L^{-1}]

NO_3^-: Extracellular NO3$^-$ concentration [mmol NO_3^-•L^{-1}]

Pi: Extracellular inorganic phosphate concentration [mmol Pi•L^{-1}]

P_c: Intracellular Pi concentration [mmol P_c•g^{-1} DW]

$P_{c,crit}$: Critical intracellular Pi concentration [mmol P_c•g^{-1} DW]

$P_{c,min}$: Minimal intracellular Pi level [mmol P_c•g^{-1} DW]

r_{hydro}: Sucrose specific hydrolysis rate [g sucrose•g^{-1} DW•d^{-1}]

S: Total extracellular sugars (glucose + fructose) concentration [g sugars•L^{-1}]

S_c: Intracellular sugars concentration [g sugars•g^{-1} DW]

$S_{c,crit}$: Critical intracellular sugars concentration [g sugars•g^{-1} DW]

$S_{c,min}$: Minimum intracellular sugars concentration [g sugars•g^{-1} DW]

SC_c : Intracellular storage carbohydrates concentration [g sugars•g^{-1} DW]

S0: Extracellular sucrose concentration [g sucrose•L^{-1}]

μ: Specific growth rate [d^{-1}]

μ_{max}: Maximum specific growth rate [d^{-1}]

V: Liquid medium volume [L]

$V_{max,I,NH4}$: High affinity NH_4^+ maximum specific uptake rate [mmol NH_4^+•g^{-1} DW•d^{-1}]

$V_{max,II,NH4}$: Low affinity NH_4^+ maximum specific uptake rate [mmol NH_4^+•g^{-1} DW•d^{-1}]

$V_{max,I,NO3}$: High affinity NO_3^- maximum specific uptake rate [mmol NO_3^-•g^{-1} DW•d^{-1}]

$V_{max,II,NO3}$: Low affinity NO_3^- maximum specific uptake rate [mmol NO_3^-•g^{-1} DW•d^{-1}]

$V_{max,I,Nmin}$: NO3$^-$ maximum specific uptake rate at $N_c < N_{c,min}$ [mmol NO3$^-$•g^{-1} DW•d^{-1}]

$V_{max,I,P}$: High affinity Pi maximum specific uptake rate [mmol Pi•g^{-1} DW•d^{-1}]

$V_{max,II,P}$: Low affinity Pi maximum specific uptake rate [mmol Pi•g^{-1} DW•d^{-1}]

$V_{max,I,Pmin}$: Pi maximum specific uptake rate at $P_c < P_{c,min}$ [mmol Pi•g^{-1} DW•d^{-1}]

$V_{max,I,S}$: Maximum sugars uptake rate [g sugar•g^{-1} DW•d^{-1}]

$V_{max,I,Smin}$: Maximum sugar uptake rate at $S_r < S_{r,min}$ [g sugar•g^{-1} DW•d^{-1}]

$V_{max,I,SC}$: Maximum rate for storage of carbohydrates [g sugar•g^{-1} DW•d^{-1}]

X: Biomass [g DW/dish or g DW/flask]

$Y_{X/N}$: Yield coefficient on nitrogen [g DW•$mmol^{-1}$ N_c]

$Y_{X/P}$: Yield coefficient on Pi [g DW•$mmol^{-1}$ P_c]

$Y_{X/S}$: Yield coefficient on sugar [g DW•g^{-1} sugar]

4.6 INTRODUCTION

Growing in nutrient limited and variable soil conditions, plants have developed unique physiological strategies maintaining efficient management of intracellular inorganic phosphate (Pi) (Bieleski, 1973; Bieleski and Ferguson, 1983; Schachtman et al., 1998; Plaxton, 1999), nitrogenous compounds (Crawford and Glass, 1998) and sugars (Thorsteinsson and Tillberg, 1987; Schellenbaum et al., 1998). Plant cell nutritional state thus plays a crucial role on cell metabolism by controlling enzyme activity and gene expression. Intracellular Pi is involved in the regulation of the bioactivity of metabolic intermediates, nucleotides (e.g. ATP, NADPH) and enzymes through phosphorylation/dephosphorylation processes (Thorsteinsson and Tillberg, 1987). Wong et al. (2004) showed that the expression of one of the asparagine synthetase genes (ASN2) in *Arabidopsis thaliana* was correlated to intracellular ammonium accumulation. In *in vitro* culture, Pi and ammonium ions of standard culture media such as B5 and MS are usually depleted within the first hours or days and the cell storage pools then support growth for the remaining days or weeks of culture. Sub-culturing *Eschscholtzia californica* cells in standard B5, low-Pi and low-nitrate B5 media has resulted in cells with significantly different behaviours (Lamboursain and Jolicoeur, 2005). The maximum specific production in total alkaloids after elicitation by chitin showed to occur at different growth stages such as at stationary phase (6 to 10 d post-inoculation) for the nitrate-limited medium, and much earlier for the Pi-limited medium at early exponential growth (1 to 3-d-old). Surprisingly, this trend coincided with the cells intracellular content in free glucose with time. The nitrate-limited culture has led to

~7 times more alkaloids than for the Pi-limited culture and the cells specific sugar content was also ~7 times higher that that in Pi-limited culture.

A plant cell is highly sensitive to its nutritional environment and perturbations in medium composition as well on the identity of the limiting nutrient. These factors will play on plant cell behaviour and affect our capacity to perform reproducible cultures. The cell interaction with its environment is highly dynamic and has an impact on the long term. Therefore, a better knowledge on the relationship between cell behaviour and its nutritional state might give precise insights allowing to adequately manipulating the culture medium and reduce culture variability. Such knowledge may be transposed as a tool enabling manipulating cell behaviour towards specific objectives such as growth and/or productivity in a molecule of interest. A descriptive model for estimating plant cell nutritional state *in vitro* was suggested by Curtis et al. (1991) who proposed to use intracellular Pi concentration in the specific growth rate expression for *Papaver somniferum* suspension cells. Then, van Gulik et al. (1993) simulated *Catharanthus roseus* cell suspension growth using both intracellular Pi and sugar concentrations in the specific growth rate expression. This model was modified by Schlatmann et al. (1999) who described ajmalicine production in *C. roseus* cell suspension from intracellular sugar accumulation. Zhang and Su (2002) used the model proposed by van Gulik et al. (1993) to estimate intracellular Pi concentration applying an extended Kalman filter. However, their method is restricted to phosphate limited cultures. In a previous work, a nutritional model was developed for *Daucus carota* hairy roots (Jolicoeur et al., 2003) with the root cells specific growth rate described from intracellular Pi and sugars and

extracellular nitrate. The model also includes the concept of minimal intracellular concentration in Pi and sugars for growth to proceed, which allowed describing the lag phase. However, the results of Lamboursain and Jolicoeur (2005) suggest that specific growth rate term should also include intracellular pools in nitrogenous compounds. The goal of the present work was thus to evaluate the potential of a structured nutritional model based on intracellular cell contents in Pi, nitrogenous compounds and sugars to describe the growth and nutritional behaviour of plant cells grown as suspension cells as well as hairy roots. A brief summary of the aforementioned articles on structured nutritional modelling for plant cells and hairy roots is presented in Table 4-1, including the model proposed in this work. The nutritional models are compared on the basis of cell type, nutrients (extracellular and intracellular), description of secondary metabolites production, number of parameters and model predictive capacity. The model presented here is the first model to describe both the extracellular and intracellular dynamics for the three major constitutive nutrients (carbon source, phosphate and nitrogen) in both plant cells and hairy roots cultures. Since one of these three nutrients is often the limiting nutrient, the model proposed here can be applied in a broad range of experimental conditions. The description of the dynamics for sugars, nitrogen sources and phosphate allows using the model without *a priori* assumptions on the limiting nutrient.

Table 4-1 Models for Plant Cells and Hairy Roots Nutrition

Model	Cell type	Nutrients	
		Extracellular	**Intracellular**
Curtis et al. (1991)	Cell suspension	---	Pi
van Gulik et al. (1993)	Cell suspension	Glucose, Pi	Pi, phosphorylated compounds (pooled), Carbohydrates
Schlatmann et al. (1999)	Cell suspension	Glucose	Carbohydrates
Zhang and Su (2002)	Cell suspension	Pi	Pi, phosphorylated compounds (pooled)
Jolicoeur et al. (2003)	Hairy roots	NO_3^-, Sugars, Pi	Sugars, Pi
Leduc et al. (2006)	Hairy roots	NO_3^-, Sugars, Pi	Nitrogen, Sugars, Pi
Cloutier et al. (2007)	Hairy roots	NO_3^-, Sugars, Pi	Nitrogen, Sugars, Pi
This work	Hairy roots/ Cell suspension	NO_3^-, NH_4^+, Sugars, Pi	Nitrogen, Sugars, Pi

Model	Cell type	Secondary metabolites	Number of parameters	Predictive capacity tested
Curtis et al. (1991)	Cell suspension	no	2	no
van Gulik et al. (1993)	Cell suspension	no	11	yes
Schlatmann et al. (1999)	Cell suspension	ajmalicine	11	yes
Zhang and Su (2002)	Cell suspension	no	13	yes
Jolicoeur et al. (2003)	Hairy roots	no	51	no
Leduc et al. (2006)	Hairy roots	precursors	89	no
Cloutier et al. (2007)	Hairy roots	precursors	108	no
This work	Hairy roots/ Cell suspension	no	39	yes

Model parameters were calibrated for *Eschscholtzia californica* cell suspension and *Catharanthus roseus* and *Daucus carota* hairy roots using experimental data taken from previous works (Lamboursain and Jolicoeur, 2005, Leduc et al., 2006, Bouchard-Marchand, 2000). These experiments are described in the Materials and Methods section. A sensitivity analysis was performed to identify critical parameters and culture conditions. The predictive capacity of the model was tested on data from medium exchange cultures of *C. roseus* and *D. carota* hairy roots.

4.7 MATERIALS AND METHODS

Biological materials and description of the cultures

Hairy roots cultures

Data for *D. carota* hairy root culture were taken from Bouchard-Marchand (2000). *D. carota* hairy roots were transformed by *Agrobacterium rhizogenes* as described in Bécard and Fortin (1988). The root cultures were maintained in 250 mL flasks by monthly transfers of ~ 0.6 g fresh weight (FW) of roots in 80 mL fresh modified White medium (Table 4-2, Bécard and Fortin, 1988). The flasks were maintained at 23±1°C, in the dark (except for manipulation) and agitated at 120 rpm. Batch and medium exchange cultures were both performed using ~ 0.32 g FW of roots obtained from 15 to 20 day old shake flask cultures. The liquid culture medium was based on minimum (M) medium (Table 4-2, Bécard and Fortin, 1988) using KH_2PO_4 (0.12 mM Pi), KNO_3 (3 mM NO_3) and 1% sucrose.

Table 4-2 Media composition

	Modified White's (Bécard and Fortin, 1988)	**M** (Bécard and Fortin, 1988)	**B5** (Gamborg, 1968)
	($mg \cdot L^{-1}$)	($mg \cdot L^{-1}$)	($mg \cdot L^{-1}$)
Glucose	---	---	30 000
Sucrose	10 000	10 000 - 30 000	---
KNO_3	80	80	2500
$Na_2SO_4 \cdot 10H_2O$	453	---	---
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	731	731	250
$(NH_4)_2SO_4$	---	---	135
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	288	288	---
KH_2PO_4	---	4.8	---
KCl	65	65	---
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	21.5	---	150
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	6	6	---
$MnSO_4 \cdot H_2O$	---	---	10
H_3BO_3	1.5	1.5	3
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	2.65	2.65	2
Kl	0.75	0.75	0.75
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.0024	0.0024	0.25
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.13	0.13	0.025
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	---	---	0.025
Glycine	3	3	---
Inositol	50	50	100
Nicotinic acid	0.5	0.5	1
Pyridoxine-HCl	0.1	0.1	1
Thiamine-HCl	0.1	0.1	10
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	---	---	150
NaFe-EDTA	8	8	---
$FeSO_4$-EDTA	---	---	43
2,4-D	---	---	0.2
kinetin	---	---	0.1

Batch cultures were performed in Petri dish (9 cm in diameter) filled with 40 mL of medium. Petri dishes were kept in the dark at 23±1°C. Roots in batch cultures were harvested twice a week for measurement of fresh and dry weights (80°C, 24h) as well as for intracellular analyzes, as previously described (*D. carota*: Jolicoeur et al., 2003; *C.*

roseus: Leduc et al., 2006). Whole Petri dishes were taken as samples (n = 3 to 5). The roots were rinsed twice with deionized water (18.2 MOhm·cm at 25°C) and frozen in liquid nitrogen for further analysis. The medium was filtered (0.2 µm) and frozen (-18°C) for further HPLC analysis. Medium exchange cultures were performed in 250 mL shake flasks containing 80 mL M-based enriched medium (Table 4-2) with 1 mM Pi and 10 mM NO_3 which was periodically renewed. The culture medium was sampled and analyzed every 3-4 days looking specifically at Pi and nitrate contents, and the medium was changed when the Pi and NO_3^- concentrations were below 0.2 mM and 3 mM respectively. At each medium exchange, the medium was withdrawn (and sampled) and the roots were weighted (fresh) within the flask (into a sterile cabinet) before addition of fresh medium. Roots were harvested once a week for fresh and dry weights and intracellular analysis (n = 3 to 5). The medium was sampled at each medium exchange, filtered (0.2 µm) and frozen (-18°C) for further HPLC analysis. Data for *C. roseus* hairy root cultures in Petri dish were taken from Leduc et al. (2006). Cultures were performed using approximately 0.125 g FW of roots to inoculate a 9 cm Petri dish containing 25 ml of M medium with 3% sucrose and 0.12 mM Pi (Table 4-2). Whole Petri dishes were taken as samples (n = 3) following a similar protocol than for *D. carota* and which is described in Leduc et al. (2006).

Cell suspension cultures

Data for *E. californica* cell suspension culture in Erlenmeyer flask were taken from Lamboursain and Jolicoeur (2005). Cultures were performed in shake flasks on an orbital shaker at 120 RPM using a B5 medium supplemented with 3% glucose (Table

4-2). The flasks, containing 160 ml of fresh medium, were inoculated with 80 g of a 10-13 days old suspension. Sampling was performed every day with whole flasks taken as samples (n = 3). After sampling, the suspension was filtered to separate the cells from the medium. Cells were rinsed twice with deionized water and frozen in liquid nitrogen for further analysis. The filtered liquid medium (0.2 μm) was kept at -18°C until further analysis.

Analytical

Analysis of intracellular and extracellular sugars and ions for both root and suspension cultures were done by HPLC as previously described (*D. carota*: Jolicoeur et al., 2003; *C. roseus*: Leduc et al., 2006; *E. californica*: Lamboursain and Jolicoeur, 2005). Total cells content in available Pi and Kjeldhal nitrogen contents were determined as previously described (*D. carota*: Jolicoeur et al., 2003; *C. roseus*: Leduc et al., 2006; *E. californica*: Lamboursain and Jolicoeur, 2005). The total cell Pi content was determined using the Lachat method (Standard Operating Procedure for Total and Dissolved Phosphorous, Revision 1, Grace Analytical Lab, 536 South Clark Street, Floor Chicago, IL 60605). Total cell content in reduced nitrogen was determined using a micro Kjeldahl procedure with sulfuric acid digestion as described by Isaac and Johnson (1976). Then, the total cell content in available nitrogenous compounds (N_c) was estimated by adding the cells content in nitrate to the Kjeldahl nitrogen.

4.8 THE STRUCTURED KINETIC MODEL

The model presented in this work (Table 4-3) builds on a model previously described in Jolicoeur et al. (2003) by specifically adding the description of intracellular nitrogen management. Cell content in available nitrogenous compounds (N_c) is included in the specific growth rate term (μ, Table 4-3, equation 2), in addition to intracellular Pi and free sugars (glucose and fructose). The specific growth rate (Table 4-3, equation 2) is described with multiple Tessier kinetics based on intracellular concentrations. Threshold levels identifying minimal intracellular nutrient concentrations ($P_{c,min}$, $N_{c,min}$, $S_{c,min}$) define the minimal cell content for growth to proceed. Nutrients uptake is described by single Michaelis-Menten kinetics for sugars (Table 4-3, equation 9) and by dual Michaelis-Menten kinetics for the other nutrients (Table 4-3, Pi: equation 3; NO_3^-: equation 5; NH_4^+: equation 6). If the intracellular concentration for a nutrient is below the minimal level, the uptake of the nutrient will be affected and the maximum specific uptake rate will be described by a minimal uptake rate ($V_{max,I,Pmin}$, $V_{max,I,N,min}$, $V_{max,I,Smin}$). The model accounts for the cell intracellular management in S_c, N_c and Pi pools (Table 4-3, equations 4, 7 and 10) and it describes cell growth even if the extracellular nutrient concentrations are depleted. A single cell population was considered with homogenous spatial conditions. However, the differential equations are presented as partial derivatives since spatial uniformity is a hypothesis. It is assumed that cell division leads to daughter cells having same intracellular composition as mother cells, with a dilution of intracellular nutrients proportional to cell growth (Table 4-3, equations 4, 7 and 10).

Table 4-3 Equations of the nutritional model

Reaction	Equation
1- Growth	$\frac{\partial X}{\partial t} = \mu \bullet X$
2- Specific growth rate	$\mu = \mu_{\max} \bullet \left[1 - e^{-K_P \bullet (P_c - P_{c,\min})}\right] \bullet \left[1 - e^{-K_S \bullet (S_c - S_{c,\min})}\right] \bullet \left[1 - e^{-K_N \bullet (N_c - N_{c,\min})}\right] \bullet \frac{K_{pp}}{K_{pp} + P_i^{inhiP}}$
3- Pi in the medium	$\frac{\partial P_i}{\partial t} = -\left[V_{\max,I,P} \bullet \frac{P_i}{K_{I,P} + P_i} + V_{\max,II,P} \bullet \frac{P_i}{K_{II,P} + P_i}\right] \bullet \frac{X}{V} - \frac{P_i}{V} \bullet \frac{\partial V}{\partial t}$
4- Plant Intracellular Pi	$\frac{\partial P_c}{\partial t} = \left[V_{\max,I,P} \bullet \frac{P_i}{K_{I,P} + P_i} + V_{\max,II,P} \bullet \frac{P_i}{K_{II,P} + P_i}\right] - \left[\frac{1}{Y_{X/P}} + P_c\right] \bullet \mu - m_P$
5- NO_3^- in the medium	$\frac{\partial NO_3^-}{\partial t} = -\left[V_{\max,I,NO3} \bullet \frac{NO_3^-}{K_{I,NO3} + NO_3^-} + V_{\max,II,NO3} \bullet \frac{NO_3^-}{K_{II,NO3} + NO_3^-}\right] \bullet \frac{X}{V} - \frac{NO_3^-}{V} \bullet \frac{\partial V}{\partial t}$
6- NH_4^+ in the medium	$\frac{\partial NH_4^+}{\partial t} = -\left[V_{\max,I,NH4} \bullet \frac{NH_4^+}{K_{I,NH4} + NH_4^+} + V_{\max,II,NH4} \bullet \frac{NH_4^+}{K_{II,NH4} + NH_4^+}\right] \bullet \frac{X}{V} - \frac{NH_4^+}{V} \bullet \frac{\partial V}{\partial t}$
7- Plant intracellular nitrogen	$\frac{\partial N_c}{\partial t} = \left[V_{\max,I,NO3} \bullet \frac{NO_3^-}{K_{I,NO3} + NO_3^-} + V_{\max,II,NO3} \bullet \frac{NO_3^-}{K_{II,NO3} + NO_3^-}\right] + \left[V_{\max,I,NH4} \bullet \frac{NH_4^+}{K_{I,NH4} + NH_4^+} + V_{\max,II,NH4} \bullet \frac{NH_4^+}{K_{II,NH4} + NH_4^+}\right] - \left[\frac{1}{Y_{X/N}} + N_c\right] \bullet \mu - m_N$
8- Sucrose in the medium	$\frac{\partial S_0}{\partial t} = -r_{hydro} \bullet \frac{X}{V} + \frac{S_0}{V} \bullet \frac{\partial V}{\partial t}$
9- Sugars in the medium	$\frac{\partial S}{\partial t} = -\frac{\partial S_0}{\partial t} - V_{\max,I,S} \bullet \frac{S}{K_{I,S} + S} \bullet \frac{X}{V} - \frac{S}{V} \bullet \frac{\partial V}{\partial t}$
10- Plant intracellular sugars	$\frac{\partial S_c}{\partial t} = V_{\max,I,S} \bullet \frac{S}{K_{I,S} + S} - \left(\frac{1}{Y_{X/S}} + S_c\right) \bullet \mu - m_S$
	$\frac{\partial SC_c}{\partial t} = V_{\max,I,SC} \bullet \frac{S}{K_{I,S} + S} - \left(SC_c\right) \bullet \mu$ (if $S_c = S_{c,crit}$)
11- Plant storage carbohydrate	$\frac{\partial SC_c}{\partial t} = -\left(\frac{1}{Y_{X/S}} + SC_c\right) \bullet \mu$ (if $S_c = S_{c,\min}$)
	$\frac{\partial SC_c}{\partial t} = -\left(SC_c\right) \bullet \mu$ (otherwise)
12- Medium volume	$\frac{\partial V}{\partial t} = -\mu \bullet X \bullet DWr - Evap$

Also, it is assumed that the cell cannot accumulate a nutrient at a level higher than a critical concentration ($S_{c,crit}$, $N_{c,crit}$ and $P_{c,crit}$). If the intracellular concentration is at critical concentration, the cells will only uptake what is necessary to sustain growth and maintenance. Table 4-4 lists the parameter values and Table 4-5 lists the state variables of the model and their initial conditions.

Table 4-4 Parameters of the Model (continued on next page)

Parameter	Hairy roots		Cell suspension
	C.roseus	*D.carota*	*E.californica*
μ_{max}	0.2870	0.2655	0.2835
inhiP	1.57	1.53	3.58
DWr	0.167	0.100	0.050
Evap	0	0.0583	0
$K_{I,P}$	0.0014	0.0026	0.0050
$K_{II,P}$	0.36	0.47	0.35
$K_{I,S}$	1.03	1.08	1.21
$K_{I,NO3}$	0.0677	0.0829	0.0150
$K_{II,NO3}$	1.43	1.93	2.04
$K_{I,NH4}$	---	---	0.02
$K_{II,NH4}$	---	---	7.25
K_P	62.7	62.4	14.9
K_S	57.1	48.4	51.3
K_N	0.46	0.49	0.24
K_{pp}	1.144	1.741	3.416
m_P	0.0010	0.00005	0.00005
m_S	0.0007	0.0007	0.0007
m_N	0.0007	0.0001	0.0007
$P_{c,min}$	0.0410	0.0023	0.0050
$P_{c,crit}$	0.507	0.231	0.810
r_{hydro}	0.256	0.610	----
$S_{c,crit}$	0.26	0.08	0.09
$S_{c,min}$	0.0050	0.0085	0.0070
$N_{c,crit}$	1.876	3.852	5.322
$N_{c,min}$	0.42	1.02	0.05
$V_{max,I,P}$	0.0025	0.0012	0.0440
$V_{max,II,P}$	0.0925	0.0720	0.9037
$V_{max,I,Pmin}$	0.00080	0.00075	0.00075
$V_{max,I,NO3}$	0.0015	0.0022	0.0273
$V_{max,II,NO3}$	0.167	0.470	1.487
$V_{max,I,N,min}$	0.0015	0.1703	0.0015
$V_{max,I,S}$	0.15	0.02	0.47
$V_{max,I,Smin}$	0.0015	0.0015	0.0144
$V_{max,I,SC}$	0.15	---	0.47
$V_{max,I,NH4}$	---	---	0.2451
$V_{max,II,NH4}$	---	---	7.8264
$Y_{X/N}$	0.72	1.84	1.20
$Y_{X/P}$	20.06	37.04	12.08
$Y_{X/S}$	15.22	8.33	2.11

Table 4-4 Continued

Parameter	Units	Eq.	Reference[1]
μ_{max}	d^{-1}	2	Jolicoeur et al., 2003
inhiP	dimensionless	2	
DWr	g DW•g FW-1	12	
Evap	$mL•d^{-1}$	12	
$K_{I,P}$	mmol $Pi•L^{-1}$	3, 4	Jolicoeur et al., 2003 Schachtman et al., 1998
$K_{II,P}$	mmol $Pi•L^{-1}$	3 ,4	"
$K_{I,S}$	g $sugar•L^{-1}$	9, 10, 11	Jolicoeur et al., 2003
$K_{I,NO3}$	mmol $NO_3^-•L^{-1}$	5, 7	Aslam et al., 1992
$K_{II,NO3}$	mmol $NO_3^-•L^{-1}$	5, 7	Le Bot et al., 1998
$K_{I,NH4}$	mmol $NH_4^+•L^{-1}$	6, 7	
$K_{II,NH4}$	mmol $NH_4^+•L^{-1}$	6, 7	
K_P	g $DW•mmol^{-1}$ Pi	2	
K_S	g $DW•g^{-1}$ sugars	2	
K_N	g $DW•mmol^{-1}$ NO_3^-	2	
K_{pp}	mmol $Pi•g^{-1}$ DW	2	
m_P	mmol $Pi•g^{-1}$ $DW•d^{-1}$	4	
m_S	g $sugar•g^{-1}$ $DW•d^{-1}$	10	
m_N	mmol $NO_3^-•g^{-1}$ $DW•d^{-1}$	7	
$P_{c,min}$	mmol $Pi•g^{-1}$ DW	2	
$P_{c,crit}$	mmol $Pi•g^{-1}$ DW	4	
r_{hydro}	g $sucrose•g^{-1}$ $DW•d^{-1}$	8	
$S_{c,crit}$	g $sugar•g^{-1}$ DW	10, 11	
$S_{c,min}$	g $sugar•g^{-1}$ DW	2	
$N_{c,crit}$	mmol $NO_3^-•g\ DW^{-1}$	7	
$N_{c,min}$	mmol $NO_3^-•g\ DW^{-1}$	2	
$V_{max,I,P}$	mmol $Pi•g^{-1}$ $DW•d^{-1}$	3, 4	Jolicoeur et al., 2003 Furihata et al., 1992
$V_{max,II,P}$	mmol $Pi•g^{-1}$ $DW•d^{-1}$	3, 4	"
$V_{max,I,Pmin}$	mmol $Pi•g^{-1}$ $DW•d^{-1}$	3, 4	
$V_{max,I,NO3}$	mmol $NO_3^-•g^{-1}$ $DW•d^{-1}$	5, 7	Cerezo et al., 1997
$V_{max,II,NO3}$	mmol $NO_3^-•g^{-1}$ $DW•d^{-1}$	5, 7	Sugiyama and Ishigaki, 1994
$V_{max,I,N,min}$	mmol $NO_3^-•g^{-1}$ $DW•d^{-1}$	5, 7	
$V_{max,I,S}$	g $sugar•g^{-1}$ $DW•d^{-1}$	9, 10	
$V_{max,I,Smin}$	g $sugar•g^{-1}$ $DW•d^{-1}$	9, 10	
$V_{max,I,SC}$	g $sugar•g^{-1}$ $DW•d^{-1}$	11	
$V_{max,I,NH4}$	mmol $NH_4^+•g^{-1}$ $DW•d^{-1}$	6, 7	
$V_{max,II,NH4}$	mmol $NH_4^+•g^{-1}$ $DW•d^{-1}$	6, 7	
$Y_{X/N}$	g $DW•mmol^{-1}$ N	6	
$Y_{X/P}$	g $DW•mmol^{-1}$ Pi	4	Jolicoeur et al., 2003
$Y_{X/S}$	g $DW•g^{-1}$ sugar	10	"

[1] Parameters were first estimated from literature as indicated and the remaining were determined from model calibration. Eq. numbers indicate the equations in which a parameter intervenes.

Table 4-5 State Variables and Initial Conditions

Variable	Initial value			Units
	C. roseus	*D. carota*	*E. californica*	
X	0.0197	0.0243	0.170	gDW (per dish or flask)
Pi	0.11	0.12	0.85	mmol Pi•L^{-1}
P_c	0.117	0.015	0.195	mmol Pi•gDW^{-1}
S0	39	11	0	g•L^{-1}
S	2.80	0.00	25.75	g•L^{-1}
S_c	0.200	0.010	0.0827	g•gDW^{-1}
SC_c	0.30	0.00	0.15	g•gDW^{-1}
NO_3^-	3.35	3.28	20.00	mmol NO3•L^{-1}
NH_4^+	0	0	2	mmol NH4•L^{-1}
N_c	0.385	0.860	2.310	mmol N•gDW^{-1}
V	0.025	0.040	0.233	L

Since the model was challenged with data from a cell suspension and two hairy root lines for three plant species cultivated using different media, the model structure had to be slightly adapted to cope with the different conditions. *C. roseus* and *D. carota* hairy roots were cultured in a modified White's medium using sucrose while *E. californica* suspension cells were cultured in standard B5 medium but with glucose. However, the model accounts for the uptake of simple sugars (glucose and fructose) whether they come from sucrose hydrolysis or from initial medium composition. The low salt media used in root cultures contain only nitrate but B5 medium contains both nitrate and ammonium ions as nitrogen sources, so the uptake of ammonium is also described

similarly to Pi and nitrate transport systems with a dual transport system. In the model, free intracellular ammonium and nitrate are pooled as cellular nitrogen (N_c). Since plant cells and hairy roots are known to accumulate sugars in the form of starch and free sugars (Lamboursain and Jolicoeur, 2005; Leduc et al., 2006), it was decided to consider that the cell can accumulate free sugars up to a maximum level and store sugars, such as starch, in a pool labelled as 'storage carbohydrates' (SC_c, Table 4-3, equation 11). Storage carbohydrates (SC_c) first need to be hydrolysed in free sugars to be used by the cells. Only free sugars are used in the specific growth rate term. For the *D. carota* hairy root cultures, sugars storage was not considered since there was no experimental data on stored carbohydrates available. However, none of the five experiments considered in this work (3 batch cultures and 2 medium exchange cultures) were limited by the carbon sources. The model is thus composed of the same differential equations for the three cell lines but with different parameters values.

Parameters Estimation from Model Simulations

The simulations were performed using Matlab (The Mathworks Inc.). Integration of the differential equations was done using a Runge-Kutta subroutine, through appropriates `ode` functions (`ode15` or `ode23s`). The error minimization between experimental data and simulations was performed for each cell line using the `lsqcurvefit.m` subroutine (Optimisation toolbox, Matlab). This subroutine is based on the Levenberg-Marquardt algorithm (More, 1977). The global error to be minimized was calculated as the sum of squares of normalized errors between each data point and their simulated values as in Leduc et al. (2006). The errors were normalized using the median value for

each data set. This method ensures that each data set will have a similar weight in the parameter optimization routine. For the hairy root cultures, only the data from batch cultures were used for calibrating the parameter values. The parameter calibration routine requires estimating initial values for the unknown parameters. Initial estimates for many parameters (mainly for transport) were taken from literature (Table 4-4). Yield coefficients were first estimated by mass balances on experimental data. Maximum specific growth rates were first estimated from linear regressions on experimental data at exponential growth phase. It is expected that the optimization problem of finding parameters that minimize the error does not have a unique solution. However, the algorithm used for parameter estimation ensures that the solutions will be local minima. Moreover, the `lsqcurvefit.m` subroutine allows restricting the parameter values to a given realistic physiological range.

4.9 RESULTS AND DISCUSSION

Identifying sensitive parameters

Model sensitivity to a parameter was arbitrarily defined as the percentage variation of the residual sum of squares when the parameter is changed by ±25%. The model seemed to be sensitive (>25% variation of global error) only to few parameters (Figure 4.1). For *C. roseus* hairy roots, four parameters related to nitrogen ($Y_{X/N}$, N_{min}, $V_{maxNO3,II}$ and $K_{NO3,II}$) and the specific sucrose hydrolysis rate (r_{hydro}) showed to have an influence on the global error. For *D. carota* hairy roots, the model showed to be sensitive to the parameters related to sugars ($Y_{X/S}$ and $V_{max,I,S}$), phosphate ($V_{maxP,II}$) and nitrogen (N_{min}). In

the case of *E. californica* cell suspension, the model was sensitive to three parameters related to nitrogen (N_{rmin} and $V_{maxNO3,II}$, and $K_{NO3,II}$ to a lower extent) and two related to sugars ($Y_{X/S}$ and $K_{I,S}$). These observations showing the model to be sensitive to most of the nutrients for the three lines may result from using culture media that have been historically selected for being well balanced. Furthermore, intrinsic nutrient accumulation capacity of plant cells is also involved. The maximum specific growth rate (μ_{max}) showed to influence the global error only for *E. californica* and *C. roseus* cultures for which there was no plateau phase, as compared to that for *D. carota*. The model also showed to be sensitive to initial concentrations in extracellular Pi, sugars or nitrate, which may suggest the importance of sub-culture history in cell behaviour as proposed previously (Lamboursain and Jolicoeur, 2005).

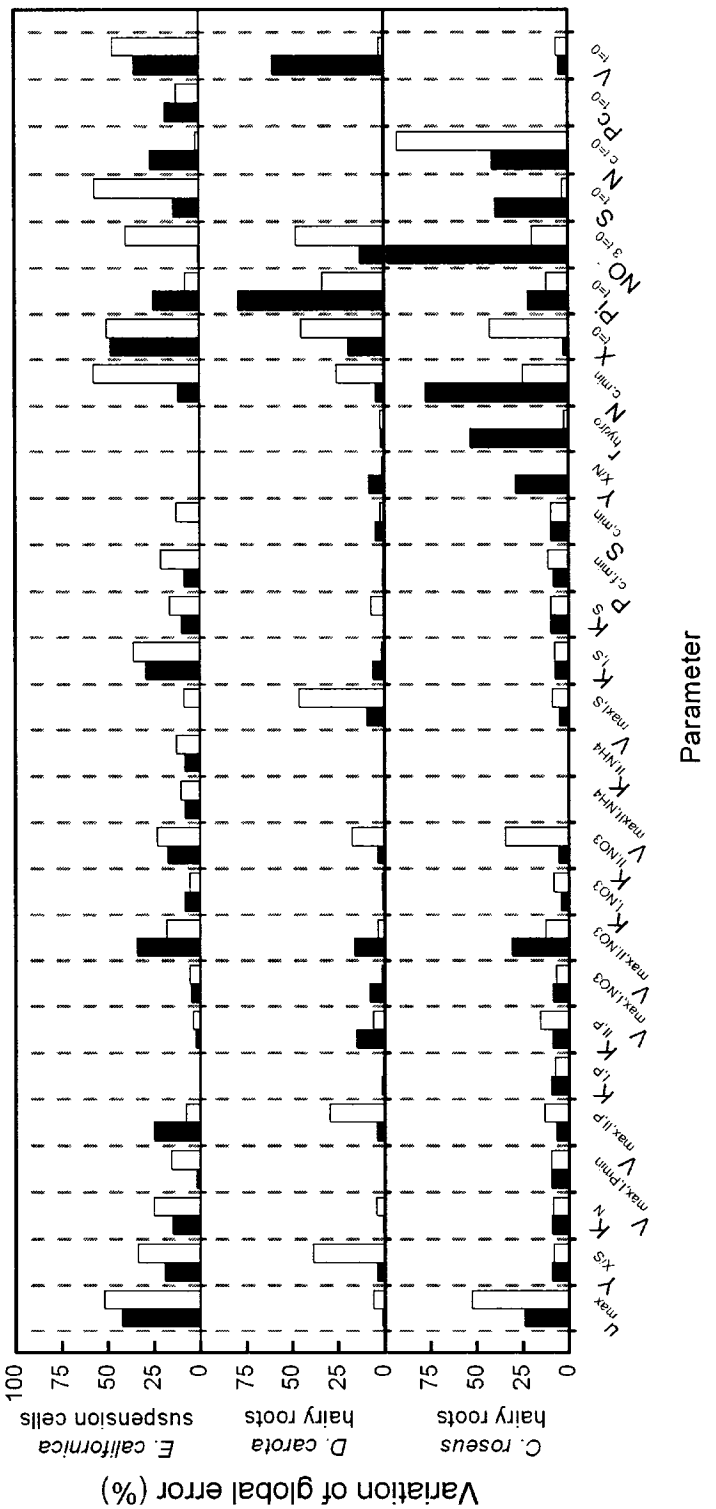


Figure 4.1 Sensitivity analysis on model parameters for the three cell lines.

Suspension cells and hairy roots growth and nutritional behaviour

Catharanthus roseus hairy roots

The model showed to simulate growth, including the beginning of the stationary phase, Pi and NO_3^- uptake and accumulation (Figure 4.2). However, simulated sucrose hydrolysis showed a lower rate than for experimental data (Figure 4.2c). Simulated free intracellular sugars rapidly reached $S_{c,crit}$, a value arbitrarily considered as the maximum cell capacity, and remained to that value for the culture duration while experimental data showed progressive increase for the first 10 d and then a slow decrease to the initial level. Simulation of the cells content in stored carbohydrates (SC_c) suggests their dilution from cell division the early days following culture inoculation, and then their accumulation at the end of the culture. Carbohydrates (e.g. starch) accumulation process is known to be favoured under Pi or nitrate limiting conditions (Lamboursain and Jolicoeur, 2005 and references therein). However, the actual model structure is not expected to accurately describe accumulation phenomenon related to nutrient limitations. The simulated final intracellular state variables were all within 25% of the experimental values.

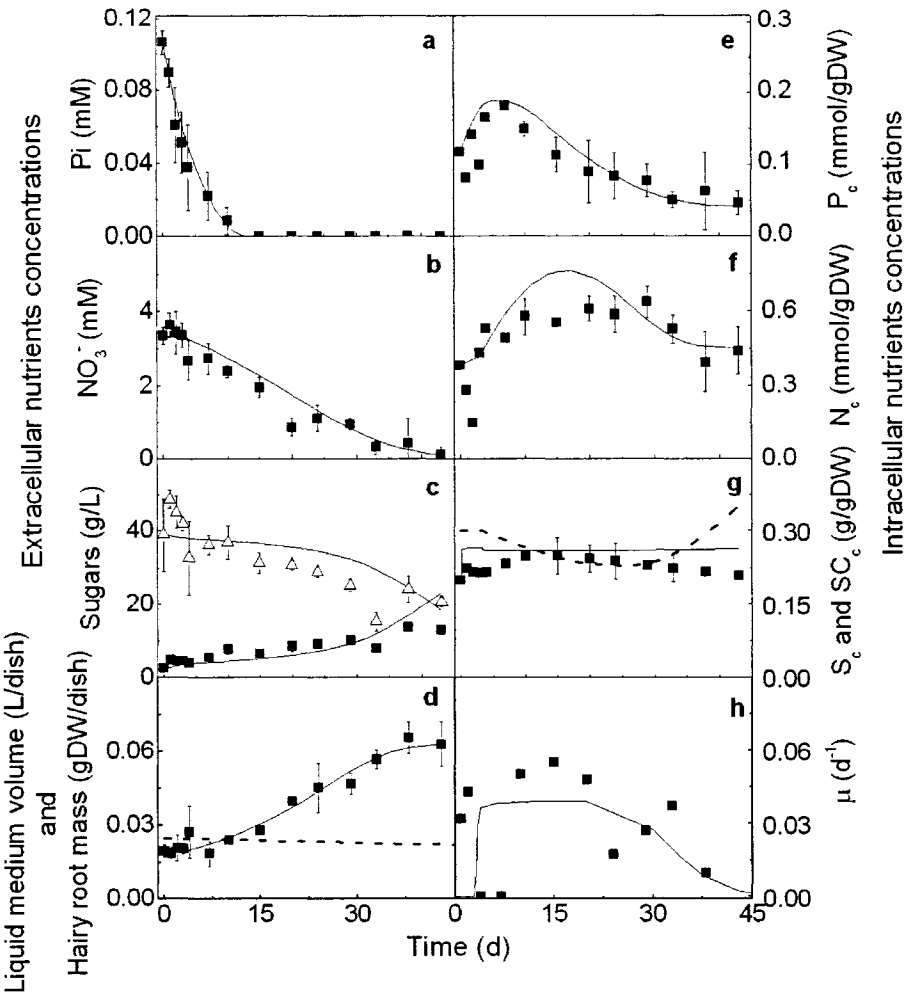


Figure 4.2 Model simulation and experimental data for *C. roseus* culture. Symbols represent experimental data and lines are for model simulation. Extracellular nutrients: Pi (a), nitrate (b), sucrose (▲) and sugars (■, glucose and fructose) (c); Root mass and medium volume (dashed line) (d); Intracellular nutrients: Pi (e); nitrogen (f); sugars (g); Solid line in (g) represents simulation for intracellular sugars and the dashed line represents simulation for storage carbohydrates; Specific growth rate (h) was estimated (■) from the hairy root mass data and compared with model prediction (line). Each sample was a complete Petri dish (n = 3). Error bars represent the standard error.

The final (experimental and simulated) intracellular nitrogen concentration ($N_{c\ final}$ = 0.45 mmol/gDW) was close to the initial one and just above the minimal free concentration ($N_{c,min}$ = 0.42 mmol/gDW). Pi is thought to be the limiting nutrient since its final intracellular concentration has reached the minimal free concentration ($P_{c,min}$). However, it is clear that N_c or P_c could be limiting in that case, within culture variability. The model can thus be useful to identify the limiting nutrient. The simulation of hairy roots specific growth rate (Figure 4.2h) was in accordance with experimental data, following the trend of the calculated specific growth rate. However, the biomass data was noisy, because of the inherent variability of hairy root culture and the difficulty to perform representative tissue sampling, which affects the calculation of specific growth rate with time. Thus, differences can be observed between experimental and simulated specific growth rates at some points in time.

There are cellular management processes that are not described by the model and which may explain some discrepancies between the model simulations and experimental data. An increase in the extracellular nitrate and sucrose concentrations in the days following inoculation was observed. This coincided with a decrease in intracellular nitrogenous compounds (N_c), and, to a lesser extent, in P_c. Water uptake by the roots might explain these observations. A decrease in liquid medium volume of 3.2 mL on an initial volume of 25 mL was simulated, and this volume decrease was distributed among evaporation (2.9 mL) and the water volume required for the biomass increase (0.3 mL).

Daucus carota hairy roots

The lag (0-5 d), growth (5-45 d) and stationary (from 45 d) phases observed experimentally were simulated by the model with an overestimation of the final biomass (Figure 4.3d) and a slight underestimation of the specific growth rate during the exponential phase (Figure 4.3h). This difference could be explained by the calculation of hairy roots specific growth rate from noisy biomass data and difficulties in tissue sampling, as explained above. The model simulated accurately NO_3^- and Pi uptake (Figure 4.3a and b) and accumulation (Figure 4.3e and f). However, simulation of the intracellular use of nitrogenous compounds was overestimated from day 30 but converged close to the final experimental N_c concentration. There were no significant differences between initial and final intracellular concentrations for both experimental and simulated values. The limiting nutrient was the nitrogen source since its final value is at the minimal free concentration ($N_{c,min}$) at 1.021 mmol/gDW. Results for sugars suggested that the model is overestimating sucrose hydrolysis rate while describing accurately the residual free glucose and fructose in the culture medium during cell growth phase (Figure 4.3c). Then, the model has underestimated free sugars uptake at growth cessation (~40 d). Simulation of intracellular sugars (S_c) rapidly reached the maximal value allowed (0.08 g/gDW) (Figure 4.3g). Unfortunately, no experimental data on intracellular sugars were available for that experiment. However, experimental extracellular sugars concentration suggests that the culture was not limited by the carbon sources. The model predicts a decrease of 6.67 mL in volume (40 to 33.3 mL) and this

decrease was due to evaporation (5.83 mL) and to the water needed for the biomass increase (0.84 mL).

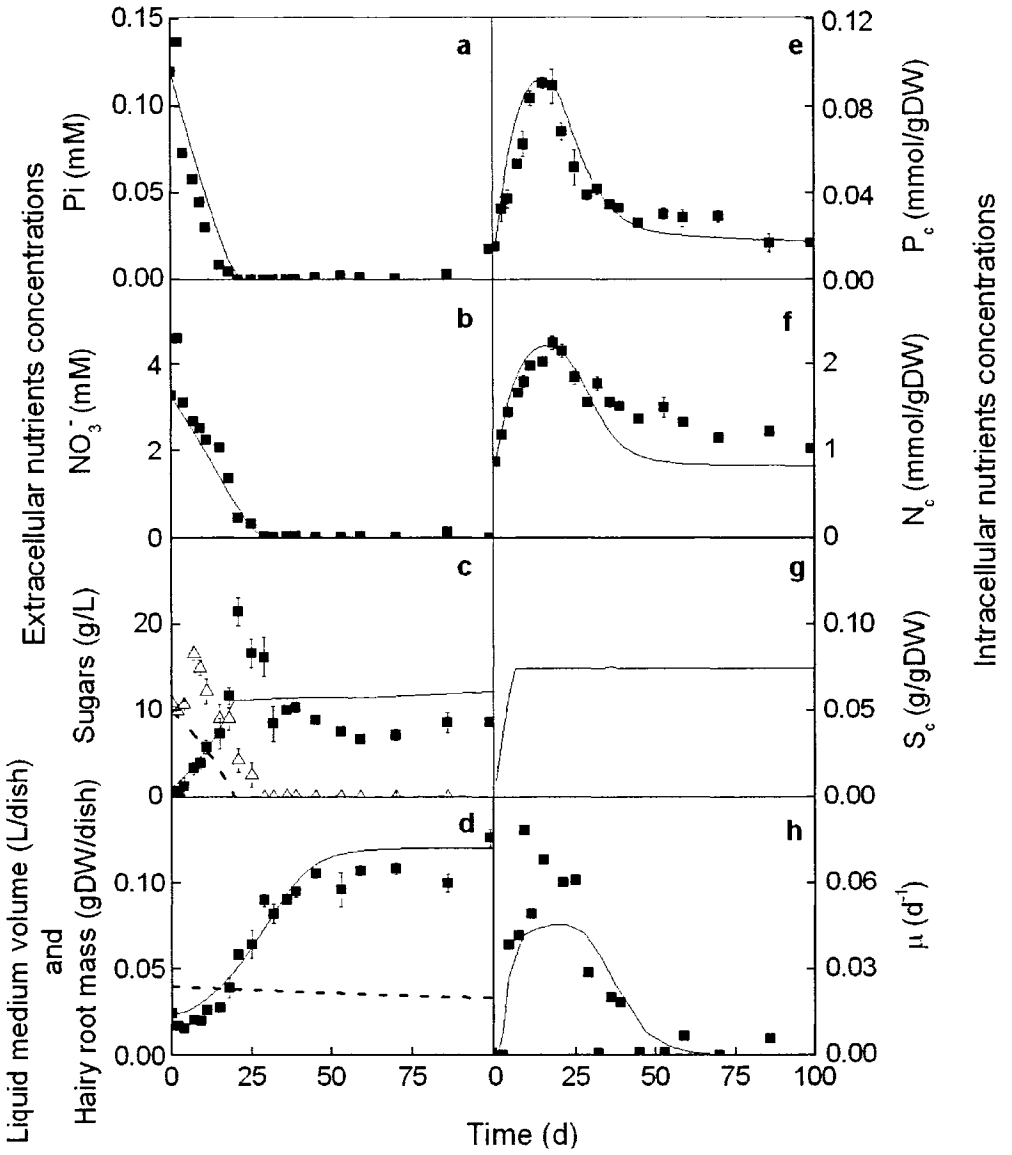


Figure 4.3 Model simulation and experimental data for *D. carota* culture. Same captions as Figure 2 applied. Each sample was a whole Petri dish (n = 3 to 5). Error bars represent the standard error.

Eschscholtzia californica suspension cells

Growth is simulated by the model (Figure 4.4d) as well as the specific growth rate which remained near the maximal observed value at 0.13 d^{-1} from day 1 to day 7 (Figure 4.4d). A deceleration phase starts at day 8, but no plateau growth phase was reached for the culture duration. The nutritional behaviour of *E. californica* cell suspension (Figure 4.4) differed from that for the roots. Pi uptake was completed within 4 hours as compared to ~15 days for both root systems, even though the B5 medium used for *E. californica* contains 10 times more Pi than the culture media used for the root cultures. This rapid uptake caused intracellular Pi concentration to increase within the first hours of culture (Figure 4.4e). A faster decrease in experimental intracellular Pi was observed for the first days, which could be explained by Pi mobilization (for ATP production and/ or protein phosphorylation) or by Pi efflux in non-free forms (i.e. not detected by the analytical protocols used). The model simulation for intracellular Pi coped with experimental data, but it is clear that a better description of the cellular phenomenon could improve the descriptive capacity of the model. NO_3^- and NH_4^+ uptake (Figure 4.4b) are also simulated by the model. Sugars uptake (Figure 4.4c) and accumulation (relatively constant at 0.09 g/gDW) (Figure 4.4g) are also simulated by the model. The simulated medium volume decreases from 233 mL to 198 mL, and since the evaporation is neglected for shake flask cultures of *E. californica*, this decrease (~15% of the initial medium volume) is due to the water needed for biomass increase. The wet-to-dry weight ratio (1/DWr) for the cell suspension is higher than for the roots (20 for

the cells as compared to 6 and 10 for the roots) so the increase in biomass results in a significant decrease in liquid medium volume.

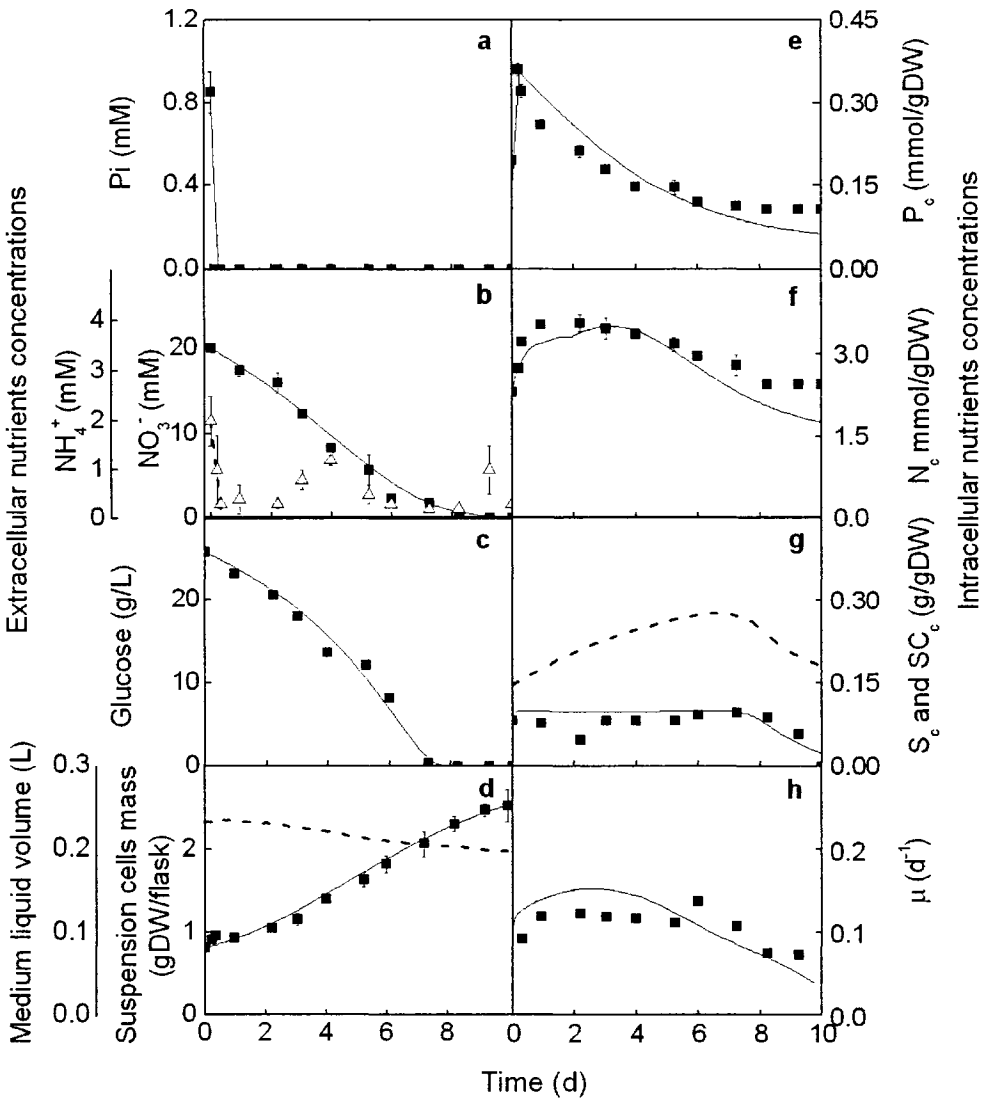


Figure 4.4 Model simulation and experimental data for *E. californica* culture. Same captions as Figure 2 applied. Each sample was a complete Erlenmeyer flask (n = 3). Error bars represent the standard error.

Comparing cell lines and model parameters value

Growth

Clear differences in the cells potential for growth were observed between hairy roots and suspension cells even though the model calibration resulted in similar estimated maximum specific growth rates for the three plant species (Table 4-4: μ_{max} = 0.276 ±0.011 d^{-1}). However, *E. californica* exhibited a maximum observed specific growth rate of ~0.13d^{-1} which was double than that observed for both root lines with ~0.06 d^{-1} (see Figures 4.2h, 4.3h and 4.4h). Experimentally, this higher observed specific growth rate may be explained by the fact that the medium used for *E. californica* cultures had higher initial concentrations in Pi (10x) and NO_3^- (7x). It was previously showed for the carrot hairy roots used in the present study that the initial medium content in Pi affects the maximum observed specific growth rate (Jolicoeur et al., 2003). The model thus showed to be robust enough to describe the growth of suspension cells and hairy roots cultured in media with different initial compositions. A comparison of the parameters for the Tessier kinetic equations suggests that the roots growth potential is more sensitive to low intracellular concentrations in P_c and N_c with higher values for K_P and K_N. Interestingly, parameters values for K_S, K_N and K_P were similar for both roots lines. The parameters $P_{c,min}$, $N_{c,min}$ and $S_{c,min}$ are the minimal concentrations at which the cell can grow and their respective values may indicate a cell efficiency to deal with low intracellular nutrient concentrations. The root lines showed lower minimal intracellular phosphate ($P_{c,min}$) concentration and *E. californica* exhibited a lower minimal free intracellular nitrate ($N_{c,min}$) concentration. The model may thus be useful to study the

relationship between a cell (or hairy root) line capacity for growth and its nutritional behaviour.

