

Titre: Mise à l'échelle de bioréacteurs de 5 litres à 150 litres pour la culture de cellules végétales
Title: culture of plant cells

Auteur: Matthieu Fortier
Author:

Date: 2003

Type: Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

Référence: Fortier, M. (2003). Mise à l'échelle de bioréacteurs de 5 litres à 150 litres pour la culture de cellules végétales [Mémoire de maîtrise, École Polytechnique de Montréal]. PolyPublie. <https://publications.polymtl.ca/8214/>
Citation:

Document en libre accès dans PolyPublie Open Access document in PolyPublie

URL de PolyPublie: <https://publications.polymtl.ca/8214/>
PolyPublie URL:

Directeurs de recherche: Pierre Carreau, & Joël Sirois
Advisors:

Programme: Non spécifié
Program:

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

MISE À L'ÉCHELLE DE BIORÉACTEURS DE 5 LITRES À 150 LITRES
POUR LA CULTURE DE CELLULES VÉGÉTALES

MATTHIEU FORTIER

DÉPARTEMENT DE GÉNIE CHIMIQUE
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLÔME DE MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES
(GÉNIE CHIMIQUE)
DÉCEMBRE 2003



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: 978-0-494-48917-8

Our file *Notre référence*

ISBN: 978-0-494-48917-8

NOTICE:

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

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

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

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

AVIS:

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

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

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

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

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé :

MISE À L'ÉCHELLE DE BIORÉACTEURS DE 5 LITRES À 150 LITRES
POUR LA CULTURE DE CELLULES VÉGÉTALES

présenté par : FORTIER Matthieu

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

M. PERRIER Michel, Ph.D., président

M. CARREAU Pierre J., Ph.D., membre et directeur de recherche

M. SIROIS Joël, Ph.D., membre et codirecteur de recherche

M. JOLICOEUR Mario, Ph.D., membre

REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord remercier mon superviseur Joël Sirois de m'avoir offert un encadrement exceptionnel tout au long de mon séjour chez Phytobiotech Inc. Il a su me communiquer, à travers ses conseils judicieux, sa passion de la science et son inébranlable motivation.

Je suis également extrêmement reconnaissant envers M. Jean Archambault de m'avoir accordé sa confiance et donné l'opportunité de travailler dans le domaine des biotechnologies et de la culture de cellules végétales. Je le remercie aussi pour sa perspicacité et ses réflexions toujours pertinentes par rapport à la compréhension des phénomènes. J'aimerais remercier spécialement mon directeur M. Pierre Carreau qui s'est montré patient et disponible pour répondre à mes nombreuses questions tout au long de mes études.

Ce travail n'aurait pu aboutir sans l'aide précieuse de mes collègues étudiants qui ont œuvré indirectement sur mon projet. J'aimerais donc remercier : M. Philippe Lessard pour son aide lors des manipulations de matériel lourd et pour la conception de programmes Excel facilitant le traitement de données, Mme Sarah Galipeau pour son sens de l'organisation et de la gestion des ressources et M. Sébastien Sarailh pour l'instigation de discussions enrichissantes et colorées permettant la remise en question et l'amélioration des protocoles établis.

Je tiens aussi à souligner l'aide précieuse apportée par les membres de Phytobiotech Inc. Je pense à M. David Fortier pour son travail scientifique ordonné sans lequel mes recherches auraient été beaucoup plus longues, M. Steve Fiset pour ses conseils précieux, son esprit de déduction et son sens critique exemplaire, M. Martin Descoteaux pour sa compétence technique, sa bonne humeur et son altruisme, M. Martin Gaudette pour sa vaillance, son écoute et son dévouement ainsi que M. Dany Aubry pour ses nombreuses explications et son implication dans le projet malgré ses innombrables responsabilités. J'aimerais aussi remercier Luc Lavoie, Francis Stabile, Serge Brouillette, Julie Paradis et tout le groupe de chimie pour les analyses ainsi que Robert Williams, Sophie Roy, Meghan Graham et tout le groupe de biologie pour la préparation des cellules et leur collaboration à la réussite de ce projet.