Nutrients uptake and management

The nutrient transporters described in the model all have the same biological basis for the three cell and hairy root lines with two affinity levels for NO_3^- and PO_4^- and one affinity level for sugars. The low-affinity transport system for Pi accounts for most of the transport in this work. $K_{II,P}$ values were similar (0.35-0.47 mM Pi) for the three cell and root lines. For *E. californica*, the maximum low affinity specific uptake rate for Pi ($V_{max,II,P}$) is ~10 times higher than for *C. roseus* and ~12 times higher than for *D. carota*. Higher maximum low affinity specific uptake rates for suspension cells could be explained from a higher cell-to-liquid medium interface than for hairy root cells. The affinity constants were within or near the ranges reported by Schachtman et al. (1998) who measured affinity constants between 3-7 μM Pi (1.4-5 μM Pi in this work) for the high affinity system and 20-350 μM Pi (350-470 μM Pi in this work) for the low affinity. In the case of nitrate, the maximum low affinity specific uptake rate ($V_{max,I,NO3}$) for *E. californica* was ~9 times higher than for *C. roseus* and ~3 times higher than for *D. carota*. The maximum high affinity specific uptake rate ($V_{max,II,NO3}$) for *E. californica* suspension cells was also higher than for the roots. The nitrate transport systems parameters values obtained from model calibration are also within the ranges reported in the literature. Aslam et al. (1992) reported high affinity constants between 7-20 μM (15-80 μM in this work), and low affinity constants of 0.25 to 25 mM (1.4-2 mM in this work) were reported in literature (Le Bot et al., 1998; Hell and Hillebrand, 2001). The

maximum transport rates in the model are also within the ranges found in literature. Sugiyama and Ishigaki (1994) reported low affinity values of 1.58-1.75 $\mu mol \cdot gFW^{-1} \cdot h^{-1}$ for blueberry plants. Using the same units the values estimated in this work are in the range 1.15-3 $\mu mol \cdot gFW^{-1} \cdot h^{-1}$. Cerezo et al. (1997) measured a nitrate high affinity maximum transport rate of 0.25 $\mu mol \cdot gFW^{-1} \cdot h^{-1}$ for citrus seedlings as compared to 0.01-0.06 $\mu mol \cdot gFW^{-1} \cdot h^{-1}$ here. The difference could be explained by the fact that the experimental conditions in that work only slightly solicited the high affinity transport. From simulation results, it was determined that the high affinity transport of nitrate accounted for only 0.6 to 5% of the total transport of that nutrient, thus resulting in a low sensitivity for that parameter and maybe a less precise estimation. In the case of sugars, the maximum transport rate for *E. califonica* cells is 3 to 20 times higher than for *C. roseus* and *D. carota*, respectively. Therefore, the model calibration suggest that *E. califonica* cell suspension exhibits higher estimated maximum transport rates than the hairy roots for the three major nutrients (Pi, nitrate and sugars). Finally, the critical nutrient concentrations ($N_{c,crit}$, $P_{c,crit}$ and $S_{c,crit}$) describing the limits in the cells capacity for accumulation also suggest that. *E. californica* cells can accumulate more phosphate, with $P_{c,crit}$ at 0.81 mmol/gDW as compared to 0.231 mmol/gDW and 0.507 mmol/gDW respectively for *D. carota* and *C. roseus*, and nitrogenous compounds, with $N_{c,crit}$ at 5.322 mmol/gDW as compared to 1.87 mmol/gDW and 3.852 mmol/gDW respectively for *C. roseus* and *D. carota*.

Yields

Since intracellular accumulation phenomenon in Pi, nitrogenous compounds and carbohydrates and the cells maintenance are described by the model, the yield parameters estimated by the model calibration are true yields. In addition to the minimal nutrient free concentrations, true yields may be useful at comparing cell and root lines efficiency. The two root lines exhibit higher yields on phosphate and sugars than the cell suspension but they all showed a similar yield on nitrogen. This is the first time, to our knowledge, that true yield values are presented and this may explain large differences when comparing to the literature data. The values reported here for the yields on sugars are thus obviously higher that measured by Bhadra and Shanks (1997) with 0.27-0.4 gDW/g for *C. roseus* who did not consider sugars accumulation. Therefore, the model was helpful at estimating and then comparing the cells efficiency on phosphate, nitrogen and sugars. Results suggest that hairy root lines have higher growth efficiency on phosphate and sugars. Since only a part of the biomass is growing in a root culture, it might be more efficient in the use of nutrients.

4.10 PREDICTIVE CAPACITY OF THE NUTRITIONAL MODEL

The predictive capacity of the model was tested using data from medium exchange cultures of *C. roseus* and *D. carota* hairy roots. Model simulations were performed using parameters determined for batch cultures (Table 4-4). The results are presented in Figure 4.5 (*C. roseus*) and Figure 4.6 (*D. carota*).

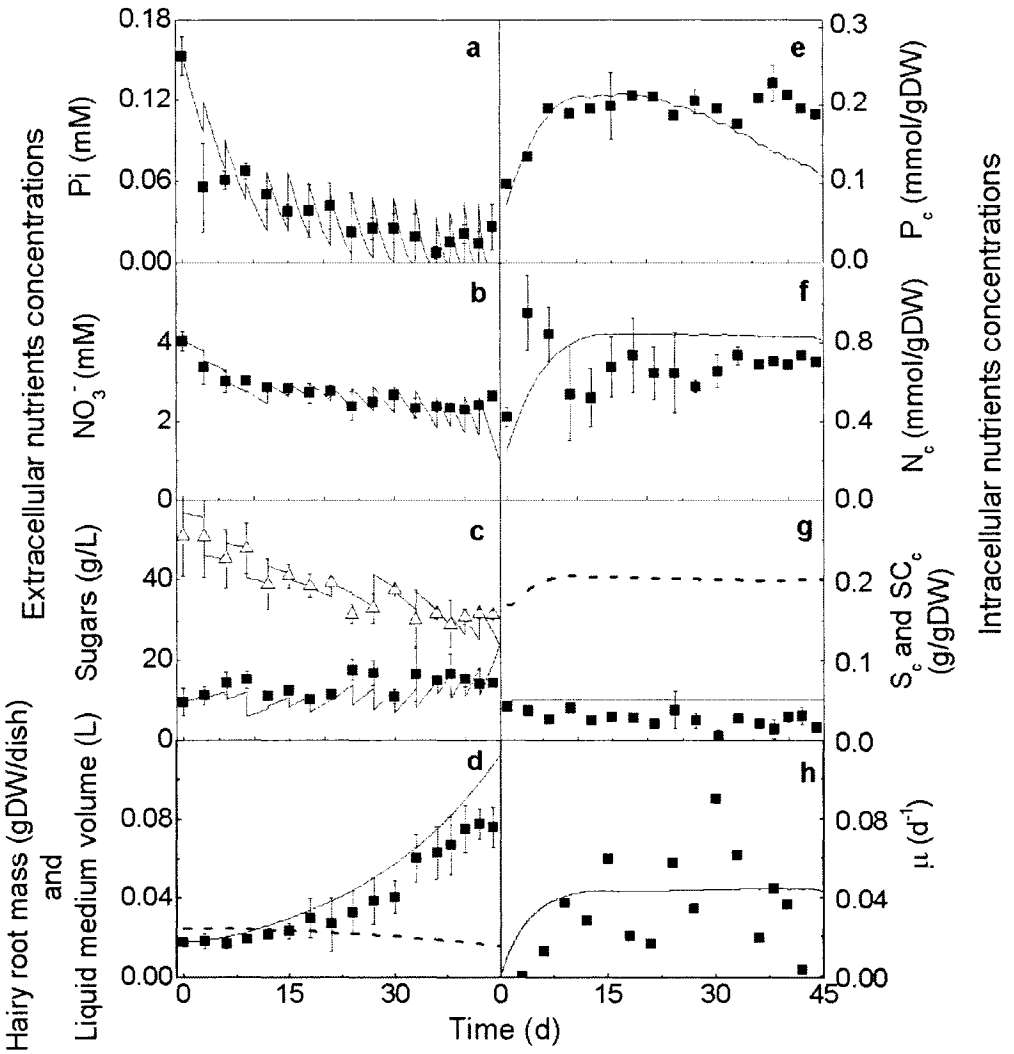


Figure 4.5 Model simulation and experimental data for *C. roseus* medium exchange culture. Same captions as Figure 2 applied. Each sample was a complete Petri dish (n = 3). Error bars represent the standard error.

The results for *C. roseus* show that the model is able to predict the cell behaviour in medium exchange culture with a divergence as compared to experimental data starting only at the 11th medium replacement. The model predicts a continuous growth for the

complete culture while experimental data suggest growth arrest at 40 days. Another nutrient such as oxygen or an inhibitory phenomenon which was not included in the model may be involved.

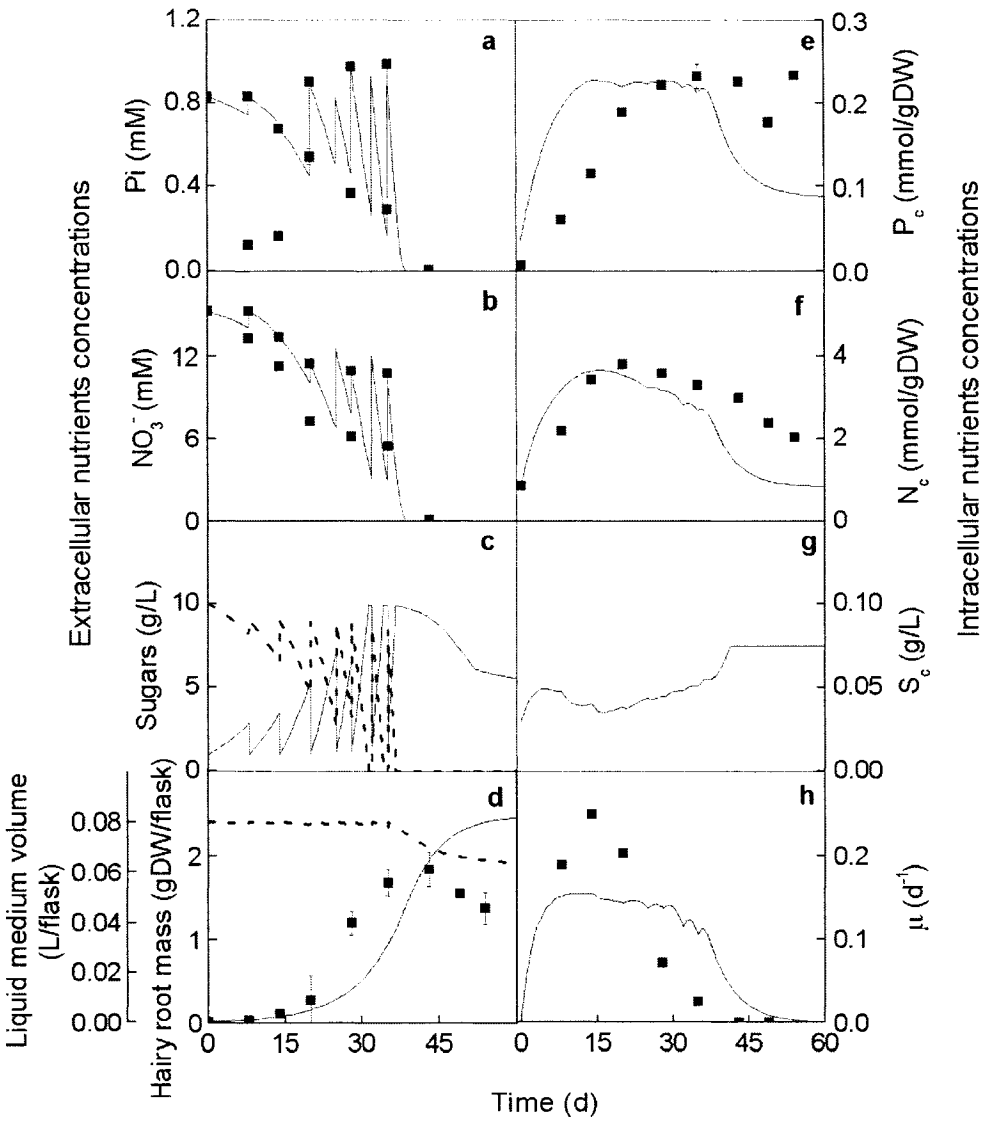


Figure 4.6 Model simulation and experimental data for *D. carota* medium exchange shake flask culture. Same captions as Figure 2 applied. Each sample was a complete flask (n = 3 to 5). Error bars represent the standard error.

The model prediction for *D. carota* in medium exchange culture is less satisfactory than for *C. roseus*. The simulated growth curve shows to be lower from 15 days and then reaches a higher final value than the experimental data (2.45 gDW/dish from model simulation compared to 1.85 gDW/dish for the experimental values). Those differences between the experimental and simulated growth curves could be explained by the fact that the medium exchange cultures for *D. carota* were performed in shake flask rather than in Petri dishes. Since the data from medium exchange experiments was not used in the calibration of the model, the simulations results show that the model can be used to predict cell behaviour, up to a point where no other limitation occurs.

4.11 CONCLUSIONS

The nutritional model previously developed by Jolicoeur et al. (2003) for *D. carota* hairy roots was successfully applied to *C. roseus* hairy roots as well as to *E. californica* suspension cells. The model was also adapted to include intracellular accumulation and management of nitrogenous compounds and storage carbohydrates. Results suggest that the model structure is suitable to describe the growth and nutritional behaviours for suspension cells and hairy roots. Furthermore, the model structure showed to be easily adaptable to different plant species and culture media. In this work, the model was used as a tool to compare plant cell species and culture types from the cells nutritional behaviour. The predictive capacity of the model was confirmed with success on data from medium exchange cultures of *C. roseus* and *D. carota* hairy roots. The developed

model could be a powerful tool for screening cell and root lines looking at identifying nutritionally effective candidates. It could also be used for works on medium and culture management optimization, which could help to improve reproducibility of plant cell bioprocesses. Finally, this model could be useful to implement a control strategy allowing reaching or maintaining an optimal nutritional state for cells growth or productivity.

4.12 REFERENCES

Aslam M, Travis R, Huffaker R. 1992. Comparative kinetics and reciprocal inhibition of nitrate and nitrite uptake in roots of uninduced and induced barley (Hordeum vulgare L.) seedlings. Plant Physiology 99:1124-1133.

Bécard G, Fortin JA. 1988. Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on Ri-T-DNA transformed roots. New Phytologist 108:211-218.

Bhadra R, Shanks JV. 1997. Transient studies of nutrient uptake, growth, and indole alkaloid accumulation in heterotrophic cultures of hairy roots of Catharanthus roseus. Biotechnology and Bioengineering 55:527-534.

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

Bieleski RL, Fergusson IB. 1983. Physiology and metabolism of phosphate and its compounds. Inorganic plant nutrition. New York: Springer. p 422-449.

Bouchard-Marchand É. 2000. Études biocinétiques et nutritionnelles de racines transformées de carotte en culture in vitro. Master's Thesis. Montreal: Université de Montréal.

Cerezo M, Garcia-Agustin P, Serna D, Primo-Millo E. 1997. Kinetics of nitrate uptake by Citrus seedling and inhibitory effects of salinity. Plant Science 126:105-112.

Cloutier M, Perrier M, Jolicoeur M. 2007. Dynamic flux cartography of hairy roots primary metabolism. In a Special Issue on Dynamic Metabolic Networks. Phytochemistry (in press).

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

Curtis WR, Hasegawa PM, Emery AH. 1991. Modeling linear and variable growth in phosphate limited suspension cultures of opium poppy. Biotechnology and Bioengineering 38(371-379).

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

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

Hell R, Hillebrand H. 2001. Plants concepts for mineral acquisition and allocation. Current Opinion Biotechnology 12:161-168.

Isaac RA, Johnson WC. 1976. Determination of total nitrogen in plant tissue using a block digestor. Journal of Association of Official Analytical Chemists. 59:98-100.

Jolicoeur M, Bouchard-Marchand É, Bécard G, Perrier M. 2003 Regulation of mycorrhizal symbiosis: development of a structured nutritional dual model. Ecological Modelling 163:247-267.

Lamboursain L, Jolicoeur M. 2005. Critical influence of Eschscholzia californica cells nutritional state on secondary metabolite production. Biotechnology and Bioengineering 91:827-837.

Le Bot J, Adamowicz S, Robin P. 1998. Modeling plant nutrition of horticultural crops: a review. Scienta Horticulturae 74:47-82.

Leduc M, Tikhomiroff C, Cloutier M, Perrier M, Jolicoeur M. 2006. Development of a kinetic metabolic model: Application to Catharanthus roseus hairy root. Bioprocess and Biosystems Engineering 28:295-313.

More JJ. 1977. The Levenberg-Marquardt algorithm: implementation and theory. In: Watson GA, editor. Numerical analysis. Lectures notes in mathematics. vol. 630. Heidelberg. Springer-Verlag, p. 105-116.

Plaxton WC. 1998. Metabolic aspects of phosphate starvation in plants. In: Lynch Jp, Deikman J, editors. Phosphorus in Plant Biology: regulatory roles in molecular, cellular, organismic, and ecosystem processes: American Society of Plant Physiologists. p 229-241.

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

Schellenbaum L, Müller J, Boller T, Wiemken A. 1998. Effects of drought on nonmycorrhizal and mycorrhizal maize: changes in the pools of non-structural carbohydrates, in the activities of invertase and trehalase, and in the pools of amino acids and imino acids. New Phytologist 138:59-66.

Schlatmann JE, ten Hoopen HJG, Heijnen JJ. 1999. A simple structure model for maintenance, biomass formation, and ajmalicine production by nondividing *Catharanthus roseus* cells. Biotechnology and Bioengineering 66:147-157.

Sugiyama N, Ishigaki K. 1994. Uptake of nitrate-nitrogen by blueberry plants. Journal of Plant Nutrition 17:1975-1982.

Thorsteinsson B, Tillberg JE. 1987. Carbohydrate partitioning, photosynthesis and growth in *Lemna gibba* G3. II. Effects of phosphorus limitation. Physiologia Plantarum 71:271-276.

Van Gulik WM, ten Hoopen HJG, Heijnen JJ. 1993. A structured model describing carbon and phosphate limited growth of *Catharanthus roseus* plant cell suspensions in batch and chemostat culture. Biotechnology and Bioengineering 41:771-780.

Wong HK, Chan HK, Coruzzi GM, Lam HM. 2004. Correlation of ASN2 gene expression with ammonium metabolism in *Arabidopsis*. Plant Physiology 134:332-338.

Zhang J, Su WW. 2002. Estimation of intracellular phosphate in plant cell culture using an extended Kalman filter. Journal of Bioscience and Bioengineering 94:8-14.

CHAPITRE 5 : DYNAMIC FLUX CARTOGRAPHY OF HAIRY ROOTS PRIMARY METABOLISM

5.1 Présentation de l'artcile 'Dynamic flux cartography of hairy roots primary metabolism'

Ce chapitre reprend l'article ***Dynamic flux cartography of hairy roots primary metabolism***. Cet article a été accepté pour publication dans le numéro spécial *Dynamic metabolic networks* de la revue Phytochemistry (Vol. 68, No. 16-18, p. 2393-2404).

Cet article présente un modèle cinétique pour les voies du métabolisme primaire des cellules et tissus végétaux. Ce modèle est une continuation de travaux précédents sur la modélisation métabolique pour les cellules de *Catharanthus roseus*. Lors de ces travaux antérieurs, la modélisation du métabolisme primaire avait été effectuée en considérant un régime permanent sur les intermédiaires du métabolisme primaire central. Cette hypothèse limitait l'applicabilité du modèle puisque le régime permanent n'est pas systématiquement observé pour le métabolisme végétal. Puisque la modélisation cinétique produit une quantité considérable de résultats de simulation (flux et concentrations dans le temps), un outil de visualisation des résultats a été développé. Cette visualisation présente, schématiquement, le profil temporel des flux et des concentrations. Cet outil a permis d'effectuer des observations importantes sur le métabolisme primaire végétal. Premièrement, les résultats de simulation ont montré que

les flux cataboliques du métabolisme primaire étaient relativement élevés et stables, alors que les flux anaboliques étaient plus faibles et variables, une observation qui concorde très bien avec la littérature sur les cellules végétales. De plus, un très haut taux de circulation du Pi entre sa forme libre et son allocation sur les molécules phosphatées a été observé. Ce taux de circulation du Pi est significativement plus élevé que les autres flux simulés du métabolisme primaire. Cette circulation considérable du Pi pourrait avoir des implications physiologiques qui demanderaient une étude plus approfondie. La modélisation cinétique a donc permis d'analyser, de manière intégrative, le métabolisme primaire végétal.

5.2 DYNAMIC FLUX CARTOGRAPHY OF HAIRY ROOTS PRIMARY METABOLISM

M. Cloutier, M. Perrier and M. Jolicoeur*

Canada Research Chair on the Development of Metabolic Engineering Tools,

Bio-P^2, Department of Chemical Engineering, Ecole Polytechnique de Montreal,

P.O. Box 6079, Station Centre-ville, Montreal, Quebec, Canada, H3C 3A7

***Corresponding Author**

Mario Jolicoeur, P.Eng., Ph.D.

Professor

Tel: 514-340-4711 ext. 4525

Fax: 514-340-4159

E-mail: mario.jolicoeur@polymtl.ca

5.3 ABSTRACT

A dynamic model for plant cell and hairy root primary metabolism is presented. The model includes nutrient uptake (Pi, sugars, nitrogen sources), the glycolysis and pentose phosphate pathways, the TCA cycle, amino acid biosynthesis, respiratory chain, biosynthesis of cell building blocks (structural hexoses, organic acids, lipids, and organic phosphated molecules). The energy shuttles (ATP, ADP) and cofactors (NAD/H, NADP/H) are also included. The model describes the kinetics of 44 biochemical reactions (fluxes) of the primary metabolism of plant cells and includes 41 biochemical species (metabolites, nutrients, biomass components). Multiple Michaelis-Menten type kinetics are used to describe biochemical reaction rates. Known regulatory phenomena on metabolic pathways are included using sigmoid switch functions. A visualization framework showing fluxes and metabolite concentrations over time is presented. The visualization of fluxes and metabolites is used to analyze simulation results from *Catharanthus roseus* hairy root 50 day batch cultures. The visualization of the metabolic system allows analyzing split ratios between pathways and flux time-variations. For carbon metabolism, the cells were observed to have relatively high and stable fluxes for the central carbon metabolism and low and variable fluxes for anabolic pathways. For phosphate metabolism, a very high free intracellular Pi turnover rate was observed with higher flux variations than for the carbon metabolism. Nitrogen metabolism also exhibited large flux variations. The potential uses of the model are also discussed.

5.4 KEYWORDS

Metabolic modeling, Hairy roots, Kinetic model, Metabolic regulation

5.5 INTRODUCTION

Plant metabolism has unique features that allow adaptation to a changing environment. Under Pi limitation, plant cells can activate pathways to bypass enzymatic reactions that require phosphate (Plaxton, 1998). Rontein et al. (2002) observed in tomato cells that the central primary metabolism fluxes are stable, but that the anabolic pathways (starch and other polysaccharide biosynthesis, amino and organic acid biosynthesis) can exhibit large variations, allowing the metabolism to adapt its behaviour to the cell's growth requirements. Gene expression in plant cells can also be correlated to intracellular ammonium concentration, as seen by Wong et al. (2004) in *Arabidopsis thaliana*. It is also well known that the intracellular concentrations in the nutrients and metabolites of plant cells can change significantly over time (Lamboursain and Jolicoeur, 2005). Thus, it is commonly accepted that plant cells have a complex metabolic capacity to adapt to a changing environment. An integrated approach in the analysis of plant cell metabolic pathways could thus yield important information on this metabolic capacity for adaptation. The most common method of accurately analyzing metabolic pathways and metabolic fluxes is the Metabolic Flux Analysis (MFA). However, since this method assumes a steady-state mass balance of metabolite concentrations, it can fail to grasp the dynamics of a metabolic system. The application of MFA to plant cell is still possible, as shown by Rontein et al. (2002), but it requires experimental conditions that can ensure the pseudo steady-state assumption.

A dynamic metabolic model was developed to account for the aforementioned specificities of plant cell metabolism (Leduc et al., 2006). This model describes metabolite and nutrient concentrations for *Catharanthus roseus* hairy roots in batch and medium exchange cultures. However, metabolite concentrations represent only the 'state' of a metabolic system, while the fluxes represent what the metabolism is 'performing'. The fluxes and turnover rates can be indicators of cell growth or biomolecule production potential. It was observed in mammalian cells that the ATP production rate is a good indicator of production potential (Lin et al., 1999; Henry et al., 2005). Thus, the description of metabolic fluxes with a dynamic model could potentially improve our capacity to understand and predict plant cell or hairy root biomolecule production potential. The central primary metabolism (glycolysis, TCA cycle, pentose-phosphate pathway, etc.) has been extensively studied, and many models can be found in the literature to analyze these pathways in bacterial cells and yeasts. The knowledge available on many organisms allows constructing reliable dynamic models that describe the kinetics of metabolic pathways. Chassagnole et al. (2002) proposed a dynamic model for the central carbon metabolism of *E. coli* to study the influence of key enzymes on the global behaviour of the system. The dynamic modelling approach for the central carbon metabolism can also be applied to *Saccharomyces cerevisiae* fermentation, as seen by Rizzi et al. (1996). Metabolic models were also developed for plant cells. However, these models only described specific sub-networks like photosynthesis (Fridlyand et al., 1999; Poolman et al., 2000; Farquhar et al., 2001), respiration (Affourtit et al., 2001), cellulose biosynthesis (Delmer and Haigler, 2002),

lipid biosynthesis (Ramli et al., 2002) or secondary metabolism (Boatright et al., 2004). Rontein et al. (2002) analyzed the central primary metabolism, but not dynamically. Thomas et al. (1997) studied the dynamics of potato tuber phosphofructokinase through Metabolic Control Analysis (MCA), but their work was limited to the dynamics of one enzyme. The model presented in Leduc et al. (2006) included the central primary metabolism, but with a steady-state hypothesis on metabolite concentrations. Thus, the fluxes and concentration profiles for the central metabolism were not described or analyzed. Moreover, the steady-state hypothesis limits the applicability of a metabolic model for plant cells, especially in a context where the high-throughput analytical methods allow the measurement of many parameters of a metabolic system. Metabolites can be measured by GC-MS (Roessner et al., 2000), fluxes can be estimated using isotope-labelled substrates (Dieuaide-Noubhani et al., 1995; Roscher et al., 2000), and gene expression can be measured with microarray analysis (Ruan et al., 1998). However, the amount of available information on metabolism is not yet sufficient to identify and understand all the metabolic regulation in plant cells. Therefore, the problems of dynamic metabolic modelling are still numerous. For instance, parameters identification is not trivial, even when a considerable dataset is available, and this can handicap the use of a model for prediction purposes. However, a fully dynamic metabolic model describing metabolite mass balances, enzyme kinetics, and pathway regulation can be a useful tool improving our capacity to analyze both hypotheses and experimental data on metabolic networks. To the best of our knowledge, no dynamic model for the central primary metabolism of plant cells can be found in the literature. In

this work, we present a dynamic metabolic model for the primary metabolism of plant cells and show how the model can be used to obtain better insight into the metabolic behaviour of *C. roseus* hairy roots in batch culture. This dynamic metabolic modelling approach yields crucial information on a metabolic network since the resolution of such a system includes both concentration profiles and fluxes over time. Thus, a visualization framework that includes the fluxes and metabolite levels is proposed in analyzing the simulation results for the dynamic metabolic network.

5.6 DYNAMIC METABOLIC MODEL FOR PLANT CELLS

General modelling approach

The dynamic metabolic model is based on the modelling approach presented in Leduc et al. (2006), but without the steady-state hypothesis on the primary metabolism. Thus, the model presented here fully describes the dynamics of the fluxes (44 reaction rates) and metabolite concentrations (41 biochemical species) of the metabolic network. The proposed metabolic network is presented in Figure 5.1 and the stoichiometric equations are listed in Table 5-1.

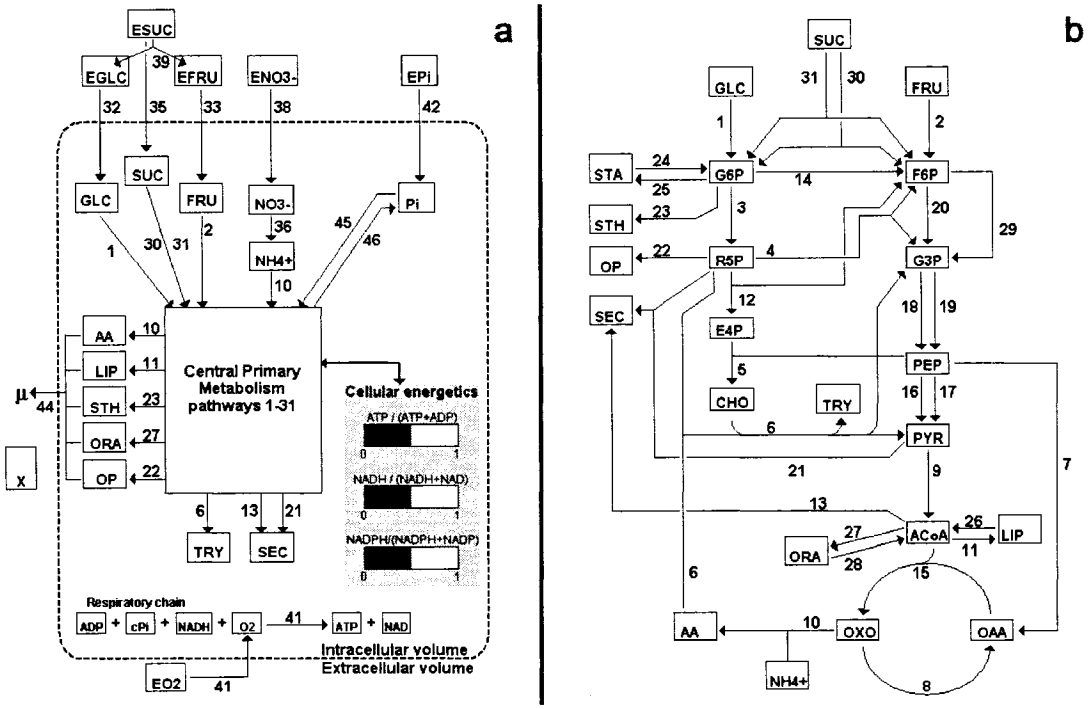


Figure 5.1 Schematic view of the dynamic metabolic model (a) and pathways of the central primary metabolism (b). Numbers correspond to fluxes numbers in Tables 5-1, 5-2 and 5-3.

The metabolite mass balances of the system can be defined as an ensemble of ordinary differential equations (ODE) as follows:

$$\frac{dS}{dt} = M \cdot v - \mu \cdot S \qquad 5.1$$

where S is a vector of the 41 metabolite concentrations, M is the stoichiometric matrix of the metabolic network, v is the vector of the metabolic fluxes, and μ is the growth rate.

This mathematical representation of a metabolic network is the most common one and there are several methods of solving it. The most common approach is the metabolic flux analysis (MFA). In that case a steady-state is assumed in metabolite concentrations, and the system can be solved by linear algebra since the left-hand side of Equation 1 is equal to 0. However the system is often underdetermined or it needs a set of known fluxes to be solved. This method is not necessarily well adapted for plant cell metabolism because plant cells are known to accumulate metabolites and nutrients, thus rendering the steady-state hypothesis dubious, except under certain conditions as discussed by Varner and Ramkrishna (1999). Rontein et al. (2002) also observed that the central carbon metabolism of tomato cells exhibits fluxes that are relatively high and stable, while the anabolic fluxes are lower and subject to variations. Thus, it is not altogether clear if a steady-state mass balance is the best way to analyze a plant cell metabolic system. It might be appropriate for a subset of reactions, as proposed in Leduc et al. (2006), but it still limits the analysis and the possible applications of a model.

Table 5-1 Reactions of the metabolic model (continued next page)

No.	Reaction
1	GLC + ATP → G6P + ADP
2	FRU + ATP → F6P + ADP
3	G6P + 2 NADP → R5P + 2 NADPH
4	3 R5P → 2 F6P + G3P
5	E4P + 2 PEP + ATP + NADH → CHO + 4 Pi + ADP + NAD
6	CHO + 2 AA + 2 ATP + R5P → PYR + 2 ADP + PPi + G3P + TRY
7	PEP + CO2 → OAA + Pi
8	OXO+2 NAD + ADP + Pi → OAA + 2 NADH + ATP
9	PYR + NAD → NADH + ACOA
10	OXO + NH_4 + 3 NADPH + 3 ATP → AA + 3 NADP + 3 ADP + 3 Pi
11	ACOA + ATP + 2 NADPH → LIP + ADP + Pi + 2 NADP
12	2 R5P → F6P + E4P
13	3 ACOA + 2 NADPH + 3 ATP → SEC + 2 NADP + 3 ADP + 3 Pi
14	G6P → F6P
15	ACOA + OAA + NAD → OXO + NADH
16	PEP + ADP → PYR + ATP
17	PEP → PYR + Pi
18	G3P + Pi + ADP + NAD → PEP + ATP + NADH
19	G3P + NADP → PEP + NADPH
20	F6P + ATP → 2 G3P + ADP
21	R5P + PYR + ATP → SEC + ADP + 2 Pi
22	R5P + 3.75 AA + 7 ATP + 0.25 NAD → 7 ADP + 3.5 Pi + 1.75 PPi + 0.25 NADH + OP
23	G6P + 2 ATP + NADPH → STH + 2 ADP + NADP + Pi + PPi
24	STA + Pi → G6P
25	G6P + ATP → STA + ADP + PPi
26	LIP + 2 ATP + NAD → ACOA + 2 ADP + PPi + NADH
27	ACOA → ORA
28	ORA → ACOA
29	F6P + PPi → 2 G3P + Pi
30	SUC + 2 ATP → G6P + F6P + 2 ADP
31	SUC + PPi → G6P + F6P
32	EGLC + ATP → GLC + ADP + Pi
33	EFRU + ATP → FRU + ADP + Pi
34	OP → Pi
35	ESUC + ATP → SUC + ADP + Pi
36	NO_3 + NADH + 3 NADPH → NH_4 + NAD + 3 NADP

Table 5-1 Continued

No.	Reaction
37	PPi → 2 Pi
38	ENO_3 + ATP → NO_3 + ADP + Pi
39	ESUC → EGLC + EFRU
40	ENH_4 + ATP → NH_4 + ADP + Pi
41	2.5 ADP + 2.5 Pi + NADH + O2 → 2.5 ATP + NAD
42	EPi + 2 ATP → 3 Pi + 2 ADP
43	ATP → ADP + Pi
44	AA + LIP + ORA + STH + OP → X
45	v8 + v18 + v24 + 2.5*v41
46	4*v5 + v7 + 3*v10 + v11 + 3*v13 + v17 + 2*v21 + 3.5*v22 + v23 + v29 + v33 + v34

In this work, a fully kinetic metabolic model is presented. Each flux is described by a kinetic equation (Tables 5-2 and 5-3) of the form:

$$v(j) = v_{\max,j} \prod_i \frac{(S_i)^{\alpha_i}}{(K_{m,i})^{\alpha_i} + (S_i)^{\alpha_i}} \bullet f(S_i) \qquad 5.2$$

where each flux has a maximum reaction rate ($v_{max,j}$), accounting for maximal potential active enzyme level. Then, each pathway regulation is described by multiplicative Michaelis-Menten type kinetics describing the effect of the substrates or cofactors and energy shuttles involved. The net global enzymatic activities are described macroscopically by lumping a series of effects. Thus, the model does not impose constant enzymatic activities. The main assumption here is that the driving forces behind the metabolic regulations are the variations in metabolites, co-factors and energy shuttles levels. This hypothesis showed to be efficient enabling the model to describe available data (see Results and Discussion section) but it remains a simplification which

could be further developed. A single affinity constant ($K_{m,i}$) is used for each substrate. The exponent 'α_i' is used to represent higher reaction order. Moreover, sigmoid switch functions ($f(S_i)$, Equation 3) are multiplied by the reaction rates to describe known metabolic regulatory phenomena and maximum accumulation levels (see Table 5-2 and 5-3). The general form of this function is:

$$f(S_i) = \frac{1}{1 + e^{-a(S_i - S_{i,t})}} \qquad 5.3$$

This function can switch from 0 to 1 around a threshold value ($S_{i,t}$) for a metabolite concentration. The parameter "a" defines the steepness of the regulation. This type of equation is more representative of biological behaviour than pure on/off switches. In a context of numerical solutions, it also reduces discontinuities around the threshold values. There are many functions that can describe sigmoid switches and the one proposed here was considered because of its simplicity (two parameters) and versatility in describing either sharp or smooth regulation (depending on the parameter "a").

This modelling approach requires the following parameter values for each individual reaction: v_{max}, K_m and the regulation parameters "a" and $S_{i,t}$ when applicable. Initial conditions for the metabolite concentrations are also needed to solve the ODE problem. The advantage of this approach, where the dynamics of each reaction is described, is that the metabolic system is solved for both the fluxes and the metabolite concentrations. This allows for a complete description of the metabolic state of the system.

Table 5-2 Biokinetic equations and the regulation of metabolic fluxes 1-22

No.	Biokinetic equation
1	$v(1) = v_{max1} \cdot \frac{GLC}{K_{M_{GLC}} + GLC} \cdot \frac{ATP}{K_{M_{ATP}} + ATP}$
2	$v(2) = v_{max2} \cdot \frac{FRU}{K_{M_{FRU}} + FRU} \cdot \frac{ATP}{K_{M_{ATP}} + ATP}$
3	$v(3) = v_{max3} \cdot \frac{G6P}{K_{M_{G6P}} + G6P} \cdot \frac{NADP}{K_{M_{NADP}} + NADP} \cdot \frac{1}{1 + e^{-10 \cdot \left(\frac{NADP}{NADP + NADPH} - 0.1 \right)}}$
4	$v(4) = v_{max4} \cdot \frac{R5P}{K_{M_{R5P}} + R5P}$
5	$v(5) = v_{max5} \cdot \frac{E4P}{K_{M_{E4P}} + E4P} \cdot \frac{PEP}{K_{M_{PEP}} + PEP} \cdot \frac{ATP}{K_{M_{ATP}} + ATP} \cdot \frac{NADH}{K_{M_{NADH}} + NADH}$
6	$v(6) = v_{max6} \cdot \frac{CHO}{K_{M_{CHO}} + CHO} \cdot \frac{AA}{K_{M_{AA}} + AA} \cdot \frac{ATP}{K_{M_{ATP}} + ATP} \cdot \frac{R5P}{K_{M_{R5P}} + R5P}$
7	$v(7) = v_{max7} \cdot \frac{PEP}{K_{M_{PEP}} + PEP} \cdot \frac{CO_2}{K_{M_{CO2}} + CO_2}$
8	$v(8) = v_{max8} \cdot \frac{OXO}{K_{M_{OXO}} + OXO} \cdot \frac{NAD}{K_{M_{NAD}} + NAD} \cdot \frac{ADP}{K_{M_{ADP}} + ADP} \cdot \frac{Pi}{K_{M_{Pi}} + Pi}$
9	$v(9) = v_{max9} \cdot \frac{PYR}{K_{M_{PYR}} + PYR} \cdot \frac{NAD}{K_{M_{NAD}} + NAD}$
10	$v(10) = v_{max10} \cdot \frac{OXO}{K_{M_{OXO}} + OXO} \cdot \frac{NH_4}{K_{M_{NH4}} + NH_4} \cdot \frac{NADPH}{K_{M_{NADPH}} + NADPH} \cdot \frac{ATP}{K_{M_{ATP}} + ATP}$
11	$v(11) = v_{max11} \cdot \frac{ACOA}{K_{M_{ACOA}} + ACOA} \cdot \frac{ATP}{K_{M_{ATP}} + ATP} \cdot \frac{NADPH}{K_{M_{NADPH}} + NADPH}$
12	$v(12) = v_{max12} \cdot \frac{R5P}{K_{M_{R5P}} + R5P}$
13	$v(13) = v_{max13} \cdot \frac{ACOA}{K_{M_{ACOA}} + ACOA} \cdot \frac{NADPH}{K_{M_{NADPH}} + NADPH} \cdot \frac{ATP}{K_{M_{ATP}} + ATP}$
14	$v(14) = v_{max14} \cdot \frac{G6P}{K_{M_{G6P}} + G6P}$
15	$v(15) = v_{max15} \cdot \frac{ACOA}{K_{M_{ACOA}} + ACOA} \cdot \frac{OAA}{K_{M_{OAA}} + OAA} \cdot \frac{NAD}{K_{M_{NAD}} + NAD}$
16	$v(16) = v_{max16} \cdot \frac{PEP}{K_{M_{PEP}} + PEP} \cdot \frac{ADP}{K_{M_{ADP}} + ADP}$
17	$v(17) = v_{max17} \cdot \frac{PEP}{K_{M_{PEP}} + PEP} \cdot \left(1 - \frac{1}{1 + e^{-10 \cdot (Pi - 1)}} \right)$
18	$v(18) = v_{max18} \cdot \frac{G3P}{K_{M_{G3P}} + G3P} \cdot \frac{Pi}{K_{M_{Pi}} + Pi} \cdot \frac{ADP}{K_{M_{ADP}} + ADP} \cdot \frac{NAD}{K_{M_{NAD}} + NAD}$

Table 5-2 Continued

19	$v(19) = v_{max\,19} \cdot \frac{G3P}{K_{M_{G3P}} + G3P} \cdot \frac{NADP}{K_{M_{NADP}} + NADP}$
20	$v(20) = v_{max\,20} \cdot \frac{F6P}{K_{M_{F6P}} + F6P} \cdot \frac{ATP}{K_{M_{ATP}} + ATP}$
21	$v(21) = v_{max\,21} \cdot \frac{R5P}{K_{M_{R5P}} + R5P} \cdot \frac{PYR}{K_{M_{PYR}} + PYR} \cdot \frac{ATP}{K_{M_{ATP}} + ATP}$
22	$v(22) = v_{max\,22} \cdot \frac{R5P}{K_{M_{R5P}} + R5P} \cdot \frac{AA}{K_{M_{AA}} + AA} \cdot \frac{ATP}{K_{M_{ATP}} + ATP} \cdot \frac{NAD}{K_{M_{NAD}} + NAD} \cdot \frac{1}{1 + e^{-32.7 \cdot (Pi - 0.0003)}}$

Table 5-3 Biokinetic equations and the regulation of metabolic fluxes 23-45

No.	Biokinetic equation
23	$v(23) = v_{max\,23} \cdot \frac{G6P}{K_{M_{G6P}} + G6P} \cdot \frac{ATP}{K_{M_{ATP}} + ATP} \cdot \frac{NADPH}{K_{M_{NADPH}} + NADPH}$
24	$v(24) = v_{max\,24} \cdot \frac{STA}{K_{M_{STA}} + STA} \cdot \frac{Pi}{K_{M_{Pi}} + Pi} \cdot \left(1 - \frac{1}{1 + e^{-100 \cdot (GLC - 0.2)}}\right)$
25	$v(25) = v_{max\,25} \cdot \frac{G6P}{K_{M_{G6P}} + G6P} \cdot \frac{ATP}{K_{M_{ATP}} + ATP} \cdot \frac{1}{1 + e^{-10 \cdot (GLC + FRU + SUC - 0.2)}} \cdot \left(1 - \frac{1}{1 + e^{-200 \cdot (STA - 1.7)}}\right)$
26	$v(26) = v_{max\,26} \cdot \frac{LIP}{K_{M_{LIP}} + LIP} \cdot \frac{ATP}{K_{M_{ATP}} + ATP} \cdot \frac{NAD}{K_{M_{NAD}} + NAD} \cdot \left(1 - \frac{1}{1 + e^{-10 \cdot (NADH - 1)}}\right)$
27	$v(27) = v_{max\,27} \cdot \frac{ACOA}{K_{M_{ACOA}} + ACOA}$
28	$v(28) = v_{max\,28} \cdot \frac{ORA}{K_{M_{ORA}} + ORA} \cdot \left(1 - \frac{1}{1 + e^{-10 \cdot (NADH - 1)}}\right)$
29	$v(29) = v_{max\,29} \cdot \frac{F6P}{K_{M_{F6P}} + F6P} \cdot \frac{PPi}{K_{M_{PPi}} + PPi} \cdot \left(1 - \frac{1}{1 + e^{-10 \cdot (Pi - 1)}}\right)$
30	$v(30) = v_{max\,30} \cdot \frac{SUC}{K_{M_{SUC}} + SUC} \cdot \frac{ATP}{K_{M_{ATP}} + ATP} \cdot \left(1 - \frac{1}{1 + e^{-100 \cdot (GLC + FRU - 0.02)}}\right)$
31	$v(31) = v_{max\,31} \cdot \frac{SUC}{K_{M_{SUC}} + SUC} \cdot \frac{PPi}{K_{M_{PPi}} + PPi}$
32	$v(32) = v_{max\,32} \cdot \frac{EGLC}{K_{M_{EGLC}} + EGLC} \cdot \frac{ATP}{K_{M_{ATP}} + ATP}$
33	$v(33) = v_{max\,33} \cdot \frac{EFRU}{K_{M_{EFRU}} + EFRU} \cdot \frac{ATP}{K_{M_{ATP}} + ATP}$
34	$v(34) = v_{max\,34} \cdot \frac{OP^4}{K_{M_{OP}}{}^4 + OP^4} \cdot \left(1 - \frac{1}{1 + e^{-15 \cdot (Pi - 0.045)}}\right)$

Table 5-3 Continued

35	$v(35) = v_{\max 35} \cdot \frac{ESUC}{K_{M_{ESUC}} + ESUC} \cdot \frac{ATP}{K_{M_{ATP}} + ATP}$
36	$v(36) = v_{\max 36} \cdot \frac{NO_3^2}{K_{M_{NO3}}^2 + NO_3^2} \cdot \frac{NADH}{K_{M_{NADH}} + NADH} \cdot \frac{NADPH}{K_{M_{NADPH}} + NADPH}$
37	$v(37) = v_{\max 37} \cdot \frac{PPi}{K_{M_{PPi}} + PPi}$
38	$v(38) = \left[v_{\max 38,LA} \cdot \frac{ENO_3}{K_{M.LA_{ENO3}} + ENO_3} + v_{\max 38,HA} \cdot \frac{ENO_3}{K_{M.HA_{ENO3}} + ENO_3} \right] \cdot \frac{ATP}{K_{M_{ATP}} + ATP}$
39	$v(39) = v_{\max 39} \cdot \frac{ESUC}{K_{M_{ESUC}} + ESUC}$
40	$v(40) = v_{\max 40} \cdot \frac{ATP}{K_{M_{ATP}} + ATP}$
41	$v(41) = v_{\max 41} \cdot \frac{NADH}{K_{M_{NADH}} + NADH} \cdot \frac{ADP}{K_{M_{ADP}} + ADP} \cdot \frac{Pi^2}{K_{M_{Pi}}^2 + Pi^2} \cdot \frac{O_2}{K_{M_{O2}} + O_2}$
42	$v(42) = \left[v_{\max 42,LA} \cdot \frac{EPi}{K_{M.LA_{EPi}} + EPi} + v_{\max 42,HA} \cdot \frac{EPi}{K_{M.HA_{EPi}} + EPi} \right] \cdot \frac{ATP}{K_{M_{ATP}} + ATP}$
43	$v(43) = v_{\max,43} \frac{ATP}{K_{M_{ATP}} + ATP}$
44	$v(44) = v_{\max 44} \cdot X \cdot \frac{AA}{K_{M_{AA}} + AA} \cdot \frac{LIP^{1.25}}{K_{M_{LIP}}^{1.25} + LIP^{1.25}} \cdot \frac{ORA}{K_{M_{ORA}} + ORA} \cdot \frac{OP^4}{K_{M_{OP}}^4 + OP^4}$

Nutrient uptake and accumulation

The major nutrients, i.e. glucose (GLC), fructose (FRU), sucrose (SUC), nitrate (NO3), ammonium (NH4) and phosphate (Pi), are taken up by the cell (respectively fluxes $v(32)$, $v(33)$, $v(35)$, $v(38)$, $v(40)$ and $v(42)$) and accumulated in intracellular pools (Figure 5.1a). These pools then feed the reactions of the primary metabolism network.

Primary metabolism

The primary metabolism produces the cell building blocks: amino acids (AA), lipids (LIP), organic phosphates (OP, including nucleic acids), structural hexoses (STH), organic acids (ORA) as well as starch (STA). The primary metabolism reactions also

include the balances on energy shuttles (ATP/ADP) and cofactors (NADH and NADPH, and their oxidized forms NAD and NADP). The major pathways of the central primary metabolism are included in the model, with simplifications in linear pathways. The model includes glycolysis (fluxes $v(1)$, $v(14)$, $v(16)$, $v(17)$, $v(18)$, $v(19)$, $v(20)$, $v(29)$) as well as pathways for the integration of other forms of sugars that are known to be used by plants: fructose (flux $v(2)$), sucrose (fluxes $v(30)$ and $v(31)$), and starch (flux $v(24)$). Some of the reactions (fluxes $v(16)$-$v(17)$, $v(18)$-$v(19)$ and $v(20)$-$v(29)$) are decoupled to account for phosphate regulation. Pyruvate (PYR) is channelled through secondary metabolite production (flux $v(21)$) or through the TCA cycle (fluxes $v(8)$, $v(9)$ and $v(15)$). Acetyl-Co-A (ACOA), apart from being consumed by the TCA cycle, is also the backbone in the production of organic acids (ORA, flux $v(27)$) and lipids (LIP, flux $v(11)$). These metabolic species are two of the cell's biomass 'building blocks' (X, reaction $v(44)$) and can also be degraded in ACOA (fluxes $v(26)$ and $v(28)$) under NADH limitation. The oxaloacetate (OAA) pool in the TCA cycle is replenished by the anaplerotic pathway ($v(7)$). Amino acid (AA) biosynthesis is included in a simplified pathway ($v(10)$) describing the fixation of NH4 with oxoglutarate (OXO). Amino acids are used for growth ($v(44)$), as secondary metabolite precursors (tryptamine: TRY) biosynthesis ($v(6)$), or in organic phosphate (OP) biosynthesis ($v(22)$). The pentose phosphate pathway ($v(3)$, $v(4)$, $v(12)$) and the shikimate pathway ($v(5)$) are also described. Since many reactions of the primary metabolism either consume or release Pi, the turnover of this nutrient is illustrated by two 'global' fluxes: $v(45)$ and $v(46)$. Flux $v(45)$ is the sum of the fluxes that consume Pi and $v(46)$ is the sum of fluxes that release

Pi. The model does not describe cell compartmentation and this may limit its biological significance for some specific fluxes which are taken as net fluxes. However, the structure of the model allows to include intracellular compartments when adequate experimental data are available for parameter calibration. Further explanations on the construction and regulation of the metabolic pathways and references for stoichiometric and kinetic parameters can be found in Leduc et al. (2006). Some of the parameters presented in Leduc et al. (2006) have changed because of the fully dynamic description of the central metabolism which implies that different metabolic interactions are described. However, many parameters did not change significantly between the two models.

Model calibration and determination of kinetic parameters

Model calibration was performed using experimental data from *C. roseus* hairy root cultures (Leduc et al., 2006). The data set is built with nutrient and metabolite measurements over time (45 day experiments). A complete description of the root line and culture conditions can be found in Leduc et al. (2006). The model simulations were done in Matlab (The Mathworks), using the ode15s.m subroutine for differential equations integration. The model has 40 affinity constants, 46 maximum reaction rates and 11 regulation functions with two parameters for a total of 108 parameters. These parameters were determined by error minimization between model predictions and experimental data using the lsqcurvefit.m subroutine. This subroutine is based on the Levenberg-Marquardt algorithm, which is appropriate for nonlinear curve-fitting. Initial estimates for the error minimization routine were taken from literature when available

(see Leduc et al., 2006 for further details). The error minimization was performed using a set of 411 experimental data points. 14 state variables were measured (ENO3, NO3, NH4, EPi, Pi, ESUC, SUC, EGLC, GLC, EFRU, FRU, AA, STA, X) in two experiments (batch and medium exchange cultures). This data set is thus related to both medium nutrients and cell nutrition, cell amino acids and proteins pool (AA) and root mass (X). The model is over-parameterized, however, the use of values taken from the literature as initial estimates in the curve-fitting algorithm ensured to maintain the model parameters within a physiologically realistic range; i.e. between the lower and higher values found in literature. Parameters for the metabolic system are presented in Table 5-4 (affinity constants) and Table 5-5 (maximum reaction rates). Table 5-6 is a summary of the state variables of the system and initial conditions.

Table 5-4 Affinity constants (K_m)

Component	Value	Units
AA	0.045754	mmol•gDW^{-1}
FRU	0.120	"
CO2	1.25E-4	"
GLC	0.13844	"
LIP	0.00254	"
NAD	4.05E-4	"
NADH	4.492E-4	"
NADP	2E-4	"
NADPH	1.5E-4	"
ADP	1.1984E-4	"
NH4	0.47157	"
ATP	0.00613	"
ORA	0.01	"
Pi	0.1006	"
PPi	2.43E-4	"
SUC	1.00	"
STA	1.00	"
STH	0.248	"
OP	0.003994	"
G6P	0.0126	"
F6P	0.0113	"
G3P	0.0149	"
E4P	0.0127	"
R5P	0.0177	"
CHO	0.0124	"
PYR	0.0132	"
PEP	0.0123	"
ACOA	0.0125	"
OAA	0.0122	"
OXO	0.0131	"
O2	5.75E-5	"
NO3	0.2007	"
EFRU	0.0461	mM
EGLC	0.0535	"
ENO3_HA	0.0677	"
ENO3_LA	0.4317	"
EPI_HA	0.0026	"
EPI_LA	0.050	"
ESUC	12.012	"
EO2	0.0125	"

Table 5-5 Maximum reaction rates (V_{max})

Reaction	Current value	Units
1	2.4938	$mmol \cdot gDW^{-1} \cdot d^{-1}$
2	5.2712	"
3	1.3658	"
4	0.0047	"
5	9.8429	"
6	2.4765	"
7	2.9044	"
8	195.17	"
9	47.114	"
10	2.5266	"
11	0.8043	"
12	0.1214	"
13	0.2722	"
14	0.544	"
15	60.369	"
16	11.891	"
17	1.1416	"
18	135.94	"
19	9.0472	"
20	17.891	"
21	0.0199	"
22	3.6042	"
23	0.0783	"
24	0.0022	"
25	0.424	"
26	0.008	"
27	0.0682	"
28	0.0001	"
29	1.5167	"
30	0.01	"
31	0.1232	"
32	1.175	"
33	0.929	"
34	0.0096	"
35	0.05	"
36	0.3688	"
37	2.9016	"
38 HA	0.0015	"
38 LA	0.2868	"
39	1.002	"
40	0	"
41	13.2	"
42 HA	0.00175	"
42 LA	0.1101	"
43	1.132	"
44	0.15	d^{-1}
45	---	---
46	---	---

Table 5-6 State variables and initial conditions

Component	Value	Units
AA	0.818	mmol•gDW^{-1}
FRU	0.0336	"
CO2	1.25E-3	"
GLC	0.1625	"
SEC	0.00515	"
TRY	8.722E-4	"
LIP	0.1	"
NAD	5.9E-5	"
NADH	2E-4	"
NADP	1.8E-5	"
NADPH	1.45E-4	"
ADP	7.13E-4	"
NH4	0.053	"
ATP	1.296E-3	"
ORA	0.00807	"
Pi	0.117	"
PPi	3.5E-5	"
SUC	0.403	"
STA	1.705	"
STH	0.01	"
OP	6.7E-3	"
G6P	0.0125	"
F6P	0.0122	"
G3P	0.0131	"
E4P	0.0127	"
R5P	0.0126	"
CHO	0.0119	"
PYR	0.0130	"
PEP	0.0125	"
ACOA	0.0124	"
OAA	0.0126	"
OXO	0.0121	"
O2	1.15E-3	"
NO3	0.385	"
EFRU	8.33	mM
EGLC	7.22	"
ENO3	3.27	"
ENH4	0	"
EPI	0.1	"
ESUC	114	"
EO2	0. 25	"

Visualization of primary metabolism

The full resolution of the metabolic model allows for the visualization of metabolic fluxes and metabolite concentrations. A visualization framework was thus established based on Figure 5.1. This Figure was built in the Matlab environment using the following graphical functions: line.m (for metabolic fluxes), patch.m (surface representation), text.m (add text to an image) and rectangle.m (for metabolites pools representation and graphical cell design). The simulated flux values, in $mmol \cdot gDW^{-1} \cdot d^{-1}$, are presented. The arrows thickness is changing proportionally to the fluxes numerical values. The metabolites simulated levels are also presented qualitatively, with a full square representing a high level for a metabolite and an empty square for a low level. The energetic state of the cell is also presented with graphical bar ranging from 0 to 1. The values in the graph for the energetic states are the following ratios: ATP/(ATP +ADP), NADH/(NADH+NAD), NADPH/(NADPH+NADP). Thus, a value of 0 represents a low energetic state, or a state in which the cofactors are in their oxidized form. A value near 1 represents a high energetic state, or a state with cofactors in their reduced form. For visualization purposes, the numerical solution of the system (fluxes and metabolites vectors) was sampled at a rate of 5 points per day over 50 days (251 points), thus producing 251 images. These 251 images were encoded at 10 frames per second using the Matlab functions getframe.m and movie2avi.m, thus producing a 25 seconds video representing the time course of the *C. roseus* batch culture. For clarity, the fluxes numerical values are updated only once per second. All the other elements of the visualization are updated frame by frame.

5.7 RESULTS AND DISCUSSION

The model describes hairy roots growth and metabolic behaviour

The model presented here without the steady-state hypothesis on the central primary metabolism described adequately the cellular behaviour, with respect to the available data for a batch culture of *C. roseus* (Figure 5.2) (data from Leduc et al., 2006). The medium exchange culture experimental data was also simulated (results not shown). The model is thus able to describe the uptake of carbohydrates, nitrate and phosphate, and their respective intracellular accumulation in specific pools (i.e. chemically compartmented but not into organelles). Moreover, the cell behaviour (in this case cell growth) is also described. Thus, the fluxes and the metabolites levels, although not yet experimentally identified, are within a physiological range since the 'extremities' of the model (input to the cell and cell behaviour) are well described (see also Leduc et al. (2006) for exhaustive comparison with literature). The rates of nutrients transport (Table 5-3, fluxes 32, 33, 38, 39 and 42) are mediated by the ATP level in the cell (i.e. ATPases for pH regulation), thus including an indicator of the cell physiological state in the description of nutrients uptake. So the model accounts for physiological variations that could affect enzymes activities and, in the case of nutrient transport, this strategy seems to be reliable enough to describe experimental data.

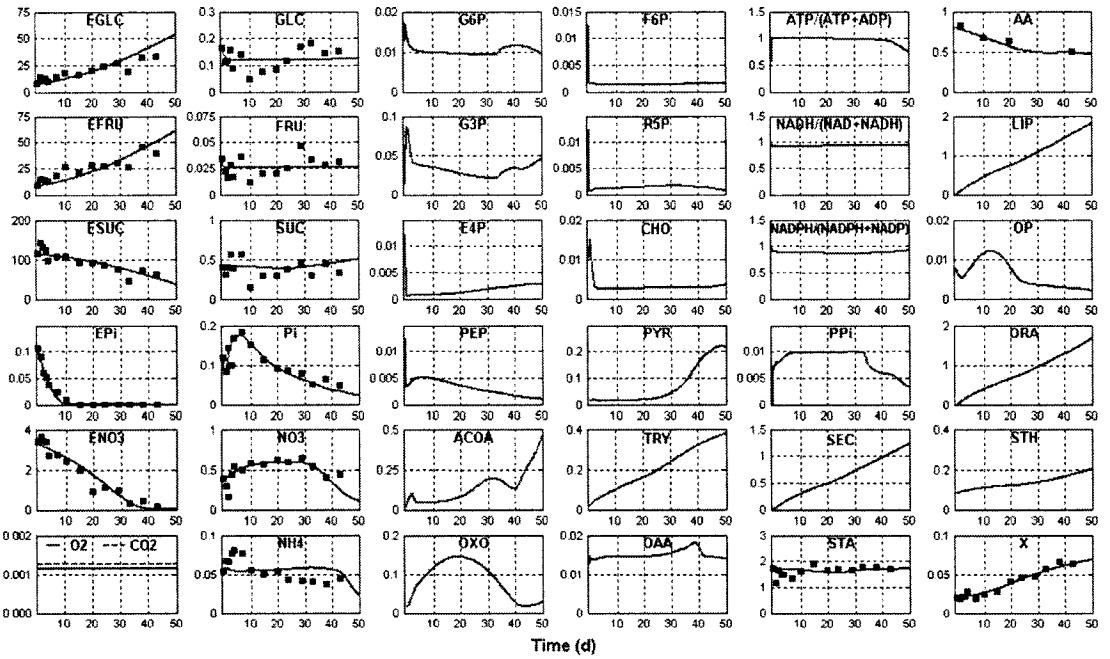


Figure 5.2 Simulated metabolites profiles and experimental data for a batch culture of *C. roseus*. Axis units are mmol•gDW^{-1} except for X (gDW per Petri dish) and for extracellular nutrients EGLC, EFRU, ESUC, EPi, ENO3 (mMol).

Metabolic flux cartography to visualize metabolic networks

Flux cartography is presented in Figures 5.3 and 5.4. Figure 5.3a presents the metabolic system after 5 days of a batch culture, with the hairy roots in early exponential phase. Figure 5.3b presents the system after 15 days, when the roots are in exponential growth. Figure 5.4a presents the deceleration phase (35 days). Finally, Figure 5.4b presents the metabolic state of the hairy roots at the end of a batch culture (50 days), when the roots are in stationary phase.

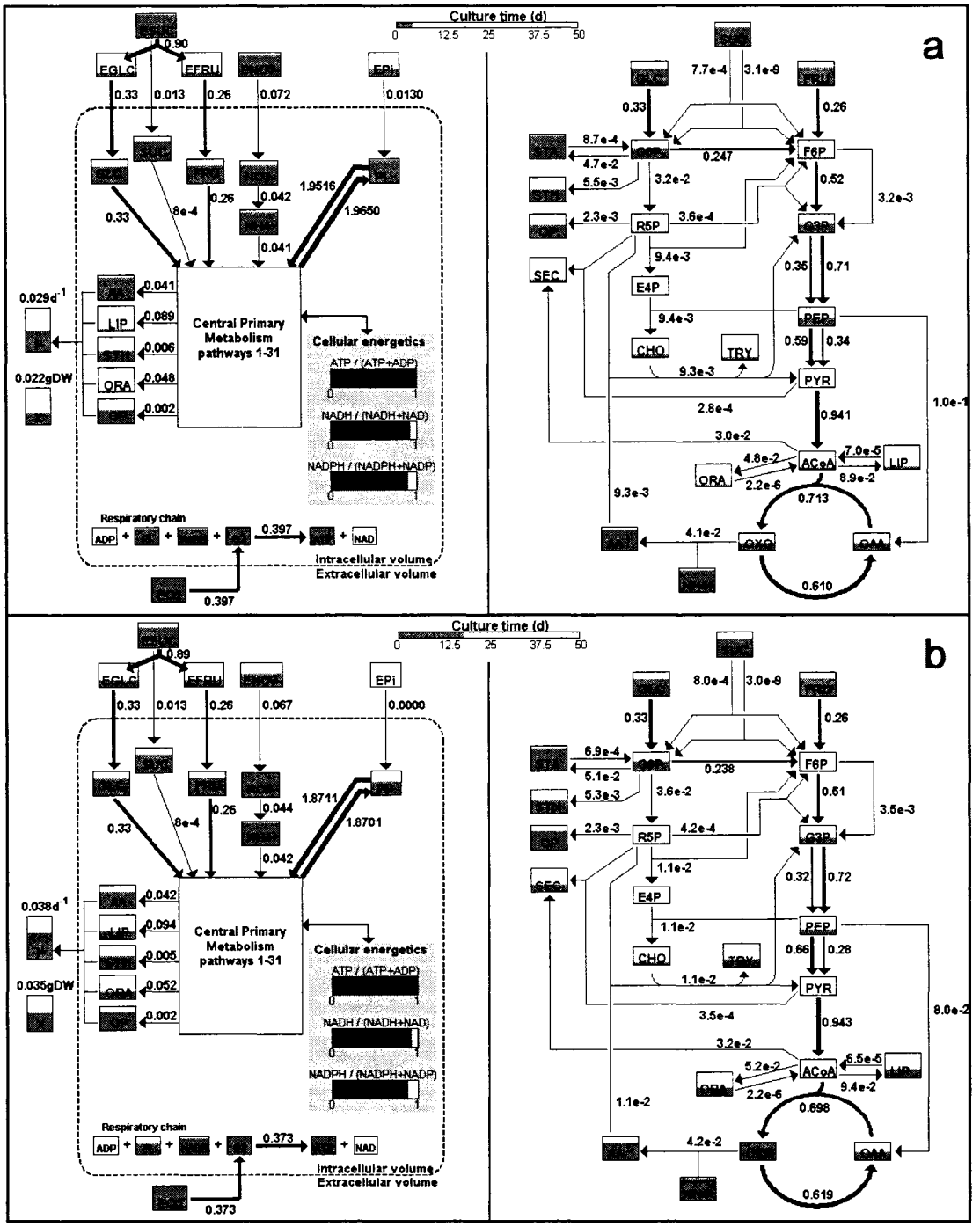


Figure 5.3 Cartography of simulated fluxes for a batch culture. Early exponential phase after 5 days (a). Exponential growth phase after 15 days (b). Fluxes units are mmol•gDW^{-1}•d^{-1}.

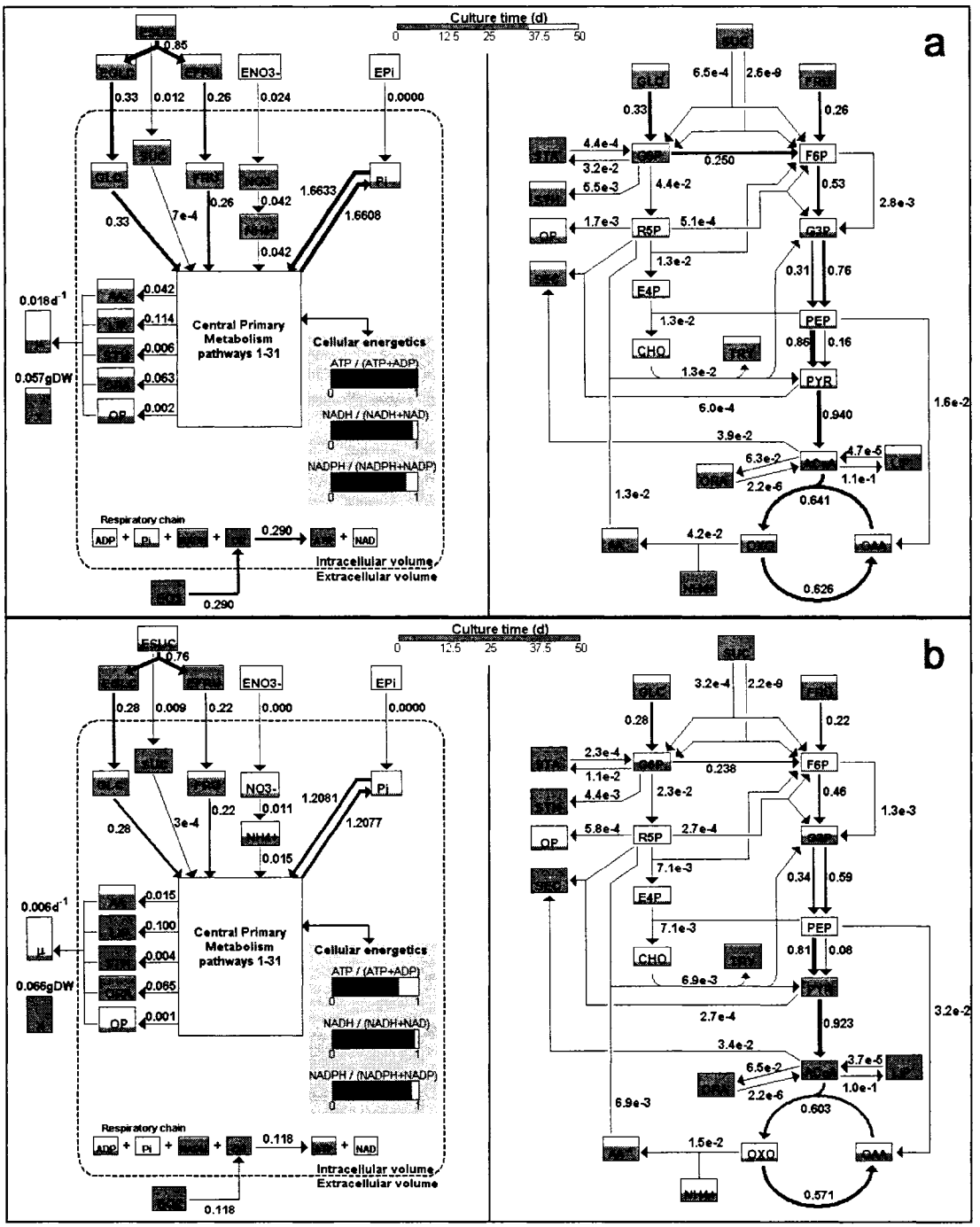


Figure 5.4 Cartography of simulated fluxes for a batch culture. Deceleration phase after 35 days (a). Stationary phase after 50 days (b). Fluxes units are $mmol \cdot gDW^{-1} \cdot d^{-1}$.

This complete visualization of the metabolic system over time is discussed in the following sections. The 25 seconds video of the simulation of the dynamic metabolic system is also provided (see Supplementary material). Figures 5.3 and 5.4 are snapshots taken from that video.

Carbon metabolism

Flux distribution shows that the entering fluxes of carbon sources to the primary metabolism ($v(1)$ and $v(2)$) are relatively high, even at the beginning of the exponential growth phase (Figure 5.3a). These fluxes are also stable through the culture phases. A decrease of 15% is observed only at the end of the batch culture. This decrease is attributed to a lower energetic state of the roots (see Figure 5.4b, 'cellular energetics') since the intracellular pools in GLC and FRU were still at a high level. The first steps of glycolysis ($v(14)$ and $v(20)$) were also stable, showing a decrease of 3.6% and 11.5%, respectively. The next step in glycolysis, the conversion of G3P to PEP, can be performed by two different pathways in the model: $v(18)$ and $v(19)$. Flux $v(19)$ exhibited a decrease of 17% due to a combined decrease in G3P and NADP concentrations. Flux $v(18)$ was stable through the culture time with observed variations of only 3%. The conversion of PEP to PYR shows larger variations in fluxes. Flux $v(16)$ increased from 0.59 $mmol \cdot gDW^{-1} \cdot d^{-1}$ to a maximum of 0.88 $mmol \cdot gDW^{-1} \cdot d^{-1}$ at 35 d and a final value of 0.81 $mmol \cdot gDW^{-1} \cdot d^{-1}$. At the same time, flux $v(17)$ decreased from 0.34 $mmol \cdot gDW^{-1} \cdot d^{-1}$ at 5 d to a final value of 0.08 $mmol \cdot gDW^{-1} \cdot d^{-1}$. Thus, the global flux from PEP to PYR is relatively stable, with a decrease of only 4.3% over 50 d. This allows maintaining the flux to PYR even though the metabolic state of the system is

changing. The flux distribution in Figures 5.3 and 5.4 shows that most of the ACOA coming from flux $v(9)$ is channelled through the TCA cycle (fluxes $v(8)$ and $v(15)$). At the beginning of the culture, flux $v(15)$ is equal to 75% of flux $v(9)$, while at the end this proportion is 65%. The ACOA that is not channelled through the TCA cycle is either accumulated or feeds the anabolic pathways $v(11)$ and $v(27)$ to produce LIP and ORA. At the beginning of the exponential phase (Figure 5.3a), 5.1% of flux $v(9)$ is channelled to ORA and 9.5% to LIP. These proportions are respectively 7% and 10.5% at the end of the batch culture (Figure 5.4b). The other pathways related to carbon metabolism, the pentose phosphate pathway, and the shikimate pathway, showed much lower fluxes, ranging from 2.7×10^{-4} to 4.4×10^{-2} mmol•gDW^{-1}•d^{-1}. These fluxes exhibited larger variations over time in the range of 25-30%. The biosynthesis of STA and STH was also channelling only a fraction of the glycolytic flux throughout the culture. The STH production flux $v(23)$ was equal to 1.6% of the entering glucose metabolic flux ($v(1)$). The flux for starch accumulation ($v(25)$) was equal to 14% of $v(1)$ at the beginning of the exponential phase, 15.5% when the growth rate was at its maximum value (Figure 5.3b), and this proportion decreased to 4% at the end of the batch experiment (Figure 5.4b). However, this decrease was not caused by a limitation in G6P, but rather by a lower energetic state at the end of the growth phase. Thus, it seems that a high and relatively stable flux in the central carbon metabolism is observed even in the case where the cells are not in growth phase. Analysis of simulation results suggests that energetic metabolism might have a greater impact on the anabolic fluxes than the availability of carbon backbones. This strategy allows maintaining stability in the central

primary metabolism, while the anabolic pathways have higher flexibility (as seen by Rontein et al., 2002). It is also noteworthy to mention that no carbohydrate limitation was observed in that experiment (Leduc et al., 2006). Glucose and fructose were still present in the culture medium and in the hairy root intracellular pools at the end of the batch culture, as can be seen in Figure 5.4b.

Phosphate and energetic metabolism

The fluxes related to phosphate metabolism exhibited higher variations than those related to carbon. The entering flux of Pi in the cell ($v(42)$) went from an initial value of 0.02 $mmol \cdot gDW^{-1} \cdot d^{-1}$ to complete exhaustion of the Pi in the culture medium after 10 days, thus a null uptake flux for Pi. However, this exhaustion of Pi in the culture medium will not lead to an immediate limitation in Pi since the intracellular Pi pool can supply the Pi-consuming reactions. The biosynthesis of organic phosphates (OP, $v(22)$) decreased from 2.3×10^{-3} $mmol \cdot gDW^{-1} \cdot d^{-1}$ at the beginning of the experiment to 5.8×10^{-4} $mmol \cdot gDW^{-1} \cdot d^{-1}$ at the end. This 75% decrease is attributed to a less energetic state and a lower level in cellular Pi, which affect the regulation in $v(22)$ (see Table 5-2). The global fluxes for Pi consumption or release by the primary metabolism are very high compared to the other simulated fluxes. At the beginning of the batch culture (Figure 5.3a), $v(45)$ and $v(46)$ are both more than 2 times higher than the third highest flux, $v(39)$. Since the intracellular concentration in Pi decreases over time, most of the reactions using Pi slow down. Thus, the influx of Pi to metabolism ($v(45)$) exhibits a decrease of 35% compared to its initial value. The release of Pi by the central metabolism exhibits the same behaviour. The fluxes $v(45)$ and $v(46)$ are also two to

three orders of magnitude higher than the net influx of Pi to metabolism (v(45) - v(46)). Thus, a high 'turnover' rate of Pi is observed. This turnover rate could be an interesting physiological indicator of the cellular activity or cell potential for growth or biomolecules production. However, it is hard to confirm this hypothesis comparing to literature results since most of the works on the turnover of phosphate are focussing on the turnover rate of one key enzyme or one phosphated molecule. Alonso et al. (2005) observed a glucose-P-to-glucose turnover in maize root tips. This cycle showed to consume 40% of the generated ATP and was affected by carbohydrate starvation. The respiratory chain (v(41)) shows a continuous decrease from an initial rate of 0.397 $mmol \cdot gDW^{-1} \cdot d^{-1}$ to 0.118 $mmol \cdot gDW^{-1} \cdot d^{-1}$. This 70% decrease is due to the decreasing level of Pi and roughly corresponds to the 75% decrease observed for the biosynthesis of OP. The global modelling approach thus shows how a nutrient could limit more than one pathway at a time. Here Pi seems to be affecting the respiratory chain and reactions of the central carbon metabolism.

Nitrogen metabolism

The extracellular nitrogen source (NO3), like the phosphate source, was depleted during the culture time period. Thus, the entering flux of NO3 in the cells falls to zero at the end of the culture from an initial value of 0.072 $mmol \cdot gDW^{-1} \cdot d^{-1}$. This triggers a decrease in the intracellular nitrate pool, and subsequently in the intracellular ammonium pool (Figure 5.4). The fluxes connected to these pools (v(10) and v(36)) decreased by a 75% at the end of the simulation. However, this occurs only after 35 days (Figure 5.4a), when the growth rate is already decreasing. The decrease in growth rate

and in many fluxes is then not directly related to a nitrogen limitation. Amino acids were still present at a relatively high level at the end of the culture (Figure 5.4b), even though the rate of production decreased. Thus, it is more likely that the medium used in these experiments limited the cells in Pi. However, the fluxes related to nitrogen also exhibited a decrease after 35 days of culture, so a limitation could occur for that nutrient as well.

5.8 CONCLUSION

A comprehensive dynamic metabolic model was presented. The model describes the major pathways of plant cell primary metabolism. The strategy used to solve the metabolic system involves the description of the kinetics of each enzymatic reaction. Multiple Michaelis-Menten type kinetics, in conjunction with sigmoid switch functions, allows describing the dynamic behaviour of the metabolic system subject to diverse regulatory phenomena. In order to better analyze the simulation results, a visualization framework including both the fluxes and metabolite levels was presented. It was observed that the central carbon metabolism had relatively high and stable fluxes, while most of the anabolic pathways had small and variable fluxes. The nitrogen metabolism exhibited considerable variations in the fluxes, but the amino acids pool was still at a high level at the end of the culture. However, it was observed that phosphate and phosphate-related pathways play a crucial role on cell behaviour. Reactions from the glycolysis, respiration, and energy metabolism were probably affected by a Pi limitation. Moreover, it was observed that the intracellular Pi is subject to a 'turnover' rate that is two to three orders of magnitude higher than the actual Pi consumed by the primary

metabolism reactions. This turnover of Pi decreased in conjunction with a decrease in intracellular Pi. A decrease in specific growth rate also occurred in conjunction with the Pi decrease. Thus, it is seen that Pi is a crucial element in explaining plant cell behaviour, not only in terms of the growth rate but also by considering metabolic processes such as glycolysis, respiration etc. The dynamic approach thus shows useful in identifying important dynamic phenomena that explain plant cell behaviour. It is clear that this model can be improved with further analyses (metabolites levels, enzymatic and compartment analyses) and experiments that are specifically designed for parameters identification such as perturbations and step-response experiments. This procedure could certainly improve the reliability of the parameters and the predictive capacity of the model. Moreover, the metabolic model presented in this work could be used in conjunction with proper analytical methods (measurement of metabolites concentrations, enzymatic activity, gene expression) to integrate knowledge on plant cell metabolism. A reliable dynamic model could also be used to identify potential targets for metabolic engineering or to develop efficient culture strategies.

5.9 REFERENCES

Affourtit, C., Krab, K., Moore, A. L., 2001. Control of plant mitochondrial respiration. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics 1504, 58-69.

Alonso, A. P., Vigeolas, H., Raymond, P., Rolin, D., Dieuaide-Noubhani, M., 2005. A new substrate cycle in plants. Evidence for a high glucose-phosphate-to-glucose turnover from in vivo steady-state and pulse-labeling experiments with [^{13}C]glucose and [^{14}C]glucose. Plant Physiology 138, 2220-2232.

Boatright, J., Negre, F., Chen, X., Kish, C. M., Wood, B., Peel, G., Orlova, I., Gang, D., Rhodes, D., Dudareva, N., 2004. Understanding in vivo benzenoid metabolism in petunia petal tissue. Plant Physiology 135, 1993-2011.

Chassagnole, C., Noisommit-Rizzi, N., Schmid, J. W., Mauch, K., Reuss, M., 2002. Dynamic modeling of the central carbon metabolism of Escherichia coli. Biotechnology and Bioengineering 79, 53-73.

Delmer, D. P., Haigler, C. H., 2002. The Regulation of Metabolic Flux to Cellulose, a Major Sink for Carbon in Plants. Metabolic Engineering 4, 22-28.

Dieuaide-Noubhani, M., Raffard, G., Canioni, P., Pradet, A., Raymond, P., 1995. Quantification of compartmented metabolic fluxes in maize root tips using isotope distribution from ^{13}C- or ^{14}C-labeled glucose. The Journal of Biological Chemistry 270, 13147-13159.

Farquhar, G. D., von Caemmerer, S., Berry, J. A., 2001. Models of Photosynthesis. Plant Physiology 125, 42-45.

Fridlyand, L. E., Scheibe, R., 1999. Regulation of the Calvin cycle for CO2 fixation as an example for general control mechanisms in metabolic cycles. Biosystems 51, 79-93.

Henry, O., Perrier, M., Kamen, A., 2005. Metabolic flux analysis of HEK-293 cells in perfusion cultures for the production of adenoviral vectors. Metabolic Engineering 7, 467-476.

Lamboursain, L., Jolicoeur, M., 2005. Critical influence of Eschscholzia californica cells nutritional state on secondary metabolite production. Biotechnology and Bioengineering 91, 827-837.

Leduc, M., Tikhomiroff, C., Cloutier, M., Perrier, M., Jolicoeur, M., 2006. Development of a kinetic metabolic model: Application to Catharanthus roseus hairy root. Bioprocess and Biosystems Engineering 28, 295-313.

Lin, J., Takagi, M., Qu, Y., Gao, P., Yoshida, T., 1999. Metabolic flux change in hybridoma cells under high osmotic pressure. Journal of Bioscience and Bioengineering 87, 255-257.

Plaxton, W. C., 1998. Metabolic aspects of phosphate starvation in plants. In: Lynch, J. p., Deikman, J. (Eds.), Phosphorus in Plant Biology: regulatory roles in molecular, cellular, organismic, and ecosystem processes. American Society of Plant Physiologists, 229-241.

Poolman, M. G., Fell, D. A., Thomas, S., 2000. Modelling photosynthesis and its control. Journal of Experimental Botany 51, 319-328.

Ramli, U. S., Baker, D. S., Quant, P. A., Harwood, J. L., 2002. Control analysis of lipid biosynthesis in tissue cultures from oil crops shows that flux control is shared between fatty acid synthesis and lipid assembly. Biochemical Journal 364, 393-401.

Rizzi, M., Baltes, M., Theobald, U., Reuss, M., 1997. In vivo analysis of metabolic dynamics in saccharomyces cerevisiae: II. Mathematical model. Biotechnology and Bioengineering 55, 592-608.

Roessner, U., Wagner, C., Kopka, J., Trethewey, R. N., Willmitzer, L., 2000. Simultaneous analysis of metabolites in potato tuber by gas chromatography-mass spectrometry. Plant Journal 23, 131-142.

Ruan, Y., Gilmore, J., Conner, T., 1998. Towards Arabidopsis genome analysis: Monitoring expression profiles of 1400 genes using cDNA microarrays. Plant Journal 15, 821-833.

Rontein, D., Dieuaide-Noubhani, M., Dufourc, E. J., Raymond, P., Rolin, D., 2002. The metabolic architecture of plant cells: Stability of central metabolism and flexibility of anabolic pathways during the growth cycle of tomato cells. Journal of Biological Chemistry 277, 43948-43960.

Roscher, A., Kruger, N. J., Ratcliffe, R. G., 2000. Strategies for metabolic flux analysis in plants using isotope labelling. Journal of Biotechnology 77, 81-102.

Thomas, S., Mooney, P. J., Burrell, M. M., Fell, D. A., 1997. Metabolic Control Analysis of glycolysis in tuber tissue of potato (Solanum tuberosum): explanation for the low control coefficient of phosphofructokinase over respiratory flux. Biochemical Journal 322, 119-127.

Varner, J., Ramkrishna, D., 1999. Mathematical models of metabolic pathways. Current Opinion in Biotechnology 10, 146-150.

Wong, H.-K., Chan, H.-K., Coruzzi, G. M., Lam, H.-M., 2004. Correlation of ASN2 Gene Expression with Ammonium Metabolism in Arabidopsis. Plant Physiology 134, 332-338.

5.10 MATÉRIEL SUPPLÉMENTAIRE

Un clip vidéo de la visualisation est disponible en annexe électronique de cette thèse (CD-ROM). Le clip est situé dans le dossier '\chapitre 5'.

Ce clip de 25 secondes présente la résolution complète (dans le temps) du modèle dynamique qui a été utilisé pour produire les Figure 5.2 et 5.3. Les unités des flux sont en $mmol \bullet gDW^{-1} \bullet d^{-1}$. Les flux sont mis à jour à chaque seconde, ce qui équivaut à 2 jours de temps de culture.

CHAPITRE 6 : KINETIC METABOLIC MODELLING FOR THE CONTROL OF PLANT CELLS CYTOPLASMIC PHOSPHATE

6.1 Présentation de l'article 'Kinetic metabolic modelling for the control of plant cells cytoplasmic phosphate'

Ce chapitre reprend l'article ***Kinetic metabolic modelling for the control of plant cells cytoplasmic phosphate***. Cet article a été soumis pour publication dans la revue Metabolic Engineering.

Le modèle métabolique dynamique développé au chapitre précédent pour *C. roseus* a été appliqué à des cultures de *E. californica* en flacons agités. La structure du modèle a été légèrement modifiée pour bien décrire le métabolisme de cette espèce végétale. Les voies du métabolisme primaire sont les mêmes pour *E. californica* que pour *C. roseus*. Les voies du métabolisme secondaire sont cependant légèrement différentes, tel que vu à la section 2.2.2 La calibration des paramètres du modèle avec des données provenant de cultures en flacons de *E. californica* a permis de bien décrire les phénomènes observés. Le modèle métabolique proposé dans ces travaux est donc adaptable et applicable à différentes espèces végétales. Des données sur le métabolisme du phosphate ont été obtenues à l'aide d'un mini-bioréacteur permettant des mesures en RMN *in vivo* sur le ^{31}P. Ce mini-bioréacteur permet d'obtenir des données quantitatives sur les pools de Pi, l'ATP, l'ADP et les phosphomonoesters. Des expériences ont été effectuées pour

identifier les dynamiques du métabolisme du phosphate. La réponse des cellules a ainsi été mesurée suite à des variations sur la concentration de Pi dans le débit d'alimentation au bioréacteur. Les équations de régulation des flux ont été adaptées pour bien décrire les phénomènes observés avec les données RMN. Le modèle a finalement été utilisé pour développer une boucle de commande sur le Pi cytoplasmique en utilisant le Pi extracellulaire comme variable manipulée. La boucle de commande a été implanté avec succès, permettant de maintenir le Pi pendant 5 heures à une valeur moyenne 14% inférieure au point de consigne, ce qui est à l'intérieur de l'erreur de mesure de la RMN dans ces conditions. Des variations de l'ordre de 24% étaient toutefois observées durant cette phase, ce qui laisse supposer que le design du contrôleur pourrait être amélioré. L'outil de commande développé lors de ces travaux sera cependant très utile pour de futures études d'ingénierie métabolique sur les cellules végétales.

6.2 KINETIC METABOLIC MODELLING FOR THE CONTROL OF PLANT CELLS CYTOPLASMIC PHOSPHATE

Mathieu Cloutier, Jingkui Chen, Frithjof Tagte, Virginie McMurray-Beaulieu, Michel Perrier, Mario Jolicoeur*

Canada Research Chair on the Development of Metabolic Engineering Tools, Bio-P2 research unit, Department of Chemical Engineering, École Polytechnique de Montreal, P.O. Box 6079, Station Centre-ville, Montreal, Quebec, Canada, H3C 3A7

***Corresponding Author**

Mario Jolicoeur, P.Eng., Ph.D.

Professor

Tel: 514-340-4711 ext. 4525

Fax: 514-340-4159

E-mail: mario.jolicoeur@polymtl.ca

6.3 ABSTRACT

A dynamic model for the primary metabolism and metabolic regulation of an *Eschscholtzia californica* suspension is presented. The model describes glycolysis, pentose phosphate pathways, TCA cycle and anabolic pathways. The energy shuttles (ATP, ADP) and cofactors (NAD/H, NADP/H) balances are included. The model also describes major nutrients (sugars, phosphate, nitrate and ammonium) uptake and accumulation. Metabolic flux regulation is described by Michaelis-Menten kinetics and sigmoid switch functions on the cells metabolites and cofactor levels. Experimental data from batch flask cultures was used to calibrate the model parameters for the slow dynamics (growth, nutrition, anabolic pathways etc.). Perturbation experiments were performed using a perfusion small-scale bioreactor monitored by *in vivo* ^{31}P NMR. Parameters identification for phosphate (Pi) metabolism was done by measuring the cells dynamic response to different inputs for extracellular Pi (two pulse-response experiments and a step-response experiment). The calibrated model can describe Pi translocation between the cellular pools (vacuole and cytoplasm). The effect of intracellular Pi management on ATP/ADP and phosphomonoesters concentrations is also described by the model. The calibrated model is then used to develop a control strategy on the cytoplasmic Pi pool. This strategy was implemented and experimental results were in accordance with model predictions. Thus, the calibrated model is able to predict cellular behaviour for phosphate management and it was demonstrated that it is possible to control the intracellular level of cytoplasmic Pi in plant cells.

6.3 KEYWORDS

Dynamic Metabolic Modelling, in vivo NMR, Phosphate Metabolism, Plant Cell Culture

6.4 INTRODUCTION

Plant cells metabolism possesses unique properties that can hinder the technological and commercial success of a bioprocess for secondary metabolites or recombinant protein production. One of these features is the capacity to accumulate high levels of intracellular nutrients, which can affect the cells secondary metabolites production potential, as reported by Lamboursain and Jolicoeur (2005). Low productivity, sensitivity to medium composition (DiCosmo and Misawa, 1995) and sensitivity to subculture cycles (Rijhwhani and Shanks, 1998) are also reported. Metabolic engineering provides methods such as metabolic flux analysis (MFA) and metabolic control analysis (MCA) to improve the catalytic properties of cells through a better understanding of its metabolic features. Even though the methods of metabolic engineering are now applied to plant cells (Rontein et al., 2002; Hughes et al., 2004; Sriram and Shanks, 2004; Ratcliffe and Shachar-Hill, 2006) many challenges are still encountered because of the limited quantitative data on the specific dynamics and regulation of plant cells metabolism. Since plant cells intracellular nutrients levels affect cellular behaviour (growth and production potential), the modulation or control of these nutrients levels could be involved in a strategy to improve productivity or reduce variability in production potential over the time course of a culture. In that case, a kinetic model is necessary in order to correctly assess the dynamics of the system. A descriptive kinetic model for metabolism with predictive capacity could be useful when improving the design and operation of bioprocesses. Understanding and modelling plant cell metabolism is challenging. There is regulation for the different cycles of carbon

integration, which offer flexibility during growth (Rontein et al. 2002), and there is also regulation for inorganic phosphate (Pi) management under Pi limitation (Plaxton, 1998), which allows plant cells to optimize their use of Pi. The intracellular nutrients are known to be involved in the regulation of plant cells metabolism. Intracellular Pi plays a central role in the regulation of enzymes activity through reversible phosphorylation processes. Many enzymes in plant glycolysis are regulated by this process, among which are pyruvate kinase, phosphoenolpyruvate carboxikinase and sucrose phosphate synthase (Huber et al., 1994). Intracellular Pi may also affect energetic shuttles concentrations and equilibrium (ATP/ADP) since it is directly involved in the conversion of ADP to ATP. Intracellular nitrate and ammonium are known to affect amino acid production. Moreover, it has been reported that the level of ammonium in plant cells can affect gene expression (Wong *et al.*, 2004). Therefore, plant cells metabolism and its regulation by metabolites and intracellular nutrients pools is a complex issue and has to be addressed properly. A model for plant cells and hairy roots nutrition was presented in Cloutier et al. (2007b). This model allowed describing the intracellular management of the three major constitutive nutrients (Pi, sugars and nitrogen). In that work, the description of the growth and nutritional dynamics was performed with a common modelling basis for plant cells and hairy roots of different species. Thus, it is possible that a similar dynamic modelling approach for metabolism can be generalized and applied to different species. This approach should include the description of nutrients pools management as well as the role of metabolite levels in metabolic control. Control of plant primary metabolism by metabolites concentrations is

a subject that is gaining attention recently. Plant metabolomics for primary metabolism was reviewed by Fiehn (2006) and studies on plant metabolomics show that metabolite level can be the controlling element in plant metabolism. Borland et al. (1999) reported that the intracellular malate concentration can control the crassulacean acid metabolism in plants under certain conditions and Carrari et al. (2003) also reported that the regulation of TCA cycle by metabolic intermediates might be significant in plants. Variations in metabolites levels are an issue when performing MFA and MCA. MFA requires a pseudo steady-state hypothesis on the pathways to be analyzed. This can be achieved by a chemostat culture, which is reported in the literature for plant cells (Dougall and Weyraugh, 1980; Balagué and Wilson, 1982; van Gulik *et al.*, 1993). However, this culture can not be easily performed because of the high viscosity and density of plant suspensions. Moreover, even if a steady-state is obtained in terms of growth rate, this would not automatically imply a metabolic or nutritional steady-state. If a nutrient is well above a limiting intracellular level, variations in concentration for that nutrient could occur without affecting the specific growth rate. The compartmentation of metabolic pathways is also a problem when performing steady-state isotope labelling experiments to identify metabolic fluxes (Kruger et al., 2007). Thus, the development and application of descriptive kinetic models for plant cells metabolism could improve our capacity to cope with the aforementioned issues, as reported by Rios-Estepa and Lange (2007). A descriptive model for metabolites and fluxes will also be a powerful tool to integrate metabolomics and fluxes distribution data to other available information on plant cell biology. This data integration will be

necessary for further improvement on plant metabolic engineering, as reported by Jenkins et al. (2004) and Oksman-Caldentey and Saito (2005).

Metabolic modelling for metabolic engineering of plant cell system is gaining attention and was reviewed by Giersch (2000), by Morgan et al. (2002). Applications and development of models for plant metabolism were also discussed by Poolman et al. (2004) and Rios-Estepa and Lange (2007). Models for plant metabolic pathways were also briefly reviewed in Leduc et al. (2006). In order to model plant cell metabolism, a dynamic approach seems to be a prerequisite because of the aforementioned typical plant cell characteristics. A dynamic metabolic model was previously developed to describe *Catharanthus roseus* hairy roots cultures (Leduc et al., 2006). This model included a steady-state hypothesis on the central primary metabolism. The possibility of removing this hypothesis to fully describe the central primary metabolism fluxes and metabolites levels was recently explored in Cloutier et al. (2007). In this work, the dynamic metabolic model will be transposed to *E. californica* suspension with the aim of designing and implementing a control strategy on plant phosphate metabolism.

6.5 DYNAMIC MODELLING FOR CONTROL OF PLANT CELL METABOLISM

The model presented here will thus be applied to batch shake flask cultures of *E. californica*. The model was also used to analyze Pi compartmentation, regulation and metabolism of the same *E. californica* cell line cultivated in a perfusion small-scale

bioreactor monitored by ^{31}P NMR. The ^{31}P NMR experiments yield valuable insight on phosphate and energy metabolism by rapid and quantitative measurement of Pi pools (vacuolar and cytoplasmic) and phosphated metabolites (phosphomonoesters, ATP and ADP) during perturbation experiments. Pi is often the limiting nutrient in plant cultures and has fast uptake and allocation dynamics, as observed by Cloutier et al. (2007) in a simulation of *C. roseus* central primary metabolism. Thus it is believed that the assessment of these dynamic with the appropriate experimental tools is fundamental for the development of an efficient modelling strategy. The use of data on the energetic state of the cells (quantitative ATP and ADP measurements) will allow a precise evaluation of the influence of energy metabolism on the glycolytic fluxes. As reported by Urbanczyk-Wochniak et al. (2003) and Alonso et al. (2005), the energetic management in plant cells might be a significant factor in the control of the glycolysis. The use of data sets from different experiments (shake flask and perfusion minibioreactor) with different timescales (days versus hours) allowed testing the capacity of a dynamic model to describe plant cell behaviour in different experimental conditions. Finally, the most common argument in favour of dynamic modelling is the capacity to predict experimental results and to improve experimental design (or culture strategy in the case of a bioprocess). In this work, the dynamic model was thus used to develop a control loop for the cytoplasmic Pi (CPi) concentration. The implementation of this experimental strategy was simplified by the use of the model as a tool to simulate the system composed of the cells cultivated in the small-scale bioreactor and the control loop.

This manuscript is thus organized as follows. The dynamic metabolic model will be briefly presented, with emphasis on changes that are implemented in the present work. The general control strategy for CPi is then described. The cells cultures and model calibration are presented in the materials and methods. The identification of model parameters and culture dynamics from experimental results is then discussed. This discussion is presented in two parts. First, the shake flask cultures are used to analyze the slow dynamics of the system (growth and stationary phase, macromolecules biosynthesis etc.) and then, the fast dynamics observed from the perfusion small-scale bioreactor experiments (Pi uptake and management, energetic metabolism) are discussed. Finally, the results of control loop tuning and implementation are presented.

6.6 DYNAMIC METABOLIC MODEL FOR PLANT CELLS

The model for *E. californica* suspension (Figure 6.1) is based on the model presented for hairy roots in Cloutier et al. (2007). This fully dynamic model includes 46 reactions and 41 metabolic species. The stoichiometric equations of the 46 described fluxes are presented in Table 6-1 and the kinetic equations for the fluxes regulation are presented in Table 6-2 and 6-3. The kinetic parameters of the model are presented in Tables 6-4 and 6-5 and a summary of the state variables of the system and initial conditions is presented in Table 6-6.

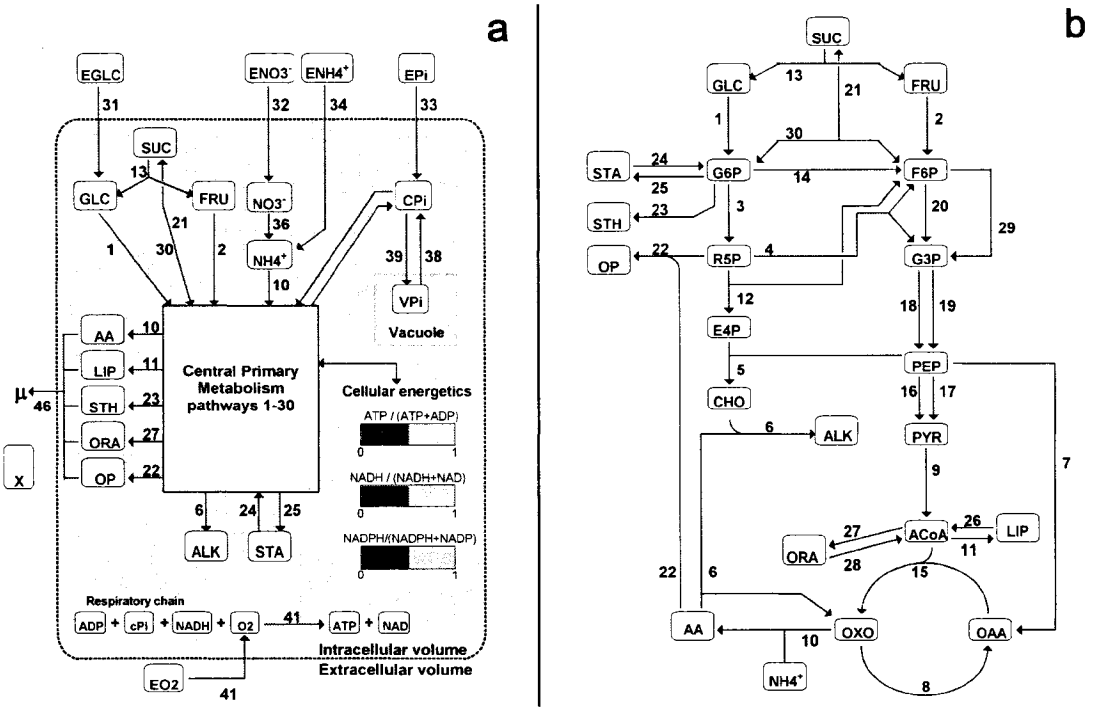


Figure 6.1 Schematic view of the dynamic metabolic model (a) and pathways of the central primary metabolism (b). Numbers correspond to fluxes numbers in Tables 6-1, 6-2 and 6-3.

The model can be described as a set of ordinary differential equation (ODE):

$$\frac{dS}{dt} = M \bullet v - \mu \bullet S \qquad 6.1$$

where S is a vector for the 41 metabolic species concentrations, M is the stoichiometric matrix of the metabolic system (Table 6-1), v is the vector of the fluxes (Table 6-2 and

6-3) and μ is the growth rate (reaction 46 in Table 6-1 and 6-3). Each flux is described by a kinetic equation:

$$v(j) = v_{\max,j} \prod_i \frac{(S_i)^{\alpha_i}}{(K_{m,i})^{\alpha_i} + (S_i)^{\alpha_i}} \bullet f(S_i) \qquad 6.2$$

Where sigmoid switch functions ($f(S_i)$, Equation 6.3) are applied to describe known regulatory phenomena:

$$f(S_i) = \frac{1}{1 + e^{-a(S_i - S_{i,t})}} \qquad 6.3$$

The construction of these kinetic equations was discussed in Leduc et al. (2006) and Cloutier et al. (2007) with extensive description of pathways and regulations. The presentation of the model here will thus be limited to the structural changes that were made to describe the culture conditions and the observed plant cell metabolic behaviour.

Table 6-1 Reactions of the metabolic model

No.	Reaction
1	GLC + ATP → G6P + ADP
2	FRU + ATP → F6P + ADP
3	G6P + 2 NADP → R5P + 2 NADPH + CO2
4	3 R5P → 2 F6P + G3P
5	E4P + 2 PEP + ATP + NADH → CHO + 4 Pi + ADP + NAD
6	CHO + AA + NAD → 0.5 ALK + OXO + NADH + CO2
7	PEP + CO2 → OAA + Pi
8	OXO+2 NAD + ADP + Pi → OAA + 2 NADH + ATP + CO2
9	PYR + NAD → NADH + ACOA + CO2
10	OXO + NH_4 + 3 NADPH + 3 ATP → AA + 3 NADP + 3 ADP + 3 Pi
11	ACOA + ATP + 2 NADPH → LIP + ADP + Pi + 2 NADP
12	2 R5P → F6P + E4P
13	SUC → GLC + FRU
14	G6P → F6P
15	ACOA + OAA + NAD → OXO + NADH + CO2
16	PEP + ADP → PYR + ATP
17	PEP → PYR + Pi
18	G3P + Pi + ADP + NAD → PEP + ATP + NADH
19	G3P + NADP → PEP + NADPH
20	F6P + ATP → 2 G3P + ADP
21	G6P + F6P + 2 NDP → SUC + 2 NTP
22	R5P + 3.75 AA + 7 ATP + 0.25 NAD → 7 ADP + 3.5 Pi + 1.75 PPi + 0.25 NADH + OP
23	G6P + 2 ATP + NADPH → STH + 2 ADP + NADP + Pi + PPi
24	STA + Pi → G6P
25	G6P + ATP → STA + ADP + PPi
26	LIP + 2 ATP + NAD → ACOA + 2 ADP + PPi + NADH
27	ACOA → ORA
28	ORA → ACOA
29	F6P + PPi → 2 G3P + Pi
30	SUC + PPi → G6P + F6P
31	EGLC + ATP → GLC + ADP + Pi
32	ENO_3 + ATP → NO_3 + ADP + Pi
33	EPi + 2 ATP → 3 Pi + 2 ADP
34	ENH_4 + ATP → NH_4 + ADP + Pi
35	OP → Pi
36	NO_3 + NADH + 3 NADPH → NH_4 + NAD + 3 NADP
37	PPi → 2 Pi
38	VPi → Pi
39	Pi + NTP → 2VPi + NDP
40	ATP → ADP + Pi
41	2.5 ADP + 2.5 Pi + NADH + O2 → 2.5 ATP + NAD
42	ATP → 3 Pi + 5 NH4 + 10/6 Glc
43	3 Pi + 5 NH4 + 10/6 Glc → ATP
44	NADH → NAD
45	GO2 → O2
46	AA + LIP + ORA + STH + OP → X
47	$V_L = V_{L0} - 20 \cdot X$

Table 6-2 Biokinetic equations for metabolic fluxes 1-23

No.	Biokinetic equation
1	$v(1) = v_{max1} \cdot \frac{GLC}{K_{M_{GLC}} + GLC} \cdot \frac{ATP}{K_{M_{ATP}} + ATP} \cdot \left(1 + \frac{1.7}{1 + e^{-50 \cdot (CPi - 0.01)}}\right) \cdot \left(1 - \frac{1}{1 + e^{-200 \cdot (G6P - 0.05)}}\right)$
2	$v(2) = v_{max2} \cdot \frac{FRU}{K_{M_{FRU}} + FRU} \cdot \frac{ATP}{K_{M_{ATP}} + ATP} \cdot \left(1 - \frac{1}{1 + e^{-200 \cdot (F6P - 0.06)}}\right)$
3	$v(3) = v_{max3} \cdot \frac{G6P}{K_{M_{G6P}} + G6P} \cdot \frac{NADP}{K_{M_{NADP}} + NADP} \cdot \frac{1}{1 + e^{-25 \cdot \left(\frac{NADP}{NADP + NADPH} - 0.75\right)}}$
4	$v(4) = v_{max4} \cdot \frac{R5P}{K_{M_{R5P}} + R5P}$
5	$v(5) = v_{max5} \cdot \frac{E4P}{K_{M_{E4P}} + E4P} \cdot \frac{PEP}{K_{M_{PEP}} + PEP} \cdot \frac{ATP}{K_{M_{ATP}} + ATP} \cdot \frac{NADH}{K_{M_{NADH}} + NADH}$
6	$v(6) = v_{max6} \cdot \frac{CHO}{K_{M_{CHO}} + CHO} \cdot \frac{AA}{K_{M_{AA}} + AA} \cdot \frac{NAD}{K_{M_{NAD}} + NAD} \cdot \left(1 - \frac{1}{1 + e^{-200 \cdot (ALK - 0.01)}}\right)$
7	$v(7) = v_{max7} \cdot \frac{PEP}{K_{M_{PEP}} + PEP} \cdot \frac{CO_2}{K_{M_{CO2}} + CO_2} \cdot \left(1 - \frac{1}{1 + e^{-400 \cdot (OAA - 0.02)}}\right)$
8	$v(8) = v_{max8} \cdot \frac{OXO}{K_{M_{OXO}} + OXO} \cdot \frac{NAD}{K_{M_{NAD}} + NAD} \cdot \frac{ADP}{K_{M_{ADP}} + ADP} \cdot \frac{Pi}{K_{M_{Pi}} + Pi}$
9	$v(9) = v_{max9} \cdot \frac{PYR}{K_{M_{PYR}} + PYR} \cdot \frac{NAD}{K_{M_{NAD}} + NAD} \cdot \left(1 - \frac{1}{1 + e^{-200 \cdot (ACOA - 0.1)}}\right)$
10	$v(10) = v_{max10} \cdot \frac{OXO}{K_{M_{OXO}} + OXO} \cdot \frac{NH_4}{K_{M_{NH4}} + NH_4} \cdot \frac{NADPH}{K_{M_{NADPH}} + NADPH} \cdot \frac{ATP}{K_{M_{ATP}} + ATP}$
11	$v(11) = v_{max11} \cdot \frac{ACOA}{K_{M_{ACOA}} + ACOA} \cdot \frac{ATP}{K_{M_{ATP}} + ATP} \cdot \frac{NADPH}{K_{M_{NADPH}} + NADPH}$
12	$v(12) = v_{max12} \cdot \frac{R5P}{K_{M_{R5P}} + R5P}$
13	$v(13) = v_{max13} \cdot \frac{SUC}{K_{M_{SUC}} + SUC}$
14	$v(14) = v_{max14} \cdot \frac{G6P}{K_{M_{G6P}} + G6P} \cdot \left(1 - \frac{1}{1 + e^{-200 \cdot (F6P - 0.05)}}\right)$
15	$v(15) = v_{max15} \cdot \frac{ACOA}{K_{M_{ACOA}} + ACOA} \cdot \frac{OAA}{K_{M_{OAA}} + OAA} \cdot \frac{NAD}{K_{M_{NAD}} + NAD}$
16	$v(16) = v_{max16} \cdot \frac{PEP}{K_{M_{PEP}} + PEP} \cdot \frac{ADP}{K_{M_{ADP}} + ADP}$
17	$v(17) = v_{max17} \cdot \frac{PEP}{K_{M_{PEP}} + PEP} \cdot \left(1 - \frac{1}{1 + e^{-10 \cdot (Pi - 0.05)}}\right)$
18	$v(18) = v_{max18} \cdot \frac{G3P}{K_{M_{G3P}} + G3P} \cdot \frac{Pi}{K_{M_{Pi}} + Pi} \cdot \frac{ADP}{K_{M_{ADP}} + ADP} \cdot \frac{NAD}{K_{M_{NAD}} + NAD}$

Table 6-2 Continued

No.	Biokinetic equation
19	$v(19) = v_{max19} \cdot \frac{G3P}{K_{M_{G3P}} + G3P} \cdot \frac{NADP}{K_{M_{NADP}} + NADP}$
20	$v(20) = v_{max20} \cdot \frac{F6P}{K_{M_{F6P}} + F6P} \cdot \frac{ATP}{K_{M_{ATP}} + ATP}$
21	$v(21) = v_{max21} \cdot \frac{G6P}{K_{M_{G6P}} + G6P} \cdot \frac{F6P}{K_{M_{F6P}} + F6P} \cdot \frac{ADP}{K_{M_{ADP}} + ADP}$
22	$v(22) = v_{max22} \cdot \frac{R5P}{K_{M_{R5P}} + R5P} \cdot \frac{AA}{K_{M_{AA}} + AA} \cdot \frac{ATP}{K_{M_{ATP}} + ATP} \cdot \frac{NAD}{K_{M_{NAD}} + NAD} \cdot \frac{1}{1 + e^{-32.7 \cdot (Pi - 0.0003)}}$
23	$v(23) = v_{max23} \cdot \frac{G6P}{K_{M_{G6P}} + G6P} \cdot \frac{ATP}{K_{M_{ATP}} + ATP} \cdot \frac{NADPH}{K_{M_{NADPH}} + NADPH}$

Table 6-3 Biokinetic equations for metabolic fluxes 24-46

No.	Biokinetic equation
24	$v(24) = v_{max24} \cdot \frac{STA}{K_{M_{STA}} + STA} \cdot \frac{Pi}{K_{M_{Pi}} + Pi} \cdot \left(\frac{1}{1 + e^{-100 \cdot (0.26 - GLC)}} \right)$
25	$v(25) = v_{max25} \cdot \frac{G6P}{K_{M_{G6P}} + G6P} \cdot \frac{ATP}{K_{M_{ATP}} + ATP} \cdot \frac{1}{1 + e^{-150 \cdot (GLC - 0.15)}} \cdot \left(\frac{1}{1 + e^{-200 \cdot (1.7 - STA)}} \right)$
26	$v(26) = v_{max26} \cdot \frac{LIP}{K_{M_{LIP}} + LIP} \cdot \frac{ATP}{K_{M_{ATP}} + ATP} \cdot \frac{NAD}{K_{M_{NAD}} + NAD} \cdot \left(\frac{1}{1 + e^{-10 \cdot (0.01 - NADH)}} \right)$
27	$v(27) = v_{max27} \cdot \frac{ACOA}{K_{M_{ACOA}} + ACOA}$
28	$v(28) = v_{max28} \cdot \frac{ORA}{K_{M_{ORA}} + ORA} \cdot \left(1 - \frac{1}{1 + e^{-10 \cdot (NADH - 0.01)}} \right)$
29	$v(29) = v_{max29} \cdot \frac{F6P}{K_{M_{F6P}} + F6P} \cdot \frac{PPi}{K_{M_{PPi}} + PPi} \cdot \left(1 - \frac{1}{1 + e^{-10 \cdot (Pi - 0.1)}} \right)$
30	$v(30) = v_{max30} \cdot \frac{SUC}{K_{M_{SUC}} + SUC} \cdot \frac{PPi}{K_{M_{PPi}} + PPi}$
31	$v(31) = v_{max31} \cdot \frac{EGLC}{K_{M_{EGLC}} + EGLC} \cdot \frac{ATP}{K_{M_{ATP}} + ATP}$
32	$v(32) = \left[v_{max32,LA} \cdot \frac{ENO_3}{K_{M,LA_{ENO3}} + ENO_3} + v_{max32,HA} \cdot \frac{ENO_3}{K_{M,HA_{ENO3}} + ENO_3} \right] \cdot \frac{ATP}{K_{M_{ATP}} + ATP}$
33	$v(33) = \left[v_{max33,LA} \cdot \frac{EPi}{K_{M,LA_{EPi}} + EPi} + v_{max33,HA} \cdot \frac{EPi}{K_{M,HA_{EPi}} + EPi} \right] \cdot \frac{ATP}{K_{M_{ATP}} + ATP}$

Table 6-3 Continued

No.	Biokinetic equation
34	$v(34) = \left[v_{\max 34,LA} \cdot \frac{ENH_4}{K_{M,LA_{ENH4}} + ENH_4} + v_{\max 34,HA} \cdot \frac{ENH_4}{K_{M,HA_{ENH4}} + ENH_4} \right] \cdot \frac{ATP}{K_{M_{ATP}} + ATP}$
35	$v(35) = v_{\max 35} \cdot \frac{OP^4}{K_{M_{OP}}{}^4 + OP^4} \cdot \left(1 - \frac{1}{1 + e^{-15 \cdot (Pi - 0.045)}} \right)$
36	$v(36) = v_{\max 36} \cdot \frac{NO_3{}^2}{K_{M_{NO3}}{}^2 + NO_3{}^2} \cdot \frac{NADH}{K_{M_{NADH}} + NADH} \cdot \frac{NADPH}{K_{M_{NADPH}} + NADPH}$
37	$v(37) = v_{\max 37} \cdot \frac{PPi}{K_{M_{PPi}} + PPi}$
38	$v(38) = v_{\max 38} \cdot \frac{VPi}{K_{M_{VPi}} + VPi} \cdot \left(1 - \frac{1}{1 + e^{-15 \cdot (CPi - 0.025)}} \right)$
39	$v(39) = v_{\max 39} \cdot \frac{CPi}{K_{M_{Pi}} + CPi} \cdot \left(\frac{1}{1 + e^{-100 \cdot (CPi - CPi,threshold)}} \right)$ with: $CPi,threshold = 0.019 + \left(\frac{0.051}{1 + e^{-90 \cdot (EPi - 0.025)}} \right)$
40	$v(40) = v_{\max 40} \cdot \frac{ATP}{K_{M_{ATP}} + ATP}$
41	$v(41) = v_{\max 41} \cdot \frac{NADH}{K_{M_{NADH}} + NADH} \cdot \frac{ADP}{K_{M_{ADP}} + ADP} \cdot \frac{CPi^2}{K_{M_{CPi}}{}^2 + CPi^2} \cdot \frac{O_2}{K_{M_{O2}} + O_2}$
42	$v(42) = v_{\max 42} \cdot \frac{ATP}{K_{M_{ATP}} + ATP} \cdot \left(\frac{1}{1 + e^{-200 \cdot (ATP + ADP - 0.01)}} \right)$
43	$v(43) = v_{\max 43} \cdot \frac{CPi}{K_{M_{CPi}} + CPi} \cdot \frac{NH_4}{K_{M_{NH4}} + NH_4} \cdot \frac{GLC}{K_{M_{GLC}} + GLC} \cdot \left(\frac{1}{1 + e^{-250 \cdot (0.01 - ATP + ADP)}} \right) \cdot \left(\frac{1}{1 + e^{-250 \cdot (0.03 - CPi)}} \right)$
44	$v(44) = v_{\max 44} \cdot \frac{NADH}{K_{M_{NADH}} + NADH} \cdot \frac{1}{1 + e^{-200 \cdot \left(\frac{NADH}{NAD + NADH} - 0.6 \right)}}$
45	$v(45) = k_L a \cdot (O2_{sat} - O2)$
46	$v(46) = v_{\max 46} \cdot X \cdot \frac{AA}{K_{M_{AA}} + AA} \cdot \frac{LIP^{1.25}}{K_{M_{LIP}}{}^{1.25} + LIP^{1.25}} \cdot \frac{ORA}{K_{M_{ORA}} + ORA} \cdot \frac{OP^4}{K_{M_{OP}}{}^4 + OP^4} \cdot \frac{ATP}{K_{M_{ATP}} + ATP}$

Table 6-4 Maximum reaction rates (V_{max})

Reaction	Current value	Units
1	3.3248	$mmol \cdot gDW^{-1} \cdot d^{-1}$
2	0.0015	"
3	2.0340	"
4	0.2045	"
5	3.5581	"
6	0.2895	"
7	0.6834	"
8	38.819	"
9	54.620	"
10	20.021	"
11	0.3029	"
12	0.0894	"
13	0.0507	"
14	3.0136	"
15	55.150	"
16	6.8021	"
17	6.3784	"
18	66.783	"
19	39.778	"
20	6.5032	"
21	0.1505	"
22	0.6500	"
23	0.5478	"
24	1.6703	"
25	0.1106	"
26	0.0080	"
27	0.1562	"
28	0.0050	"
29	0.7640	"
30	0.2512	"
31	2.2401	"
32_LA	1.8650	"
32_HA	0.0275	"
33_LA	4.7311	"
33_HA	0.0754	"
34_LA	7.8209	"
34_HA	0.2520	"
35	0.0161	"
36	2.8100	"
37	1.4527	"
38	0.0426	"
39	0.9045	"
40	5.6776	"
41	48.972	"
42	0.1522	"
43	2.5736	"
44	4.4198	"
45 (k_La)	65.589	d^{-1}
46 (μ)	0.3644	d^{-1}

Table 6-5 Affinity constants (K_m)

Component	Value	Units
AA	0.014693	$mmol \cdot gDW^{-1}$
FRU	0.4551	"
CO2	0.000125	"
GLC	0. 4572	"
LIP	0.0025438	"
NAD	0.00027308	"
NADH	0.00032242	"
NADP	0.00025	"
NADPH	0.00017	"
ADP	0.0017316	"
NH4	0.032279	"
ATP	1.7071 e-5	"
ORA	0.021	"
VPi	0.0035236	"
CPi	0.00217	"
Pi	0.00217	"
PPi	0.12686	"
SUC	0.413	"
STA	0.941	"
STH	0.125	"
OP	0.029064	"
G6P	0.00475	"
F6P	0.00475	"
G3P	0.0095	"
E4P	0.0095	"
R5P	0.00475	"
CHO	0.0095	"
PYR	0.0095	"
PEP	0.0095	"
ACOA	0.002375	"
OAA	0.00475	"
OXO	0.00475	"
O2	0.00289	"
NO3	0.0157	"
EGLC	11.12	mM
ENO3_HA	0.0157	"
ENO3_LA	9.8430	"
EPI_HA	0.0017	"
EPI_LA	0.0151	"
ENH4_HA	0.021	"
ENH4_LA	1.975	"
EO2	0.0069	"

Table 6-6 State variables description and initial conditions for shake flask cultures

Component	Description	Value	Units
AA	Amino Acids	0.286	$mmol \cdot gDW^{-1}$
FRU	Fructose	0.025	"
CO2	Carbon Dioxide	0.00125	"
GLC	Glucose	0.5	"
ALK	Total alkaloids	0.0004	"
LIP	Lipids	0.404762	"
NAD	Nicotinamide Adenine Dinucleotide (oxidised)	0.0002	"
NADH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide (reduced)	0.0002	"
NADP	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate (oxidised)	0.00009	"
NADPH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate (reduced)	0.00011	"
ADP	Adenosine Diphosphate	0.0058	"
NH4	Ammonium	0.057	"
ATP	Adenosine Triphosphate	0.002709	"
ORA	Organic Acids	0.16	"
CPi	Cytoplasmic Pi	0.03	
VPi	Vacuolar Pi	0.005	
Pi	Intracellular Free Pi (CPi + VPi)	0.0035	"
PPi	Pyrophosphate	0.005	"
SUC	Sucrose	0.01	"
STA	Starch	0.2914	"
STH	Structural Hexoses	0.2944	"
OP	Organic Phosphates	0.0248	"
G6P	Glucose-6-Phosphate	0.00464	"
F6P	Fructose-6-Phosphate	0.00486	"
G3P	Glyceraldehyde-3-Phosphate	0.00475	"
E4P	Erythrose-4-Phosphate	0.00475	"
R5P	Ribulose-5-Phosphate	0.00475	"
CHO	Chorismate	0.00475	"
PYR	Pyruvate	0.00475	"
PEP	Phosphoenolpyruvate	0.00475	"
ACOA	Acetyl-CoenzymeA	0.00475	"
OAA	Oxaloacetate	0.00475	"
OXO	Oxoglutarate	0.00475	"
O2	Oxygen	0.0044	"
NO3	Nitrate	0.0157	"
PME	Phosphomonesters (G6P+F6P)	0.0095	"
EGLC	Glucose (extracellular)	124	mM
ENO3	Nitrate (extracellular)	20.2	"
ENH4	Ammonium (extracellular)	2.02	"
EPi	Phosphate (extracellular)	0.98	"
EO2	Oxygen (extracellular)	0.23	"
L	Liquid medium volume	0.057	L
X	Biomass	0.175	$gDW \cdot Flask^{-1}$

Variation of liquid medium volume

The liquid medium volume ($L \cdot flask^{-1}$) is included in the mass balances of the model (Table 6-1, reaction 47). The cell suspension used in this work has an average water content of 95% (20gFW of cells contains 1gDW of cell mass and 19g of water), thus the cell volume is not negligible and the liquid medium volume is reduced proportionally to cell growth (Table 6-1, reaction 47).

Secondary metabolites production

A pool for secondary metabolites is included in the model, even though the description of secondary metabolites production is not the main concern of this work. For *E. californica*, the only precursor for the benzophenanthridin alkaloids biosynthesis is tyrosine, which is obtained from glutamate (AA, the amino acids pool described by the model) and chorismate (CHO). Two units of tyrosine are necessary to synthesize norcoclaurine, which is then used to produce all the intermediates of the benzophenanthridin alkaloids pathways. Reaction 6 describes this global conversion of AA and CHO to obtain the secondary metabolites pool. Since alkaloids are toxic compounds, a maximum accumulation level is considered for reaction 6 (see Table 6-2).

Pi management, regulation and extracellular Pi sensing

The major change implemented in this work is a more thorough description of Pi storage, metabolism and its effect on pathway regulation. Since *in vivo* ^{31}P NMR data

were available it was possible to develop and calibrate the pathways for vacuolar storage of Pi (VPi, Table 6-1, reactions 38 and 39). The interest of such a compartment description is to enhance the predictive capacity of the model in regard to intracellular Pi management and regulation. Since the glycolytic reactions are affected by Pi management (Plaxton, 1998) a better modelling of cellular Pi pools will enhance the description of Pi regulation in the model. When a high level is reached in the cytoplasm, CPi is transferred to the vacuole (Table 6-3, reaction 39). It can be transferred back in the cytoplasm in case of Pi limitation (Table 6-3, reaction 38). The translocation of Pi from the cytoplasm to the vacuole (Table 6-3, reaction 39) is also regulated by the concentration in the cytoplasm and by the presence of extracellular Pi (EPi). First, there is a threshold concentration in CPi for which the transfer rate to the vacuole is half its maximal value ($CPi_{threshold}$ in reaction 39). When cytoplasmic Pi concentration is higher than the threshold concentration, the transport rate in the vacuole can be activated up to its maximal value. Since higher concentrations in CPi were systematically observed when the cells were submitted to higher EPi concentrations, it is postulated that the presence of EPi is affecting the intracellular management of Pi. Thus, the threshold concentration in CPi for transfer in the vacuole ($CPi_{threshold}$) is increased by the presence of extracellular Pi (see Table 6-3, reaction 39). This regulation allows higher CPi concentrations when cells are submitted to high EPi concentrations. This EPi-sensing hypothesis proved to be highly efficient in enhancing the capacity of the model to describe experimental data (see Results and Discussion). This observation about EPi-sensing needs however to be further investigated.

An increase of phosphomonoesters concentration (PME: G6P and F6P) was also systematically observed at high CPi concentrations during NMR experiments. This increase in PME did not systematically correlate with an increase in ATP level, which is one of the substrates in the formation of G6P (Table 6-1, reaction 1). A simple linear fit of PME versus CPi for the available NMR data had a correlation factor (R^2) of 0.83 while the same fit for PME versus ATP showed a correlation factor of 0.08 (data not shown). A logarithmic correlation was also tested and the correlation factors were slightly improved: R^2 of 0.86 for PME versus CPi and R^2 of 0.13 for PME versus ATP. While it is clear that the biological relationship between these metabolites may neither be linear nor logarithmic, the correlation is obviously stronger between CPi and PME. So, it is assumed that a regulatory phenomenon is taking part in the observed increase in PME. This effect was included in reaction 1 (Table 6-2). This regulation increases the rate of phosphorylation of GLC to G6P when CPi concentration is high. However, this regulation phenomenon is probably indirect because there is no report in the literature of a direct activation of the plant hexokinases at high cytoplasmic Pi concentrations. Maximum accumulation levels were considered for G6P (0.05mmol•gDW^{-1}) and F6P (0.06 mmol•gDW^{-1}) using the sigmoid switch function (Equation 6.3) in reaction 1, 2 and 14 (see Table 6-2).

Energy shuttles

The energy shuttles (ATP, ADP) are included in the stoichiometric equations of the model. In previous works (Leduc et al., 2006; Cloutier et al., 2007) it was assumed that the sum of ATP and ADP was constant over time and the ATP to ADP ratio was changing depending on global cellular energetic balance. However it was observed by ^{31}P NMR that the sum of energy shuttles (ATP+ADP) can vary significantly, even over a short timescale (see Results and Discussion). Thus, reactions for the synthesis (43) and degradation (42) of ATP were included in the model. These reactions are derived from the elementary mass balance of C, N and P from glucose, ammonium and Pi. This simplified reaction for ATP synthesis was chosen so to have a consistent mass balance with metabolites that are already included in the model (GLC, NH4, Pi) and to avoid adding pathways for adenine or ribose synthesis. However, it is clear that other reactions are involved in the observed variations in energetic shuttles concentrations, like the degradation or use of ADP to AMP or other compounds that are not visible to NMR.

6.7 DEVELOPMENT OF A CONTROLLER FOR CYTOPLASMIC PHOSPHATE

Since *in vivo* NMR allows for a fast and on-line measurement of the Pi pools in the cells, it is possible to implement a control strategy on Pi metabolism using the extracellular Pi (EPi) concentration as the manipulated variable. As was observed by Mauch et al. (1997) the intracellular dynamics of a metabolic system can be affected by an adequate perturbation in extracellular concentrations. The possibility of controlling intracellular processes by manipulating extracellular variables was also mentioned in

Stephanopoulos et al. (1998). The manipulated variable used in this work (EPi) is easily manipulated since the NMR minibioreactor is operated in perfusion mode. CPi was chosen as the controlled variable in this work since it is the first storage pool for Pi and it is involved in the regulation of many reactions of the primary metabolism of plant cells that occur in the cytoplasm. The possibility of controlling the CPi concentration in plant cells could lead to significant advances in the elucidation of many regulatory phenomena. An operating strategy that can provide stable intracellular Pi concentration even in the presence of perturbations (gene induction, secondary metabolism induction, nutritional perturbation) could improve our understanding of metabolic regulation in plant cells.

The controller designed for this work is a proportional-integral (PI) controller with the CPi concentration (mmol CPi•gDW^{-1}) as the controlled variable and the EPi feeding concentration (mMol) as the manipulated variable. This controller was implemented in discrete form with a control action every hour. The discrete form of the controller is written as follow:

$$EPi_n = EPi_{n-1} + K_c \bullet \left[(e_n - e_{n-1}) + \frac{\Delta t}{\tau_i} \bullet e_n \right] \qquad 6.4$$

where EPi_n is the actuated EPi concentration, EPi_{n-1} is the EPi concentration at iteration 'n-1', K_c is the proportional gain of the controller, τ_i is the integral time constant, Δt is

the time between two control actions (1 hour in this case) and e_n and e_{n-1} are the errors (setpoint minus measurement) on CPi at iteration 'n' and 'n-1', respectively. More details on the parameters tuning for this controller are provided in the Results and Discussion.

6.8 MATERIALS AND METHODS

Plant cells cultures

Cultures were performed in 125 mL shake flasks on an orbital shaker at 120 RPM using a B5 medium (Gamborg et al., 1968) supplemented with 3% glucose, 0.1mg•L^{-1} kinetin and 0.2mg•L^{-1} 2-4-D. The flasks, containing 40 mL of sterile medium, were inoculated with 20 g of a 10 days old suspension. Sampling was performed every day with whole flasks taken as samples (n = 3). Biomass concentration (gDW•L^{-1} and gFW•L^{-1}) was measured as described in Lamboursain and Jolicoeur (2005). The dry weight was used as a direct measure of biomass (gDW•$flask^{-1}$) and to estimate specific growth rate (d^{-1}). The fresh weight was used to estimate liquid medium volume remaining in the flask (L•$flask^{-1}$). After sampling 10 mL for biomass measurement, the remaining suspension was processed for freezing and freeze-drying and further analysis as described in Lamboursain et Jolicoeur (2005). Dissolved oxygen measurements were performed (before removing the flask from the shaker) using a polarographic probe (Mettler-Toledo, InPro 6800).

Analytical

Analysis of intracellular and extracellular ions (PO_4^-, NO_3^- and NH_4^+) was done by HPLC as previously described (Cloutier et al., 2007b; Lamboursain and Jolicoeur, 2005). Extracellular glucose was analyzed using the enzymatic glucose infinity reagent (Sigma-Aldrich). Intracellular soluble glucose was measured by extracting 15 mg of freeze-dried cells three times with 0.5 mL of 80% EtOH followed by centrifugation for 5 minutes at 10 000g. The supernatants from the three successive extractions were pooled and analyzed for glucose concentration using the glucose infinity reagent. The pellet from glucose extraction was kept for starch analysis. Starch was extracted and measured as described in Leduc et al. (2006). Total lipids content was determined by a colorimetric method (Elkahoui et al., 2004). Freeze dried (10 mg) cells were suspended in 1 mL acetone followed by sonication on ice for 20 minutes and centrifugation at 10 000g and 4°C for 10 minutes. The supernatant was treated with 1.5% sulfosalicylic acid (0.1 mL of supernatant in 0.9 mL of sulfosalicylic acid). The mixture was put on an orbital shaker at 300 RPM for 40 minutes and the absorbance of the sample (proportional to lipids concentration) was read at 440nm.

In vivo ^{31}P NMR Spectroscopy

A small-scale (3 mL) perfusion bioreactor (Figure 6.2, adapted from Chen, 2004) was used to perform in vivo ^{31}P NMR spectroscopy. This bioreactor is a modified NMR probe that can contain a cell bed of 1 gFW (approximately 0.05 gDW). The medium is aerated in an external flask and perfused to the NMR probe with a peristaltic pump. The

medium used for perfusion in the minibioreactor is a B5 medium (Gamborg et al., 1968) free of paramagnetic ions and EPi (unless for Pi-feeding, as described further) and supplemented with 3% glucose, 0.1mg•L^{-1} kinetin and 0.2mg•L^{-1} 2-4-D. Deuterated water (D_2O) was added to the medium (10% v/v) to lock the NMR signal. The slight dilution caused by D_2O addition was considered in the modelling of extracellular nutrient concentrations.

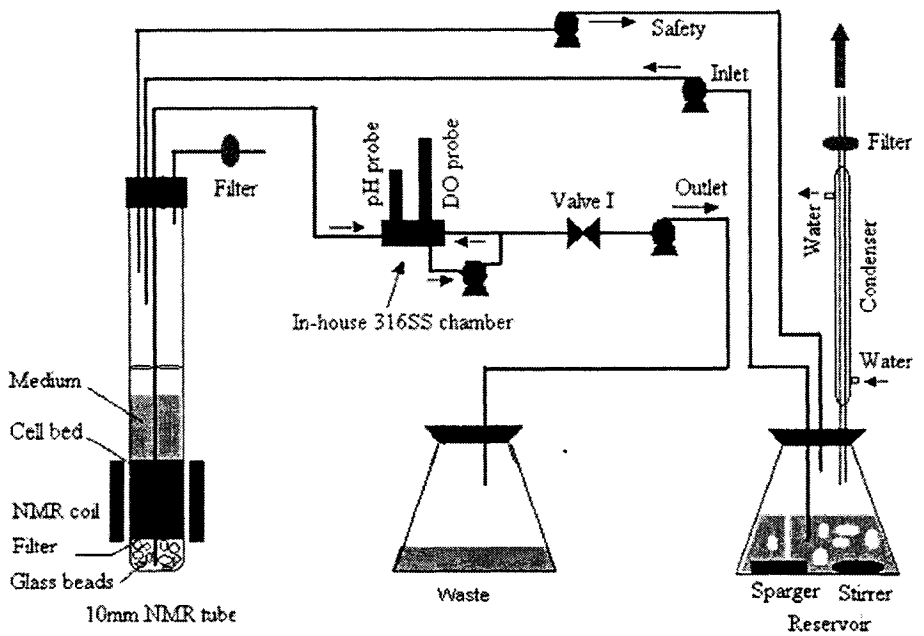


Figure 6.2 NMR perfusion bioreactor and experimental setup.

In all the NMR experiments, 5 days old cells from shake flask cultures were used to inoculate the bioreactor. The cells were allowed to stabilize in the small-scale bioreactor for 1 hour before recording the first spectrum. The perfusion flowrate in the minibioreactor was 1.6 mL•min^{-1}, as determined in Gmati et al., (2005). This flowrate minimizes the time delay caused by circulation in the tubing and allows for a fast

replenishment of medium in the minibioreactor with a residence time in the order of minutes. NMR operating parameters were based on Gmati et al., (2005) and Chen (2004) and allowed for reliable quantification of cytoplasmic and vacuolar Pi, as well as PME (G6P and F6P), ATP and ADP. The NMR experiments were 5 to 7 hours long as compared to a typical doubling time of 2.5 days for *E. californica* cells cultivated in the conditions described in this work. This timescale (5-7 hours) is adequate to study Pi metabolism in plant cells (Bligny and Douce, 2004). The model also showed no significant variations in biomass, macromolecules and carbon sources on that timescale (simulations not shown), suggesting that the main effect, both experimentally and in the simulations, will be due to Pi metabolism. Further details on the experiments performed with the small-scale bioreactor are provided in the Results and Discussion section.

Model simulations and calibration of the kinetic parameters

The model simulations and parameters calibration were performed using the Matlab software as described in Cloutier et al., (2007). The model contains 49 reactions rates, 41 affinity constants and 44 regulation parameters for a total of 134 parameters. Model parameters (Table 6-4 and 6-5) and unknown initial conditions (Table 6-6) were determined by least-squares curve fitting using the lsqcurvefit.m subroutine. Initial estimates for growth and nutrient transport parameters were taken from Cloutier et al. (2007b). Respiration parameters (reaction 41) were first estimated from respirometric data (Lamboursain and Jolicoeur, 2002 and unpublished data). The data set for parameters calibration is composed of 14 measured states variables from flask cultures

(X, EGLC, EPi, ENO3, ENH4, GLC, Pi, NO3, NH4, STA, LIP, O2, growth rate and liquid medium volume) and 5 states variables measured in 3 distinct *in vivo* NMR experiments (CPi, VPi, PME, ATP, ADP) for a total of 322 data points (182 from the flask cultures and 140 from the NMR experiments). The calibration with NMR data was done in parallel to the model calibration for flask experiments. Thus, a unique set of parameters to describe the four experiments is obtained.

6.9 RESULTS AND DISCUSSION

The model describes the dynamics of plant cells batch cultures

Figure 6.3 presents the comparison between simulated metabolites profiles and experimental data points for a shake flask culture. The overall performance of the model at describing available data in batch cultures is similar to what was obtained for *C. roseus* hairy roots cultivated in Petri dishes (Cloutier et al., 2007). This observation suggests that the proposed modelling basis for metabolism can be easily adapted to different plant species, as was observed in Cloutier et al. (2007b) for dynamic nutritional modelling. The description of cell growth and nutrition is in accordance with the data, with only minor discrepancy in the management of intracellular sugars and starch.

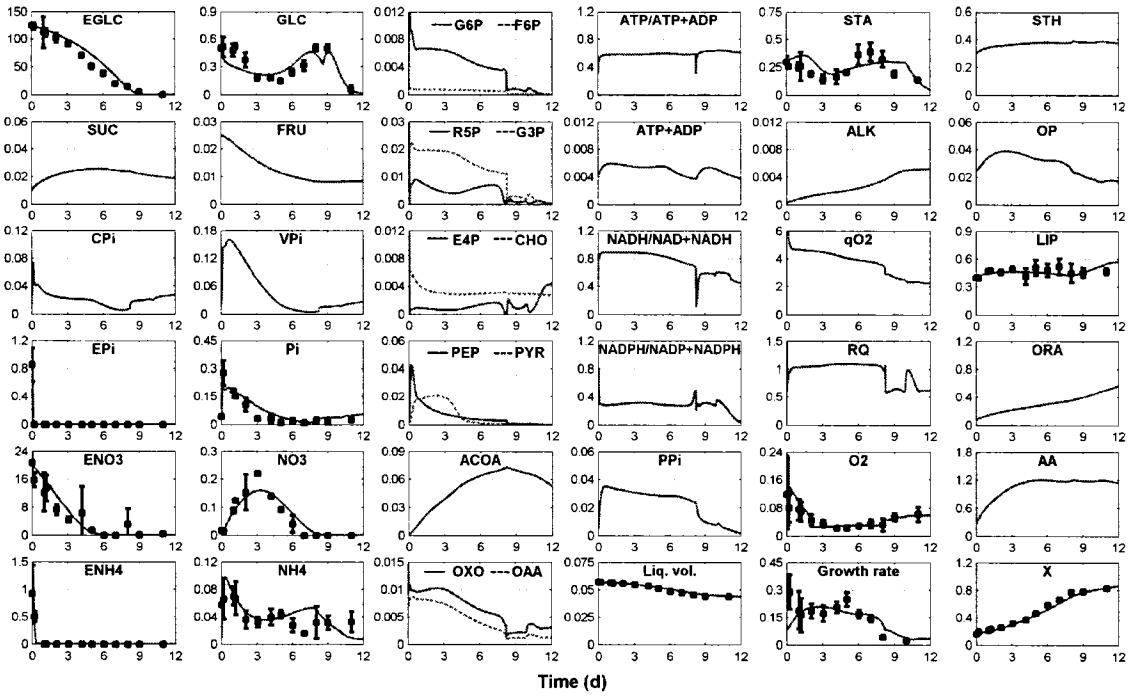


Figure 6.3 Simulated metabolites profiles and experimental data for a batch culture of *E. californica*. Axis units are mmol•gDW^{-1} except for X (gDW•Flask^{-1}), growth rate (d^{-1}) extracellular nutrients EGLC, EFRU, ESUC, EPi, ENO3, O2 (mM), Liquid volume (L•Flask^{-1}), qO2 (mmol•gDW^{-1}•j^{-1}), energetic ratios and RQ (dimensionless). Error bars represents the standard deviation (n = 3).

The respiratory quotient (RQ), an important physiological parameter, was estimated from the model simulation using the global CO2 production by the cells: qCO2 = $v(3)$ + $v(8)$ + $v(9)$ + $v(15)$ + $v(6)$ - $v(7)$ and the respiration rate: qO2 = $v(41)$. The simulated qCO2 to qO2 ratio, the RQ, is thus presented in Figure 6.3. During the growth phase, this ratio was constant and near unity, which is expected for glycolytic metabolism. After 8 days of culture, the simulated RQ went down from 1. This corresponds to the

beginning of the stationary phase and to a clear change in metabolic behaviour, because the extracellular GLC is depleted and the growth rate is limited by a low level in nucleotides (OP, Figure 6.3). However, it remains to be confirmed experimentally that the RQ for *E. californica* cells could decrease in these conditions. It is interesting to note that the integrative modelling approach proposed here can predict realistic behaviour for the complete culture duration, in that case: ≈2 cells doubling plus a clear stationary phase.

Model describes the fast dynamics of phosphate metabolism

Three perturbations experiments were performed and monitored using the NMR small-scale bioreactor. In a first experiment, a 1 hour pulse at 220 μM EPi was performed with NMR spectra integrated every 30 minutes (Figure 6.4). In a second pulse-response experiment, 88 μM EPi was applied for 2 hours with NMR spectra recorded every hour (Figure 6.5). These experimental conditions respectively represent ~25% and ~10% of the normal EPi concentration of B5 medium (1 mM). The actual values for EPi are actually a little bit lower in that case because of the addition of 10% D_2O in the medium (see Materials and Methods). A step-response experiment was also performed (Figure 6.6). The cells were monitored in the NMR small-scale bioreactor for 1.75 hours without EPi and then, a 20 μM EPi concentration was applied for 4 hours with NMR spectra recorded every 30 minutes. This lower concentration was chosen to avoid high accumulation of Pi in the cells and possible Pi efflux (Raghothama, 1999; Bieleski, 1973). The EPi concentrations assayed in these experiments are all higher than the K_m values reported in the literature for high affinity transport of Pi (0.5-8 μM), as reviewed

in Leduc et al. (2006). Thus, the dynamics of the small-scale bioreactor (i.e. the cells Pi consumption rate) will be driven by the dynamics of low-affinity Pi transporters and not by inducible high affinity Pi transporters. The PME measured by NMR includes the G6P and F6P pools and thus the simulated PME presented in Figures 6.3 to 6.7 is the sum of these two metabolites obtained from the model simulations.

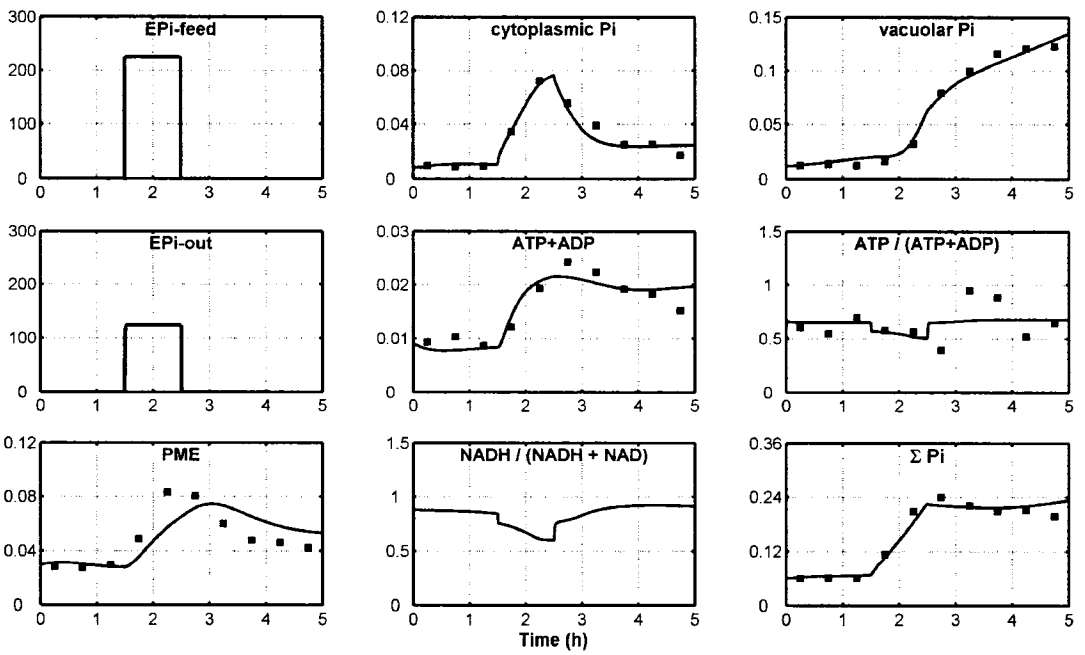


Figure 6.4 Simulated metabolites profiles and experimental NMR data for a pulse response experiment. 220 μM extracellular Pi applied from 1.5h to 2.5h with data points recorded every 30 minutes. Axis units are mmol•gDW^{-1} except for EPi-feed (μM), EPi-out (μM) and energetic ratios (dimensionless). Σ Pi represents the sum of simulated and experimental values for cytoplasmic Pi, vacuolar Pi, PME (G6P and F6P), ATP and ADP.

The two pulse response experiments (Figure 6.4 and 6.5) show how Pi is first accumulated in the cytoplasm and then used for PME synthesis and the excess is transferred in the vacuole. The CPi pool is decreasing at the end of the two pulses, following a first order dynamic (e.g. an emptying tank). However the level of CPi does not necessarily go back to the stable value observed before the pulse, as is expected of a pure first order system. A slight delay is also observed between the Pi feeding and the intracellular response because of the medium circulation time in the system. In both pulse experiments, the total uptake of Pi quantifiable by NMR (ΣPi the sum of CPi, VPi, PME, ATP and ADP) is described very well by the model. This total Pi concentration increases during the pulse and then stabilizes. The minor variations in total Pi after the pulses (EPi $\approx$ 0) are probably due to Pi being exchanged with pools that are not visible to NMR.

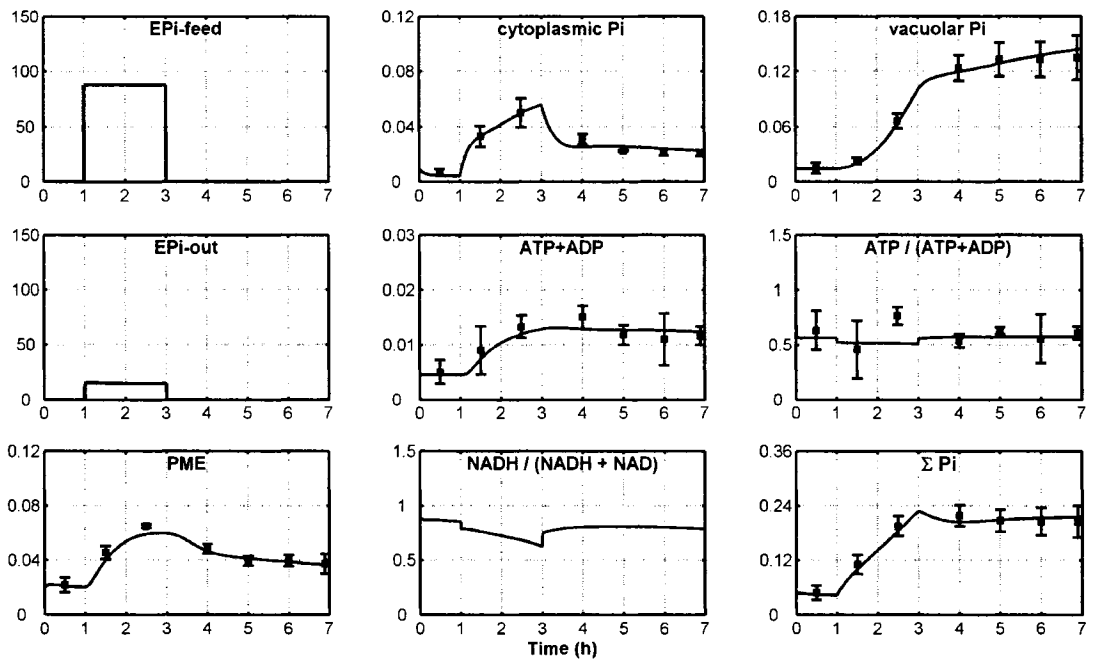


Figure 6.5 Simulated metabolites profiles and experimental NMR data for a pulse response experiment. 88 μM extracellular Pi applied from 1h to 3h with data points recorded every 60 minutes. Axis units are the same as for Figure 4. Error bars represents the standard deviation (n = 3).

The step response experiment (Figure 6.6) also shows that the CPi pool has the dynamic response of a first-order plus time delay (FOPTD) system. The calibrated model was again able to describe the first order dynamic of the CPi pool under these conditions.

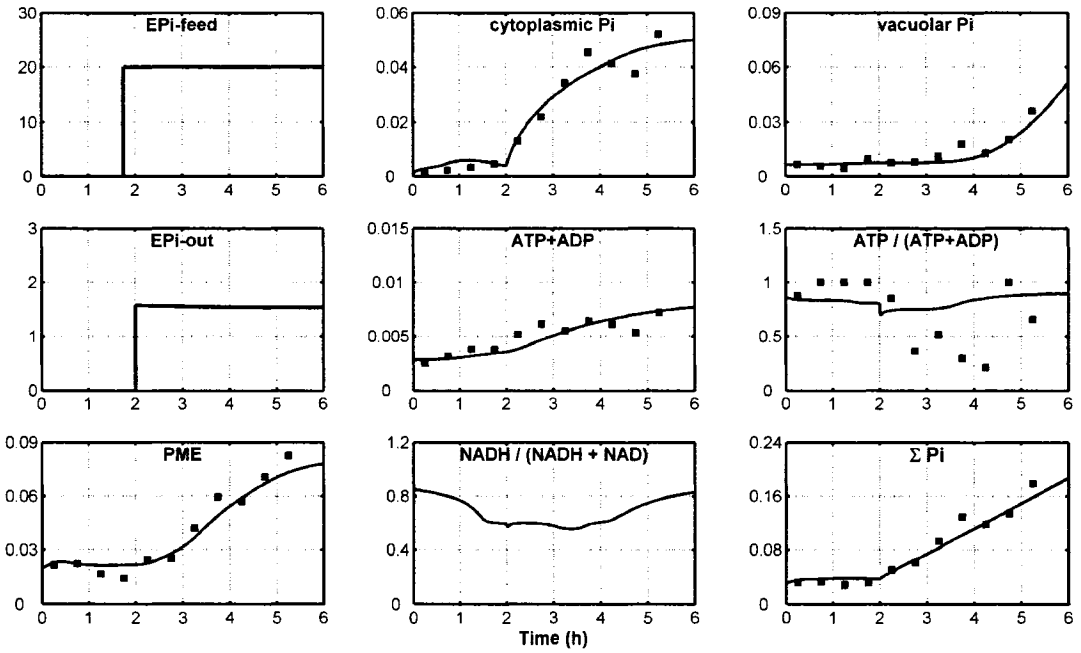


Figure 6.6 Simulated metabolites profiles and experimental NMR data for a step response experiment. 20 μM extracellular Pi applied from 1.75h with data points recorded every 30 minutes. Axis units are the same as for Figure 4.

With the application of a 20 μM EPi concentration, the CPi concentration is stabilized at approximately 0.05 mmolg•DW^{-1} 2 to 3 hours after the beginning of the step, although variations are still observed in the experimental data after 2 hours. However, it is not clear if these observed variations have any biological significance since the NMR reading in these conditions has an expected error of 10 to 15%, mainly because of manual peak integration (Rebeille et al., 1985). The effect of the step in EPi is also observed on the PME pool which increases continuously. The total intracellular Pi during the step response experiment is also simulated accurately by the model.

Using the model to implement the controller for cytoplasmic Pi

The proportional-integral controller proposed in this work (Equations 6.4) has two parameters: the proportional gain (K_c) and the integral time constant (τ_i). There exist various methods to determine these parameters, depending on the dynamics of the system and the desired closed-loop response. In this work, the CPi (output variable which is to be controlled) is responding to the manipulated variable (EPi) with a FOPTD behaviour, as observed from the pulse and step response experiments. A PI controller was thus chosen because it is adequate for the control of FOPTD systems. The PI controller parameters can be tuned through numerous rules that are either theoretical or empirical. In this work, a first approximation of controller parameters was done by the direct synthesis method (see Table 6-7), which only requires the parameters of the FOPTD system and the desired response time in closed-loop (τ_c). The parameters found by direct synthesis where then optimized through a simulation of the control loop. This simulation was performed using the calibrated metabolic model with the time sequence of the input (EPi) determined by the controller (equation 6.4). In this case, the simulated values for CPi were used as measurements. The integral error (IE) criterion was used to tune the control parameters. This criterion is defined by the integral of the absolute value of the error (e(t) = setpoint in CPi minus simulated CPi value) as follows:

$$IE = \int |e(t)| dt \qquad 6.5$$

The minimization of the integral error is achieved by finding optimal control parameters (K_c and τ_i). For this application, a CPi setpoint of 0.02 mmol•gDW^{-1} is used. This value was chosen for two reasons. First, it is significantly higher than the initial value typically measured in NMR (0.001 to 0.005 mmol CPi•gDW^{-1}), thus requiring a significant action from the controller. Secondly, this setpoint is lower than the highest values observed during the identification experiments (0.05 to 0.08 mmol CPi•gDW^{-1}), making sure that the system will be operated in the range of previous experimental conditions. Operating the system at a physiologically realistic value is important here to avoid inducing homeostasis effects that are not described by the model. A summary of the controller design is presented in Table 6-7.

Table 6-7 Controller design

	Variable	Value	units
Process model First order with time delay	K	2.25	mmol cPi•gDW^{-1}•mMol EPi^{-1}
	τ	1.25	hours
	θ	0.25	hours
Time interval between control actions	Δt	1	hours
Desired response time of the controller	τ_c	1.5	hours
Controller parameters from direct synthesis	$K_c = \tau / [K•(\theta + \tau_c)]$	0.32	mMol EPi• (mmol cPi•gDW^{-1})$^{-1}$
	$\tau_i = \tau$	1.25	hours
Controller tuning by IE criterion	K_c	0.72	mMol EPi• (mmol cPi•gDW^{-1})$^{-1}$
	τ_i	1.05	hours

The IE criterion minimization through model simulations leads to a more aggressive controller (higher K_c and slightly lower τ_i) than what is found by direct synthesis (see Table 6-7). This might induce oscillations in the process, but since the NMR experiment with the controller is relatively short (6 hours, with 5 control actions), a more aggressive controller is obtained because it reaches the setpoint faster and thus reduce the IE criterion. The controller tuned with the parameters from IE minimization was implemented on the NMR perfusion small-scale bioreactor (Figure 6-7). After two control actions (t = 2.5 hours), the input to the system is at 22 μM EPi and CPi reaches the setpoint of 0.02 mmol CPi•gDW^{-1}. However the controller was not able to precisely maintain that setpoint. The average value of CPi from 2.75 to 6 hours was at a mean value of 0.0172 mmol CPi•gDW^{-1}, thus being (on average) 14% below the setpoint. During that phase, variations in CPi were observed in the range of 0.013 to 0.021 mmol•gDW^{-1}, which is equal to 21 to 24% variations around the average value of 0.0172.

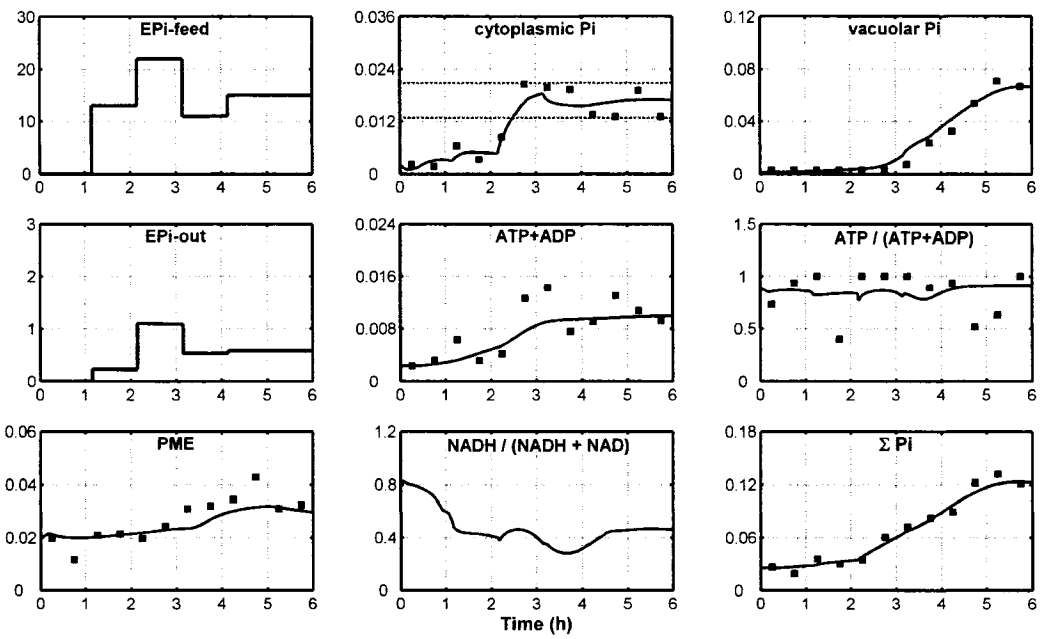


Figure 6.7 Simulated metabolites profiles and experimental NMR data for the application of the control algorithm with data points recorded every 30 minutes. Axis units are the same as for Figure 4.

The model was able to predict the average concentration in CPi during the control experiment, although the variations in the simulated CPi pool are less pronounced than what is observed in the experimental data. It is possible that the controller design could be improved in order to reduce variations in the CPi pool. However, these variations are just above the typical measurement error of the NMR in these conditions (10-15%, as mentioned previously). A longer experiment would definitely allow a more thorough assessment of the controller performance. However, a longer experiment could result in Pi accumulation in the cells and induce significant Pi efflux to the extracellular medium (Raghothama, 1999; Bieleski, 1973) or Pi allocation to pools that are not quantified by

NMR or not included in the model. The possible efflux of Pi is a phenomenon that is not included in the modelling and it could affect the controller performance. The simulated profiles for the other pools (VPi, PME, ATP, ADP) were also in accordance with experimental results, even though the data from that experiment was not used for the model calibration. Thus, the model presented in this work is adequate not only for the description of plant metabolism, but also allowed the tuning of a controller for CPi concentration and predicted the system behaviour.

6.10 CONCLUSIONS

A dynamic metabolic model for plant cells describing the major pathways of the primary metabolism, cells energetic state and nutrition was presented. The model was calibrated using data from batch cultures in shake flask. *In vivo* ^{31}P NMR spectroscopy was performed to obtain online data on phosphate related compounds and to precisely identify parameters of phosphate and energetic metabolism. The performance of the model at describing available experimental data was verified successfully. Using the calibrated model, a proportional-integral controller was designed for cytoplasmic Pi concentration, with extracellular Pi as the manipulated variable. The controller was implemented successfully, reaching an average value in cytoplasmic Pi only 14% below the desired setpoint. Variations of 21-24% were observed in the controlled variable, suggesting that improvement might still be possible in the controller design or in the experimental approach. Thus, the system used in this work (dynamic metabolic model with NMR small-scale bioreactor) had both its advantages and limitations. The model is

relatively complex, but can describe and predict accurately experimental results on Pi and energy metabolism, which allowed designing an efficient control strategy. The NMR small-scale bioreactor allows for online quantitative measurement of intracellular pools, a prerequisite for closed-loop control, but it has very specific dynamics that might be problematic for long-term control applications. Nevertheless, the possibility of developing a control framework for such an important intracellular nutrient as cytoplasmic Pi was successfully explored and the results are very promising for future developments. The proposed system could be further used as a tool for metabolic engineering. The ability to place the cells in a desired metabolic state regardless of initial experimental conditions and cells sub-culture history will allow exploring new possibilities in plant metabolic engineering.

6.11 REFERENCES

Balagué, C., Wilson, G., 1982. Growth and alkaloid biosynthesis by cell suspensions of *Catharanthus roseus* in a chemostat under sucrose and phosphate limiting conditions. Physiologie Végetale. 20, 515-522.

Bligny, R., Douce, R., 2001. NMR and plant metabolism. Current Opinion in Plant Biology. 4, 191-196.

Carrari, F., Urbanczyk-Wochniak, E., Willmitzer, L., Fernie, A. R., 2003. Engineering central metabolism in crop species: learning the system. Metabolic Engineering. 5, 191-200.

Chen, J. Y., In vivo 31P-NMR study of phosphate metabolism for Eschscholtzia californica using a small-scale perfused bioreactor. Département de génie chimique, Vol. Master. École polytechnique de Montréal, Montréal, 2004, pp. 131.

Cloutier, M., Perrier, M., Jolicoeur, M., 2007. Dynamic flux cartography of hairy roots primary metabolism. Phytochemistry. 68, 2393-2404.

Cloutier, M., Bouchard-Marchand, E., Perrier, M., Jolicoeur, M., 2007. A predictive nutritional model for plant cells and hairy roots. Biotechnology and Bioengineering. 99, 189-200.

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

Elkahoui, S., Smaoui, A., Zarrouk, M., Ghrir, R., Limam, F., 2004. Salt-induced lipid changes in Catharanthus roseus cultured cell suspensions. Phytochemistry. 65, 1911-1917.

Fiehn, O., 2006. Study of metabolic control in plants by metabolomics. In: Plaxton, W. C., McManus, M. T., Eds.), Control of Primary metabolism in plants. Blackwell, Malden, pp. 60-84.

Gamborg, O. L., Miller, R. A., Ojima, K., 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Experimental Cell Research. 50, 151-158.

Giersch, C., 2000. Mathematical modelling of metabolism. Current Opinion in Plant Biology. 3, 249-253.

Gmati, D., Chen, J., Jolicoeur, M., 2005. Development of a small-scale bioreactor: Application to in vivo NMR measurement. Biotechnology and Bioengineering. 89, 138-147.

Huber, S. C., Huber, J. L., McMichael, R. W., 1994. Control of plant enzyme activity by reversible protein phosphorylation. International Review of Cytology. 149, 47-98.

Hughes, E. H., Hong, S.-B., Gibson, S. I., Shanks, J. V., San, K.-Y., 2004. Metabolic engineering of the indole pathway in Catharanthus roseus hairy roots and increased accumulation of tryptamine and serpentine. Metabolic Engineering. 6, 268-276.

Jenkins, H., Hardy, N., Beckmann, M., Draper, J., Smith, A. R., Taylor, J., Fiehn, O., Goodacre, R., Bino, R. J., Hall, R., Kopka, J., Lane, G. A., Lange, B. M., Liu, J. R., Mendes, P., Nikolau, B. J., Oliver, S. G., Paton, N. W., Rhee, S., Roessner-Tunali, U., Saito, K., Smedsgaard, J., Sumner, L. W., Wang, T., Walsh, S., Wurtele, E. S., Kell, D. B., 2004. A proposed framework for the description of plant metabolomics experiments and their results. Nat Biotech. 22, 1601-1606.

Kruger, N. J., Le Lay, P., Ratcliffe, R. G., 2007. Vacuolar compartmentation complicates the steady-state analysis of glucose metabolism and forces reappraisal of sucrose cycling in plants. Phytochemistry. 68, 2189-2196.

Lamboursain, L., St-Onge, F., Jolicoeur, M., 2002. A lab-built respirometer for plant and animal cell culture. Biotechnology Progress. 18, 1377-1386.

Lamboursain, L., Jolicoeur, M., 2005. Critical influence of Eschscholzia californica cells nutritional state on secondary metabolite production. Biotechnology and Bioengineering. 91, 827-837.

Leduc, M., Tikhomiroff, C., Cloutier, M., Perrier, M., Jolicoeur, M., 2006. Development of a kinetic metabolic model: Application to Catharanthus roseus hairy root. Bioprocess and Biosystems Engineering. 28, 295-313.

Mauch, K., Arnold, S., Reuss, M., 1997. Dynamic sensitivity analysis for metabolic systems. Chemical Engineering Science. 52, 2589-2598.

Morgan, J. A., Rhodes, D., 2002. Mathematical Modeling of Plant Metabolic Pathways. Metabolic Engineering. 4, 80-89.

Oksman-Caldentey, K.-M., Saito, K., 2005. Integrating genomics and metabolomics for engineering plant metabolic pathways. Current Opinion in Biotechnology. 16, 174-179.

Plaxton, W. C., 1998. Metabolic aspects of phosphate starvation in plants. In: Lynch, J. p., Deikman, J., Eds.), Phosphorus in Plant Biology: regulatory roles in molecular, cellular, organismic, and ecosystem processes. American Society of Plant Physiologists, pp. 229-241.

Poolman, M. G., Assmus, H. E., Fell, D. A., 2004. Applications of metabolic modelling to plant metabolism. J. Exp. Bot. 55, 1177-1186.

Ratcliffe, R. G., Shachar-Hill, Y., 2006. Measuring multiple fluxes through plant metabolic networks. Plant Journal. 45, 490-511.

Rebeille, 1985. Effect of sucrose starvation on sycamore (Acer pseudoplatanus) cell carbohydrate and Pi status. Biochemical Journal. 226, 679-684.

Rios-Estepa, R., Lange, B. M., 2007. Experimental and mathematical approaches to modelling plant metabolic networks. Phytochemistry. 68, 2351-2374.

Rontein, D., Dieuaide-Noubhani, M., Dufourc, E. J., Raymond, P., Rolin, D., 2002. The metabolic architecture of plant cells: Stability of central metabolism and flexibility of anabolic pathways during the growth cycle of tomato cells. Journal of Biological Chemistry. 277, 43948-43960.

Sriram, G., Shanks, J. V., 2004. Improvements in metabolic flux analysis using carbon bond labeling experiments: bondomer balancing and Boolean function mapping. Metabolic Engineering. 6, 116-132.

Stephanopoulos, G. N., Aristidou, A. A., Nielsen, J., 1998. Metabolic Engineering: Principles and Methodologies. Academic Press, San Diego.

Urbanczyk-Wochniak, E., Leisse, A., Roessner, U., Lytovchenko, A., Reismeier, J., Willmitzer, L., Fernie, A. R., 2003. Expression of a bacterial xylose isomerase in potato tubers results in an altered hexose composition and a consequent induction of metabolism. Plant and Cell Physiology. 44, 1359-1367.

van Gulik, W. M., ten Hoopen, H. J. G., Heijnen, J. J., 1993. Structured model describing carbon and phosphate limited growth of Catharanthus roseus plant cell suspensions in batch and chemostat culture. Biotechnology and Bioengineering. 41, 771-780.

Wong, H.-K., Chan, H.-K., Coruzzi, G. M., Lam, H.-M., 2004. Correlation of ASN2 Gene Expression with Ammonium Metabolism in Arabidopsis. Plant Physiol. 134, 332-338.

CHAPITRE 7: APPLICATION DU MODÈLE MÉTABOLIQUE À DES CULTURES EN BIORÉACTEUR

Tel que mentionné dans la revue de littérature, les cellules de plantes peuvent être utilisées pour produire des métabolites secondaires, dont les alcaloïdes font partie. Plusieurs méthodes de cultures sont possibles afin de maximiser la productivité en alcaloïdes. Nous retiendrons ici les éléments suivants : utilisation d'un agent éliciteur, utilisation d'une phase d'extraction et la modulation du milieu de culture. Ces trois éléments, lorsque combinés, peuvent augmenter la productivité par un facteur 100, tel que mentionné par Shuler et Kargi (2001) pour des cellules de *C. roseus*. Une telle approche a déjà été présentée pour les cellules d'*E. californica* utilisées dans les travaux présents. Lamboursain et Jolicoeur (2005) ont présenté des résultats de production d'alcaloïdes pour des cultures en flacons avec utilisation d'un agent éliciteur, d'une phase d'extraction et d'un milieu de production. Dans ces travaux, il a été remarqué que la concentration intracellulaire en sucres au moment de l'élicitation était un facteur critique pour la productivité. De plus, différents milieux de cultures ont été utilisés lors de ces travaux et il a été observé qu'un milieu pauvre en azote permettait une plus grande accumulation de sucres intracellulaires, donc une plus grande productivité après élicitation. Les travaux de De Dobbeleer et al. (2006) présentent des résultats de production d'alcaloïdes pour les mêmes cellules, mais dans un contexte de culture en bioréacteur. De plus, lors de ces travaux, l'extraction des alcaloïdes par une boucle externe a été tentée. Cependant, cette dernière approche a résulté en une productivité

significativement plus basse lorsque comparée à une culture avec des résines en suspension avec les cellules.

Dans ce chapitre, des résultats de culture en bioréacteur seront analysés de manière systématique à l'aide du modèle métabolique présenté au chapitre 6. Le modèle sera appliqué à des cultures en bioréacteur en mode cuvée. Une première série de données provenant de trois cultures cuvée sans résines extractives sera utilisée pour calibrer le modèle. Ensuite, le modèle sera appliqué à une culture cuvée avec résines extractives. Ces quatres séries de données serviront à établir un modèle suffisamment précis pour décrire la croissance, la nutrition et la productivité des cellules végétales cultivées en bioréacteur, dans des conditions typiques de production de métabolites secondaires. Cette approche permettra de juger si le modèle est suffisamment précis et complet pour décrire les liens entre la nutrition cellulaire et la productivité. Au niveau expérimental, de tels liens sont répertoriés (voir Lamboursain et Jolicoeur, 2005 et références citées). Puisque le modèle métabolique décrit l'intégration des 3 nutriments majeurs (Pi, azote, glucose) et les voies menant au métabolisme secondaire, il pourra servir d'outil analytique pour quantifier, avec une approche intégrative, ces liens entre nutrition et productivité.

Le modèle sera ensuite utilisé pour identifier des cibles potentielles d'amélioration du bioprocédé. Pour ce faire, une analyse de sensibilité dynamique sera effectuée. Cette approche permettra d'identifier les paramètres physiologiques critiques pour

l'établissement d'une stratégie de culture. Finalement, une stratégie de culture prometteuse (selon l'analyse de sensibilité dynamique) sera retenue et implantée expérimentalement.

7.1 Cultures en bioréacteur opérées en mode cuvée

Des cultures en bioréacteur opérées en mode cuvée ont été réalisées. Le système utilisé est décrit au chapitre 3, ainsi que les méthodes analytiques utilisées pour obtenir des données nutritionnelles et métaboliques.

Dans un premier temps, trois cultures en bioréacteur opérées en mode cuvée ont été réalisées. Ces cultures ont été élicités à l'aide de 400 mL d'une solution de chitine ajoutée après 4 jours de culture. La solution d'élicitation est du milieu B5 contenant 20 $g \cdot L^{-1}$ de chitine pour une concentration finale de 3,3 $g \cdot L^{-1}$ dans le bioréacteur. Des échantillons ont été prélevés quotidiennement pendant 11 jours, sauf pour la première journée (2 échantillons) et pour la 4e journée (échantillonnage avant et après élicitation). Tel que le montrent les résultats de culture (Figure 7.3), l'élicitation a stimulé la productivité en alcaloïdes. Cependant, aucune phase d'extraction n'était utilisée, ce qui fait que la production totale s'est avérée relativement faible (0,01 mmol/gDW ou 3,5 mg/gDW). Les échantillons d'une des cultures ont également été analysés par RMN *in vivo* pour obtenir des données quantitatives sur les bassins de Pi (cytoplasme et vacuole), les navettes énergétiques (ATP et ADP) ainsi que sur les phosphomonoesters (glucose-6-P, fructose-6-P). Ces données sont inclues dans la Figure 7.4. La méthode

RMN pour obtenir ces données est décrite à la section 3.3 ainsi qu'au chapitre 6, section 6.8.

Une culture avec une phase extractive (60 $g \cdot L^{-1}$ de résine polymérique Amberlite XAD-7) a également été réalisée avec les mêmes paramètres que pour la culture cuvée décrite précédemment. La seule différence était la présence de la phase extractive. Puisque les alcaloïdes sont des molécules toxiques, leur séquestration par les résines est connue pour stimuler la production et a permis d'obtenir une production spécifique environ 10 fois plus élevée : 0,1 mmol/gDW, ou 35 mg/gDW (Figure 7.4).

Bien que ce protocole de culture ne soit pas nécessairement optimal, il concorde très bien avec ce qui est rapporté dans la littérature (Shuler et Kargi, 2001; Lamboursain et Jolicoeur, 2005). Il servira donc de base pour établir une stratégie de culture plus élaborée dans une optique d'optimisation de la production d'alcaloïdes. Afin d'arriver à cette stratégie de culture, le modèle métabolique dynamique a été appliqué aux cultures en bioréacteur.

7.1.1 Mesures d'activités enzymatiques

Des échantillons de la culture cuvée avec résines ont également été utilisés pour mesurer l'activité de certaines enzymes du métabolisme primaire. Le protocole de mesure est décrit à la section 3.3. Les échantillons prélevés aux jours 4, 6 et 9 de la culture ont été analysés. Ces analyses ont permis d'observer une plus grande activation des hexokinases

en présence de glucose extracellulaire. Puisque ceci peut avoir des implications sur la description de la régulation métabolique par le modèle, une expérience de limitation en glucose suivi d'un échelon sur la concentration extracellulaire en glucose a été également réalisée. Les mesures ainsi obtenues suggèrent bien une activation des hexokinases en présence de glucose extracellulaire. Ces résultats et leur implication sur la modélisation sont présentés à la section 7.2.

7.2 Application du modèle métabolique aux cultures en bioréacteur

Le modèle utilisé pour décrire les cultures en bioréacteur est basé sur celui décrit au chapitre 6 (Figure 6.1). Puisque le modèle a légèrement été modifié, les équations stoechiométriques et cinétiques, ainsi que les paramètres cinétiques (v_{max}, K_m et paramètres de régulation) sont énumérés en Annexe B.

7.2.1 Production de métabolites secondaires

Puisque des mesures d'alcaloïdes totaux ont été effectuées sur les cultures en bioréacteur, le pool simulé d'alcaloïdes totaux sera comparé avec des données expérimentales pour les alcaloïdes totaux (voir section 3.4). Les cultures ont été élicitées avec de la chitine, l'effet de cet activateur a donc été ajouté dans la réaction de biosynthèse des alcaloïdes (réaction 6, Tableau 2 en Annexe B). En l'absence de résines, les alcaloïdes s'accumulent rapidement et inhibent la production. Ce phénomène est inclus dans la réaction 6 du modèle (Tableau 2, Annexe B). En présence de résines

extractives, cet effet d'inhibition a été supprimé, puisque l'on suppose que les résines en suspension peuvent extraire les alcaloïdes plus rapidement que le taux de sécrétion par les cellules (voir Klavana et al., 2005 pour une analyse plus approfondie de ce phénomène). Les processus de sécrétion des alcaloïdes et d'adsorption sur les résines ne sont pas inclus dans le modèle, donc le bassin d'alcaloïdes (ALK, Figure 6.1) n'est pas physiquement situé dans l'espace intracellulaire. Ce bassin représente simplement la quantité totale d'alcaloïdes à avoir été produite par unité de masse cellulaire (mmol d'alcaloïdes par gDW), peu importe que ces alcaloïdes soient dans les cellules, le milieu ou dans la phase extractive. Ce bassin simulé d'alcaloïdes totaux sera donc comparé avec des mesures expérimentales d'alcaloïdes totaux (intracellulaire + extracellulaire + contenu des résines). Donc, même si la description physique du bassin d'alcaloïdes totaux n'est pas complète, la comparaison entre les données expérimentales et les simulations se fera de manière rigoureuse. Les voies du métabolisme secondaire ne sont pas décrites en détail ici puisque le but des présents travaux n'est pas d'optimiser ces voies, mais bien de décrire et comprendre les liens entre le métabolisme primaire et la production globale d'alcaloïdes. Il n'est donc pas nécessaire, ici, de décrire précisément comment les alcaloïdes sont distribués dans les différents bassins (voir Figure 2.6 : sanguinarine, macarpine, chélélutine, chélirubine, chélérytrine). Une description plus élaborée de ces voies, ainsi que l'incorporation des phénomènes de sécrétion pourraient être envisageables lors de travaux futurs. Ceci pourrait permettre de mieux comprendre certains phénomènes, comme les dynamiques d'inhibition des voies du métabolisme secondaire ou l'effet d'une phase extractive sur ces voies.

7.2.2 Mesures d'activité enzymatique et détection de glucose

Les cellules ont des mécanismes de détection du glucose ('glucose sensing', Rolland et al., 2001; Lalonde et al., 1999). La détection du glucose par les cellules de plantes leur permet de moduler les voies du métabolisme pour utiliser plus efficacement les ressources en glucides. Cette régulation peut se faire au niveau génétique, mais également au niveau de l'activation enzymatique (Avonce et al., 2005). La première étape enzymatique de la glycolyse (glucokinase) est impliquée dans ce phénomène de détection de glucose (Avonce et al., 2005), tout comme les transporteurs de glucose (Lalonde et al., 1999). Lors des cultures cuvées en bioréacteur, le glucose était épuisé du milieu extracellulaire après 7 jours (voir Figures 7.3 et 7.4). Puisque les cultures duraient 11 jours, les cellules fonctionnaient pendant 4 jours dans un environnement sans glucose. Ceci induira fort probablement des phénomènes de régulation qui changeront le comportement métabolique des cellules. L'activité enzymatique des hexokinases a donc été mesurée sur des échantillons d'un des triplicatas de la culture cuvée élicitée sans résines. La Figure 7.1 présente ces résultats :

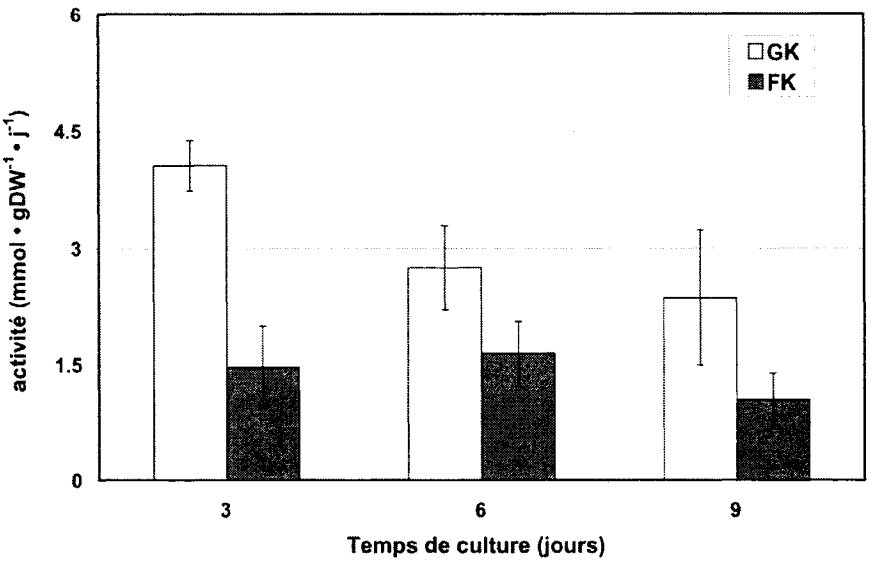


Figure 7.1 Activité des hexokinases durant une culture cuvée. Les données de la culture d'où proviennent les échantillons sont présentées à la Figure 7.3. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type sur la répétition de l'essai enzymatique (n=3).

On remarque donc que l'activité de la GK est significativement réduite entre le 3e et le 6e jour de culture et que l'activité FK diminue, mais seulement pour le 9e jour de culture. La réduction d'activité des HK n'est pas ici nécessairement due à l'épuisement du glucose extracellulaire. Après le 6e jour de culture, les cellules entraient en phase stationnaire, ce qui peut évidemment avoir un impact au niveau du fonctionnement cellulaire. Une autre expérience a donc été tentée pour confirmer si la modification de l'activité de la GK pouvait bien être due à un phénomène de détection de glucose. Une observation de ce potentiel phénomène de détection de glucose a donc été réalisée en mesurant l'activité enzymatique des hexokinases dans des conditions avec et sans

glucose. Afin de détecter la régulation fine (d'ordre biochimique et non d'ordre génétique), l'expérience suivante a été réalisée :

- Culture des cellules en bioréacteur sur un milieu sans glucose pendant 4 jours avec échantillonnage quotidien
- Ajout ponctuel et rapide de milieu contenant du glucose pour atteindre une concentration de 5 $g \cdot L^{-1}$ (échelon de 0 à 5 $g \cdot L^{-1}$ sur le glucose)
- Échantillonnage rapide après l'ajout de glucose (10 échantillons en 100 minutes)
- Mesure de l'activité des hexokinases sur 3 échantillons
    - avant l'ajout de glucose (2 jours avant)
    - 1 heure après l'ajout
    - 2 jours après l'ajout

La culture en bioréacteur a donc été effectuée avec le système et les conditions décrites à la section 3.2. Le milieu utilisé (B5, Annexe A) est le même que pour toutes les autres cultures, à la différence qu'il ne contenait pas de glucose initialement. Les cellules sont gardées en culture durant 4 jours dans ces conditions limitantes afin de s'assurer que les réserves intracellulaires de glucose seront bien épuisées lors de l'ajout. Les échantillons sont prélevés tel que décrit à la section 3.2. L'activité des hexokinases a été mesurée tel que décrit à la section 3.3. La Figure 7.2 présente les résultats de cette expérience :

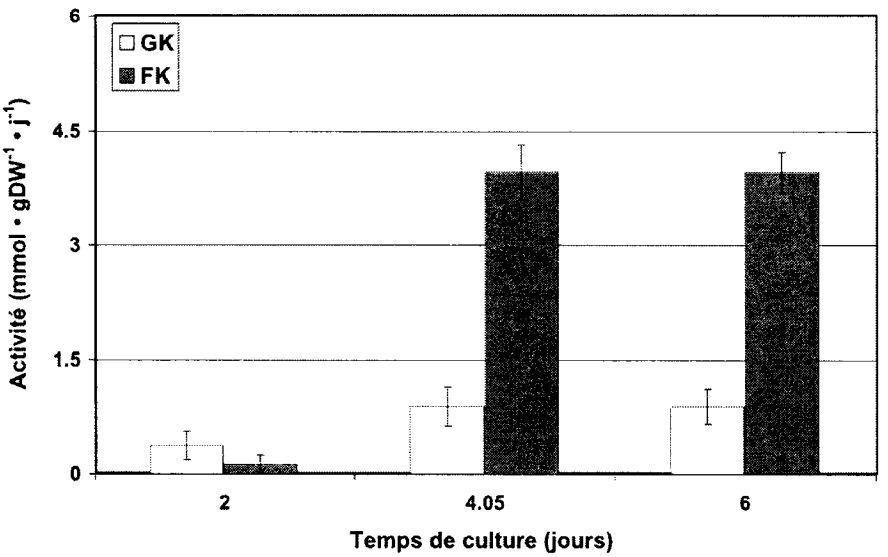


Figure 7.2 Activité des hexokinases lors de l'application d'un échelon sur le glucose extracellulaire. Les cellules sont cultivées sur un milieu sans glucose et la concentration est augmentée à $5g \cdot L^{-1}$ après 4 jours de cultures. L'échantillon à t = 4,05 jours est prélevé 1 heure après l'ajout de glucose. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type sur la répétition de l'essai enzymatique (n=3).

On observe donc que l'activité des hexokinases est affectée significativement par la limitation en glucose. L'activité mesurée pour la GK après deux jours de culture sur un milieu sans glucose est 88% plus faible que la valeur moyenne mesurée pour la culture cuvée sur un milieu avec glucose (moyenne des trois points de la Figure 7.1). Pour la FK, l'activité mesurée en conditions de limitation de glucose est 91% inférieure à la valeur moyenne pour la culture cuvée (moyenne des trois points de la Figure 7.1). Après l'ajout de glucose, on observe une augmentation significative de l'activité mesurée des hexokinases. L'activité de la GK augmente par un facteur de 2,4 et celle de la FK, par

un facteur de 31. Étrangement, l'activité de la FK après l'ajout de glucose est même supérieure aux valeurs mesurées pour la culture cuvée sur un milieu avec glucose. Cependant, pour l'expérience de limitation, on remarque que l'activité de la GK après ajout de glucose (Figure 7.2) ne revient pas au même niveau que pour la culture cuvée avec glucose. Deux jours après l'ajout de glucose (Figure 7.2), l'activité de la GK est 71% inférieure à l'activité moyenne mesurée pour la culture cuvée (Figure 7.1). Ce résultat pourrait suggérer que l'on observe ici autant de la régulation fine (activation rapide en présence de glucose) que de la régulation génétique (désactivation à long terme des hexokinases en absence de glucose).

Suite à ces observations, la réaction de la glucokinase du modèle métabolique (Tableau B-3, réaction 1) et la réaction de la fructokinase (Tableau B-3, réaction 2) ont donc été modifiées pour inclure cette capacité de régulation en présence de glucose extracellulaire. Cette observation d'activation et de désactivation des hexokinases par la mesure d'activité enzymatique permet donc d'ajuster et d'améliorer notre description de la régulation métabolique par le modèle. Lors des expériences de mesures d'activités enzymatiques, d'autres enzymes que les hexokinases ont également été analysées. Ces valeurs sont présentées à l'Annexe D (Tableau D-1). En guise de comparaison, les v_{max} obtenus par la calibration du modèle ainsi que les valeurs de flux simulés (v) sont également présentées au Tableau D-1. Les v_{max} du modèle représentent une abstraction du taux de réaction maximal des enzymes décrites par le modèle. Cependant, la description de la régulation et les conditions *in vivo* font en sorte que l'on peut

s'attendre à observer des différences entre les v_{max} ou les flux simulés du modèle et les activités mesurées *in vitro*. Ces mesures pourront cependant être utilisées lors de travaux futurs pour améliorer la description de la régulation métabolique. Tel que vu pour les hexokinases, cette approche semble très prometteuse pour améliorer la description de la régulation métabolique par le modèle. Au Tableau D-1, on remarque que le v_{max} du modèle pour la glucokinase se rapproche beaucoup des mesures d'activité enzymatique. La glucokinase est également l'une des réactions du modèle pour laquelle l'équation cinétique est la plus élaborée puisque des observations en RMN *in vivo* ont également été utilisées pour en améliorer la régulation (voir chapitre 6).

7.2.3 Modifications apportées au modèle

Structurellement, seules les réactions 6 (biosynthèse d'alcaloïdes, Tableau B-2, réaction 6) ainsi que les hexokinases (Tableau B-2, réactions 1 et 2) ont nécessité des changements mineurs. Les autres réactions du modèle sont donc identiques au modèle présenté au chapitre 6. Les paramètres cinétiques des réactions ont été légèrement modifiés par rapport au modèle présenté au chapitre 6. Bien que les mêmes cellules furent utilisées, les données de culture ont été obtenues dans un contexte expérimental différent (cultures élicitées en bioréacteur versus cultures non élicitées en flacons Erlenmeyer). Bien qu'une des 4 cultures en bioréacteur ait été effectuée avec une résine extractive, il est possible de décrire les cultures avec un même modèle. Globalement, une augmentation de la productivité en alcaloïdes, même par un facteur 10, n'aura pas une incidence énorme au niveau métabolique puisque les alcaloïdes représentent

respectivement 0,35% et 3,5% de la masse cellulaire (3,5 et 35 mg•gDW^{-1}) dans les cultures sans résines et avec résines.

7.2.4 Résultats

La Figure 7.3 présente les résultats (expérimentaux et simulations) pour la culture en bioréacteur cuvée sans phase extractive, et la Figure 7.4 présente les résultats pour la culture cuvée avec une phase extractive.

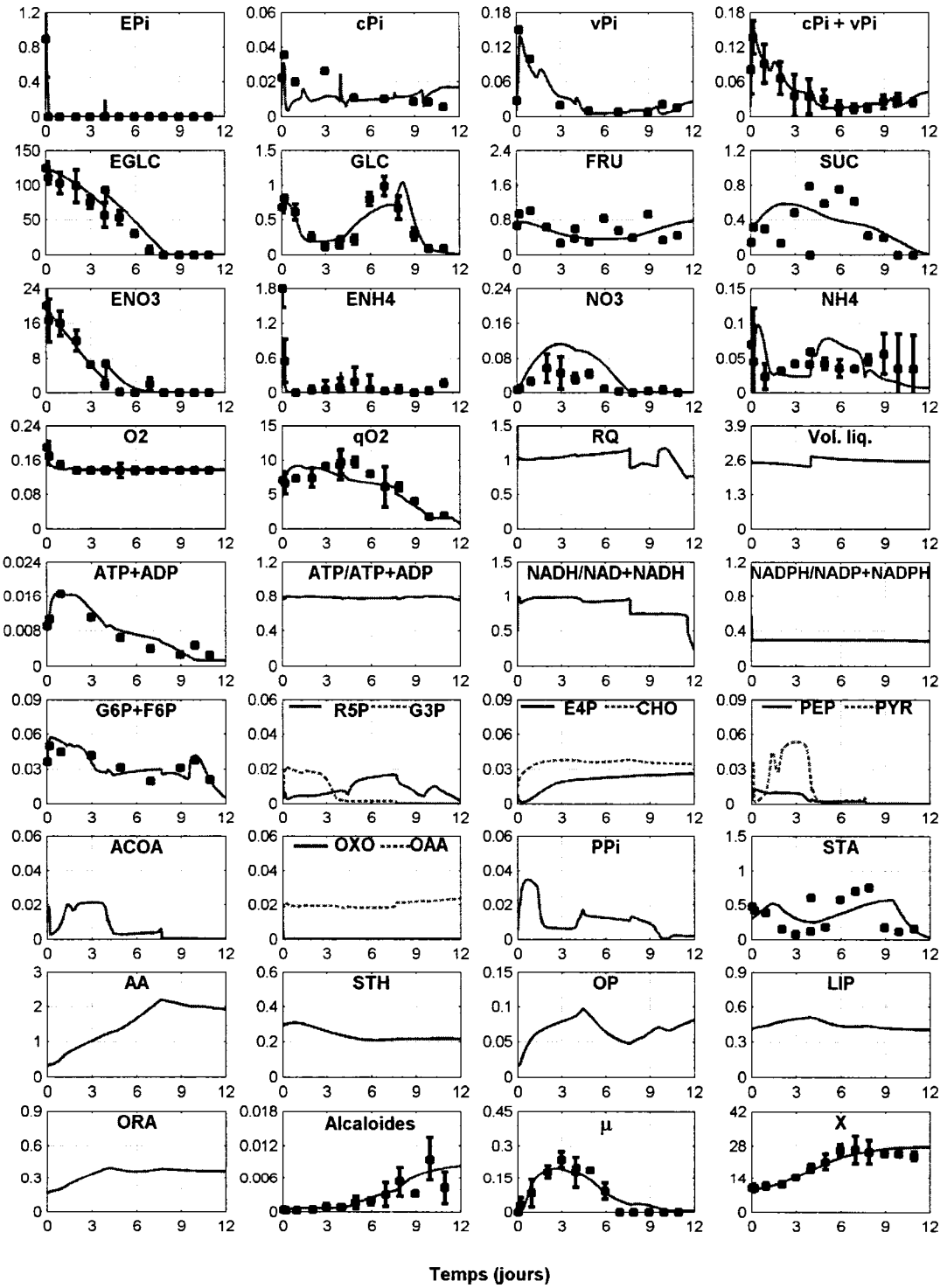


Figure 7.3 Culture cuvée élicitée en bioréacteur sans phase extractive. Légende en page suivante.

Figure 7.3 (légende) Les points représentent les résultats expérimentaux (moyenne de 3 expériences distinctes), les barres d'erreurs représentent l'écart-type (n = 3) et les lignes (pleines et pointillées) représentent les résultats de simulation. Les unités pour les métabolites sont en mmol•gDW^{-1}, les nutriments extracellulaires sont en mM, le volume de liquide est en L, le taux de respiration (qO2) est en mmol•gDW^{-1}•j^{-1}, le quotient respiratoire (RQ) est adimensionnel, la biomasse est en gDW (par bioréacteur) et le taux de croissance spécifique est en j^{-1}.

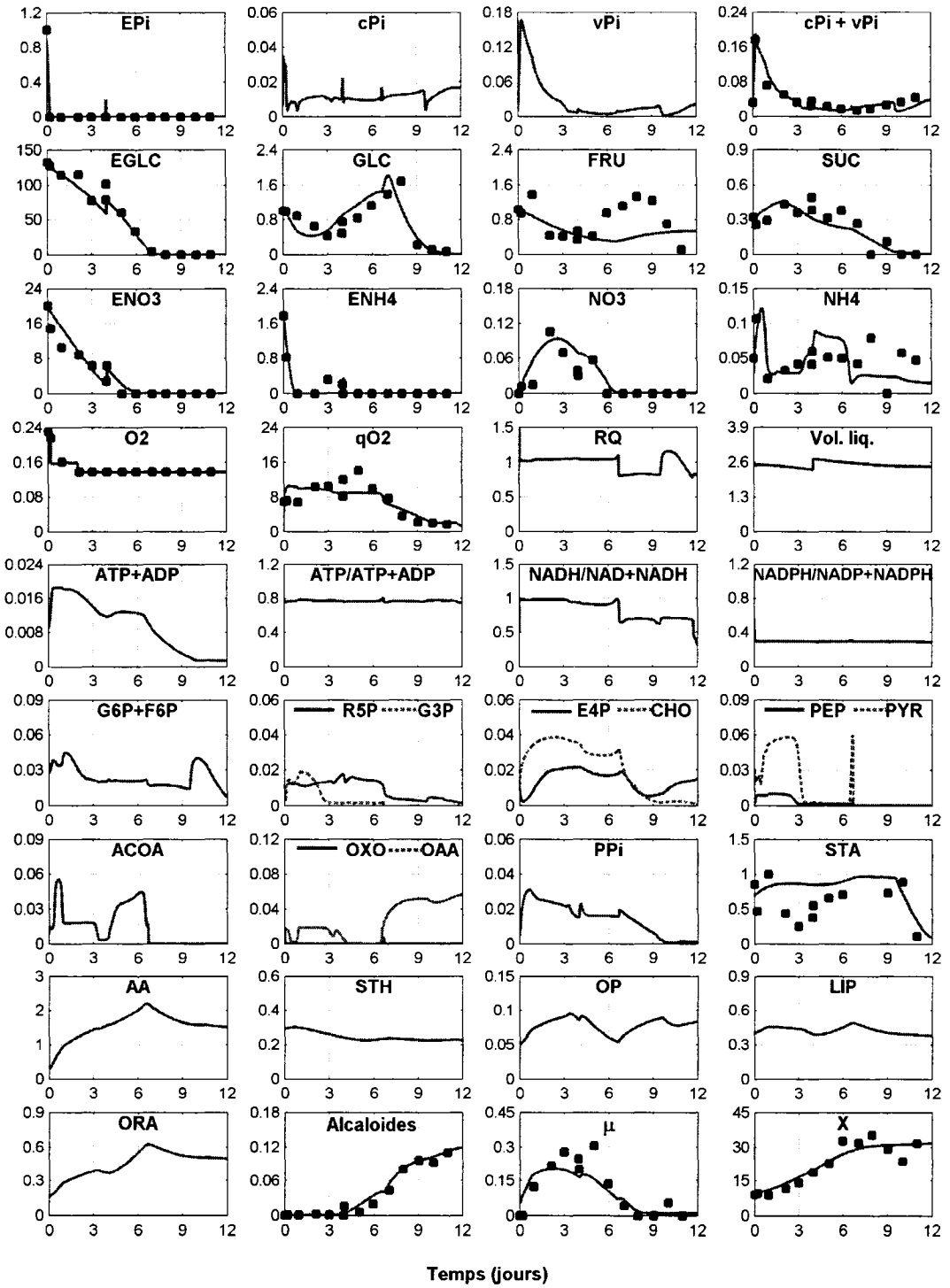


Figure 7.4 Culture cuvée élicitée en bioréacteur avec une phase extractive. Les données proviennent d'une seule expérience (n = 1). La légende de la Figure 7.3 s'applique.

Les résultats expérimentaux montrent que la croissance est limitée à partir du 6e jour, autant pour la culture avec ou sans résine. La culture sans résine a atteint une concentration en biomasse moyenne de 9,4 gDW•L^{-1} en phase stationnaire (jours 6-11). La concentration en biomasse était légèrement plus élevée pour la culture avec résines : 11,2 gDW•L^{-1} en moyenne entre les jours 6 et 11. Cette valeur plus élevée pourrait cependant être causée par une mauvaise séparation entre la suspension et les résines. Une mauvaise séparation ferait en sorte que la mesure de biomasse inclurait une fraction des résines et donc serait plus élevée. La phase stationnaire est induite par un faible niveau de nutriments (Pi et azote), mais il pourrait être risqué d'avancer que la limitation est uniquement due à l'un des deux. Tel qu'observé avec la modélisation nutritionnelle (voir chapitre 4), l'identification du nutriment limitant est souvent ardue, notamment à cause de la variabilité des cultures et aussi parce que les proportions en nutriments sont parfois bien équilibrées dans les milieux de culture. La simulation métabolique montre cependant que la limitation ici est due à un faible niveau en navettes énergétiques, qui est causé par une longue phase de croissance en conditions de faible Pi intracellulaire. Ce faible niveau en navettes énergétiques est observé expérimentalement (Figure 7.3) grâce aux données obtenues en RMN *in vivo*. Cependant, les métabolites n'ont pas tous été mesurés. Il serait donc possible qu'un métabolite non mesuré ou un élément du milieu de culture (sel, gaz en solution) limite la croissance.

Bien que la croissance soit arrêtée après 6 jours, l'activité métabolique ne cesse pas pour autant. Les cellules peuvent utiliser leurs réserves de carbone et d'azote pour maintenir la production en alcaloïdes. Ceci est particulièrement visible à la Figure 7.4 où la biosynthèse d'alcaloïdes se produit principalement après le 6e jour de culture. Dans ce cas-ci, il semblerait que les réserves intracellulaires de sucres, non épuisées après 6 jours de culture, soient canalisées, via la voie des pentoses phosphates, vers le métabolisme secondaire (Figure 6.1, réactions 3, 5, 6 et 12).

Il est possible d'analyser plus avant les résultats de cultures et de simulations obtenus ici. Puisque le modèle est descriptif et non purement empirique, il peut établir les liens entre la nutrition cellulaire, les voies métaboliques et la productivité en alcaloïdes. On peut donc émettre l'hypothèse que le modèle serait capable de prédire les résultats pour une culture dans des conditions (métaboliques ou nutritionnelles) légèrement différentes. Cette hypothèse sur la capacité prédictive du modèle a d'ailleurs été vérifiée pour des expériences en RMN *in vivo* au chapitre 6. Pour les cultures en bioréacteurs décrites ici, nous utiliserons le modèle afin de voir si il est possible d'identifier des paramètres clés permettant d'augmenter la productivité en alcaloïdes.

7.3 Analyse de sensibilité dynamique sur la productivité

Divers outils ou cadres de travail existent pour analyser les réseaux métaboliques. Le MCA en est un, mais son application reste limitée en pratique puisque l'approche requiert l'atteinte de régimes permanents. De plus, l'optimisation d'une culture ou d'un

système métabolique pourrait requérir des variations de paramètres considérables, alors que le MCA est limité à de faibles changements de paramètres (Kascer et Burns, 1973).

Puisque le modèle utilisé ici est tout simplement un système réactionnel avec des cinétiques définies, il est possible de faire une analyse de sensibilité sur les paramètres de ce système. Tel que vu au chapitre 4, une analyse de sensibilité pour un modèle cinétique peut simplement consister à mesurer une variation de l'erreur de prédiction suite à un changement de paramètre. Ceci permet d'identifier les paramètres sensibles du modèle (i.e. les paramètre qui, lorsque modifiés, induisent des variations dans le comportement du modèle). Cette approche n'indique toutefois pas si une variation de paramètre serait souhaitable ou non pour optimiser une variable du système (croissance ou productivité). De plus, une telle analyse ne donne aucune indication sur les propriétés dynamiques du système à l'étude. Idéalement, nous chercherons à définir un cadre de travail permettant d'estimer, dans le temps, la variation de la productivité des cellules en alcaloïdes suite à un changement de paramètre du système. Ceci permettra d'identifier comment une modification sur le système (niveau enzymatique ou condition de culture) aura des répercussions sur la productivité et ce, sans avoir à définir un intervalle de temps qui serait inévitablement arbitraire. En effet, si l'on prend comme référence la productivité après un certain temps, par exemple, après 10 jours de culture, il est possible d'arriver à des conclusions erronées. Par exemple, une modification du système pourrait avoir un effet néfaste sur la productivité après 10 jours, mais un effet globalement positif si on cultive les cellules quelques jours de plus.

On retrouve dans la littérature quelques exemples d'analyse de sensibilité pour les systèmes métaboliques. Une approche retiendra cependant notre attention ici : l'analyse de sensibilité dynamique. Cette approche consiste à mettre au point une fonction objectif (productivité, croissance etc.) et de voir comment cette fonction peut évoluer dans le temps. Cette approche est relativement facile à implémenter dans le cas présent puisque le modèle décrit toutes les variables d'état du système dans le temps. De plus, cette approche s'avère performante pour les systèmes métaboliques dynamiques. Tel qu'observé (sur le métabolisme de *E. coli*) par Radakrishnan et al. (2002), l'utilisation d'une fonction objectif dynamique permet une meilleure prédiction des propriétés du système qu'une fonction objectif évaluée à un temps fixe. De plus, tel que mentionné au chapitre 2, le problème d'optimisation de la productivité des cellules végétales est un problème pour lequel les dynamiques de culture et les dynamiques intracellulaires sont extrêmement importantes. Une analyse de sensibilité dynamique sur le modèle permettra donc de mieux cerner ces phénomènes, puisque le modèle décrit bien les dynamiques du système.

7.3.1 Fonctions objectif pour le métabolisme végétal

Une analyse de sensibilité dynamique sur le métabolisme des racines de *C. roseus* a déjà été établie par Cloutier et al. (2007). Cette analyse a été réalisée en utilisant le modèle présenté au chapitre 5. Dans ce cas-ci, la fonction objectif analysée était le potentiel de production des racines. Cette fonction avait été définie comme étant la somme des

concentrations en précurseurs (tryptamine et sécologanine) et des flux de production de précurseurs :

$$P(t) = w_1 \bullet SEC(t) + w_2 \bullet TRY(t) + w_3 \bullet v_{TRY}(t) + w_4 \bullet v_{SEC}(t) \qquad 7.1$$

où SEC(t) et TRY(t) sont les concentrations en précurseurs et $v_{TRY}(t)$ et $v_{SEC}(t)$ sont les flux de production de ces précurseurs. Chaque terme est pondéré par un poids (w_i) afin de placer les 4 facteurs (2 flux et 2 concentrations) sur un même ordre de grandeur. La variation de cette fonction dans le temps suite à un changement de paramètre (v_{max} ou condition de culture) avait permis d'analyser la sensibilité du potentiel de production. Cette analyse avait permis de conclure que le maintient des réserves intracellulaires en glucides était un facteur important dans le maintient du potentiel de production (Cloutier et al., 2007), ce qui est en accord avec les résultats expérimentaux obtenus par Lamboursain et Jolicoeur (2005).

Avec les résultats de simulation obtenus présentés dans ce chapitre, il est possible d'établir une fonction objectif à optimiser pour le métabolisme des cellules d'*E. californica*. Puisque la production spécifique d'alcaloïdes totaux ($mmol \bullet gDW^{-1}$) est bien définie par le modèle (voir les Figures 7.3 et 7.4), on peut simplement utiliser cette production spécifique comme fonction objectif :

$$P(t) = ALK(t) \qquad 7.2$$

Puisque la fonction contient un seul terme, il est inutile de le pondérer. Nous prendrons la simulation présentée à la Figure 7.4 comme référence, puisque cette culture représente le système (expérimental) que nous voulons optimiser. Le profil temporel de cette fonction peut donc être analysé suite à un changement de paramètre du modèle ou suite à un changement de condition de culture. Pour ce qui est des paramètres, nous étudierons des changements de niveaux enzymatiques (v_{max}). Les constantes d'affinités ne seront pas étudiées puisqu'il est beaucoup plus aisé, en ingénierie cellulaire, de modifier les niveaux enzymatiques que de modifier les constantes d'affinités d'un système métabolique. Pour les conditions de culture, notre intérêt se portera sur la composition du milieu de culture, un facteur toujours important dans l'établissement d'une culture optimale. La possibilité de maintenir les concentrations intracellulaires en nutriments à des niveaux stables durant la culture sera également étudiée. Tel que démontré au chapitre 6 pour le Pi cytoplasmique, il semble être possible, avec une approche adéquate, de maintenir un niveau intracellulaire constant en nutriments. Il sera donc intéressant de voir comment cette stabilisation des concentrations intracellulaires pourrait affecter la productivité.

7.3.2 Considérations pratiques pour l'analyse de sensibilité

Avant de présenter les résultats de l'analyse de sensibilité dynamique, quelques éléments doivent être mentionnés. Premièrement, l'analyse de sensibilité porte sur la production spécifique d'alcaloïdes par les cellules ($mmol \cdot gDW^{-1}$) et non sur la

productivité totale d'un bioréacteur, productivité qui pourrait être exprimée en $mmol \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$ pour inclure des considérations temporelles et économiques dans l'optimisation du bioprocédé. Cependant, le but de cette étude n'est pas d'optimiser, au sens économique, le bioprocédé puisque celui-ci n'est pas à l'échelle industrielle. La présente étude vise plutôt à montrer comment un modèle descriptif peut être utilisé pour mettre au point un bioprocédé de manière rationnelle. En ce sens, l'outil développé dans les présents travaux (analyse de sensibilité dynamique sur un modèle métabolique) se veut le plus générique possible, afin de permettre son application à d'autres systèmes. Il sera donc aisé d'appliquer l'approche présentée ici, que ce soit pour d'autres cellules, d'autres conditions de cultures ou pour la production d'une biomolécule autre que les alcaloïdes.

De plus, il importe de préciser un paramètre important, soit l'intervalle de temps sur lequel l'analyse de sensibilité dynamique sera effectuée. Dans des conditions idéales, on pourrait faire une analyse de sensibilité sur un intervalle de temps le plus long possible, par exemple 4 ou 5 fois le temps de sous-culture des cellules (10 jours). Cependant, en pratique, il est très peu aisé de garder les cellules en culture aussi longtemps, notamment à cause d'une mortalité cellulaire importante lorsque le milieu de culture est épuisé. De plus, il est peu probable qu'un protocole de culture trop long (par rapport à une culture cuvée) soit profitable, notamment parce que les alcaloïdes sont des molécules relativement fragiles. Même avec des résines pour séquestrer les alcaloïdes, une culture en bioréacteur plus longue expose forcément le produit à des conditions difficiles. Une

approche en régime permanent permettrait de s'affranchif d'un intervalle de temps, forcément arbitraire, dans l'analyse de sensibilité. Au niveau expérimental, un système de culture permettant un régime permanent serait toutefois nécessaire. Une autre possibilité consisterait à inclure dans le modèle tous les phénomènes qui peuvent affecter négativement le bioprocédé (mortalité cellulaire, dégradation du produit etc.). Un tel modèle pourrait éventuellement être utilisé pour prédire un temps de culture optimal. Actuellement, le modèle n'inclut pas de tels phénomènes. Il a donc été décidé, pour des raisons pratiques, de limiter l'analyse de sensibilité dynamique à un intervalle de temps réalisable en culture, soit 15 jours. Cet intervalle est légèrement plus long que la durée des cultures utilisées pour calibrer le modèle (11 jours), il faudra donc user de prudence dans l'analyse des résultats. En effet, même si le modèle décrit bien les phénomènes se produisant durant les 11 premiers jours de culture, rien n'assure que les prédictions au-delà du 11e jour seront aussi précises. Donc, lors de l'analyse de sensibilité, il faudra toujours garder en mémoire ces éléments. Même s'il serait possible, par la simple description mathématique des voies métaboliques, d'obtenir une productivité très élevée (par exemple en alimentant de manière considérable et continue du milieu frais au bioréacteur) ceci ne garantirait pas la faisabilité et donc l'optimalité, d'une telle approche. L'analyse de sensibilité dynamique présentée ici a donc été produite dans une optique d'implantation expérimentale. Les changements de paramètres et de conditions de culture ont donc été effectués dans cette optique. La Figure 7.5 présente le profil de production spécifique d'alcaloïdes totaux que l'on utilisera comme base de comparaison pour l'analyse de sensibilité.

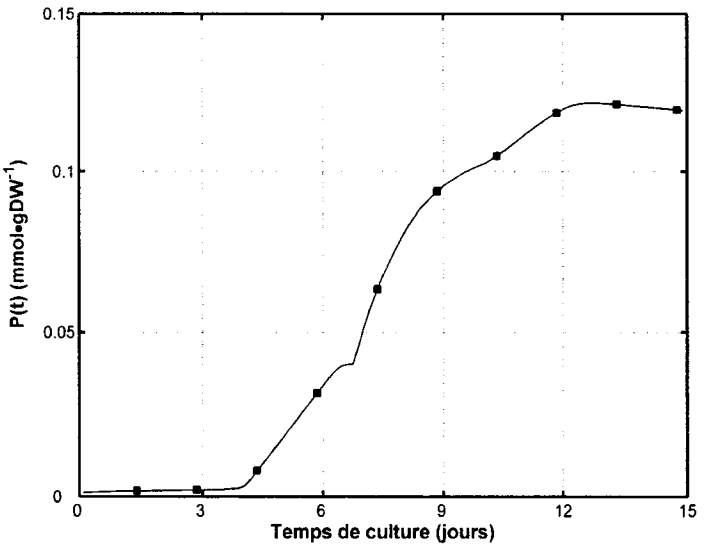


Figure 7.5 Profil de production spécifique simulé pour la culture cuvée avec résines extractives. Les points représentent également les valeurs simulées et sont ajoutés pour identification future des différents profils. Ce profil est le même que le résultat de simulation de la Figure 7.4.

On observe une stabilisation de la concentration spécifique en alcaloïdes totaux après le 12e jour, ce qui laisse supposer l'épuisement d'un des éléments nécessaires à leur biosynthèse. Au vu des résultats de simulation de la culture cuvée élicitée avec résines (voir Figure 7.4), on pourrait avancer l'hypothèse que la voie des pentoses phosphates et la voie des acides shikimiques, qui fournissent les squelettes carbonés pour les alcaloïdes, sont en cause ici. Les concentrations (simulées) des intermédiaires de ces voies (R5P, E4P, CHO) sont relativement faibles à la fin de la culture (Figure 7.4). L'aspect dynamique de ce phénomène est très important. Après le 6e jour de culture,

deux phénomènes majeurs se produisent : un épuisement du glucose extracellulaire, qui est la cause d'un épuisement des ressources intracellulaires quelques jours plus tard et on observe également une diminution des navettes énergétiques (ATP + ADP) après le 6e jour de culture, diminution qui est due à une limitation en Pi. Puisque l'ATP est nécessaire pour convertir le GLC en G6P, une diminution de la concentration en ATP jumelée à une limitation en sucres peut limiter le flux entrant de G6P et par le fait même causer, ultimement, un épuisement des voies métaboliques menant à la production des alcaloïdes. Le modèle permet ici de bien intégrer les différentes dynamiques et les phénomènes qui peuvent contribuer à limiter la productivité. Une analyse expérimentale plus élaborée des intermédiaires métaboliques et des flux serait cependant nécessaire pour confirmer ces observations.

7.3.3 Sensibilité des paramètres métaboliques

Toutes les réactions du modèle métabolique ont été soumises, successivement, à des variations de v_{max} de +50% et -50%. Les profils de production résultants (46 x 2 = 92 profils de production) ont été analysés par rapport à la courbe de référence de la Figure 7.5. Par soucis de concision, seules les variations de v_{max} causant les plus hautes variations de productivité (10% et plus) sont présentées ici. La Figure 7.6 présente les profils de production suite à des changements (+ et - 50%) sur les enzymes reliées à l'intégration du GLC. La simulation de référence de la Figure 7.5 est également présentée pour fins de comparaison.

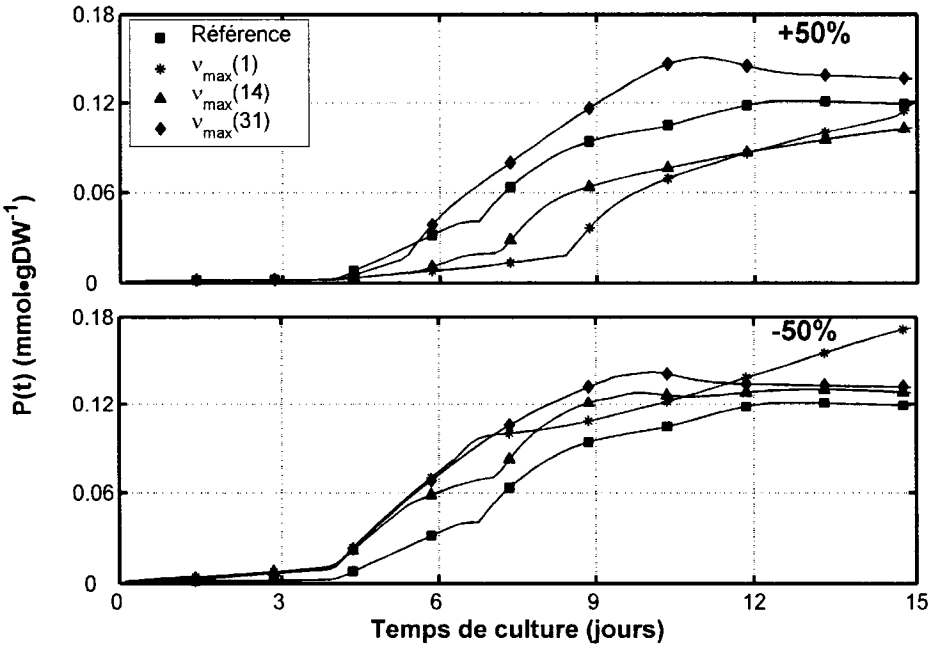


Figure 7.6 Sensibilité des voies reliées à l'intégration du GLC. $v_{max}(1)$: GK; $v_{max}(14)$: PGI; $v_{max}(31)$: transporteur de glucose.

On remarque que la réaction 1 (phosphorylation du GLC par la glucokinase) a un effet négatif sur la productivité. Une augmentation de cet enzyme cause un ralentissement de la productivité, bien qu'au 15e jour, la production spécifique finisse par rattraper la simulation de référence. Une diminution des hexokinases induit une augmentation de 44% de la production spécifique. Ceci peut sembler contradictoire, puisque le G6P alimente les voies menant aux alcaloïdes, mais l'aspect dynamique du problème entre probablement en compte ici. Puisque les réserves de glucose (milieu de culture + réserves intracellulaires) ne sont pas infinies, leur canalisation plus rapide par les hexokinases permet peut-être tout simplement de canaliser les sucres plus rapidement vers la glycolyse, au détriment de la voie des pentoses phosphates. Lorsque les cellules entrent en phase de production (après le 4e jour) elles ont donc moins de ressources

carbonées puisque celles-ci ont déjà été utilisées. Le même raisonnement semble applicable à la voie 14 (conversion du G6P en F6P). Le transport des sucres du milieu extracellulaire au milieu intracellulaire (voie 31) présente un comportement intéressant. Autant l'augmentation que la diminution de $v_{max}(31)$ permettent d'augmenter la productivité spécifique dans le temps, bien que l'effet soit moins marqué au bout des 15 jours de simulation. D'un côté, une augmentation du transport permet une augmentation des réserves intracellulaires de GLC (sans que celles-ci soient nécessairement canalisées vers la glycolyse), mais de l'autre, une diminution du transport permet peut-être de maintenir les réserves intracellulaires plus longtemps (en épuisant le milieu de culture moins rapidement). De plus, il est possible qu'une diminution du transporteur de glucose induise simplement une concentration plus basse en glucose intracellulaire et donc moins de stockage sous forme d'amidon (un phénomène inclus dans le modèle). Ceci pourrait expliquer en partie le résultat observé. Tel qu'observé expérimentalement par Lamboursain et Jolicoeur (2005) ainsi que pour une analyse semblable sur *C. roseus* (Cloutier et al., 2007), il semblerait que la gestion des réserves de GLC soit un phénomène important pour expliquer la capacité de production en métabolites secondaires. Ce phénomène est donc observé également pour des cultures d'*E. californica* en bioréacteur. La Figure 7.7 présente les résultats d'analyse de sensibilité dynamique pour des changements sur les enzymes reliées aux autres nutriments. L'assimilation de l'azote vers les acides aminés (voies 10 et 36), l'assimilation du Pi en nucléotides (voie 22) et l'assimilation de l'O2 (voie 41) retiennent particulièrement notre attention.

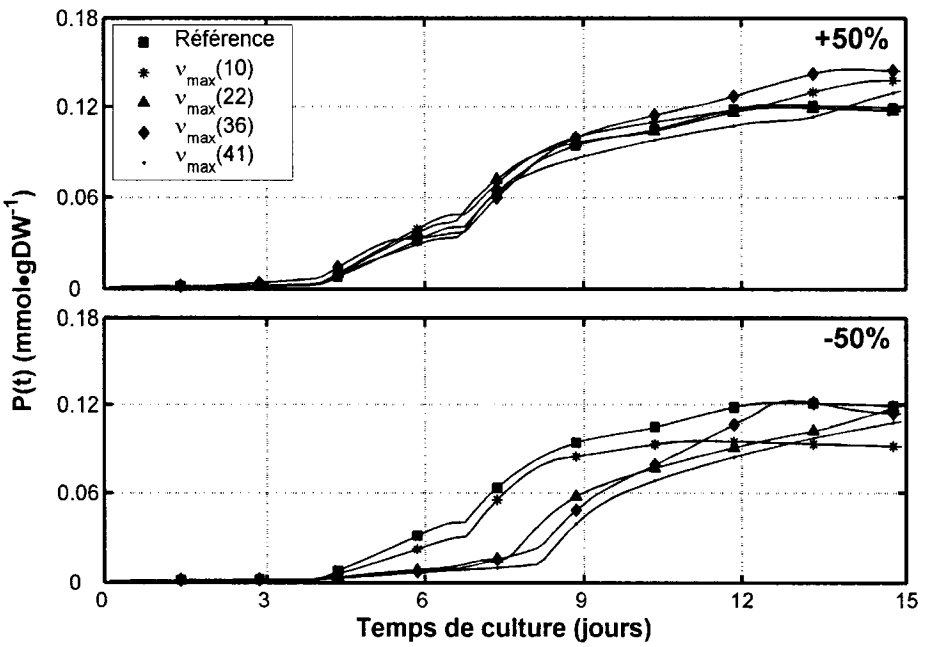


Figure 7.7 Sensibilités des voies reliées à l'intégration des nutriments

Premièrement, on remarque qu'une diminution de 50% du ν_{max} des réactions qui intègrent à l'azote ou au Pi ont un effet seulement temporaire sur la productivité. Bien qu'on observe des variations importantes pour ces paramètres, après les 15 jours de simulation, les systèmes perturbés ont une production spécifique à peine de 5 à 15% inférieure à la simulation de référence. Une augmentation des ν_{max} pour les enzymes reliées à l'intégration des nutriments induit une légère augmentation de la production spécifique (entre 0 et 20% d'augmentation après 15 jours), mais cette augmentation s'observe essentiellement à la fin de la période à l'étude (après 12 jours).

Finalement, un dernier ensemble de réactions retiendra notre attention : la voie des pentose phosphate, des acides shikimiques et la synthèse des alcaloïdes (réactions 3, 5, 6 et 12). Les résultats pour la production d'alcaloïdes suite à des changements de + ou - 50% pour les v_{max} de ces voies sont présentés à la Figure 7.8.

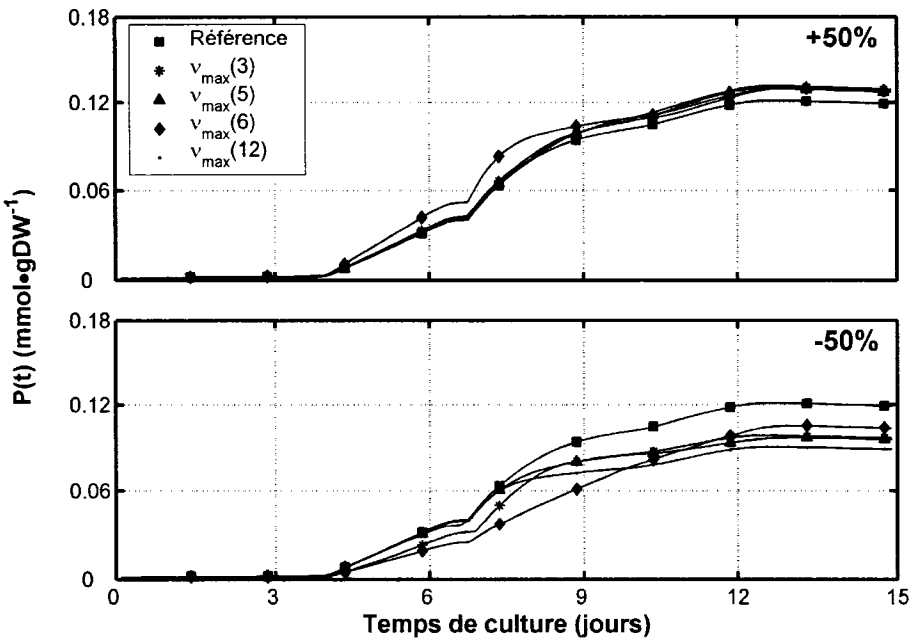


Figure 7.8 Sensibilités des voies reliées à la production d'alcaloïdes

La stimulation de ces voies augmente la production spécifique de seulement 7-8% après 15 jours, bien que la concentration spécifique en produit soit constamment supérieure à celle de la courbe de référence au cours de la période simulée. Cette incapacité à augmenter la productivité en stimulant une à une les enzymes menant aux alcaloïdes indique que le flux global pour cette cette voie est probablement régulé par un autre facteur (navettes énergétiques, cofacteurs etc.) que les vitesses de réaction maximales.

De plus, une augmentation des vitesses de réactions ne permettra pas nécessairement d'obtenir plus de produit, puisque les cellules épuisent le milieu de culture (voir Figures 7.3 et 7.4). Par exemple, une augmentation de 50% du v_{max} de la réaction 6 (synthèse d'alcaloïdes), permet d'obtenir une productivité 30% supérieure à la trajectoire de référence après 7,5 jours, mais cet effet est presque complètement estompé après 15 jours. Donc, même si on permet aux cellules de canaliser plus rapidement leurs ressources vers les alcaloïdes, ceci ne garantit pas un gain en bout de ligne puisque les réserves sur lesquelles les cellules s'alimentent (intracellulaires et extracellulaires) sont probablement épuisées plus rapidement. La diminution de 50% des v_{max} dans ce cas mène à des diminutions de la productivité de l'ordre de 13 à 25% après 15 jours.

Il semblerait donc, au vu de ces résultats, qu'une approche de génie génétique dirigée vers une augmentation des voies reliées au métabolisme du carbone ou des alcaloïdes pourrait permettre d'augmenter la production spécifique d'alcaloïdes par *E. californica*. Le résultat le plus prometteur à ce chapitre serait une diminution de l'expression des hexokinases (44% d'augmentation de la productivité après 15 jours). Une confirmation expérimentale de cette prédiction du modèle serait nécessaire avant de pousser l'analyse plus loin. Une analyse plus approfondie serait également intéressante, par exemple en modifiant simultanément les niveaux enzymatiques de plusieurs réactions. Cependant, ceci nous éloignerait encore plus des conditions pour lesquelles le modèle a été calibré, donc les résultats seraient peut-être moins fiables. Mais il est fort probable que le

modèle serait suffisamment performant pour, à tout le moins, guider des travaux d'ingénierie cellulaire en diminuant le nombre d'expériences à réaliser.

7.3.4 Sensibilité à la composition du milieu de culture

Lors de l'établissement de conditions de culture, il est relativement facile d'optimiser la composition du milieu de culture. Le milieu utilisé dans les expériences en bioréacteur est un milieu B5 supplémenté de 30 $g \cdot L^{-1}$ de glucose. Ce milieu est relativement bien balancé en nutriments et permet une bonne croissance des cellules. Cependant, rien n'indique que ce milieu soit optimal pour stimuler la productivité. Tel que relevé par Lamboursain et Jolicoeur (2005), la littérature est contradictoire sur l'effet que peut avoir un composant du milieu de culture sur la productivité. Ces résultats contradictoires peuvent être dus à une combinaison de plusieurs facteurs : identité du nutriment limitant, accumulation de nutriments par les cellules ou dynamique de culture.

Afin de mieux cerner cette problématique, l'analyse de sensibilité dynamique a été appliquée aux composants majeurs du milieu de culture : glucose, azote (NO_3^- - NH_4^+) et Pi. Les résultats sont toujours comparés à la simulation de référence. De plus, la sensibilité a été testée pour des changements de 10, 25 et 50% des concentrations par rapport à la composition du milieu B5 standard (Annexe A). La Figure 7.9 présente ces résultats.

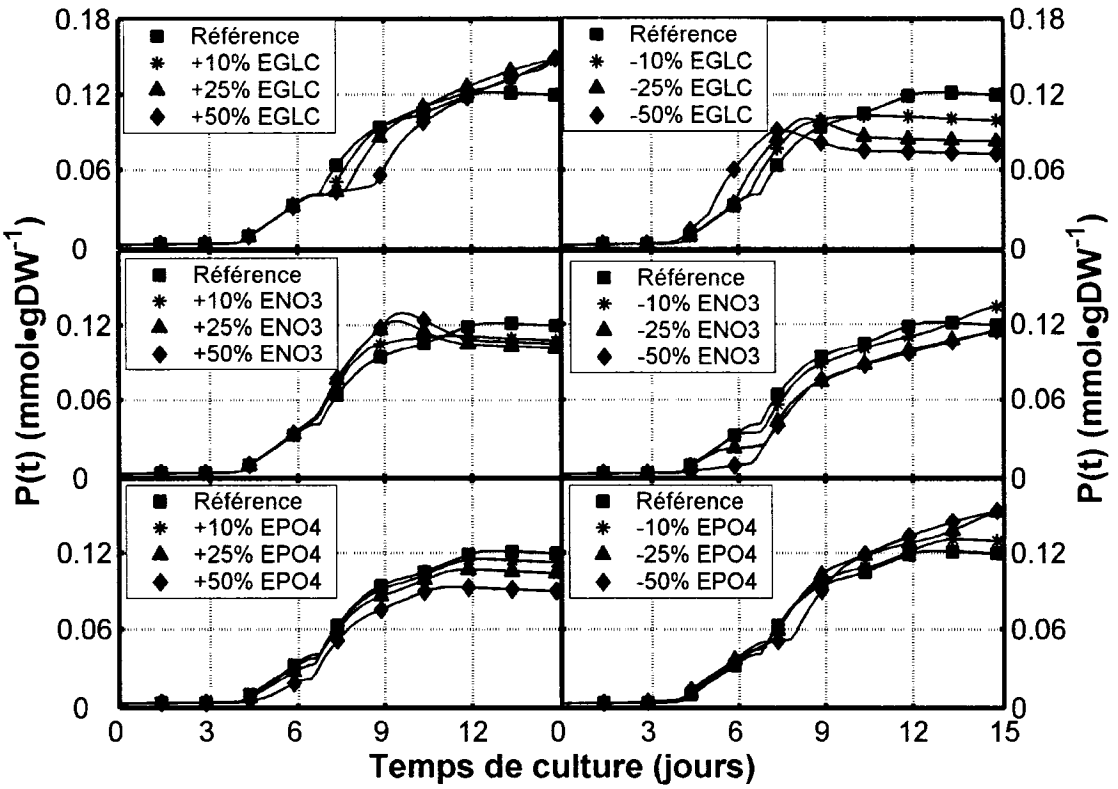


Figure 7.9 Sensibilité à la composition du milieu de culture

La production spécifique est affectée par certaines variations des composants du milieu de culture. Une augmentation du glucose amène une augmentation de la concentration spécifique en alcaloïdes, mais seulement entre le 7e et le 10e jour de culture ou après 12 jours de culture (+24% après 15 jours). Fait intéressant, une augmentation de 10% du glucose donne pratiquement la même production qu'une augmentation de 50%. On pourrait donc en conclure que, soit un autre élément que le glucose limite la productivité, soit les cellules ont des réserves suffisantes et sont peu sensibles à une grande augmentation de glucose. Une diminution de la concentration en glucose amène une diminution marquée de la production spécifique. Et il y a une distinction claire entre

les courbes à -10, -25 et -50% de glucose, ce qui permet de conclure que la disponibilité d'une source de carbone est cruciale pour maintenir la productivité.

Les variations de la composition en sources azote donnent des résultats plus mitigés. Une augmentation de la concentration en azote semble stimuler la production jusqu'au 9-10e jour de culture et ensuite, la concentration en alcaloïdes simulée tombe sous la courbe de référence. Une diminution de 20 ou 50% de la concentration en azote induit un ralentissement dans la production d'alcaloïdes, bien qu'après 15 jours, la productivité dans ces deux cas soit presque revenue à la courbe de référence. Une diminution de 10% de la composition du milieu en azote permet même une légère augmentation de la productivité après 15 jours de culture.

La composition en Pi du milieu de culture affecte également la production d'alcaloïdes : une diminution de la concentration en Pi permet d'augmenter la production spécifique et, inversement, une augmentation du Pi la diminue. Comme pour le glucose, les différents cas étudiés n'induisent pas tous des productivités divergentes. Une diminution de 25 ou 50% du Pi donne pratiquement la même productivité, à une valeur environ 25% supérieure par rapport à la courbe de référence.

On voit donc qu'une analyse partielle, basée sur un seul nutriment ou limitée dans le temps peut facilement produire des résultats qui sembleraient contradictoires. Les résultats présentés ici montrent qu'une approche intégrative basée sur une modélisation

incluant les nutriments permet de bien analyser les aspects dynamiques d'un tel problème. De plus, on remarquera un point intéressant : le milieu de production commun pour les cellules d'*E. californica* utilisées dans ces travaux (voir Annexe A) est un milieu sans Pi contenant du glucose et des sources d'azote (Lamboursain et Jolicoeur, 2005; Klavana et al., 2004). Ce milieu est généralement ajouté avec l'agent éliciteur afin de stimuler le métabolisme secondaire tout en fournissant aux cellules les nutriments nécessaires à la production. L'analyse de sensibilité dynamique nous montre effectivement qu'une telle approche semble adéquate pour stimuler la productivité, bien qu'il faille être prudent avec les dynamiques de culture.

7.3.5 Établissement d'une stratégie de culture

Tel qu'observé ici avec l'analyse de sensibilité dynamique et tel qu'observé expérimentalement par Lamboursain et Jolicoeur (2005), il semblerait donc que la gestion des réserves intracellulaires en glucose par les cellules soit un phénomène déterminant pour la productivité en métabolites secondaires. Cependant, tel qu'observé à la Figure 7.9, une simple augmentation du glucose contenu dans le milieu de culture ne permet pas nécessairement d'obtenir une augmentation directe et rapide de la productivité. De même, une augmentation des flux entrants de glucose au métabolisme primaire (Figure 7.6) ne garantit pas non plus une augmentation directe de la productivité, notamment parce que cela pourrait faire en sorte que les cellules épuisent leurs réserves trop rapidement.

Il serait donc intéressant de voir comment la stabilisation des réserves intracellulaires dans le temps pourrait affecter la productivité. Dans un premier temps, des simulations ont été effectuées en considérant (une à une) des concentrations intracellulaires stables en glucose, en azote (NO_3^- et NH_4^+) ou en Pi. Ces simulations sont comparées à la même simulation de référence (Figure 7.5), simulation pour laquelle les concentrations intracellulaires en nutriments varient beaucoup dans le temps (voir Figure 7.4). Les concentrations intracellulaires en nutriments ont donc été stabilisées, successivement, aux valeurs suivantes : glucose à 0,4 mmol•gDW^{-1}, NO_3^- et NH_4^+ respectivement à 0,1 et 0,04 mmol•gDW^{-1} et Pi à 0,04 mmol•gDW^{-1}. Ces valeurs ont été choisies après quelques essais (résultats de simulation non présentés) qui ont montré que la productivité est stimulée ou inhibée pour peu que les concentrations soient suffisamment élevées pour éviter les limitations sévères. De plus, ces concentrations sont dans le même ordre de grandeur que les concentrations observées pour des cellules en croissance, ce qui assure qu'on stabilise les cellules dans des conditions physiologiquement réalistes. Les résultats de cette analyse sont présentés à la Figure 7.10.

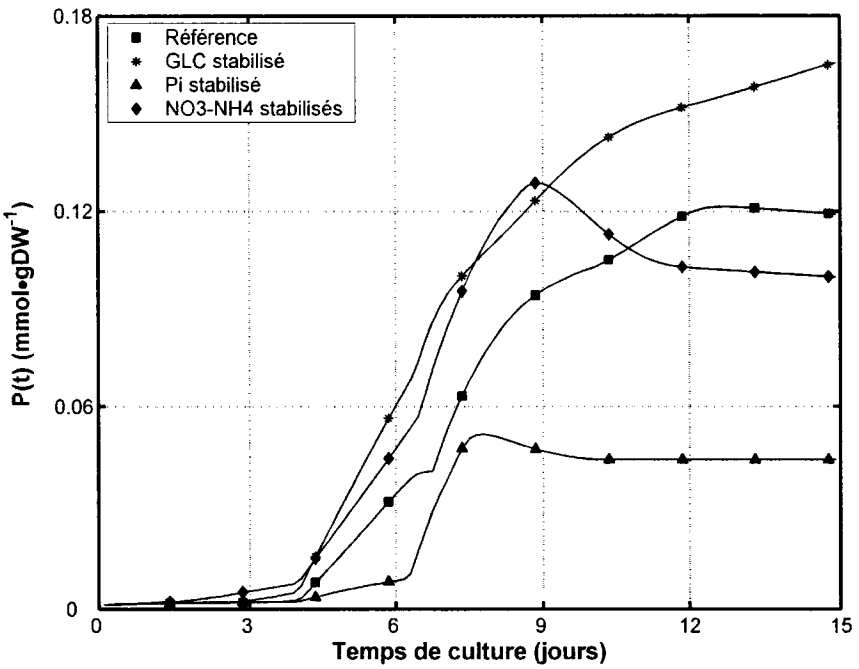


Figure 7.10 Effet de la stabilisation des nutriments intracellulaires

On remarque que le maintient des réserves intracellulaires en glucose stimule la production (+38% après 15 jours) et que le maintient des réserves intracellulaires en Pi l'inhibe (-63% après 15 jours). Il est d'ailleurs intéressant de noter que l'effet d'une stabilisation du glucose est observé rapidement après l'élicitation (jour 4) et cet effet est soutenu dans le temps. Dans ce cas-ci, au lieu de simplement fournir plus de glucose aux cellules au début de la culture, on s'assure plutôt que les cellules auront des réserves intracellulaires en tout temps, donc forcément, ces réserves seront disponibles pour la phase de production. Le maintient des réserves en azote est plus particulier puisqu'il stimule la productivité jusqu'au 9e jour de culture (moment auquel l'effet est même supérieur au maintient des réserves de glucose), mais par la suite, cet effet se résorbe et

la production spécifique après le 11e jour de culture est systématiquement plus basse comparativement à la courbe de référence.

Finalement, l'analyse de sensibilité dynamique a été appliquée pour des stabilisations couplées des concentrations intracellulaires (Pi + azote, Pi + glucose et glucose + azote). Les niveaux auxquels sont stabilisées les réserves sont les mêmes que précédemment, mais cette fois elles sont stabilisées deux par deux. Les résultats de cette analyse sont présentés à la Figure 7.11.

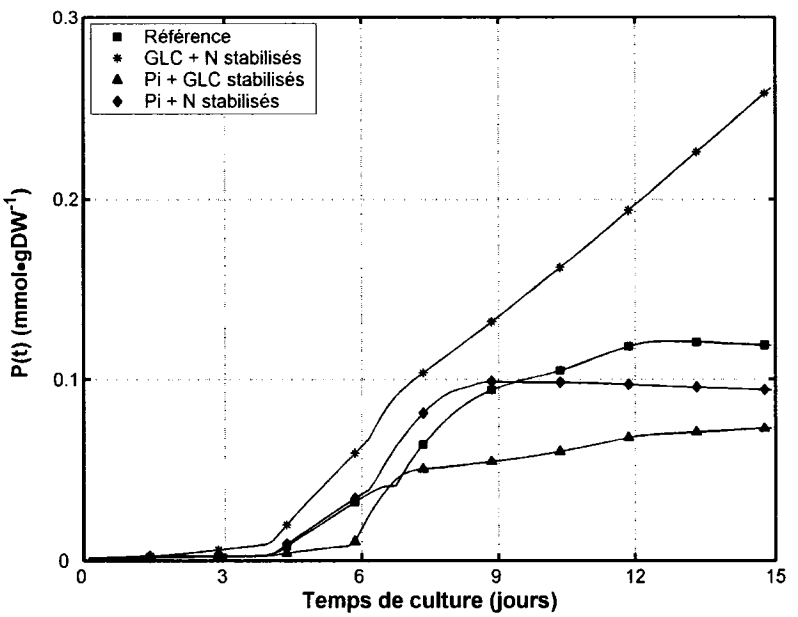


Figure 7.11 Stabilisation couplée des nutriments intracellulaires

L'effet négatif du Pi est bien démontré, puisqu'il diminue la productivité autant si on le stabilise avec le glucose ou avec l'azote. Cependant, le résultat le plus marquant est la

production spécifique en alcaloïdes des cellules pour lesquelles on a stabilisé les réserves intracellulaires en glucose et en azote. L'effet est plus fort que celui observé pour la simple stabilisation des réserves de glucose. Après 15 jours de culture, on arrive même à doubler la production spécifique des cellules (+116%). Dans ce cas-ci, le Pi limite la croissance (résultats de simulations non montrés), ce qui laisse les cellules dans des conditions favorables pour canaliser les réserves de glucose et d'azote vers la production d'alcaloïdes. Bien que la production semble pouvoir continuer au delà du 15e jour dans ces conditions, il est fort probable qu'un autre facteur (Pi, navettes énergétiques, cofacteurs, mortalité etc.) limitera le fonctionnement cellulaire et, ainsi, la production d'alcaloïdes. Toujours est-il que la stratégie de culture identifiée ici (stabilisation des réserves intracellulaires en glucose et en azote) semble très prometteuse. Les résultats de simulations montrent même que cette approche, qui permet une augmentation de 116% de la production spécifique, serait significativement supérieure aux approches d'ingénierie génétique (+44%) et d'optimisation du milieu de culture (+25%). Évidemment, l'analyse présentée ici n'est pas exhaustive et il serait possible qu'une autre stratégie puisse donner des résultats encore plus prometteurs. On a considéré ici une stabilisation des réserves intracellulaires, mais il est tout à fait possible qu'un profil variable dans le temps soit envisageable pour optimiser la culture. Cette approche serait toutefois plus ardue à implanter expérimentalement, surtout en l'absence de mesure en ligne fiable pour les concentrations intracellulaires. Nonobstant, on constate que le modèle et l'analyse de sensibilité dynamique permettent d'identifier rapidement les facteurs critiques pour stimuler la productivité en métabolites

secondaires

7.4 Implantation expérimentale

La stratégie de culture identifiée par l'analyse de sensibilité dynamique, soit le maintient des réserves intracellulaires en glucose et en azote concorde très bien avec la littérature sur les milieux de production pour les cellules végétales (voir Dicosmo et al., 1995; Lamboursain et Jolicoeur, 2005). En effet, ces milieux de production sont, généralement, des milieux sans Pi, mais contenant du glucose et des sources d'azote. Ces milieux fournissent donc aux cellules des réserves d'azote et de carbone, sans leur fournir le Pi qui stimulerait la croissance. Évidemment, l'ajout de milieu de production à une culture ne garantit pas que les réserves intracellulaires seront stabilisées, mais au moins, en absence de Pi, les cellules seront probablement dans un état plus favorable à une canalisation des ressources vers les voies de production que vers les voies de croissance. L'analyse de sensibilité dynamique a cependant montré que, pour augmenter la production, la stabilisation des ressources intracellulaires semble de loin plus prometteuse qu'une simple modulation du milieu de culture. Cette approche permet de tenir compte des dynamiques particulières des cellules végétales, en fournissant les ressources adéquates à la production, au moment où les cellules en ont besoin, soit durant la phase stationnaire.

Une implantation expérimentale de la stratégie optimale identifiée par l'analyse de sensibilité a donc été réalisée. Afin de maintenir les réserves intracellulaires en

nutriments, il sera nécessaire d'alimenter le système en continu avec du milieu de culture. Tel que vu au chapitre 6, il est possible, avec un système opéré en perfusion, de maintenir un bassin intracellulaire. L'alimentation (débit et concentrations) doit cependant être effectuée adéquatement. Pour alimenter les cellules en continu, un bioréacteur à perfusion de 3L a été utilisé. Ce système est décrit en détail à la section 3.3. Le protocole opératoire (débits, concentrations) a été précisé en utilisant les bilans de masse et les estimations du modèle métabolique cinétique.

7.4.1 Développement de la stratégie d'alimentation

Puisqu'une stabilisation des réserves intracellulaires est recherchée, il est nécessaire d'alimenter le milieu de culture de manière proportionnelle à la demande cellulaire globale. Cette demande peut être établie par le bilan sur les nutriments. La Figure 7.12 présente le diagramme d'écoulement pour ce système de bioréacteur.

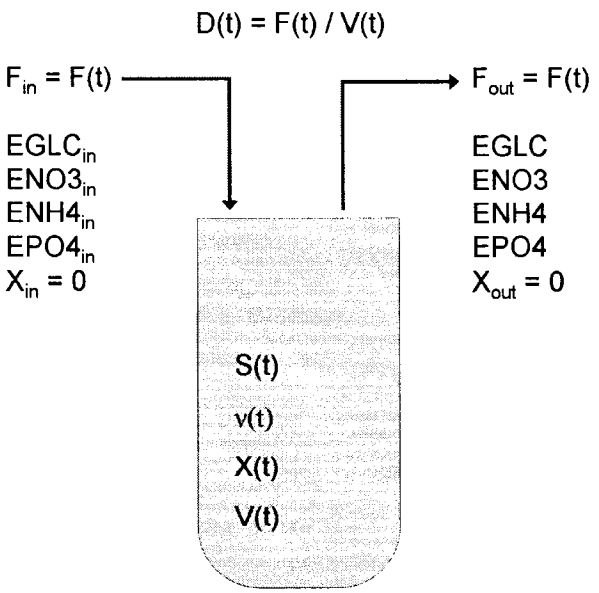


Figure 7.12 Diagramme d'écoulement pour le bioréacteur à perfusion

Ce bioréacteur peut être analysé comme un système réactif où la biomasse (X) agit comme un catalyseur pour convertir les nutriments alimentés en espèces métaboliques (espèces décrites par le vecteur S) tout en produisant plus de biomasse. Tel que mentionné précédemment, les réactions du système métabolique sont décrites par le vecteur v. Dans le cas où le bioréacteur est opéré en mode perfusion, la biomasse est retenue dans le système. De plus, on peut considérer que ce bioréacteur est parfaitement mélangé, donc que la concentration dans la sortie sera égale à la concentration dans la phase liquide. Un bilan sur les nutriments peut nous aider à établir une stratégie de culture adéquate pour stabiliser les concentrations intracellulaires. Pour simplifier le problème, nous considérerons ici un seul nutriment, soit le glucose. Ce nutriment a été choisi pour deux raisons. Premièrement, l'analyse de sensibilité dynamique nous montre

qu'une stabilisation des réserves de glucose est un facteur critique pour la productivité. De plus, il a été observé expérimentalement pour les cellules de *E. californica* que la concentration intracellulaire en glucose lors de l'élicitation est également un facteur critique pour la productivité cellulaire (Lamboursain et Jolicoeur, 2005). Il serait possible de tenter de stabiliser simultanément les réserves de glucose et d'azote, afin d'émuler le plus précisément possible l'approche identifiée précédemment par l'analyse de sensibilité (Figure 7.11), mais ceci impliquerait de modifier la composition du milieu de culture ou d'alimenter le glucose et l'azote séparément. Une telle approche serait probablement mieux servie par des outils de commande multivariée, ce qui n'est pas l'objet des travaux présents. De plus, si on utilise un milieu bien balancé en nutriments, on peut supposer que la stabilisation d'une des réserves intracellulaires pourra aider au maintient des autres réserves. Une équilibration du milieu de culture par des mesures de composition cellulaire serait probablement une avenue intéressante à ce chapitre, tel qu'observé par Matsubara et al. (1989).

Le bilan sur le glucose intracellulaire, tel que défini dans le modèle métabolique, s'écrit comme suit :

$$\frac{\partial GLC}{\partial t} = v_{31}(t) - v_1(t) - GLC \bullet \mu \qquad 7.3$$

où $v_{31}(t)$ est le taux de transport du glucose du milieu vers l'espace intracellulaire, $v_1(t)$ est le taux de consommation de glucose par les cellules et le terme GLC•μ représente la dilution du contenu intracellulaire par la croissance. Ce terme est généralement négligeable, mais cette hypothèse a tout de même été investiguée pour les cellules utilisées ici. Le détail de cette analyse est présenté à l'Annexe E et a permis de confirmer que la dilution est négligeable. Le bilan sur le glucose extracellulaire va nous permettre d'intégrer le taux de dilution dans l'analyse. Ce bilan s'écrit comme suit :

$$\frac{\partial EGLC}{\partial t} = D(t) \bullet \left(EGLC_{in} - EGLC\right) - v_{31}(t) \bullet X(t) \qquad 7.4$$

Si l'on pose l'hypothèse que l'alimentation en glucose par la perfusion est relativement lente par rapport au transport du glucose par les cellules, tout le glucose dans le débit d'alimentation sera ainsi assimilé et la concentration à la sortie (EGLC) sera négligeable. Dans ce cas, la dérivée du glucose extracellulaire peut être considérée nulle, puisque la concentration en EGLC sera faible et variera très peu. Ceci nous permet de simplifier le bilan comme suit :

$$v_{31}(t) \bullet X(t) = D(t) \bullet EGLC_{in} \qquad 7.5$$

Les deux hypothèses susmentionnées (EGLC = 0 et ∂EGLC/∂t = 0) ne sont pas nécessairement vérifiées, comme le montreront les résultats de culture, mais l'incidence

de ces déviations ne sera pas considérable, notamment parce les deux termes que l'on suppose nuls ($\partial EGLC/\partial t$ et $D(t) \bullet EGLC(t)$) auront tendance à s'annuler lorsque la concentration résiduelle en glucose extracellulaire n'est pas négligeable et cette concentration extracellulaire en glucose tendra vers zéro (voir section 7.4.2 pour plus de détails sur ce point).

On peut donc isoler $v_{31}(t)$ et le remplacer dans l'équation 7.3. Le terme de dilution par la croissance est également retiré de l'équation 7.3. Nous obtenons donc l'équation 7.6 pour le bilan sur le glucose intracellulaire :

$$\frac{\partial GLC}{\partial t} = \frac{D(t) \bullet EGLC_{in}}{X(t)} - v_1(t) \qquad 7.6$$

Et la résolution de l'équation 7.6 pour obtenir un régime permanent sur le glucose intracellulaire nous donnera le profil d'alimentation suivant :

$$D(t) = \frac{v_1(t) \bullet X(t)}{EGLC_{in}} \qquad 7.7$$

Évidemment, le taux de dilution variera dans le temps selon la quantité de biomasse présente dans le bioréacteur, ainsi que selon l'activité métabolique (taux de phosphorylation du glucose). Donc, la mesure (préférablement en ligne) de la

concentration en biomasse et du taux de consommation de glucose intracellulaire permettrait de moduler l'alimentation afin d'atteindre un régime permanent. D'autres options seraient également envisageables pour atteindre cet objectif, comme par exemple, implanter une boucle de commande avec le glucose intracellulaire comme variable contrôlée et le débit de perfusion comme variable manipulée. Cette approche serait similaire à la boucle de commande qui a été implantée au chapitre 6 pour la concentration cytoplasmique en Pi. Malheureusement, il serait ardu de mesurer en ligne la concentration intracellulaire de glucose. Une mesure hors-ligne serait envisageable, bien qu'un délai d'environ 1 heure serait nécessaire pour extraire et mesurer le glucose intracellulaire sur un échantillon. Et cette mesure effectuée pour une masse de cellules fraîches (FW) devrait être convertie pour avoir le GLC par unité de masse sèche (DW). Le ratio entre le FW et le DW varie beaucoup et il faut sécher les cellules pendant 24 heures pour avoir une bonne mesure du DW. Un estimé du DW devrait donc être utilisé pour la conversion, ce qui amènerait une erreur supplémentaire. Le même genre de problème serait rencontré au niveau expérimental pour l'estimation en ligne du flux $v_1(t)$.

Afin de pallier à ces problèmes, les estimations du modèle métabolique ont été utilisées pour déterminer le profil de $v_1(t)$. La Figure 7.13 présente le profil simulé du flux $v_1(t)$ pour la culture en cuvée avec la résine extractive (Figure 7.4). Ce profil est équivalent au taux de réaction 1 du Tableau 2 en Annexe B.

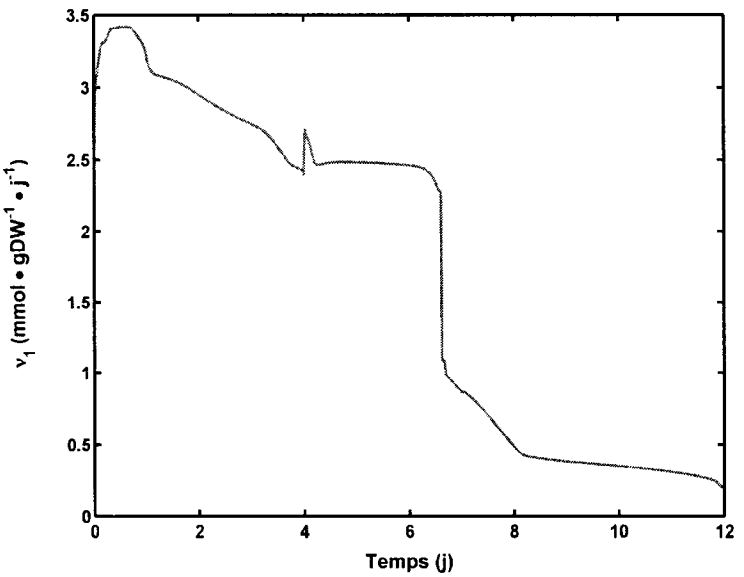


Figure 7.13 Taux de réaction pour le flux $v_1(t)$

On remarque que le taux de consommation de GLC varie durant les premiers jours de culture et qu'il se stabilise ensuite à environ 2,5 mmol•gDW^{-1}•j^{-1}, avant de diminuer après le 6e jour de culture. Dans la simulation, cette diminution après le 6e jour est causée par l'épuisement du glucose extracellulaire (voir Figure 7.4) et par la diminution du niveau en navettes énergétiques, nécessaire à la phosphorylation du glucose. Il est également intéressant de noter que la simulation donne une valeur relativement proche de ce qui est obtenu par les analyses enzymatiques. La simulation donne un flux qui varie entre 3,5 et 0,25 mmol•gDW^{-1}•j^{-1} alors que l'activité observée pour la glucokinase (Figure 7.1) variait entre 4 et 2,3 mmol•gDW^{-1}•j^{-1}. Il est cependant important de noter ici que les mesures d'activités enzymatiques *in vitro* ne peuvent pas être directement comparées aux valeurs simulées pour des flux *in vivo*. Mais l'obtention de valeurs expérimentales qui sont du même ordre de grandeur et légèrement plus élevées que les

valeurs simulées est attendue, puisque les valeurs obtenues *in vitro* représentent des conditions physiologiques idéales alors que la simulation représente des conditions *in vivo* probablement non idéales (limitations en substrats, limitations diffusionnelles, variations de pH ou de température etc.).

Nous retiendrons donc la valeur à laquelle se stabilise le flux $v_1(t)$ dans la simulation (2,5 $mmol \bullet gDW^{-1} \bullet j^{-1}$) et nous l'utiliserons dans l'équation 7.7 pour définir le taux de perfusion au bioréacteur. L'utilisation d'une valeur constante pourrait induire une erreur, mais en l'absence de mesure en ligne fiable sur le métabolisme du glucose, il est probablement préférable de se fier aux résultats obtenus précédemment plutôt que de tenter une estimation dynamique qui serait peut-être biaisée. La validité du flux $v_1(t)$ sera vérifiée *a posteriori* lorsque les résultats de culture seront disponibles. Nous obtenons donc une équation qui permet de fixer le débit d'alimentation de manière proportionnelle à la biomasse. Puisque la biomasse varie dans le temps et que les échantillons sont prélevés seulement une fois pas jour, un estimateur de biomasse, basé sur le bilan en O_2 dissous, a été développé (voir section 3.6, équation 3.3). Cet estimateur permet donc de préciser le terme X(t) pour ainsi définir complètement l'équation 7.7 sur toute la durée d'une culture.

L'algorithme suivant est donc proposé pour effectuer une culture en bioréacteur à perfusion dans une optique de stabilisation des réserves intracellulaires :

Tableau 7-1 Algorithme proposé pour la culture en perfusion

Étape	Jours de culture	Taux de perfusion (j^{-1})	Milieu utilisé
Adaptation	0 à 2	0	---
Croissance	2 à t_e*	$D(t) = \frac{v_1 \bullet \hat{X}(t)}{EGLC_{in}}$	B5**
Élicitation	t_e à $t_e + 1$	0.4	P + chitine**
Production	$t_e + 1$ à 15	$D(t) = \frac{v_1 \bullet \hat{X}(t)}{EGLC_{in}}$	P + chitine**

* t_e, le moment auquel est élicitée la culture, est défini comme étant le jour où la concentration en biomasse atteint 8-9 $gDW \bullet L^{-1}$

** La composition des milieux de culture est donnée à l'Annexe A

Premièrement, les cellules seront perfusées avec un milieu de croissance jusqu'à ce que la biomasse atteigne la valeur moyenne obtenue en phase stationnaire lors des cultures précédentes en cuvée, soit entre 8 et 9 $gDW \bullet L^{-1}$. Puisque les cellules auront certainement accumulé des réserves, la croissance continuera après ce point. Mais en perfusant un milieu de production sans Pi pour la suite de la culture, nous limiterons la croissance afin de ne pas causer de problèmes au niveau de la capacité de transfert et de mélange du bioréacteur. De plus, tel qu'observé par De Dobbeleer et al. (2006) le bioréacteur à perfusion est plus performant pour des densités cellulaires moins élevées, il faut donc user de prudence avec une culture éventuellement plus dense. Des résultats de simulation du modèle métabolique pour l'implantation de cet algorithme montrent que la biomasse atteindrait une concentration entre 12 et 14 $gDW \bullet L^{-1}$ durant la phase stationnaire. D'un point de vue de l'efficacité du bioprocédé, cette concentration supérieure en biomasse est même désirable puisque la productivité volumétrique du système est ainsi augmentée.

Les paramètres de culture ont été légèrement modifiés par rapport aux expériences en cuvée. Premièrement, pour la culture en mode cuvée, l'élicitation se faisait de manière ponctuelle, par un ajout de 400 mL de milieu B5 contenant les résines extractives et l'agent éliciteur. D'un point de vue pratique, cette approche n'est pas idéale puisqu'elle cause une variation de volume non négligeable dans le bioréacteur. De plus, l'ajout de l'agent éliciteur de manière ponctuelle a tendance à provoquer la formation de mousse. C'est pourquoi l'élicitation sera faite ici de manière continue, soit par la perfusion d'un milieu de production contenant l'agent éliciteur. Afin de ne pas induire un biais expérimental, le milieu de production perfusé au bioréacteur contient exactement la même concentration d'agent éliciteur que la concentration utilisée lors des cultures opérées en cuvée, soit 3,3 $g \cdot L^{-1}$. La phase d'élicitation d'une journée (Tableau 7-1) servira donc à remplacer une bonne proportion du milieu de culture par le milieu de production (contenant la chitine). Par la suite, les cellules seront constamment soumises à la perfusion d'un milieu de production contenant l'agent éliciteur. Puisque l'on peut s'attendre à obtenir une concentration en biomasse plus élevée, la concentration en résines extractive dans le bioréacteur devra être plus élevée pour garder la même efficacité d'extraction. Il a donc été décidé de commencer l'élicitation avec la même concentration en résines ($60 g \cdot L^{-1}$) que pour la culture cuvée et d'ajuster par la suite cette concentration afin de garder le même ratio résines/biomasse. Pour des raisons pratiques, la concentration en résines a été ajustée par des ajouts ponctuels. Au 7e jour de culture, la concentration en résines a été augmentée à 75 $g \cdot L^{-1}$ et au 11e jour, un autre ajout a été

effectué, pour porter la concentration en résines à 85g•L^{-1}. Lors de la phase stationnaire, le ratio massique résines/biomasse était donc de 5,9, soit pratiquement la même valeur que lors de la culture en mode cuvée (5,5).

7.4.2 Résultats et analyse

La Figure 7.14 montre les variables d'état du système qui ont été utilisées pour l'implantation de l'estimateur de biomasse et pour l'algorithme de culture en perfusion. La Figure 7.14 présente également une comparaison entre la biomasse estimée en ligne par le bilan sur l'O_2 et les résultats de mesure de biomasse hors-ligne.

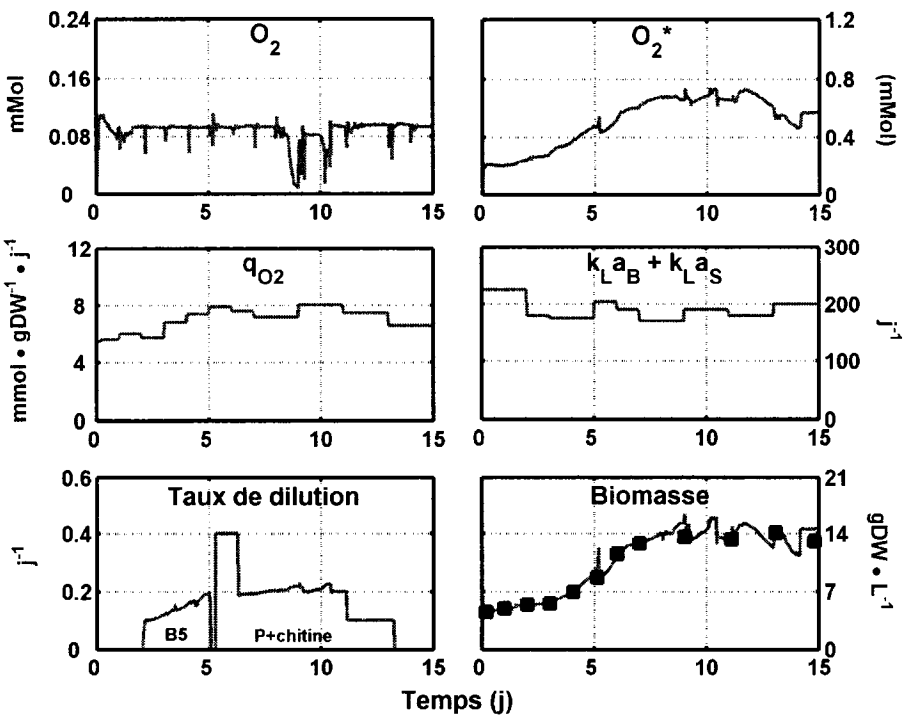


Figure 7.14 Implantation de l'algorithme de culture en perfusion

La perfusion de milieu de croissance aura donc été effectuée entre le 2e et le 5e jour de culture, moment où la concentration en biomasse a atteint 8,67 gDW•L^{-1}. La phase d'élicitation a donc eu lieu entre le 5e et le 6e jour et par la suite, la perfusion du milieu de production a continué jusqu'au 12e jour de culture. Après élicitation, une concentration en biomasse pratiquement constante entre 12 et 14 gDW•L^{-1} a été observée, tel que prévu par la modélisation. C'est pourquoi le taux de perfusion a été pratiquement constant à 0,2 j^{-1} entre le 6e et le 11e jour de culture, tel que calculé par l'équation 7.7. Par la suite, le taux de perfusion a été diminué à 0,1 j^{-1} et complètement arrêté pour des raisons pratiques. Puisque la densité cellulaire était relativement élevée et que les cellules étaient plus âgées, la décantation était moins efficace, ce qui aurait pu provoquer une perte de biomasse par le système de perfusion. Le bioréacteur à perfusion a été développé pour des cultures cuvée de 10-14 jours atteignant une densité entre 10 et 12 gDW•L^{-1}. Mais il a été observé avec *E. californica* que la sédimentation est moins efficace pour des cellules âgées (9 jours de culture et plus) et pour une densité plus élevée (De Dobbeleer et al., 2006). Les conditions de cultures rencontrées lors des présents travaux, soit une densité cellulaire de 13-14 gDW•L^{-1} pour une culture de 15 jours, dépassent donc légèrement les limites à l'intérieur desquelles le bioréacteur avait été développé. Le système de perfusion est suffisamment performant pour la stratégie d'alimentation développée ici, notamment parce que les taux de perfusion nécessaires pour alimenter les cellules sont relativement bas (0.1-0.4j^{-1}) comparativement aux taux

de perfusion utilisés par De Dobbeleer et al. (2006) pour l'extraction des alcaloïdes ($5\text{-}20j^{-1}$).

La Figure 7.15 montre les résultats de simulations et les variables métaboliques et nutritionnelles mesurées hors-ligne. Le modèle métabolique utilisé pour simuler ce système est le même que celui utilisé précédemment (Annexe B). Les paramètres cinétiques (v_{max}, K_m) n'ont pas été adaptés pour mieux décrire les données. Seules les conditions initiales ont été modifiées pour bien décrire l'état initial de la culture. Le modèle est donc utilisé ici de manière prédictive.

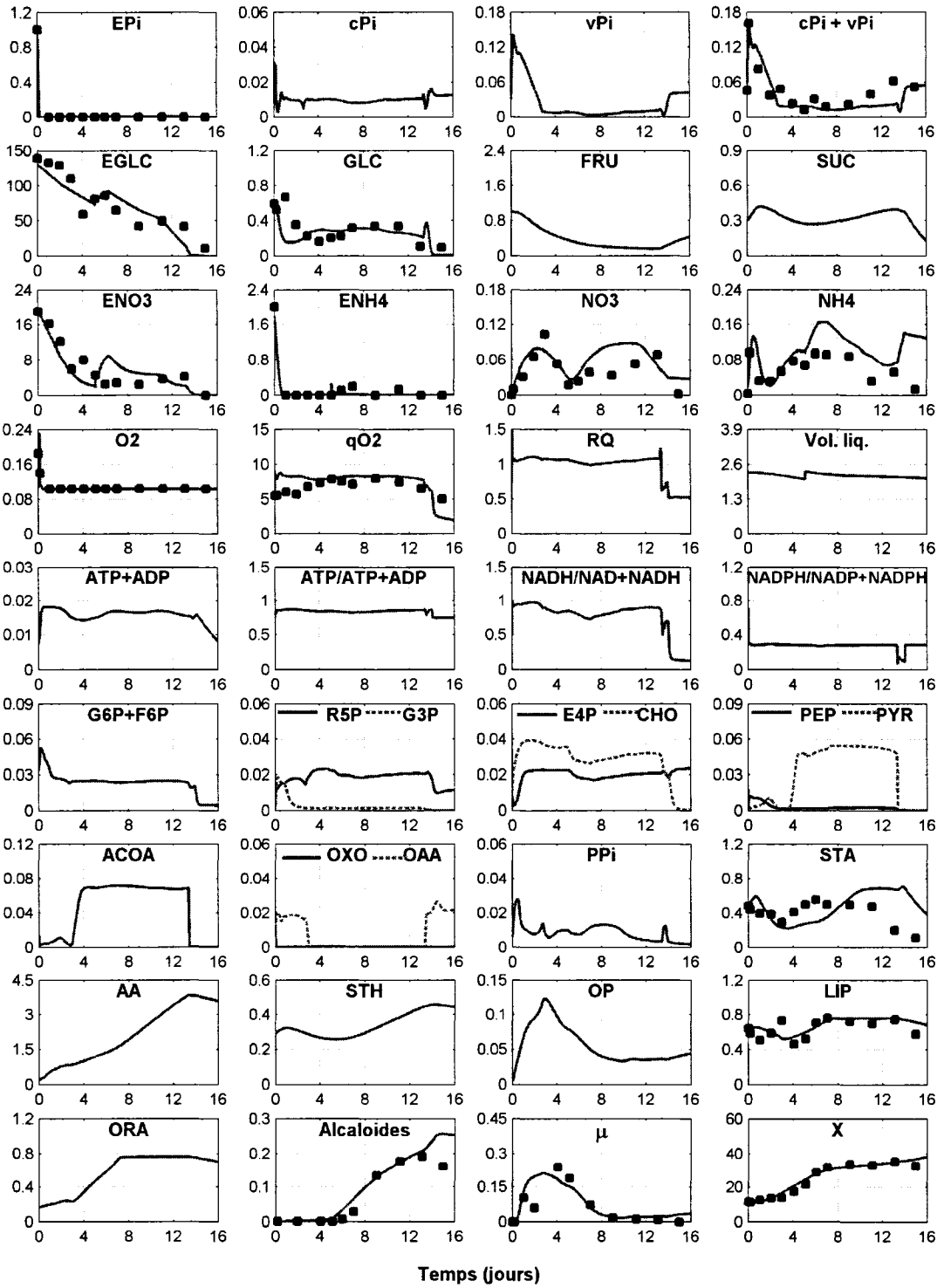


Figure 7.15 Résultats expérimentaux et simulation de la culture en perfusion. La même légende que pour la Figure 7.3 s'applique.

On remarque que les prédictions du modèle concordent relativement bien avec les résultats expérimentaux, bien que des déviations majeures soient observées vers la fin de la culture. Ceci n'est pas surprenant, puisque le modèle a été calibré avec des données provenant de cultures en cuvée de 11 jours et non pas avec des cultures en perfusion d'une plus longue durée, comme celle effectuée ici. La culture d'une plus longue durée pourrait être sujette à des phénomènes non décrits par le modèle, comme une maintenance ou une mortalité cellulaire plus importantes.

L'algorithme de stabilisation du GLC semble avoir bien fonctionné. On remarque que le GLC a été stabilisé entre le 2e et le 11e jour de culture à une valeur moyenne de 0,28 ± 0,07 mmol•gDW^{-1}. La prédiction du modèle pour le GLC concorde très bien avec les résultats expérimentaux. Les réserves intracellulaires en azote n'ont pas été stabilisées, mais elles ont au moins été maintenues à des niveaux suffisants pour que les cellules ne soient pas limitées.

L'effet du maintient des réserves sur la production d'alcaloïdes est clairement observé. La production spécifique d'alcaloïdes a atteint un maximum de 0,192 mmol•gDW^{-1}, au 13e jour de culture, soit 75% de plus que la production après le 11e jour de culture en mode cuvée (0,11 mmol•gDW^{-1}). Ce résultat concorde très bien avec la prédiction obtenue par l'analyse de sensibilité. La Figure 7.16 présente une comparaison dans le

temps entre les résultats expérimentaux de production totale d'alcaloïdes pour les trois expériences réalisées ici.

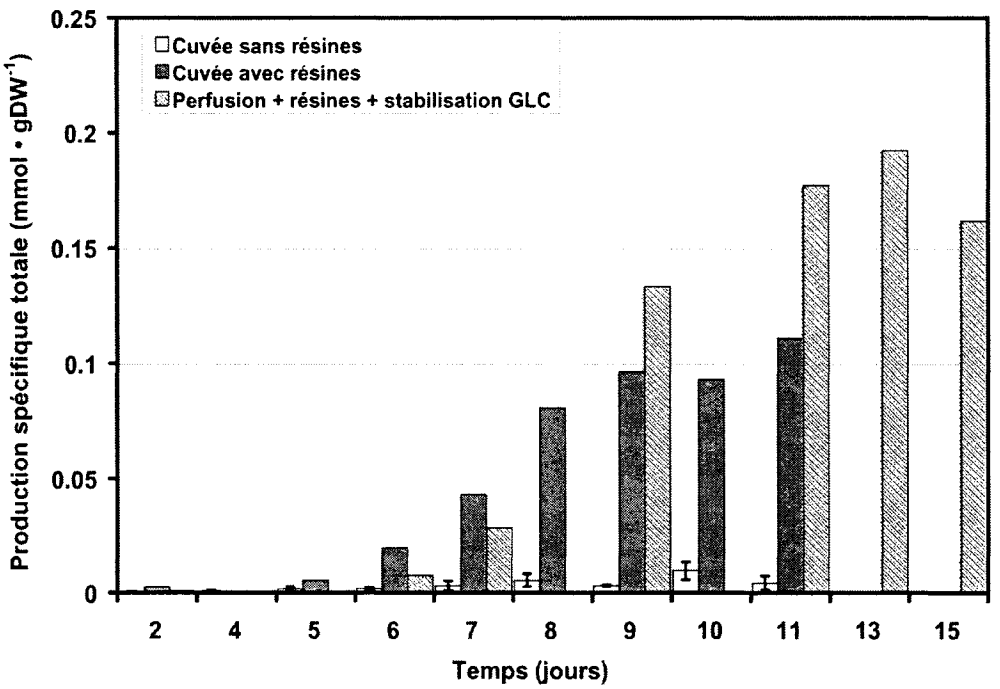


Figure 7.16 Résultats expérimentaux de production spécifique totale d'alcaloïdes (intracellulaire + extracellulaire + résines) pour les expériences en bioréacteur.

On remarque donc que la stratégie de perfusion identifiée par l'analyse de sensibilité et implantée ici a bien eu l'effet prédit par le modèle, soit une augmentation de la production totale d'alcaloïdes. Cet effet est surtout remarqué entre les jours 9 et 13, où la production spécifique totale pour la culture en perfusion atteint une valeur 75% plus élevée que pour la culture opérée en mode cuvée. Puisque le modèle semble avoir bien prédit l'implantation de cette stratégie de culture (Figure 7.15), il sera intéressant de

comparer les prédictions du modèle et les résultats expérimentaux pour la production spécifique totale d'alcaloïdes. Cette comparaison est présentée à la Figure 7.17.

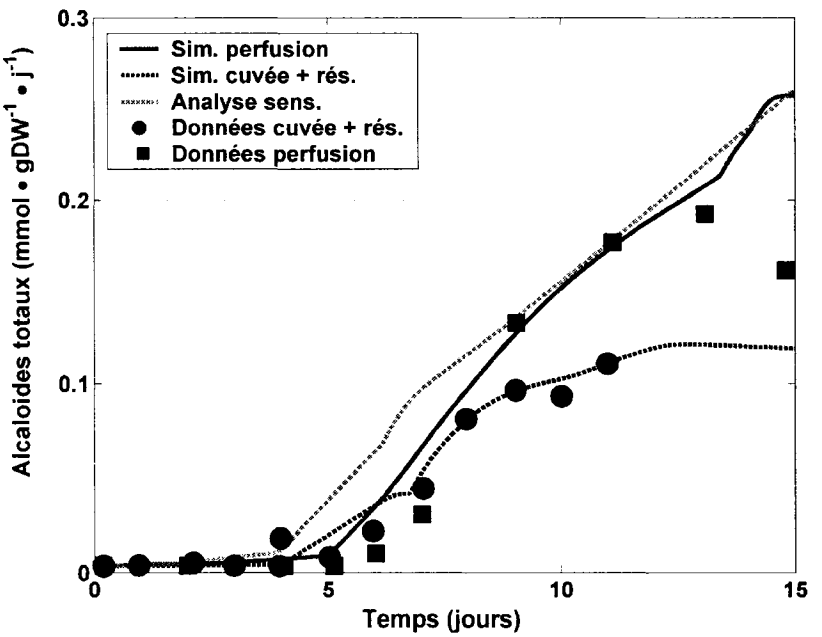


Figure 7.17 Comparaison des résultats (expérimentaux et simulations) pour la production totale spécifique.

La seule déviation majeure du modèle se produit à la fin de la culture en perfusion, où le modèle prédit que la production d'alcaloïdes continue au delà du 13e jour, un résultat qui n'est pas confirmé expérimentalement. Ceci peut être dû à plusieurs phénomènes. Tel que mentionné précédemment, un élément non inclus dans le modèle ou un phénomène mal décrit par la modélisation pourrait limiter la production d'alcaloïdes. Il est également possible que l'on observe expérimentalement une dégradation du produit, un autre phénomène qui n'est pas inclus dans le modèle. De plus, on remarque une bonne

similitude entre la courbe simulée de la culture en perfusion et la courbe issue de l'analyse de sensibilité dynamique. La simulation pour l'analyse de sensibilité dynamique avait été faite en bloquant les concentrations intracellulaires en GLC et en NO3-NH4 (dérivée nulle en tout temps), ce qui représente une opération idéale impossible à réaliser expérimentalement. Il est certainement possible de stabiliser les réserves intracellulaires, mais pas sur toute la durée de la culture, comme nous le montrent les résultats expérimentaux. Les résultats simulés de production totale d'alcaloïdes pour la culture en perfusion concordent cependant très bien avec le résultat de l'analyse de sensibilité. Ceci confirme donc que la stratégie de perfusion a réussi à émuler l'approche identifiée par l'analyse de sensibilité dynamique. De plus, un autre avantage de la stratégie proposée ici est que la perfusion d'un milieu de croissance (jour 2 à 5) a permis d'obtenir une concentration en biomasse 33% plus élevée par rapport à la culture cuvée (14,1gDW•L^{-1} versus 10,6). La production volumétrique d'alcaloïdes totaux a donc été augmentée de 132% (2,7 mM en perfusion versus 1,16 mM en cuvée). Globalement, la production d'alcaloïdes a atteint 67,2 mg•gDW^{-1} ou 6,7% du poids sec des cellules. Il n'est pas évident de comparer rigoureusement cette valeur à ce qui est rapporté dans la littérature, puisque les méthodes de mesures sont souvent très différentes ou alors l'analyse est concentrée sur une seule molécule et non pas sur la production totale. Généralement, les résultats observés dans la littérature pour les rendements massiques en alcaloïdes vont de quelques µg par gDW à quelques dizaines de mg par gDW, tel que rapporté par Misawa (1994). Le résultat obtenu ici (67 mg•gDW^{-1}) est donc réaliste et semble indiquer que le bioprocédé a été relativement

bien opéré. Cependant, il est envisageable de continuer l'optimisation de bioprocédé. Tel que mentionné précédemment, les conditions de cultures du bioprocédé ne sont probablement pas toutes optimales. Les résultats obtenus ici ont clairement montré qu'à partir d'un mode opératoire typique (cuvée avec utilisation d'une phase extractive et d'un éliciteur), il est possible d'utiliser le modèle métabolique cinétique pour identifier et implémenter une stratégie de culture intéressante.

Une des hypothèses utilisées pour développer la stratégie de perfusion était que le flux v_1 avait une valeur de 2,5 mmol•gDW^{-1}•j^{-1}. Puisque le modèle semble relativement bien prédire les résultats de culture, nous pouvons vérifier si le flux simulé v_1 correspond bien à ce qui est attendu. La Figure 7.18 présente le profil simulé de ce taux de réaction métabolique.

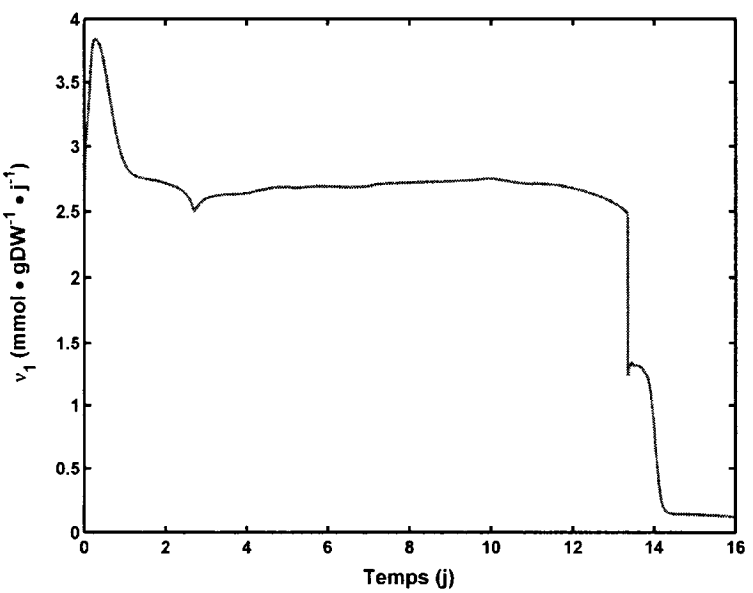


Figure 7.18 Profil simulé de v_1 pour la culture en perfusion

On remarque que la valeur constante de 2,5 mmol•gDW^{-1}•j^{-1} utilisée pour implanter l'algorithme concorde très bien avec la prédiction du modèle entre le 2e et le 13e jour de culture. La valeur simulée pour $v_1(t)$ durant cette période varie entre 2,5 et 2,7 mmol•gDW^{-1}•j^{-1} avec une valeur moyenne de 2,65 mmol•gDW^{-1}•j^{-1}. Cette valeur moyenne de $v_1(t)$ est donc seulement 6% supérieure à la valeur utilisée pour fixer le débit de perfusion. Malgré la précision, on remarque tout de même que l'hypothèse d'une concentration résiduelle négligeable en EGLC n'est pas vérifiée expérimentalement (voir Figure 7.15, EGLC). Cependant, on remarque que cette concentration tend à diminuer (la dérivée dEGLC/dt est négative durant presque toute la phase de perfusion). Donc, ultimement, le système tendrait vers une concentration résiduelle nulle en EGLC et les hypothèses utilisées pour établir le débit de perfusion seraient potentiellement vérifiées. Une façon de procéder ici pour que l'hypothèse soit vérifiée dès le début de la phase de perfusion serait de commencer la culture avec une concentration en EGLC plus faible. Cependant, il s'agirait là d'une perturbation supplémentaire qui pourrait avoir des conséquences inattendues sur le comportement cellulaire. Il serait possible d'améliorer la performance de l'algorithme utilisé ici pour la culture en perfusion. Par exemple, l'équation 7.7 permet de stabiliser les réserves intracellulaires en GLC, mais aucun point de consigne ne peut être spécifié, ce qui fait que la concentration intracellulaire atteint un point d'équilibre défini par la dynamique du système. Il serait peut-être possible de réellement contrôler cette valeur de concentration en GLC, mais tel que mentionné précédemment, ceci impliquerait une

mesure en ligne ou une estimation très précise par le modèle de la concentration en GLC. Bien que l'approche de stabilisation présentée ici semble fonctionner, une approche de commande de procédé plus élaborée pourrait peut-être produire de meilleurs résultats. La stratégie de perfusion présentée ici a cependant l'avantage d'être relativement simple et elle exige seulement une estimation de la biomasse et du taux de réaction $\nu_1(t)$.

7.5 Conclusions

Une modélisation cinétique du métabolisme des cellules de pavot de Californie a été appliquée à des cultures en bioréacteur. Cette modélisation a permis de bien décrire les résultats expérimentaux obtenus pour des cultures en bioréacteur élicitées avec et sans ajout de résines extractives. Des mesures d'activité enzymatique ont été effectuées pour préciser la simulation du taux de réaction des hexokinases en fonction du glucose extracellulaire. La modélisation permet, entre autres, de bien quantifier les cinétiques du métabolisme primaire et la production d'alcaloïdes totaux par les cellules. Le modèle a été utilisé pour développer une approche d'analyse de sensibilité dynamique. Cette analyse de sensibilité dynamique permet de simuler, dans le temps, les variations de production spécifique suite à un changement de paramètre sur le métabolisme (niveau enzymatique) ou suite à un changement de condition de culture (concentration initiale). Cette analyse a mené à la conclusion qu'une stabilisation des réserves intracellulaires de glucose et d'azote était désirable pour augmenter la production spécifique. Cette stratégie de culture (stabilisation des réserves intracellulaires) a été implantée

expérimentalement. Un profil d'alimentation pour une culture en perfusion a donc été développé à l'aide des bilans de masse et estimations du modèle. Lors des phases de croissance et de production, le débit de perfusion était ajusté selon la demande cellulaire globale en glucose. Cette stratégie a permis de stabiliser les réserves intracellulaires de glucose et une augmentation de 75% de la production spécifique a été observée. Ce résultat concorde avec les prédictions obtenues par l'analyse de sensibilité dynamique. De plus, la stratégie de culture proposée permet également d'augmenter la concentration en biomasse dans le bioréacteur de 33% par rapport à une culture cuvée, ce qui améliore d'autant plus la productivité volumétrique du système. En tenant compte de l'augmentation de production spécifique (+75%) et de l'augmentation de concentration en biomasse (+33%), la productivité globale en alcaloïdes totaux a été augmentée de 132% avec une production de 2,7 mM (ou 0,95 $g \cdot L^{-1}$) d'alcaloïdes totaux pour la culture en perfusion. L'approche développée ici a permis de bien décrire et analyser les interactions possibles entre la nutrition cellulaire, le métabolisme primaire et la production de métabolites secondaires par les cellules de plantes. L'analyse systématique et intégrative du métabolisme végétal et des dynamiques de cultures à l'aide du modèle métabolique a donc permis de développer et d'implanter expérimentalement une stratégie de culture très performante. D'autres avenues pour améliorer la production spécifique d'alcaloïdes ont également été identifiées par la modélisation (modulation des niveaux enzymatiques ou du milieu de culture), mais n'ont pas été implantées expérimentalement. Il s'agirait là de pistes intéressantes pour des recherches futures. De plus, les outils de modélisation et d'analyse de sensibilité

dynamique développées et présentés dans le cadre de ces travaux pourraient aisément être transposés à d'autres espèces végétales ou à d'autres cultures cellulaires.

CHAPITRE 8: DISCUSSION GÉNÉRALE

Les travaux présentés dans cette thèse ont permis d'avancer notre connaissance et notre compréhension des bioprocédés utilisant des cellules végétales. La modélisation cinétique, qu'elle soit nutritionnelle (chapitre 4) ou métabolique (chapitres 5 à 7) a permis de faire ressortir des résultats originaux. Deux points particuliers ressortent clairement de ces travaux : l'approche *intégrative* et la considération des *dynamiques* ont été continuellement présentes.

La modélisation nutritionnelle peut être qualifiée d'intégrative puisqu'elle est la première de la sorte à considérer les trois nutriments constitutifs majeurs des cultures végétales. Ceci a permis d'identifier certaines propriétés qui n'auraient pas été observées avec une analyse (même plus approfondie) basée sur un seul nutriment. La considération des dynamiques nutritionnelles a permis d'observer que des facteurs cintétiques (transport des nutriments) peuvent expliquer les différences entre des cellules (croissance rapide) et des racines (croissance lente).

Toute l'approche de modélisation métabolique est également très intégrative. On y retrouve toujours les trois nutriments constitutifs majeurs, mais de plus, les phénomènes métaboliques importants pour la croissance et la production de métabolites secondaires sont inclus. Bien que cette modélisation soit inévitablement approximative, l'approche intégrative s'avère très importante pour identifier les propriétés de base du système

(flux, croissance, production), tel qu'observé au chapitres 5. Ces propriétés ne sont d'ailleurs pas constantes dans le temps, ce qui rend l'approche dynamique d'autant plus pertinente.

L'application de commande présentée dans ces travaux (chapitre 6) a fait appel à la capacité prédictive du modèle pour intégrer les différents phénomènes reliés au métabolisme du phosphate. Un modèle plus simplifé aurait peut-être pu être utilisé à cette étape, mais ce modèle aurait fort probablement perdu la capacité de modéliser autant les cinétiques lentes (croissance) que les cinétiques rapides (accumulation et mobilisation du Pi).

Finalement, le modèle, une fois bien développé, permet de mieux comprendre les cinétiques de production en bioréacteur et de bien saisir les interactions entre les trois nutriments majeurs et leur implication dans la croissance et la production de métabolites secondaires. Encore une fois, une approche simplifiée ou non-cinétique n'aurait probablement pas permis d'obtenir les mêmes résultats.

L'*intégration* des phénomènes et considération des *dynamiques* sont d'ailleurs à l'avant-plan de la biologie intégrative des systèmes (*systems biology*), une approche qui gagne beaucoup en crédibilité dernièrement dans la recherche touchant à la biologie. Il va sans dire qu'une continuation de cette approche avec les cellules végétales est éminement souhaitable. Cela permet ainsi de complémenter la grande quantité de connaissance qui

a découlé de l'approche traditionnelle de recherche en biologie, c'est-à-dire par l'*isolation* et l'analyse d'un phénomène dans des conditions *invariantes*. Les deux approches (traditionnelle et intégrative) devront définitivement progresser ensemble afin de maximiser notre compréhension des systèmes biologiques. Les travaux et résultats présentés dans cette thèse ne sont qu'un exemple parmi tant d'autres montrant que cette approche est pertinente.

CHAPITRE 9: CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS

« La carte n'est pas le territoire »

-Alfred Korzybski

9.1 Conclusion

Cette thèse de doctorat proposait des approches de modélisation cinétique du métabolisme des cellules végétales dans une optique de commande et d'optimisation de bioprocédé pour la production de métabolites secondaires. Quatre objectifs principaux ont été poursuivis afin d'arriver à développer des outils analytiques et expérimentaux efficaces pour améliorer la compréhension du métabolisme des cellules végétales.

Premièrement, un modèle cinétique pour la nutrition végétale a été appliqué à trois espèces distinctes dont deux cultures de tissus et une culture en suspension. Cette approche a permis de constater qu'une base commune d'équations cinétiques et de bilans de masse peut être utilisée pour modéliser les mêmes phénomènes pour des espèces végétales et des conditions de cultures diverses. De plus, il a été vérifié que la modélisation des dynamiques nutritionnelles par une approche cinétique permet de prédire les résultats de cultures pour des conditions différentes. Le modèle a été développé avec des cultures cuvées et il a été montré qu'il pouvait prédire les résultats de cultures en mode cuvée-alimentée. Ceci a permis d'émettre l'hypothèse qu'un

modèle cinétique plus élaboré (pour le métabolisme) pourrait avoir les mêmes propriétés d'adaptabilité et de prédiction. Le modèle nutritionnel proposé lors de ces travaux est également le premier du genre à intégrer les dynamiques intracellulaires pour les trois nutriments constitutifs majeurs (phosphate, azote, carbone) des cellules végétales, ce qui lui permet de modéliser des cultures avec précision, sans qu'il soit nécessaire d'en connaître le nutriment limitant. Ce modèle est relativement simple à utiliser et adapter, il pourrait donc éventuellement être utilisé pour d'autres espèces ou pour des études de criblage sur la nutrition végétale.

Deuxièmement, un modèle partiellement cinétique développé pour le métabolisme primaire des racines transformées de *C. roseus* a été modifié pour inclure les cinétiques du métabolisme primaire central. Le modèle a été calibré avec des données expérimentales de cultures cuvées provenant de travaux antérieurs. Cette modélisation a permis de visualiser à la fois les concentrations et les flux dans le temps, ce qui donne une cartographie relativement élaborée du métabolisme. Cette approche a permis d'identifier un phénomène physiologique très peu mentionné dans la littérature scientifique sur le métabolisme végétal, soit la circulation du Pi entre sa forme libre et son allocation sur les métabolites phosphatés. Il a été observé que ce taux de circulation du Pi est très élevé ($\approx$2 mmol•gDW^{-1}•j^{-1}) par rapport aux autres flux du métabolisme primaire ($\approx$0.01-1 mmol•gDW^{-1}•j^{-1}). Il pourrait s'agir là d'un paramètre physiologique très important, puisqu'une corrélation entre le taux de circulation du Pi et le taux de croissance a été observée. Le modèle présenté dans ces travaux est le premier modèle

métabolique décrivant les cinétiques du métabolisme primaire pour des cultures de tissus végétaux.

Ensuite, le modèle métabolique cinétique a été appliqué à des cultures en suspension de cellules d'*E. californica*, ainsi qu'à des cultures en perfusion effectuées dans un minbioréacteur avec un suivi en ligne par RMN sur le ^{31}P. Quelques modifications mineures ont été apportées à la structure du modèle afin de bien décrire les données expérimentales et les particularités de la lignée. Premièrement, une modification des voies menant au métabolisme secondaire a été effectuée pour que le modèle puisse décrire éventuellement l'accumulation d'alcaloïdes benzophénanthridines par *E. californica*. Les modifications majeures apportées au modèle à cette étape des travaux portèrent cependant sur la description du métabolisme du Pi et sur l'effet régulateur du Pi sur les voies du métabolisme primaire. Les dynamiques plus lentes (croissance, synthèse de macromolécules) ont été identifiées avec des cultures cuvées en flacon Erlenmeyer. Le minibioréacteur avec suivi par RMN a permis d'obtenir des données quantitatives sur les concentrations en Pi (cytoplasmique et vacuolaire), ATP, ADP ainsi que pour les phosphomonoesters (PME). Des expériences d'identification de paramètres (réponse à un échelon, réponse à une impulsion) ont été effectuées pour le métabolisme du Pi en modulant le milieu de culture perfusé au minibioréacteur. Ces expériences ont permis d'identifier les dynamiques rapides ($\approx$ heures) du métabolisme du Pi, notamment la translocation du Pi entre la vacuole et le cytoplasme et l'effet de la concentration cytoplasmique en Pi sur la synthèse des PME. De plus, la réponse du métabolisme

énergétique de la cellule a été quantifiée et a permis de bien calibrer les voies de synthèse et de dégradation de navettes énergétiques (ATP, ADP). Le modèle ainsi calibré a été utilisé pour mettre au point une boucle de commande sur la concentration cytoplasmique en Pi. Le CPi a donc été contrôlé en utilisant la concentration extracellulaire en Pi dans l'alimentation du minbioréacteur comme variable manipulée. Cette boucle de commande a été implantée expérimentalement. Bien que les résultats expérimentaux aient montré une certaine variabilité, il a été possible de maintenir, en moyenne, le CPi à 14% du point de consigne pendant 5 heures.

Finalement, le modèle métabolique cinétique développé pour *E. californica* a été appliqué à des cultures en bioréacteur. Les échantillons prélevés lors de cultures en mode cuvée ont permis d'effectuer plusieurs mesures sur le métabolisme (nutriments, métabolites, produits, activités enzymatiques). Ces mesures ont été utilisées pour calibrer le modèle sur des cultures cuvées en bioréacteur. Deux types de cultures ont été analysées : avec et sans résines extractives. Le modèle calibré a été soumis à une analyse de sensibilité dynamique. Cette approche a permis d'identifier des conditions de culture critiques pour le maintien de la productivité des cellules en alcaloïdes totaux. La stratégie la plus intéressante pour augmenter la productivité s'est avérée être un maintien des ressources intracellulaires en glucose et en azote. Cette possibilité a donc été implantée expérimentalement à l'aide d'un bioréacteur à perfusion. Les résultats obtenus concordent très bien avec les prédictions du modèle métabolique. La stratégie de culture ainsi développée a permis une augmentation de 75% de la productivité spécifique et une

augmentation de 132% de la productivité volumétrique du bioréacteur par rapport à une culture en mode cuvée. Cette production volumétrique s'élevait donc à 2,3 mM, ou 0,95 $g \cdot L^{-1}$.

9.2 Recommandations et perspectives de recherche

Les travaux présentés dans cette thèse ont permis de voir qu'un modèle descriptif, pour peu qu'il soit suffisamment précis dans sa description d'un phénomène biologique, peut être un outil très puissant pour analyser ledit phénomène. Les outils de modélisation nutritionnelle et métabolique développés lors de ces travaux ont non seulement permis de décrire des phénomènes biologiques observés expérimentalement sur la nutrition et le métabolisme des cellules végétales, mais ils ont également permis de prédire certains de ces phénomènes. Ces deux attributs (capacité de description et de prédiction) de la modélisation cinétique peuvent être utilisés de manière bien distincte lors de travaux futurs. Les utilisations possibles de la capacité descriptive et de la capacité prédictive du modèle peuvent donc s'enligner sur deux axes de recherches parallèles. Ces deux approches vont dans le sens préconisé par la biologie intégrative des systèmes en permettant une meilleure intégration des données expérimentales et une meilleure compréhension des cellules végétales en tant que système. Finalement, en ce qui concerne spécifiquement l'organisation des données et des connaissances, le modèle métabolique est l'outil désigné pour établir une base centrale de données et d'analyse qui peut ensuite être utilisée par la communauté scientifique.

9.2.1 Améliorer et utiliser la capacité descriptive du modèle

Premièrement, la capacité des modèles nutritionnels et métaboliques présentés ici à décrire les phénomènes se produisant lors de cultures de cellules végétales peut être utilisée pour faire avancer notre compréhension de ces phénomènes. Le modèle métabolique présenté dans le cadre de ces travaux a permis de décrire les profils temporels de concentrations et de flux métaboliques. Les profils de concentration ont été comparés avec des données expérimentales, mais non les profils de flux. Un modèle cinétique tel que celui présenté ici pourrait éventuellement décrire et prédire, dans le temps, les flux et les concentrations en métabolites. Mais ceci nécessiterait d'obtenir des données de flux et de concentrations et ce, pour une seule espèce cellulaire et pour des conditions expérimentales bien définies. Ceci n'est évidemment pas impossible, surtout avec l'émergence des techniques expérimentales à haut débit.

Il a également été observé que le modèle peut donner des estimations de flux et de vitesses maximales de réaction qui concordent avec des mesures d'activité enzymatique. Une avenue très intéressante à ce chapitre serait d'améliorer notre description de la régulation *in vivo* à l'aide de ces informations que donnent les analyses enzymatiques. Les résultats préliminaires présentés ici montrent que l'utilisation de données *in vitro* sur les hexokinases peut améliorer notre description de la régulation métabolique. Il pourrait alors être intéressant de systématiser cette approche en analysant les propriétés enzymatiques pour des cultures effectuées dans diverses conditions (limitation en Pi, en azote, en O2, phase de croissance ou production etc.). De plus, il est maintenant facile

d'obtenir des données d'expression génétique ('transcriptome') rapidement et à grande échelle. Et le génome d'*Arabidopsis thaliana* est maintenant complètement séquencé. Comme ce fut le cas pour les bactéries il y a une dizaine d'année, il serait envisageable de commencer la construction d'un modèle à grande échelle pour le métabolisme des cellules végétales. Les données de concentrations en métabolites et de flux métaboliques permettent la mise au point d'un modèle précis dans sa description des réactions de base de la cellule, mais l'ajout de données enzymatiques et de données de transcription génétique pourrait ajouter un niveau de description au modèle. Cependant, il s'agirait là d'un projet à très long terme, ne serait-ce qu'à cause de la complexité de la régulation génétique chez les plantes (par rapport aux bactéries). L'approche de modélisation cinétique des voies du métabolisme a montré une grande capacité de description des phénomènes observés expérimentalement, alors il s'agit là d'un axe de recherche qui mérite certainement notre attention. Le modèle permet de rendre plus systématique et plus intégrative notre analyse des données expérimentales disponibles. Puisque ces données sont produites maintenant en quantités de plus en plus considérables par les méthodes à haut débit, un outil permettant l'intégration et la réconciliation des données sera d'autant plus utile.

Finalement, le modèle a montré une bonne capacité de description des phénomènes métaboliques, mais certaines limites ont été remarquées au niveau de la description du bioprocédé dans son ensemble. Par exemple, la production d'alcaloïde décrite par le modèle n'a pas été fragmentée pour décrire les différents bassins (intracellulaire,

extracellulaire, extraits par les résines). Il serait alors très intéressant d'inclure les phénomènes de sécrétion et d'adsorption dans la modélisation, pour ainsi être en mesure de faire une optimisation beaucoup plus ciblée. Par exemple, on pourrait vouloir optimiser non pas la quantité totale d'alcaloïdes, mais la quantité d'alcaloïdes adsorbés dans les résines, puisque ceux-ci sont plus aisément récupérés. Avec une bonne description des voies du métabolisme secondaire, il serait également envisageable d'optimiser la productivité pour un alcaloïde en particulier. Une meilleure description de la mortalité et de la dégradation du produit constitueraient également des améliorations importantes à amener au modèle. Le modèle serait ainsi encore plus précis dans sa prédiction des résultats expérimentaux et il pourrait même être utilisé pour identifier le moment auquel la récolte du produit doit s'effectuer.

9.2.2 Utiliser la capacité prédictive du modèle

L'autre axe sur lequel on peut s'orienter pour des recherches futures se base sur la capacité prédictive du modèle métabolique cinétique. Tel que vu au chapitre 7, le modèle peut être utilisé de manière à prédire une culture effectuée dans des conditions qui n'ont jamais été tentées expérimentalement. Ceci permet d'identifier rapidement des voies de recherche intéressante sans avoir à effectuer trop de travail expérimental. Deux possibilités intéressantes ont été remarquées au chapitre 7 sans être implantées expérimentalement : l'optimisation du milieu de culture et l'ingénierie génétique.

Le modèle peut être utilisé pour simuler des expériences d'optimisation du milieu de culture et ainsi diminuer le travail nécessaire en orientant les recherches. Il faut cependant être très prudent avec une telle approche, puisque les passages cellulaires prolongés sur un milieu différent pourraient induire des déviations dans le comportement métabolique des cellules. Une étude potentiellement intéressante à réaliser ici serait d'utiliser le modèle pour tenter de prédire l'effet de passages cellulaires prolongés sur un milieu différent. Puisque le modèle inclut les conditions intracellulaires initiales et finales, il est possible de simuler le processus par lequel on effectue les passages cellulaires (les conditions finales du passage 'n' deviennent les conditions initiales du passage 'n+1'). Ce serait là un test énorme pour la capacité prédictive du modèle métabolique. Il serait ainsi envisageable d'identifier non pas un milieu de culture qui donne un bon résultat de productivité, mais bien un milieu de culture qui permet de maintenir cette productivité au fil des passages cellulaires.

Pour ce qui est de l'ingénierie génétique, il est tout à fait possible d'utiliser cette approche pour améliorer la productivité d'une lignée cellulaire. Mais il s'agit là d'expériences qui sont souvent faites à tâtons puisque notre compréhension de toute la régulation métabolique et des interactions possibles à l'intérieur de la cellule est encore limitée. À ce chapitre, le modèle métabolique et l'analyse de sensibilité dynamique présentés au chapitre 7 pourraient être utilisés pour guider les recherches en permettant l'identification rapide des étapes sensibles. Comme pour les expériences sur le milieu de

culture, ceci permettrait éventuellement d'accélérer le processus expérimental et d'exploiter au maximum la capacité prédictive du modèle.

Finalement, bien qu'une stratégie de culture augmentant la productivité ait été mise au point lors des présents travaux, cela ne signifie pas que les conditions de culture optimales aient été identifiées pour la production d'alcaloïdes par *E. californica*. Tout comme pour l'ingénierie génétique et la composition du milieu de culture, le modèle pourra être utilisé pour simuler d'éventuelles expériences d'optimisation du bioprocédé. Plusieurs paramètres pourront être considérés dans cette optimisation : concentration en biomasse, moment où l'élicitation est effectuée, maintient des concentrations extracellulaires ou intracellulaires, ajouts ponctuels de milieu pour stimuler la productivité. L'utilisation de la capacité prédictive du modèle permettra non seulement d'identifier des approches permettant une meilleure productivité, mais il pourra également quantifier les paramètres opératoires à utiliser. Ceci permettra donc d'accélérer le processus menant à une culture plus efficace.

9.2.3 Utiliser le modèle métabolique en tant qu'outil d'analyse et d'organisation des connaissances disponibles

Le modèle présenté aux chapitres 6 et 7 est basé sur des travaux précédents (Leduc et al., 2006) et ce modèle va également être appliqué à d'autres espèces cellulaires dans le futur (actuellement, *Nicotiana tabacum*). Un problème surviendra rapidement, soit la

construction d'une arborescence de modèles. Pour chaque projet ou pour chaque espèce cellulaire, il y aura un modèle, développé à partir d'un des modèles disponibles (dans un ordre chronologique ou non). Ceci donne lieu à une perte d'information puisque les données, outils et conclusions établies à une étape ne sont pas nécessairement transférables. Ce mode de développement pourrait donc donner lieu à une multitude de travaux ayant chacun peu d'impact, tout en diluant l'information à chaque étape de développement. La figure 9.1 schématise ce mode de développement, qui est actuellement en cours.

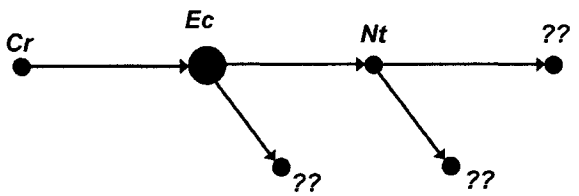


Figure 9.1 Développement de la modélisation en arborescence. La taille des points montre, qualitativement, l'état d'avancement du modèle pour l'espèce et/ou la quantité de données expérimentales disponibles. Cr : *C. roseus*; Ec : *E. californica*; Nt : *N. tabacum*.

En plus d'une éventuelle dilution de l'information dans le développement chronologique des travaux, la Figure 9.1 montre clairement que la connaissance se retrouvera rapidement distribuée (voire éparpillée) sur différents projets. Une amélioration significative du modèle pour une espèce en particulier ne sera donc pas aisément

transmise aux autres modèles. Ceci entre définitivement en contradiction avec l'idée selon laquelle un modèle doit servir à organiser la connaissance disponible dans un domaine de recherche. Afin d'éviter ce problème, il faudra plutôt penser à développer la modélisation du métabolisme végétal sur la base d'un modèle étalon, qui lui pourra être adapté, appliqué et développé spécifiquement pour chaque projet de recherche. La Figure 9.2 schématise cette organisation de la modélisation.

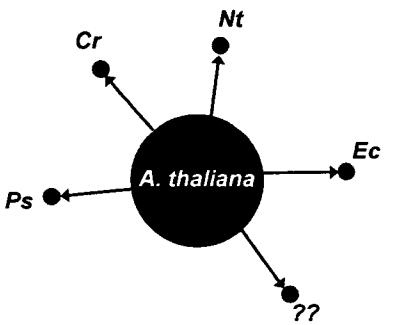


Figure 9.2 Développement de la modélisation à partir d'un modèle étalon pour *Arabidopsis thaliana*. Cr : *C. roseus*; Ec : *E. californica*; Nt : *N. tabacum*. Ps : *Papaver somniferum*.

Évidemment, si une telle approche devait se concrétiser, *A. thaliana* serait le candidat idéal pour établir un modèle étalon incluant des données de tout genre (génome, transcriptome, protéome, métabolome, régulation etc.). Le génome de cette espèce est maintenant entièrement décodé et plusieurs outils expérimentaux ont été développés en utilisant *A. thaliana*, ce qui en fait l'espèce végétale pour laquelle le bassin de données disponibles est le plus important. Dans cette optique de développement, chaque projet

peut partir d'une base commune et toute nouvelle connaissance peut aisément être retransmise au modèle « central », ce qui la rend rapidement accessible à toute la communauté scientifique.

RÉFÉRENCES

Abel S, Nürnberger T, Ahnert V, Krauss G-J, Glund K. 2000. Induction of an extracellular cyclic nucleotide phosphodiesterase as an accessory ribonucleolytic activity during phosphate starvation of cultured tomato cells. Plant Physiology 122:543-552.

Abu Qamar SF, Sors TG, Cunningham SM, Joern BC, Volenec JJ. 2005. Phosphate nutrition effects on growth, phosphate transporter transcript levels and physiology of alfalfa cells. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 82:131-140.

Affourtit C, Krab K, Moore AL. 2001. Control of plant mitochondrial respiration. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics 1504(1):58-69.

Allen DK, Shachar-Hill Y, Ohlrogge JB. 2007. Compartment-specific labeling information in ^{13}C metabolic flux analysis of plants. Phytochemistry 68(16-18): 2197-2210.

Alonso AP, Raymond P, Rolin D, Dieuaide-Noubhani M. 2007. Substrate cycles in the central metabolism of maize root tips under hypoxia. Phytochemistry 68(16-18): 2222-2231.

Alonso AP, Vigeolas H, Raymond P, Rolin D, Dieuaide-Noubhani M. 2005. A new substrate cycle in plants. Evidence for a high glucose-phosphate-to- glucose turnover from in vivo steady-state and pulse-labeling experiments with ^{13}C glucose and ^{14}C glucose. Plant Physiology 138(4):2220-2232.

Archambault J, Williams, R. D., Bédard, C., Chavarie, C. 1996. Production of sanguinarine by elicited plant cell culture: I. Shake flas suspension cultures. Journal of Biotechnology 46:95-105.

Archambault J, Williams, R. D., Perrier, M., Chavarie, C. 1996. Production of sanguinarine by elicited plant cell culture: III. Immobilized bioreactor cultures. Journal of Biotechnology 46:121-129.

Asada M, Shuler ML. 1989. Stimulation of ajmalicine production and excretion from *Catharanthus roseus*: effects of adsorption in situ, elicitors and alginate immobilization. Applied Microbiology and Biotechnology 30:475-481.

Aslam M, Travis R, Huffaker R. 1992. Comparative kinetics and reciprocal inhibition of nitrate and nitrite uptake in roots of uninduced and induced barley (*Hordeum vulgare L.*) seedlings. Plant Physiology 99:1124-1133.

Avigad G, Dey, P.M. 1997. Carbohydrates metabolism: storage carbohydrates. In: Harbone PMDeJB, editor. Plant Biochemistry. London: Academic Press. p 143.

Avonce N, Leyman B, Thevelein J, Iturriaga G. 2005. Trehalose metabolism and glucose sensing in plants. Biochemical Society Transactions 33(1):276-279.

Bailey CM, Nicholson H. 1989. A new structured model for plant cell cultures. Biotechnology and Bioengineering 34:1331-1336.

Bailey JE. 1998. Mathematical Modeling and Analysis in Biochemical Engineering: Past Accomplishments and Future Opportunities. Biotechnology Progress 14:8-20.

Balagué C, Wilson G. 1982. Growth and alkaloid biosynthesis by cell suspensions of *Catharanthus roseus* in a chemostat under sucrose and phosphate limiting conditions. Physiologie Végetale 20(3):515-522.

Barz W, Reinhard E, Zenk MH. 1977. Plant Tissue Culture and Its Bio-technological Application. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag.

Baxter CJ, Liu JL, Fernie AR, Sweetlove LJ. 2007. Determination of metabolic fluxes in a non-steady-state system. Phytochemistry 68(16-18):2313-2319.

Bécard G, Fortin JA. 1988. Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on Ri-T-DNA transformed roots. New Phytology 108:211-218.

Beever RE, Burns DJW. 1980. Phosphorus uptake, storage and utilization by fungi. Advances in Botanical Research 8:127-219.

Bhadra R, Shanks JV. 1997. Transient studies of nutrient uptake, growth, and indole alkaloid accumulation in heterotrophic cultures of hairy roots of *Catharanthus roseus*. Biotechnology and Bioengineering 55(3):527-534.

Bhadra R, Vani S, Shanks JV. 1993. Production of indole alkaloids by selected hairy root lines of *Catharanthus roseus*. Biotechnology and Bioengineering 41(5): 581-592.

Bieleski RL. 1973. Phosphate pools, phosphate transport, and phosphate availability. Ann. Rev. Plant Physiology 24:225-52.

Bieleski RL, Ferguson IB. 1983. Physiology and metabolism of phosphate and its compounds. In: Lauchi AB, R.L., editor. Inorganic Plant Nutrition: Springer Verlag. p 422-449.

Bieleski RL, Fergusson IB. 1983. Physiology and metabolism of phosphate and its compounds. Inorganic plant nutrition. New York: Springer. p 422-449.

Bieleski RL, Johson PN. 1982. The external location of phosphatase activity in phosphorous-deficient *Spirodela oligorrhiza*.707-720.

Bligny R, Douce R. 2001. NMR and plant metabolism. Current Opinion in Plant Biology 4(3):191-196.

Blom TJM, Sierra, M., van Vliet, T.B., Franke-van Dijk, M.E.I., de Koning, P., van Iren, F., Verpoorte, R., Libbenga, K.R. 1990. Uptake and accumulation of ajmalicine into isolated vacuoles of cultured cells of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. and its conversion into seprentine. Planta 183:170-177.

Borland AM, Hartwell J, Jenkins GI, Wilkins MB, Nimmo HG. 1999. Metabolite Control Overrides Circadian Regulation of Phosphoenolpyruvate Carboxylase Kinase and CO2 Fixation in Crassulacean Acid Metabolism. Plant Physiol. 121(3):889-896.

Bouchard-Marchand É. 2000. Études biocinétiques et nutritionnelles de racines transformées de carotte en culture in vitro. Montreal: Université de Montréal.

Bramley PM. 1997. Isoprenoid Metabolism. In: Harbone PMDeJB, editor. Plant Biochemistry. London: Academic Press. p 416.

Britto DT, Glass ADM, Kronzucker HJ, Siddiqi MY. 2001. Cytosolyic concentrations and transmembrane fluxes of NH4+/NH3. An evaluation of recent proposals. Plant Physiology 125:523-526.

Brownleader MD, Harbone, J.B., Dey, P.M. 1997. Carbohydrate metabolism: primary metabolism of monosaccharides. In: Harbone PMDeJB, editor. Plant Biochemistry. London: Academic Press. p 111.

Brownleader MD, McNally, P. E., Davies, G. E. A., Treva, M., Dey, P. M. 1997. Elicitor-induced extensin insolubilization in suspension-cultured tomato cells. Phytochemistry 46(1):1-9.

Carew DP, Kruger RJ. 1977. *Catharanthus roseus* tissue culture : the effects of medium modifications on growth and alkaloid production. J Nat. Prod. 4:326-336.

Carrari F, Urbanczyk-Wochniak E, Willmitzer L, Fernie AR. 2003. Engineering central metabolism in crop species: learning the system. Metabolic Engineering 5:191-200.

Cerezo M, Garcia-Agustin P, Serna D, Primo-Millo E. 1997. Kinetics of nitrate uptake by Citrus seedling and inhibitory effects of salinity. Plant Science 126:105-112.

Chassagnole C, Noisommit-Rizzi N, Schmid JW, Mauch K, Reuss M. 2002. Dynamic modeling of the central carbon metabolism of *Escherichia coli*. Biotechnology and Bioengineering 79(1):53-73.

Chen D, Lieth J. 1993. A two-dimentional, dynamic model for root growth distribution of potted plants. J Amer Coc Hort Sci 118(2):181-187.

Chen JY. 2004. In vivo 31P-NMR study of phosphate metabolism for *Eschscholtzia californica* using a small-scale perfused bioreactor [Master]. Montréal: École polytechnique de Montréal. 131 p.

Chrispeels MJ, Crawford NM, Schroeder JI. 1999. Proteins for transport of water and mineral nutrients across the membranes of plant cells. The Plant Cell 11:661-675.

Clarkson D. 1985. Factors affecting mineral nutrient acquisition by plants. Ann Rev Plant Physiol 36:77-115.

Clarkson D, Hanson J. 1980. The mineral nutrition of higher plants. Ann Rev Physiol 31:239-298.

Clarkson D, Scattergood C. 1982. Growth and phosphate transport in barley and tomato plants during development of, and recovery from, phosphate-stress. J Exp Bot 33:865-875.

Clarkson DT, Hanson, J.B. 1980. The mineral nutrition of higher plants. Ann. Rev. Plant Physiol. 31:239-209.

Clarkson DT, Gojon A, Saker LR, Wiersema PK, Purves JV, Tillard P, Arnold GM, Paans AJM, Vaalburg W, Stulen I. 1996. Nitrate and ammonium influxes in soybean (*Glycine Max*) roots: direct comparison of ^{13}N and ^{15}N tracing. PLant, Cell and Environment 19:859-868.

Clarkson DT, Sanderson J, Scattergood CB. 1978. Influence of phosphate-stress on phosphate absorption and translocation by various parts of the root system of *Hordeum Vulgare* L. (Barley). Planta 139:47-53.

Clarkson DT, Scattergood CB. 1982. Growth and phosphate transport in barley and tomato plants during the development of, and recovery from, phosphate-stress. Journal of Experimental Botany 33(136):865-875.

Cloutier M, Bouchard-Marchand E, Perrier M, Jolicoeur M. 2007. A predictive nutritional model for plant cells and hairy roots. Biotechnology and Bioengineering 99(1):189-200.

Cloutier M, Perrier M, Jolicoeur M. 2007. Dynamic flux cartography of hairy roots primary metabolism. Phytochemistry 68(16):2393-2404.

Cloutier M, Perrier M, Jolicoeur M. 2007. Dynamic sensitivity analysis of hairy roots primary metabolism. 10th International IFAC Symposium on Computer Applications in Biotechnology. Cancùn, Mexico: IFAC.

Crawford NM, Glass ADM. 1998. Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. trends in plant science 3(10):389-395.

Cress WA, Thronberry GO, Lindsey DL. 1979. Kinetics of phosphorus absorption by mycorrhizal and nonmycorrhizal tomato roots. Plant Physiology 64:484-487.

Cresswell RC, Fowler MW, Stafford A, Stepan-Sarkissian G. Inputs and outputs: primary substrates and secondary metabolism. Primary and Secondary Metabolism of Plant Cell... p 14-26.

Curien G, Ravanel S, Dumas R. 2003. A kinetic model of the branch-point between the methionine and threonine biosynthesis pathways in *Arabidopsis thaliana*. European Journal of Biochemistry 270:4615-4627.

Curtis WR, Hasegawa PM, Emery AH. 1991. Modeling linear and variable growth in phosphate limited suspension cultures of opium poppy. Biotechnology and Bioengineering 38(4):371-379.

Daae EB, Dunnill P, Mitsky TA, Padgette SR, Taylor NB, Valentin HE, Gruys KJ. 1999. Metabolic Modeling as a Tool for Evaluating Polyhydroxyalkanoate Copolymer Production in Plants. Metabolic Engineering 1(3):243-254.

De Dobbeleer C, Cloutier M, Fouilland M, Legros R, Jolicoeur M. 2006. A high-rate perfusion bioreactor for plant cells. Biotechnology and Bioengineering 95(6): 1126-1137.

de Gunst MCM, Harkes PAA, Val J, van Zwet WR, Libbenga KR. 1990. Modelling the growth of a batch culture of plant cells. A corpuscular approach. Enzyme and Microbial Technology 12(1):61-71.

Delmer DP, Haigler CH. 2002. The Regulation of Metabolic Flux to Cellulose, a Major Sink for Carbon in Plants. Metabolic Engineering 4(1):22-28.

Delucia EH, Callaway RM, Thomas EM, Schlesinger WH. 1997. Mechanism of phosphorous acquisition for Ponderosa pine seedlings under high CO2 and temperature. Annals of Botany 79:111-120.

DiCosmo F, Misawa M. 1995. Alternatives for metabolite production. Biotechnol. Adv. 13:425-453.

DiCosmo F, Towers GHN. 1984. Stress and secondary metabolism in cultured plant cells. In: Timmermann BN, Steelink C, Loewus FA, editors. Recent advances in phytochemistry. New York: Plenum Press. p 97-175.

Dieuaide-Noubhani M, Raffard G, Canioni P, Pradet A, Raymond P. 1995. Quantification of compartmented metabolic fluxes in maize root tips using isotope distribution from ^{13}C- or ^{14}C-labeled glucose. The Journal of Biological Chemistry 270(22):13147-13159.

Doller G. 1978. Influence of the medium on the production of serpentine by suspension cultures of *Catharanthus roseus*. In: Alfermann AW, Reinhard E, editors. Production of natural compounds by cell culture methods. Munich: Gesellschaft für strahlen- und Umweltforschung. p 109-116.

Dougall DK, Weyraugh KW. 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.

Drapeau DH, Blanch HW, Wilke CR. 1986. Growth kinetics of *Discorea deltoida* and *Catharanthus roseus* in batch culture. Biotechnology and Bioengineering 28:1555-1563.

Duarte NC, Herrgard MJ, Palsson BO. 2004. Reconstruction and Validation of *Saccharomyces cerevisiae* iND750, a Fully Compartmentalized Genome-Scale Metabolic Model. Genome Res.14:1289-1309.

Edwards JS, Palsson BO. 2000. The *Escherichia coli* MG1655 in silico metabolic genotype: Its definition, characteristics, and capabilities. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97(10):5528-5533.

Eilert U, Constabel E, Kurz WGW. 1985. Elicitor stimulation of monoterpene indole alkaloid metabolism in suspension cultures of *Catharanthus roseus*. Journal of Plant Physiology 119:77-87.

Epstein E. 1972. Mineral nutrition of plants: Principles and perspectives. New York: John Wiley & Sons, Inc. 412 p.

Facchini JP. 2001. Alkaloid biosynthesis in plants: biochemistry, cell biology, molecular regulation and metabolic enginnering applications. Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol. 52(29-66).

Farquhar GD, von Caemmerer S, Berry JA. 2001. Models of Photosynthesis. Plant Physiol. 125(1):42-45.

Farrar J, Pollock, C., Gallagher, J. 2000. Sucrose and the integration of metabolism in vascular plants. Plant Sci. 254:1-11.

Fernie AR. 2003. Metabolome characterisation in plant system analysis. Functional Plant Biology 30(1):111-120.

Fiehn O. 2006. Study of metabolic control in plants by metabolomics. In: Plaxton WC, McManus MT, editors. Control of Primary metabolism in plants. first ed. Malden: Blackwell. p 60-84.

Fischer W-N, André B, Rentsch D, Krolkiewicz S, Tegeder M, Breitkreuz K, Frommer WB. 1998. Amino acid transport in plants. trends in plant science 3(5):188-195.

Forde BG. 2000. Nitrate transporters in plants: structure, function and regulation. Biochimica and Biophysica Acta 1465:219-235.

Forster J, Famili I, Fu B, Palsson BO, Nielsen J. 2003. Genome-scale reconstruction of the *Saccharomyces cerevisiae* metabolic network. Genome Res. 13(244-253).

Fredrickson AG, McGee RD, Tsuchiya HM. 1970. Mathematical models in fermentation processes. Advances in Applied Microbiology 23:419-425.

Fridlyand LE, Scheibe R. 1999. Regulation of the Calvin cycle for CO2 fixation as an example for general control mechanisms in metabolic cycles. Biosystems 51(2): 79-93.

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

Gamborg OL, Miller RA, Ojima K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Experimental Cell Research 50(1):151-158.

Gayler S, Leser C, Priesack E, Treutter D. 2004. Modelling the effect of environmental factors on the trade-off between growth and defensive compounds in young apple trees. Trees 18:363-371.

Gibbs J, Greenway H. 2003. Mechanisms of anoxia tolerance in plants. I. Growth, survival, and anaerobic catabolism. Functional Plant Biology 30:1-47.

Giersch C. 2000. Mathematical modelling of metabolism. Current Opinion in Plant Biology 3:249-253.

Glass ADM. 1983. Regulation of ion transport. Annual Reviews of Plant Physiology 34:311-26.

Gmati D, Chen J, Jolicoeur M. 2005. Development of a small-scale bioreactor: Application to in vivo NMR measurement. Biotechnology and Bioengineering 89(2):138-147.

Guardiola J, Iborra JL, Canovas M. 1995. Model that links growth and secondary metabolite production in plant cell suspension cultures. Biotechnology and Bioengineering 46(3):291-297.

Haefner JW. 1996. Modelling Biological Systems: Principles and Applications. New York: Chapman and Hall. 496 p.

Haigler CH, Ivanova-Datcheva M, Hogan PS, Salnikov VV, Hwang S, Martin K, Delmer DP. 2001. Carbon partitioning to cellulose synthesis. Plant Molecular Biology 47(1-2):29-51.

Heinzle E, Matsuda F, Miyagawa H, Wakasa K, Nishioka T. 2007. Estimation of metabolic fluxes, expression levels and metabolite dynamics of a secondary metabolic pathway in potato using label pulse-feeding experiments combined with kinetic network modelling and simulation. The Plant Journal 50(1): 176-187.

Hell R, Hillebrand H. 2001. Plants concepts for mineral acquisition and allocation. Current Opinion in Biotechnology 12:161-168.

Henry O, Perrier M, Kamen A. 2005. Metabolic flux analysis of HEK-293 cells in perfusion cultures for the production of adenoviral vectors. Metabolic Engineering 7(5-6):467-476.

Herrmann KM, Weaver, L.M. 1999. The shikimate pathway. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 50:473-503.

Higgins J. 1963. Analysis of sequential reactions. Annals of the New York Academy of Science 10(108):305-321.

Hill CM, Waightm RD, Bardsley WG. 1977. Does any enzyme follow the Michaelis—Menten equation? Molecular and Cellular Biochemistry 15(3):173-178.

Hill SA. 1998. Carbohydrate metabolism in plants. Trends in plant science 3(8): 370-371.

Hooker BS, Lee JM. 1992. Application of a new structured model to tobacco cell cultures. Biotechnology and Bioengineering 39(7):765-774.

Hu D, Yuan J-M. 2006. Time-dependent sensitivity analysis of biological networks: Coupled MAPK and PI3K signal transduction pathways. Journal of Physical Chemistry A 110(16):5361-5370.

Huber SC, Huber JL. 1996. Role and regulation of sucrose-phosphate synthase in higher plants. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 47:431-444.

Huber SC, Huber JL, McMichael RW. 1994. Control of plant enzyme activity by reversible protein phosphorylation. International Review of Cytology 149:47-98.

Hughes EH, Hong S-B, Gibson SI, Shanks JV, San K-Y. 2004. Metabolic engineering of the indole pathway in *Catharanthus roseus* hairy roots and increased accumulation of tryptamine and serpentine. Metabolic Engineering 6(4): 268-276.

Ingalls BP, Sauro HM. 2003. Sensitivity analysis of stoichiometric networks: an extension of metabolic control analysis to non-steady state trajectories. Journal of Theoretical Biology 222(1):23-36.

Isaac RA, Johnson WC. 1976. Determination of total nitrogen in plant tissues using a block digestor. J. Assoc Off Anal Chem 59:98-100.

Jang JC, Sheen J. 1994. Sugar sensing in higher plants. Plant Cell 6:1665-1679.

Jenkins H, Hardy N, Beckmann M, Draper J, Smith AR, Taylor J, Fiehn O, Goodacre R, Bino RJ, Hall R and others. 2004. A proposed framework for the description of plant metabolomics experiments and their results. Nat Biotech 22(12): 1601-1606.

Johnson M, Zhulin IB, Gapuzan M-ER, Taylor BL. 1997. Oxygen dependant growth of the obligate anaerobe *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. Journal of Bateriology 179(7):5598-5601.

Jolicoeur M, Bouchard-Marchand E, Bécard G, Perrier M. 2003. Regulation of mycorrhizal symbiosis: development of a structured nutritional dual model. Ecological Modelling 163:247-267.

Jolicoeur M, Chavarie C, Carreau PJ, Archambault J. 1992. Development of a helical-ribbon impeller bioreactor for high-density plant cell suspension culture. Biotechnology and Bioengineering 39(5):511-521.

Junker BH, Lonien J, Heady LE, Rogers A, Schwender J. 2007. Parallel determination of enzyme activities and in vivo fluxes in *Brassica napus* embryos grown on organic or inorganic nitrogen source. Phytochemistry 68(16-18):2232-2242.

Kacser H, Acerenza L. 1993. A universal method for achieving increases in metabolite production. European Journal of Biochemistry 216:361-367.

Kacser H, Burns JA. 1973. The control of flux. Symposia of the Society for Experimental Biology(27):65-104.

Kaiser C, Peuker T, Bauch T, Ellert A, Luttmann R. 2007. Process analytical technology in cultivation processes with recombinant *E. coli*. 10th International IFAC Symposium on Computer Applications in Biotechnology. Cancùn, Mexico: IFAC.

Klavana M, Legros R, Jolicoeur M. 2004. In situ extraction strategy affects benzophenanthridine alkaloid production fluxes in suspension cultures of *Eschscholtzia californica*. Biotechnology and bioengineering 89:280-289.

Knobloch KH, Berlin J. 1980. Influence of medium composition on the formation of secondary compounds in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus* G. Don. Naturforsch 35:551-556.

Krab K. 1995. Kinetic and regulatory aspects of the function of the alternative oxidase in plant respiration. Journal of Bioenergetics and Biomembranes 27(4):387-396.

Kreim M, Giersch C. 2007. Measuring in vivo elasticities of Calvin cycle enzymes: Network structure and patterns of modulations. Phytochemistry 68(16-18): 2152-2162.

Kronzucker HJ, Kirk GJD, Siddiqi MY, Glass ADM. 1998. Effects of hypoxia on $^{13}NH_4^+$ fluxes in rice roots. Kinetics and compartmental analysis. Plant Physiology 116:581-587.

Kronzucker HJ, Siddiqi MY, Glass ADM, Kirk GJD. 1999. Nitrate-Ammonium synergism in rice. A subcellular flux analysis. Plant Physiology 119:1041-1045.

Kruger NJ, Huddleston JE, Le Lay P, Brown ND, Ratcliffe RG. 2007. Network flux analysis: Impact of 13C-substrates on metabolism in *Arabidopsis thaliana* cell suspension cultures. Phytochemistry 68(16-18):2176-2188.

Kruger NJ, Le Lay P, Ratcliffe RG. 2007. Vacuolar compartmentation complicates the steady-state analysis of glucose metabolism and forces reappraisal of sucrose cycling in plants. Phytochemistry 68(16-18):2189-2196.

Lalonde S, Boles E, Hellmann H, Barker L, Ptrick JW, Frommer WB, Ward JM. 1999. The dual function of sugar carriers: transport and sugar sensing. The Plant Cell 11:707-726.

Lamboursain L, Jolicoeur M. 2005. Critical influence of *Eschscholzia californica* cells nutritional state on secondary metabolite production. Biotechnology and Bioengineering 91(7):827-837.

Lamboursain L, St-Onge F, Jolicoeur M. 2002. A lab-built respirometer for plant and animal cell culture. Biotechnology Progress 18(6):1377-1386.

Le Bot J, Adamowicz S, Robin P. 1998. Modelling plant nutrition of horticultural crops: a review. Scientia Horticulturae 74:47-82.

Leduc M, Tikhomiroff C, Cloutier M, Perrier M, Jolicoeur M. 2006. Development of a kinetic metabolic model: Application to *Catharanthus roseus* hairy root. Bioprocess and Biosystems Engineering 28(5):295-313.

Lee CWT, Shuler ML. 2000. The Effect of Inoculum Density and Conditioned Medium on the Production of Ajmalicine and Catharanthine from Immobilized *Catharanthus roseus* Cells. Biotechnology and Bioengineering 67(1):61-71.

Lee RB, Ratcliffe RG. 1983. Phosphorus nutrition and the intracellular distribution of inorganic phosphate in pea root tips: a quantitative study suing ^{31}P-NMR. Journal of Experimental Botany 34(146):1222-1244.

Lee RB, Ratcliffe RG. 1993. Subcellular distribution of inorganic phosphate, and levels of nucleoside triphoshate, in mature maize roots at low external phosphate concentrations: measurements with ^{31}P-NMR. Journal of Experimental Botany 44(260):587-598.

Lee RB, Ratcliffe RG, Southon TE. 1990. ^{31}P NMR measurements of the cytoplasmic and vacuolar Pi content of mature maize roots: relationships with phosphorus status and phosphate fluxes. Journal of Experimental Botany 41(230):1063-1078.

Leidreiter K, Kruse A, Heineke D, Robinson DG, Heldt HW. 1995. Subcellular volumes and metabolite concentrations in potato (*Solanum tuberosum*) leaves. Bot. Acta 108:439-444.

Lemoinde R. 2000. Sucrose transporters in plants: update on function and structure. Biochimica et Biophysoca Acta 1465:246-262.

Libourel IGL, Gehan JP, Shachar-Hill Y. 2007. Design of substrate label for steady state flux measurements in plant systems using the metabolic network of *Brassica napus* embryos. Phytochemistry 68(16-18):2211-2221.

Liu C, Muchlal US, Uthappa M, Kononowicz AK, Raghothama KG. 1998. Tomato phosphate transporter genes are differentially regulated in plant tissues by phosphorus. Plant Physiology 116:91-99.

Luttmann R, Eicke M, Kazemi A, Ellert A, Hanh E, Werner E. 2007. Process development for production of active pharmaceutical ingredients with *Pichia*

pastoris. 10th International IFAC Symposium on Computer Applications in Biotechnology. Cancùn, Mexico: IFAC.

Martinez-Barajas E, Randall DD. 1998. Purification and characterization of a glucokinase from young tomato (*Lycopersicon esculentum* L. Mill.) fruit. Planta 205:567-573.

Massou S, Nicolas C, Letisse F, Portais J-C. 2007. NMR-based fluxomics: Quantitative 2D NMR methods for isotopomers analysis. Phytochemistry 68(16-18): 2330-2340.

Matsubara K, Kitani S, Yoshioka T, Morimoto T, Fujita Y, Yamada Y. 1989. High density culture of *Coptis japonica* cells increases berberine production. Journal of Chemical Technology and Biotechnology 46(1):61-69.

Matsuda F, Wakasa K, Miyagawa H. 2007. Metabolic flux analysis in plants using dynamic labeling technique: Application to tryptophan biosynthesis in cultured rice cells. Phytochemistry 68(16-18):2290-2301.

Mauch K, Arnold S, Reuss M. 1997. Dynamic sensitivity analysis for metabolic systems. Chemical Engineering Science 52(15):2589-2598.

McKnight TD, Roessner, C.A., Devagupta, R., Scott, A.I., Nessler, C.L. 1990. Nucleotide sequence of a cDNA encoding the vacuolar protein strictosidine synhtase from *Catharanthus roseus*. Nucleic Acids Res. 18:4939.

Meehan TD, Cocsia, C.J. 1973. Hydroxylation of geraniol and nerol by a monooxygenase from *Vinca rosea*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 53:1043-1048.

Menke FLH, Champion A, Kijne JW, Memelink J. 1999. A novel jasmonate-and elicitor-responsive element in the periwinkle secondary metabolite biosynthetic gene Str interacts with a jasmonate- and elicitor-inducible AP2-domain transcription factor, ORCA2. The European Molecular Biology Organization Journal 18:4455-4463.

Menke FLK, Prchmann S, Mueller MJ, Kijne JW, Memelink J. 1999. Involvement of the octodecanoid pathway and protein phosphorylation in fungal elicitor-induced expression of terpenoid indole alkaloid biosynthetic genes in *Catharanthus roseus*. Plant Physiology 119:1289-1296.

Michal G. 1999. Biochemical Pathways. New York: John Wiley & Sonc, Inc.

Miller AJ, Smith, S.J. 1992. The mechanism of nitrate transport across the tonoplast of barley root cells. Planta 187:554-557.

Mimura T. 1999. Regulation of phosphte transport and homeostasis in plant cells. International Review of Cytology 191:149-200.

Mimura T, Dietz K-J, Kaiser W, Schramm MJ, Kaiser G, Heber U. 1990. Phosphate transport across biomembranes and cytosolic phosphate homeostasis in barley leaves. Planta 180:139-146.

Misawa M. 1994. Plant tissue culture: An alternative for production of useful metabolites Nations FaAOotU, editor. Rome.

Moré JJ. 1978. The Levenberg-Marquardt Algorithm: Implementation and Theory. In: Watson GA, editor. Lectures Notes in Mathematics. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag. p 105-116.

Morgan JA, Rhodes D. 2002. Mathematical Modeling of Plant Metabolic Pathways. Metabolic Engineering 4(1):80-89.

Mulabagal M, Tsay H-S. 2004. Plant cell cultures - an alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites. International Journal of Applied Science and Engineering 2(1):29-48.

Nelder JA, Mead R. 1965. A simplex methode for function minimization. Computer Journal 7:308-313.

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

Nungesser D, Kluge M, Tolle H, Oppelt W. 1984. A dynamic computer model of the metabolic and regulatory processes in Crassulacean acid metabolism. Planta 162(3):204-214.

Park HH, Choi SK, Kang JK, Lee HY. 1990. Enhancement of producing catharanthine by suspension growth of *Catharanthus roseus*. Biotechnology Letters 12(8): 603-608.

Pettersson G, Ryde-Pettersson U. 1988. A mathematical model of the Calvin photosynthesis cycle. European Journal of Biochemistry 175(3):661-672.

Plaxton WC. 1996. The organization and regulation of plant glycolysis. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 47:185-214.

Plaxton WC. 1998. Metabolic aspects of phosphate starvation in plants. In: Lynch Jp, Deikman J, editors. Phosphorus in Plant Biology: regulatory roles in molecular, cellular, organismic, and ecosystem processes: American Society of Plant Physiologists. p 229-241.

Poolman MG, Assmus HE, Fell DA. 2004. Applications of metabolic modelling to plant metabolism. J. Exp. Bot. 55(400):1177-1186.

Poolman MG, Fell DA, Thomas S. 2000. Modelling photosynthesis and its control. J. Exp. Bot. 51(suppl_1):319-328.

Raghothama KG. 1999. Phosphate acquisition. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 50:665-693.

Raghothama KG, Muchhal US, Kim D-H, Bucher M. 1998. Molecular regulation of plant phosphate transporters. In: Lynch Jp, Deikman J, editors. Phosphorus in Plant Biology: regulatory roles in molecular, cellular, organismic, and ecosystem processes: American Society of Plant Physiologists. p 271-280.

Ramli US, Baker DS, Quant PA, Harwood JL. 2002. Control analysis of lipid biosynthesis in tissue cultures from oil crops shows that flux control is shared between fatty acid synthesis and lipid assembly. Biochemical Journal 364(2): 393-401.

Ratcliffe RG, Shachar-Hill Y. 2006. Measuring multiple fluxes through plant metabolic networks. Plant Journal 45(4):490-511.

Rebeille. 1985. Effect of sucrose starvation on sycamore (*Acer pseudoplatanus*) cell carbohydrate and Pi status. Biochemical Journal 226(3):679-684.

Rijhwani SH, Shanks JV. 1998. Effect of subculture cycle on growth and indole alkaloid production by Catharanthus roseus hairy root cultures. Enzyme and Microbial Technology 22:606-611.

Rios-Estepa R, Lange BM. 2007. Experimental and mathematical approaches to modelling plant metabolic networks. Phytochemistry 68(16-18):2351-2374.

Rivoal J, Dorion S, Claeyssen E, Zhang H. 2004. Organization of the plant cytosolic glycolytic pathway and its regulation by abiotic stresses in nonphotosynthetic tissues. In: Pandalai SG, editor. Recent Research Developments in Environmental Biology. p 77-100.

Rizzi M, Baltes M, Theobald U, Reuss M. 1997. In vivo analysis of metabolic dynamics in saccharomyces cerevisiae: II. Mathematical model. Biotechnology and Bioengineering 55(4):592-608.

Roberts JKM, Pang MKL. 1992. Estimation of ammonium ion distribution between cytoplasm and vacuole using nuclear magnetic resonance spectroscopy. Plant Physiology 100:1571-1574.

Robins R, Bolwell GP, Lewis NG. 2007. Phytochemistry and the new technologies: Tackling the critical barriers to advancing systems biology. Phytochemistry 68(16-18):2134-2135.

Roessner U, Wagner C, Kopka J, Trethewey RN, Willmitzer L. 2000. Simultaneous analysis of metabolites in potato tuber by gas chromatography-mass spectrometry. The Plant Journal 23(1):131-142.

Rohwer JM, Botha FC. 2001. Analysis of sucrose accumulation in the sugar cane culm on the basis of *in vivo* kinetic data. Biochemistry Journal 358:437-445.

Rolland F, Winderickx J, Thevelein J. 2001. Glucose-sensing mechanism in eucaryotic cells. Trends in Biochemical Sciences 26(5):310-317.

Romisch-Margl W, Schramek N, Radykewicz T, Ettenhuber C, Eylert E, Huber C, Romisch-Margl L, Schwarz C, Dobner M, Demmel N and others. 2007. 13CO2 as a universal metabolic tracer in isotopologue perturbation experiments. Phytochemistry 68(16-18):2273-2289.

Rontein D, Dieuaide-Noubhani M, Dufourc EJ, Raymond P, Rolin D. 2002. The metabolic architecture of plant cells: Stability of central metabolism and flexibility of anabolic pathways during the growth cycle of tomato cells. Journal of Biological Chemistry 277(46):43948-43960.

Roscher A, Emsley L, Raymond P, Roby C. 1998. Unidirectional steady state rates of central meatbolism enzymes measured simultaneously in a living plant tissue. The Journal of Biological Chemistry 273(39):25053-25061.

Roscher A, Kruger NJ, Ratcliffe RG. 2000. Strategies for metabolic flux analysis in plants using isotope labelling. Journal of Biotechnology 77(1):81-102.

Ruan Y, Gilmore J, Conner T. 1998. Towards *Arabidopsis* genome analysis: Monitoring expression profiles of 1400 genes using cDNA microarrays. Plant Journal 15(6): 821-833.

Sakano K. 1990. Proton/phosphate steochiometry in uptake of inorganic phosphate by cultured cells of *Catharanthus Roseus* (L.) G. Don. Plant Physiology 93:479-483.

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

Schellenbaum L, Müller J, Boller T, Wiemken A. 1998. Effects of drought on nonmycorrhizal and mycorrhizal maize: changes in the pools of non-structural carbohydrates, in the activities of invertase and trehalase, and in the pools of amino acids and imino acids. New Phytologist 138:59-66.

Schlatmann JE, Koolhaas CMA, Vinke JL, ten Hoopen HJG, Heijnen JJ. 1995. Role of glucose in ajmalicine production by Catharanthus roseus cell cultures. Biotechnology and Bioengineering 47(5):525-534.

Schlatmann JE, ten Hoopen HJG, Heijnen JJ. 1999. Simple structured model for maintenance, biomass formation, and ajmalicine production by nondividing *Catharanthus roseus* cells. Biotechnology and Bioengineering 66(3):147-157.

Schlatmann JE, Vinke JL, ten Hoopen HJG, Heijnen JJ. 1995. Relation between dissolved oxygen concentration and ajmalicine production rate in high-density cultures of *Catharanthus roseus*. Biotechnology and Bioengineering 45(5): 435-439.

Schmidt M-E, Heim S, Wylegalla C, Helmbrecht C, Wagner KG. 1992. Characterization of phosphate uptake by suspension cultured *Catharanthus Roseus* cells. J. Plant Physiology 140:179-184.

Schwender J, Ohlrogge JB, Shachar-Hill Y. 2003. A Flux Model of Glycolysis and the Oxidative Pentosephosphate Pathway in Developing *Brassica napus* Embryos. J. Biol. Chem. 278(32):29442-29453.

Sembler G, Parthier B. 1993. The biochemistry and the physiological and molecular actions of jasmonates. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 44:569-89.

Shampine LF, Reichelt MW. 1997. The Matlab ODE suite. SIAM Journal on Scientific Computing 18:1-22.

Shanks JV, Rijhwani SK, Morgan J, Vani S, Bhadra R, Ho C-H. 1999. Quantification of metabolic fluxes for metabolic engineering of plant products. In: al. Fe, editor. Plant Cell and tissue culture for the production of food ingredients. New York: Kluwer Academic / Plenum. p 45-60.

Shastri AA, Morgan JA. 2007. A transient isotopic labeling methodology for 13C metabolic flux analysis of photoautotrophic microorganisms. Phytochemistry 68(16-18):2302-2312.

Shibasaki NT, Yonemoto T, Tadaki T. 1993. Application of five-state structured model for growth and secondary metabolite production in cultures of *Nicotiana tabacum*. Journal of Chemical Technology and Biotechnology 58(2):151-157.

Shuler ML, Kargi F. 2001. Bioprocess engineering: Basic concepts. New York: Prentice Hall. 553 p.

Sirois J, Perrier M, Archambault J. A two-step structured model development for optimization of plant cells growth. Proceedings of the 14th World Congress. International Federation of Automatic Control; 1999; Beijing, China. Elsevier Sci. p 451-6.

Spielbauer G, Margl L, Hannah LC, Romisch W, Ettenhuber C, Bacher A, Gierl A, Eisenreich W, Genschel U. 2006. Robustness of central carbohydrate metabolism in developing maize kernels. Phytochemistry 67(14):1460-1475.

Sriram G, Fulton DB, Iyer VV, Peterson JM, Zhou R, Westgate ME, Spalding MH, Shanks JV. 2004. Quantification of Compartmented Metabolic Fluxes in Developing Soybean Embryos by Employing Biosynthetically Directed Fractional 13C Labeling, Two-Dimensional [13C, 1H] Nuclear Magnetic Resonance, and Comprehensive Isotopomer Balancing. Plant Physiol. 136(2): 3043-3057.

Sriram G, Fulton DB, Shanks JV. 2007. Flux quantification in central carbon metabolism of *Catharanthus roseus* hairy roots by 13C labeling and comprehensive bondomer balancing. Phytochemistry 68(16-18):2243-2257.

Stephanopoulos GN, Aristidou AA, Nielsen J. 1998. Metabolic Engineering: Principles and Methodologies. San Diego: Academic Press. 749 p.

Steuer R. 2007. Computational approaches to the topology, stability and dynamics of metabolic networks. Phytochemistry 68(16-18):2139-2151.

Sturm OE. 1999. Invertases. primary structures, functions and roles in plant development and sucrose partitioning. Plant Physiology 121:1-7.

Su WW, Arias R. 2003. Continuous plant cell perfusion culture: Bioreactor characterization and secreted enzyme production. Journal of Bioscience and Bioengineering 95(1):13-20.

Sugiyama N, Ishigaki K. 1994. Uptake of nitrate-nitrogen by blueberry plants. Journal of Plant Nutrition 17:1975-1982.

Sweetlove LJ, Kossmann J, Riesmeier JW, Trethewey RN, Hill SA. 1998. The control of source to sink carbon flux during tuber development in potato. Plant Journal 15(5):697-706.

Sweetlove LJ, Last RL, Fernie AR. 2003. Predictive metabolic engineering: A goal for systems biology. Plant Physiology 132(2):420-425.

Taiz L, Zeiger, E. 1998. Plant Physiology. Sunderland: Sinauer Associates, Inc., Publishers.

Tanaka H. 2000. Technological problems in cultivation of plant cells at high density. Biotechnology and Bioengineering 67(6):775-790.

Tanner W, Caspari T. 1996. Membrane transport carriers. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 47:595-626.

Taticek R, Moo-Young AM, Legge RL. 1990. Effect of bioreactor configuration on substrate uptake by cell suspension cultures of *Eschscholtzia californica*. Applied Microbiology and Biotechnology 33:280-286.

Thomas S, Mooney PJ, Burrell MM, Fell DA. 1997. Metabolic Control Analysis of glycolysis in tuber tissue of potato (*Solanum tuberosum*): explanation for the low control coefficient of phosphofructokinase over respiratory flux. Biochemical Journal 322:119-127.

Thornley JH, Johnson IR. 1990. Plant and Crop Modelling: A Mathematical Approach to Plant and Crop Physiology. New York: Oxford University Press. 669 p.

Tikhomiroff C. 2001. Étude des métabolismes primaire et secondaire de racines transformées de *Catharanthus roseus* en vue du développement d'un modèle cinétique [Master]. Montréal: Université de Montréal. 268 p.

Tomita M, Hashimoto K, Takahashi K, Shimizu TS, Matsuzaki Y, Miyoshi F, Saito K, Tanida S, Yugi K, Venter JC and others. 1999. E-CELL: software environment for whole-cell simulation. Bioinformatics 15(1):72-84.

Troufflard S, Roscher A, Thomasset B, Barbotin J-N, Rawsthorne S, Portais J-C. 2007. *In vivo* ^{13}C NMR determines metabolic fluxes and steady state in linseed embryos. Phytochemistry 68(16-18):2341-2350.

Ullrich-Eberius CI, Novacky A, Fischer E, Lüttge U. 1981. Relationship between energy dependant phosphate uptake and the electrical membrane potential in *Lemna gibba* G1. Plant Physiology 67:797-801.

Urbanczyk-Wochniak E, Leisse A, Roessner U, Lytovchenko A, Reismeier J, Willmitzer L, Fernie AR. 2003. Expression of a bacterial xylose isomerase in potato tubers results in an altered hexose composition and a consequent induction of metabolism. Plant and Cell Physiology 44:1359-1367.

Uys L, Botha FC, Hofmeyr J-HS, Rohwer JM. 2007. Kinetic model of sucrose accumulation in maturing sugarcane culm tissue. Phytochemistry 68(16-18): 2375-2392.

van Gulik WM, ten Hoopen HJG, Heijnen JJ. 1993. Structured model describing carbon and phosphate limited growth of *Catharanthus roseus* plant cell suspensions in batch and chemostat culture. Biotechnology and Bioengineering 41(8):771-780.

Varner J, Ramkrishna D. 1999. Mathematical models of metabolic pathways. Current Opinion in Biotechnology 10(2):146-150.

Verpoorte R, van der Heijden, R., ten Hoopen, H.J.G., Memelink, J. 1999. Metabolic engineering of plant secondary metabolite pathways for the production of fine chemicals. Biotechnology Letters 21:467-479.

Wagner F, Vogelmann H. 1977. Cultivation of plant tissue cultures in bioreactors and formation of product. In: Barz W, Reinhard E, Zenk MH, editors. Plant Tissue Culture and Its Bio-technological application. Berlin: Springer-Verlag. p 250.

Weathers PJ, Hemmavanh DD, Walcerz DB, Cheetham RD, Smith TC. 1997. Interactive effects of nitrate and phosphate salts, sucrose, and inoculum culture age on growth and sequiterene production in *Artemisia Annua* hairy root cultures. Plant 33:306-312.

Wiechert W. 2002. Modeling and simulation: Tools for metabolic engineering. Journal of Biotechnology 94(1):37-63.

Williams LE, Lemoine, R., Sauer, N. 2000. Sugar transporters in higher plants - a diversity of roles and complex regulation. Trends in plant science 5(7):283-290.

Williams RD, Chauret N, Bédard C, Archambault J. 1992. Effect of polymeric adsorbents on the production of sanguinarine by *Papaver somniferus* cell cultures. Biotechnology and Bioengineering 40:971-977.

Wong H-K, Chan H-K, Coruzzi GM, Lam H-M. 2004. Correlation of ASN2 Gene Expression with Ammonium Metabolism in *Arabidopsis*. Plant Physiol. 134(1): 332-338.

Wu J, Lin L. 2002. Elicitor-like effects of low-energy ultrasound on plant (*Panax ginseng*) cells: induction of plant defense responses and secondary metabolite production. Applied Microbiology and Biotechnology 59:51-57.

Wu J, Zhong JJ. 1999. Production of ginseng and its bioactive components in plant cell culture: current technological and applied aspects. Journal of Biotechnology 68(2-3):89-99.

Yamamoto H, Katano, N., Ooi, A., Inoue, K. 2000. Secologanin synthase which catalyzes the oxidative cleavage of loganin into secologanine is a cytochrome P450. Phytochem. 53:7-12.

Yamamoto H, Zhao P, Yakazi K, Inoue K. 2002. Regulation of lithospermic acid B and shikonin production in *Lithospermum erythrorhizon* cell suspension cultures. Chemical and Pharmaceutical Bulletin 50(8):1086-1090.

Yan Q, Hu Z, Tan RZ, Wu J. 2005. Efficient production and recovery of diterpenoid tanshinones in Salvia miltiorrhiza hairy root cultures with in situ adsorption, elicitation and semi-continuous operation. Journal of Biotechnology 119:416-424.

Zhang FS, Ma J, Cao YP. 1997. Phosphorus deficiency enhances root exudation of low-molecular weight organic acids and utilization of sparingly soluble inorganic phosphates by radish (*Raghanus satius* L.) and rape (*Brassica napus* L.) plants. Plant and Soil 196:261-264.

Zhang J, Wei WS. 2002. Estimation of intracellular phosphate content in plant cell cultures using an extended Kalman filter. Journal of Bioscience and Bioengineering 94(1):8-14.

Zhang W, Furusaki S, Middelberg APJ. 1998. Phase-segregated model for plant cell culture: The effect of cell volume fraction. Journal of Chemical Engineering of Japan 31(3):469-474.

Zhong J-J. 2001. Biochemical Engineering of the Production of Plant-Specific Secondary Metabolites by Cell Suspension Cultures. Plant Cells. p 1-26.

Zhu X-G, Sturler E, Long SP. 2007. Optimizing the distribution of resources between enzymes of carbon metabolism can dramatically increase photosynthetic rate: A numerical simulation using an evolutionary algorithm. Plant Physiology 145:513-526.

ANNEXE A : Milieux de culture

Tableau A-1 Composition des milieux de culture

	Milieu*		
	B5	**B5-RMN**	**P**
Composant	$mg \cdot L^{-1}$	$mg \cdot L^{-1}$	$mg \cdot L^{-1}$
Glucose	30 000	27 000	30 000
KNO_3	2500	2250	1900
(NH4)NO3	---	---	1650
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	250	225	250
$(NH_4)_2SO_4$	135	121,5	---
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	150	---	---
$MnSO_4 \cdot H_2O$	10	---	---
H_3BO_3	3	2,7	---
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	2	1,8	---
KI	0,75	0,675	---
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,25	0,225	---
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,025	0,0225	---
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0,025	---	---
Inositol	100	90	---
Nicotinic acid	1	0,9	---
Pyridoxine-HCl	1	0,9	---
Thiamine-HCl	10	9	---
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	150	135	332
$FeSO_4$-EDTA	43	---	43
2,4-D	0,2	0,18	---
kinétine	0,1	0,09	---
D_2O	---	10% (v/v)	---
chitine**	---	---	3 300

* Les milieux sont préparés avec de l'eau déionisée. Le pH est ajusté à 5,6 avant stérilisation (25 min. à 121°C)

** Une solution mère de chitine ($20 g \cdot L^{-1}$) est préparée dans du milieu de culture. La solution est ensuite stérilisée (30 min. à 121°C) et filtrée tel que décrit dans De Dobbeleer et al. (2006)

ANNEXE B : Descriptif du modèle métabolique utilisé au chapitre 7

Tableau B-1 Équations stoechiométriques (réactions 1-23)

No.	Stoechiométrie
1	GLC + ATP → G6P + ADP
2	FRU + ATP → F6P + ADP
3	G6P + 2 NADP → R5P + 2 NADPH + CO2
4	3 R5P → 2 F6P + G3P
5	E4P + 2 PEP + ATP + NADH → CHO + 4 Pi + ADP + NAD
6	CHO + AA + NAD → 0.5 ALK + OXO + NADH + CO2
7	PEP + CO2 → OAA + Pi
8	OXO+2 NAD + ADP + Pi → OAA + 2 NADH + ATP + CO2
9	PYR + NAD → NADH + ACOA + CO2
10	OXO + NH_4 + 3 NADPH + 3 ATP → AA + 3 NADP + 3 ADP + 3 Pi
11	ACOA + ATP + 2 NADPH → LIP + ADP + Pi + 2 NADP
12	2 R5P → F6P + E4P
13	SUC → GLC + FRU
14	G6P → F6P
15	ACOA + OAA + NAD → OXO + NADH + CO2
16	PEP + ADP → PYR + ATP
17	PEP → PYR + Pi
18	G3P + Pi + ADP + NAD → PEP + ATP + NADH
19	G3P + NADP → PEP + NADPH
20	F6P + ATP → 2 G3P + ADP
21	G6P + F6P + 2 NDP → SUC + 2 NTP
22	R5P + 3.75 AA + 7 ATP + 0.25 NAD → 7 ADP + 3.5 Pi + 1.75 PPi + 0.25 NADH + OP
23	G6P + 2 ATP + NADPH → STH + 2 ADP + NADP + Pi + PPi

Tableau B-2 Équations stoechiométriques (réactions 24-47)

No.	Stoechiométrie
24	STA + Pi → G6P
25	G6P + ATP → STA + ADP + PPi
26	LIP + 2 ATP + NAD → ACOA + 2 ADP + PPi + NADH
27	ACOA → ORA
28	ORA → ACOA
29	F6P + PPi → 2 G3P + Pi
30	SUC + PPi → G6P + F6P
31	EGLC + ATP → GLC + ADP + Pi
32	ENO_3 + ATP → NO_3 + ADP + Pi
33	EPi + 2 ATP → 3 Pi + 2 ADP
34	ENH_4 + ATP → NH_4 + ADP + Pi
35	OP → Pi
36	NO_3 + NADH + 3 NADPH → NH_4 + NAD + 3 NADP
37	PPi → 2 Pi
38	VPi → Pi
39	Pi + NTP → 2VPi + NDP
40	ATP → ADP + Pi
41	2.5 ADP + 2.5 Pi + NADH + O2 → 2.5 ATP + NAD
42	ATP → 3 Pi + 5 NH4 + 10/6 Glc
43	3 Pi + 5 NH4 + 10/6 Glc → ATP
44	NADH → NAD
45	GO2 → O2
46	AA + LIP + ORA + STH + OP → X
47	$V_L = V_{L0} - 20 \cdot X$ (volume de liquide)

Tableau B-3 Équations biocinétiques (réactions 1-16)

No.	Équation biocinétique
1	$v(1) = v_{\max 1} \bullet \frac{GLC}{K_{M_{GLC}} + GLC} \bullet \frac{ATP}{K_{M_{ATP}} + ATP} \bullet \left(0.76 + \frac{0.24}{1 + e^{-50 \bullet (CPi - 0.018)}}\right) \bullet \left(1 - \frac{1}{1 + e^{-200 \bullet (G6P - 0.05)}}\right) \bullet \left(0.56 + \frac{0.44}{1 + e^{-100 \bullet (EGLC - 8)}}\right)$
2	$v(2) = v_{\max 2} \bullet \frac{FRU}{K_{M_{FRU}} + FRU} \bullet \frac{ATP}{K_{M_{ATP}} + ATP} \bullet \left(1 - \frac{1}{1 + e^{-200 \bullet (F6P - 0.06)}}\right) \bullet \left(0.16 + \frac{0.84}{1 + e^{-100 \bullet (EGLC - 8)}}\right)$
3	$v(3) = v_{\max 3} \bullet \frac{G6P}{K_{M_{G6P}} + G6P} \bullet \frac{NADP}{K_{M_{NADP}} + NADP} \bullet \frac{1}{1 + e^{-25 \bullet \left(\frac{NADP}{NADP + NADPH} - 0.75\right)}}$
4	$v(4) = v_{\max 4} \bullet \frac{R5P}{K_{M_{R5P}} + R5P}$
5	$v(5) = v_{\max 5} \bullet \frac{E4P}{K_{M_{E4P}} + E4P} \bullet \frac{PEP}{K_{M_{PEP}} + PEP} \bullet \frac{ATP}{K_{M_{ATP}} + ATP} \bullet \frac{NADH}{K_{M_{NADH}} + NADH}$
6	$v(6) = v_{\max 6} \bullet \frac{CHO}{K_{M_{CHO}} + CHO} \bullet \frac{AA}{K_{M_{AA}} + AA} \bullet \frac{NAD}{K_{M_{NAD}} + NAD} \bullet \left(1 - \frac{1}{1 + e^{-200 \bullet (ALK - 0.01)}}\right) \bullet \left(0.48 + \frac{0.52}{1 + e^{-50 \bullet (t - t_e)}}\right)$
7	$v(7) = v_{\max 7} \bullet \frac{PEP}{K_{M_{PEP}} + PEP} \bullet \frac{CO_2}{K_{M_{CO2}} + CO_2} \bullet \left(1 - \frac{1}{1 + e^{-400 \bullet (OAA - 0.02)}}\right)$
8	$v(8) = v_{\max 8} \bullet \frac{OXO}{K_{M_{OXO}} + OXO} \bullet \frac{NAD}{K_{M_{NAD}} + NAD} \bullet \frac{ADP}{K_{M_{ADP}} + ADP} \bullet \frac{Pi}{K_{M_{Pi}} + Pi}$
9	$v(9) = v_{\max 9} \bullet \frac{PYR}{K_{M_{PYR}} + PYR} \bullet \frac{NAD}{K_{M_{NAD}} + NAD} \bullet \left(1 - \frac{1}{1 + e^{-200 \bullet (ACOA - 0.1)}}\right)$
10	$v(10) = v_{\max 10} \bullet \frac{OXO}{K_{M_{OXO}} + OXO} \bullet \frac{NH_4}{K_{M_{NH4}} + NH_4} \bullet \frac{NADPH}{K_{M_{NADPH}} + NADPH} \bullet \frac{ATP}{K_{M_{ATP}} + ATP}$
11	$v(11) = v_{\max 11} \bullet \frac{ACOA}{K_{M_{ACOA}} + ACOA} \bullet \frac{ATP}{K_{M_{ATP}} + ATP} \bullet \frac{NADPH}{K_{M_{NADPH}} + NADPH}$
12	$v(12) = v_{\max 12} \bullet \frac{R5P}{K_{M_{R5P}} + R5P}$
13	$v(13) = v_{\max 13} \bullet \frac{SUC}{K_{M_{SUC}} + SUC}$
14	$v(14) = v_{\max 14} \bullet \frac{G6P}{K_{M_{G6P}} + G6P} \bullet \left(1 - \frac{1}{1 + e^{-200 \bullet (F6P - 0.05)}}\right)$
15	$v(15) = v_{\max 15} \bullet \frac{ACOA}{K_{M_{ACOA}} + ACOA} \bullet \frac{OAA}{K_{M_{OAA}} + OAA} \bullet \frac{NAD}{K_{M_{NAD}} + NAD}$
16	$v(16) = v_{\max 16} \bullet \frac{PEP}{K_{M_{PEP}} + PEP} \bullet \frac{ADP}{K_{M_{ADP}} + ADP}$

Tableau B-4 Équations biocinétiques (réactions 17-32)

No.	Équation biocinétique
17	$v(17) = v_{max17} \cdot \frac{PEP}{K_{M_{PEP}} + PEP} \cdot \left(1 - \frac{1}{1 + e^{-10 \cdot (Pi - 0.05)}}\right)$
18	$v(18) = v_{max18} \cdot \frac{G3P}{K_{M_{G3P}} + G3P} \cdot \frac{Pi}{K_{M_{Pi}} + Pi} \cdot \frac{ADP}{K_{M_{ADP}} + ADP} \cdot \frac{NAD}{K_{M_{NAD}} + NAD}$
19	$v(19) = v_{max19} \cdot \frac{G3P}{K_{M_{G3P}} + G3P} \cdot \frac{NADP}{K_{M_{NADP}} + NADP}$
20	$v(20) = v_{max20} \cdot \frac{F6P}{K_{M_{F6P}} + F6P} \cdot \frac{ATP}{K_{M_{ATP}} + ATP}$
21	$v(21) = v_{max21} \cdot \frac{G6P}{K_{M_{G6P}} + G6P} \cdot \frac{F6P}{K_{M_{F6P}} + F6P} \cdot \frac{ADP}{K_{M_{ADP}} + ADP}$
22	$v(22) = v_{max22} \cdot \frac{R5P}{K_{M_{R5P}} + R5P} \cdot \frac{AA}{K_{M\_AA} + AA} \cdot \frac{ATP}{K_{M\_ATP} + ATP} \cdot \frac{NAD}{K_{M_{NAD}} + NAD} \cdot \frac{1}{1 + e^{-32.7 \cdot (Pi - 0.0003)}}$
23	$v(23) = v_{max23} \cdot \frac{G6P}{K_{M_{G6P}} + G6P} \cdot \frac{ATP}{K_{M_{ATP}} + ATP} \cdot \frac{NADPH}{K_{M_{NADPH}} + NADPH}$
24	$v(24) = v_{max24} \cdot \frac{STA}{K_{M_{STA}} + STA} \cdot \frac{Pi}{K_{M_{Pi}} + Pi} \cdot \left(\frac{1}{1 + e^{-100 \cdot (0.26 - GLC)}}\right)$
25	$v(25) = v_{max25} \cdot \frac{G6P}{K_{M_{G6P}} + G6P} \cdot \frac{ATP}{K_{M_{ATP}} + ATP} \cdot \frac{1}{1 + e^{-150 \cdot (GLC - 0.15)}} \cdot \left(\frac{1}{1 + e^{-200 \cdot (1.7 - STA)}}\right)$
26	$v(26) = v_{max26} \cdot \frac{LIP}{K_{M_{LIP}} + LIP} \cdot \frac{ATP}{K_{M_{ATP}} + ATP} \cdot \frac{NAD}{K_{M_{NAD}} + NAD} \cdot \left(\frac{1}{1 + e^{-10 \cdot (0.01 - NADH)}}\right)$
27	$v(27) = v_{max27} \cdot \frac{ACOA}{K_{M_{ACOA}} + ACOA}$
28	$v(28) = v_{max28} \cdot \frac{ORA}{K_{M_{ORA}} + ORA} \cdot \left(1 - \frac{1}{1 + e^{-10 \cdot (NADH - 0.01)}}\right)$
29	$v(29) = v_{max29} \cdot \frac{F6P}{K_{M_{F6P}} + F6P} \cdot \frac{PPi}{K_{M_{PPi}} + PPi} \cdot \left(1 - \frac{1}{1 + e^{-10 \cdot (Pi - 0.1)}}\right)$
30	$v(30) = v_{max30} \cdot \frac{SUC}{K_{M_{SUC}} + SUC} \cdot \frac{PPi}{K_{M_{PPi}} + PPi}$
31	$v(31) = v_{max31} \cdot \frac{EGLC}{K_{M_{EGLC}} + EGLC} \cdot \frac{ATP}{K_{M_{ATP}} + ATP}$
32	$v(32) = \left[v_{max32,LA} \cdot \frac{ENO_3}{K_{M\_LA_{ENO3}} + ENO_3} + v_{max32,HA} \cdot \frac{ENO_3}{K_{M\_HA_{ENO3}} + ENO_3}\right] \cdot \frac{ATP}{K_{M_{ATP}} + ATP}$

Tableau B-5 Équations biocinétiques (réactions 33-46)

No.	Équation biocinétique
33	$v(33) = \left[v_{\max 33,LA} \cdot \frac{EPi}{K_{M,LA_{EPi}} + EPi} + v_{\max 33,HA} \cdot \frac{EPi}{K_{M,HA_{EPi}} + EPi} \right] \cdot \frac{ATP}{K_{M_{ATP}} + ATP}$
34	$v(34) = \left[v_{\max 34,LA} \cdot \frac{ENH_4}{K_{M,LA_{ENH4}} + ENH_4} + v_{\max 34,HA} \cdot \frac{ENH_4}{K_{M,HA_{ENH4}} + ENH_4} \right] \cdot \frac{ATP}{K_{M_{ATP}} + ATP}$
35	$v(35) = v_{\max 35} \cdot \frac{OP^4}{K_{M_{OP}}{}^4 + OP^4} \cdot \left(1 - \frac{1}{1 + e^{-15 \cdot (Pi - 0.045)}} \right)$
36	$v(36) = v_{\max 36} \cdot \frac{NO_3{}^2}{K_{M_{NO3}}{}^2 + NO_3{}^2} \cdot \frac{NADH}{K_{M_{NADH}} + NADH} \cdot \frac{NADPH}{K_{M_{NADPH}} + NADPH}$
37	$v(37) = v_{\max 37} \cdot \frac{PPi}{K_{M_{PPi}} + PPi}$
38	$v(38) = v_{\max 38} \cdot \frac{VPi}{K_{M_{VPi}} + VPi} \cdot \left(1 - \frac{1}{1 + e^{-15 \cdot (CPi - 0.025)}} \right)$
39	$v(39) = v_{\max 39} \cdot \frac{CPi}{K_{M_{Pi}} + CPi} \cdot \left(\frac{1}{1 + e^{-100 \cdot (CPi - CPi,threshold)}} \right)$ avec: $CPi,threshold = 0.019 + \left(\frac{0.051}{1 + e^{-90 \cdot (EPi - 0.025)}} \right)$
40	$v(40) = v_{\max 40} \cdot \frac{ATP}{K_{M_{ATP}} + ATP}$
41	$v(41) = v_{\max 41} \cdot \frac{NADH}{K_{M_{NADH}} + NADH} \cdot \frac{ADP}{K_{M_{ADP}} + ADP} \cdot \frac{CPi^2}{K_{M_{CPi}}{}^2 + CPi^2} \cdot \frac{O_2}{K_{M_{O2}} + O_2}$
42	$v(42) = v_{\max 42} \cdot \frac{ATP}{K_{M_{ATP}} + ATP} \cdot \left(\frac{1}{1 + e^{-200 \cdot (ATP + ADP - 0.01)}} \right)$
43	$v(43) = v_{\max 43} \cdot \frac{CPi}{K_{M_{CPi}} + CPi} \cdot \frac{NH_4}{K_{M_{NH4}} + NH_4} \cdot \frac{GLC}{K_{M_{GLC}} + GLC} \cdot \left(\frac{1}{1 + e^{-250 \cdot (0.01 - ATP + ADP)}} \right) \cdot \left(\frac{1}{1 + e^{-250 \cdot (0.03 - CPi)}} \right)$
44	$v(44) = v_{\max 44} \cdot \frac{NADH}{K_{M_{NADH}} + NADH} \cdot \frac{1}{1 + e^{-200 \cdot \left(\frac{NADH}{NAD + NADH} - 0.6 \right)}}$
45	$v(45) = k_L a \cdot (O2_{sat} - O2)$
46	$v(46) = v_{\max 46} \cdot X \cdot \frac{AA}{K_{M_{AA}} + AA} \cdot \frac{LIP^{1.25}}{K_{M_{LIP}}{}^{1.25} + LIP^{1.25}} \cdot \frac{ORA}{K_{M_{ORA}} + ORA} \cdot \frac{OP^4}{K_{M_{OP}}{}^4 + OP^4} \cdot \frac{ATP}{K_{M_{ATP}} + ATP}$

Tableau B-6 Taux de réaction maximum (réactions 1-23)

Réaction	v_{max}	**Unités**
1	3.6821	$mmol \bullet gDW^{-1} \bullet j^{-1}$
2	0.2458	"
3	4.6422	"
4	0.0014	"
5	2.4830	"
6	0.0178	"
7	1.2293	"
8	398.49	"
9	138.79	"
10	24.743	"
11	0.4298	"
12	0.0712	"
13	0.1568	"
14	7.8330	"
15	252.05	"
16	7.6207	"
17	6.7058	"
18	73.185	"
19	24.646	"
20	11.235	"
21	2.8689	"
22	1.6091	"
23	0.2051	"

Tableau B-7 Taux de réaction maximum (réactions 24-46)

Réaction	v_{max}	**Unités**
24	1.7544	$mmol \cdot gDW^{-1} \cdot j^{-1}$
25	0.7796	"
26	0.0215	"
27	0.2507	"
28	0.0022	"
29	0.8318	"
30	0.1802	"
31	3.1303	"
32_LA	1.8643	"
32_HA	0.0271	"
33_LA	1.1496	"
33_HA	0.0754	"
34_LA	1.5500	"
34_HA	0.2502	"
35	0.0523	"
36	2.1280	"
37	2.3155	"
38	0.1333	"
39	2.2212	"
40	25.989	"
41	116.19	"
42	0.0097	"
43	0.1908	"
44	19.626	"
45 (k_La)	368.30	j^{-1}
46 (μ)	0.4669	j^{-1}

Tableau B-8 Constantes d'affinité

Métabolite	Valeur	Unités
AA	0.0147	$mmol \cdot gDW^{-1}$
FRU	0.1045	"
CO2	$1.25x10^{-4}$	"
GLC	0.1121	"
LIP	0.0025	"
NAD	$2.7 x10^{-4}$	"
NADH	$3.2 x10^{-4}$	"
NADP	$2.5 x10^{-4}$	"
NADPH	$1.7 x10^{-4}$	"
ADP	$1.73 x10^{-3}$	"
NH4	0.0322	"
ATP	0.0041	"
ORA	0.0210	"
VPi	0.0035	"
CPi	0.0018	"
PPi	0.2064	"
SUC	0.0465	"
STA	0.9410	"
STH	0.1250	"
OP	0.0291	"
G6P	0.0139	"
F6P	0.0396	"
G3P	0.0095	"
E4P	0.0086	"
R5P	0.0096	"
CHO	0.0095	"
PYR	0.0094	"
PEP	0.0021	"
ACOA	0.0211	"
OAA	0.0043	"
OXO	0.0014	"
O2	$1.3 x10^{-4}$	"
NO3	0.0518	"
EGLC	4.6120	mM
ENO3_HA	0.0157	"
ENO3_LA	9.8430	"
EPI_HA	0.0017	"
EPI_LA	0.0151	"
ENH4_HA	0.0210	"
ENH4_LA	1.9750	"
EO2	0.0069	"

Tableau B-9 Variables d'état et conditions initiales

Métabolite	C1*	C2	C3	Unités
AA	0.286	0.286	0.286	$mmol \cdot gDW^{-1}$
FRU	0.75	1	1	"
CO2	0.00125	0.00125	0.00125	"
GLC	0.83	1.01	0.6	"
ALK	0.0003	0.0003	0.0003	"
LIP	0.404762	0.404762	0.64	"
NAD	0.000171	0.000171	0.000171	"
NADH	0.000174	0.000174	0.000192	"
NADP	0.000335	0.000335	0.000335	"
NADPH	0.000444	0.000444	0.000819	"
ADP	0.001833	0.001833	0.001833	"
NH4	0.03	0.03	0.03	"
ATP	0.007333	0.007333	0.00571	"
ORA	0.16	0.16	0.16	"
CPi	0.007	0.007	0.007661	"
VPi	0.01	0.01	0.03	"
PPi	0.005	0.005	0.005987	"
SUC	0.304286	0.304286	0.304286	"
STA	0.294444	0.7	0.5	"
STH	0.293395	0.293395	0.293395	"
OP	0.015	0.05	0.005	"
G6P	0.021	0.021	0.018213	"
F6P	0.015	0.015	0.015	"
G3P	0.010442	0.009641	0.012227	"
E4P	0.005877	0.01031	0.01031	"
R5P	0.007572	0.010239	0.008366	"
CHO	0.013149	0.009558	0.010228	"
PYR	0.01	0.01	0.01	"
PEP	0.01	0.01	0.01	"
ACOA	0.01	0.01	0.01	"
OAA	0.01	0.01	0.01	"
OXO	0.01	0.01	0.01	"
O2	0.0044	0.0044	0.0044	"
NO3	0.0157	0.0157	0.0157	"
PME	0.0095	0.0095	0.0095	"
EGLC	126.7865	126.7865	130	mMol
ENO3	19.468	19.468	19.468	"
ENH4	0.4	1.8	1.8	"
EPi	0.9	0.9	1	"
EO2	0.23	0.23	0.23	"
V	2.511	2.511	2.3	L
X	9.855	9.855	11	$gDW \cdot bioréacteur^{-1}$

*C1 : Cuvée sans résines; C2 : cuvée avec résines; C3 : perfusion avec résines

ANNEXE C : Correction des données d'O_2 dissous

Les sondes polarographiques pour mesurer l'O_2 dissous ont des temps de réponse (τ_r) de l'ordre de quelques secondes jusqu'à 1,5 minutes, tout dépendamment de leur taille, de l'état de la membrane, de l'électrode et de la solution d'électrolyte. Il est donc nécessaire de corriger les données brutes d'O_2 dissous afin d'enlever ce biais expérimental. La correction des données peut être effectuée avec l'équation suivante :

$$O_{2,corr} = O_2 + \tau_r \cdot \partial O_2 / \partial t$$

La valeur O_2 et sa dérivée représentent les données brutes obtenues par la sonde et la valeur $O_{2,corr}$ est la valeur corrigée pour tenir compte du biais expérimental causé par le temps de réponse. Ce temps de réponse est considéré comme étant le temps que prendra la sonde, après une perturbation, à atteindre 63,2% de sa réponse en régime permanent. Afin d'identifier cette valeur, il suffit de transférer rapidement la sonde d'une solution complètement désaturée en O_2 à une solution saturée (0,23 mMol d'O_2 en solution). Le temps de réponse sera alors le temps que mettra la sonde (après le transfert) pour indiquer 0,145 mMol d'O_2 (0,23 x 63,2%) La Figure suivante montre le résultat d'un tel test.

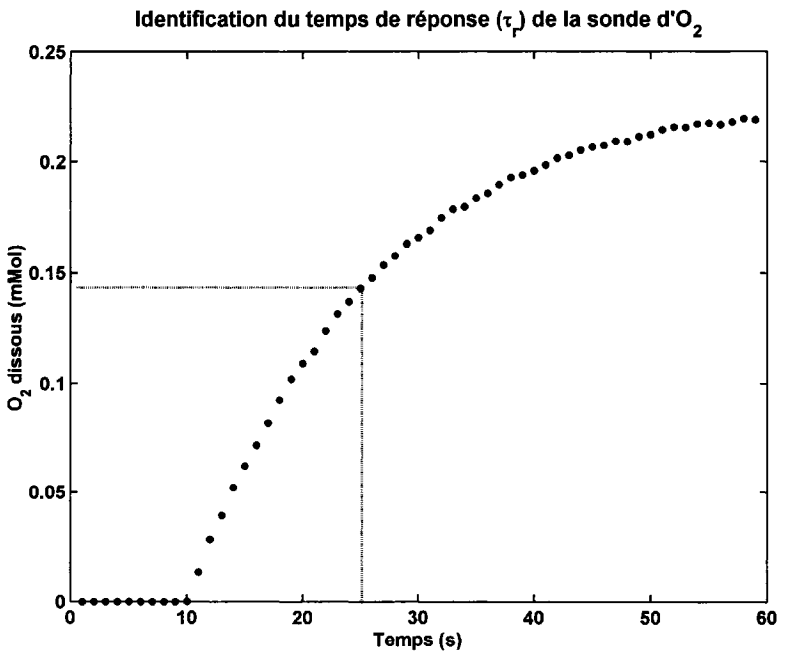


Figure C.1 Temps de réponse de la sonde d'O_2 dissous

On observe donc que la sonde a un temps de réponse (τ_r) d'environ 15 secondes. Cette valeur sera donc utilisée pour corriger les données d'O_2 avant d'effectuer les calculs de respiration et de k_La.

ANNEXE D : Mesures d'activité enzymatiques

Tableau D-1 Mesure des activités enzymatiques lors d'une culture cuvée et comparaison avec les taux de réaction du modèle (simulés et maximum)

Enzymes et réactions		Jour de culture* 3	6	9	v_{max}**
GK	mesure *in vitro*	4,05 ±0,32	2,75 ±0,54	2,35 ±0,87	
	simulée (v1)	2,92	2,48	0,49	3,68
FK	mesure *in vitro*	1.46 ±0,53	1.64 ±0,41	1.04 ±0,34	
	simulée (v2)	0,14	0,105	0,006	0,246
PGI	mesure *in vitro*	169 ±14,1	157 ±28,3	186 ±23,1	
	simulée (v14)	2,30	1,93	0,77	7,83
PEPC	mesure *in vitro*	98.1 ±17,9	78.9 ±17,4	55.1 ±13,4	
	simulée (v7)	0,48	0,45	0	4,23
PEPase	mesure *in vitro*	88.4 ±14,4	61.3 ±12	53.7 ±2,1	
	simulée (v17)	1,83	2,15	0,66	6,71
PK	mesure *in vitro*	5.60 ±2,7	2.93 ±1.41	7.24 ±3,2	
	simulée (v16)	2,82	1,75	0,2	7,62
MDH	mesure *in vitro*	1607 ±203	1288 ±120	1079 ±378	
	simulée (v8)	3,9	3,4	0,86	398,5
AGPase	mesure *in vitro*	13.9 ±9,6	10.4 ±4,2	7.97 ±4,8	
	simulée (v25)	0,006	0,11	0,013	0,79

* Les échantillons ont été prélevés sur un bioréacteur cuvée élicité sans résine extractive (Figure 7.3)

**Les vi représentent les valeurs des flux simulés par le modèle (jours 3, 6 et 9) et les v_{max} représentent les taux maximum de réaction identifiés par la calibration du modèle (Tableaux B-6 et B7). Les taux sont donnés en $mmol \cdot gDW^{-1} \cdot j^{-1}$

GK : glucokinase; FK : fructokinase; PGI : phosphoglucose isomérase; PEPC : Phosphoenolpyruvate carboxylase; PEPase : phosphoenolpyruvate phosphatase; PK : Pyruvate kinase; MDH : malate déshydrogénase; AGPase : ADP-glucose-pyrophosphorylase.

Les intervalles de confiance représentent l'écart-type sur l'essai enzymatique (n=3)

ANNEXE E : Vérification de l'hypothèse de dilution négligeable

Lorsqu'un bilan de masse est effectué sur un système métabolique, l'équation suivante est considérée :

$$\frac{dS}{dt} = M \bullet v - \mu \bullet S$$

Le terme de dilution par la croissance (μ•S) est généralement négligé pour simplifier le système. Cette hypothèse est confirmée pour plusieurs espèces cellulaires, notamment parce que les concentrations en métabolites sont relativement faibles et que les taux de croissance sont généralement plus bas que les taux de réaction métaboliques (v). L'hypothèse de dilution négligeable est tout de même investiguée ici pour les cellules végétales puisque ces cellules peuvent accumuler les nutriments à des niveaux relativement élevés par rapport aux autres cellules.

Les cellules végétales ont un faible taux de croissance Par exemple, pour les cellules de plantes, on observe des taux spécifiques de croissance de l'ordre de 0,1 à 0,3 j^{-1} (voir Figures 7.3 et 7.4) et la concentration en glucose est de l'ordre de 1 mmol•gDW^{-1}. Lors de la culture en perfusion (Figure 7.15), une concentration maximale de 0,35 mmol•gDW^{-1} a été observée durant l'application de l'algorithme d'alimentation. Avec cette concentration intracellulaire en glucose, le terme de dilution par la croissance serait

de l'ordre de 0,035 à 0,105 mmol•gDW^{-1}•j^{-1}, soit bien en deçà de la consommation de glucose par les hexokinases, qui dans ce cas est de l'ordre de 2,6 mmol•gDW^{-1}•j^{-1}, tel que vu à la Figure 7.18. Dans ces conditions, la dilution par la croissance équivaut au plus à 4% de la consommation de GLC par les hexokinases. L'hypothèse de dilution négligeable est donc vérifiée pour les conditions dans lesquelles a été effectuée la culture en perfusion avec stabilisation des réserves intracellulaires en GLC.