En terminant, j'aimerais remercier mes proches qui m'ont aidé et supporté tout au long de mes études, mes parents qui ont toujours cru en moi et qui ont su être présents lors des moments difficiles malgré la distance qui nous séparent, ma compagne, Isabelle, qui s'est toujours montrée patiente et attentionnée durant la longue rédaction et finalement mes amis Stéphane F., Stéphane D., Pascal, Alexandre, Daniel, Étienne, Julie-Anne, Annie, Jonathan et tous les autres qui m'ont accordé leur respect, leur confiance et leur soutien.

RÉSUMÉ

L'objectif principal de ce projet est de valider la mise à l'échelle d'un bioréacteur de 40 L et de réaliser la mise à l'échelle d'un bioréacteur de 150 L. Le projet vise le développement d'un système permettant un coefficient de transfert d'oxygène (k_{LA}) de 15 h^{-1} dans l'eau pour une aération de 0.05 vvm, un temps de mélange inférieur à 2 min et un cisaillement induit par le mobile d'agitation inférieur à $60 s^{-1}$.

La faisabilité d'une mise à l'échelle a été évaluée par la validation d'un bioréacteur de 40 L en cuvée alimentée avec deux espèces (*A* et *B*). Les cultures en 40 L ont été effectuées en parallèle avec des bioréacteurs de 3 L. Les taux de croissance se sont avérés semblables en 40 L et en 3 L. On remarque même un taux de croissance 30 % plus élevée dans le bioréacteur de 40 L lors de la culture de *B*. Par contre, les performances en production sont en moyenne 50% plus élevées à plus petite échelle. Ces écarts n'ont pas pu être associés à un effet d'échelle puisque des différences dans l'état nutritionnel des deux cultures ont été observées en période de croissance et de production. Les bonnes performances du bioréacteur de 40 L permettent de confirmer l'efficacité de la méthode de mise à l'échelle utilisée. Les problèmes majeurs de la culture à grande échelle identifiés sont le retrait du CO₂ dissous et la production de mousse. Un système permettant l'expulsion de façon stérile de la mousse a donc été élaboré.

Des essais de mise en suspension, des mesures de k_{La} et des temps de mélange sur un modèle à froid ont ensuite été effectués pour vérifier l'atteinte des conditions nécessaires à la croissance des cellules. Ces tests ont permis de choisir une cuve ayant un H/D de 2 et une hélice ayant un p/d de 1.5. De plus, des simulations à l'aide d'un modèle mathématique ont permis de choisir un entrefer entre l'hélice et la cuve de 25 mm assurant un taux de cisaillement inférieur à 60 s^{-1} . Ces dimensions ont donc permis d'atteindre un k_{La} de 15 h^{-1} , une suspension ayant un degré d'uniformité moyen de 63% et un temps de mélange inférieur à 2 minutes. Celui-ci est quatre fois plus petit que le temps caractéristique de transfert d'oxygène en culture ($1/k_{La}$) et négligeable par rapport au temps caractéristique de consommation des nutriments (taux de consommation maximal de 9 mM/j). Le transfert d'oxygène et la distribution des nutriments est donc uniforme à l'intérieur de la cuve. Il a aussi été montré qu'il est difficile d'extrapoler les performances de transfert du bioréacteur de 150 L à l'aide d'un modèle mathématique lorsqu'il y a une mauvaise approximation du taux de coalescence à grande échelle.

Enfin, une description détaillée du nouveau bioréacteur de 150 L a pu être effectuée grâce aux dimensions validées lors de l'expérience. La mise à l'échelle géométrique de certaines composantes du bioréacteur de 5 L et d'autres considérations pratiques ont permis de compléter son dimensionnement. Par contre, l'opération de ce nouveau bioréacteur de 150 L devra être validé en culture pour connaître ses performances réelles.

ABSTRACT

The main objective of this project was the feasibility of a 40 L bioreactor scale-up and the conception of a 150 L bioreactor. A system allowing a volumetric mass transfer coefficient (k_{La}) of 15 h^{-1} in water for a gas flow rate of 0.05 vvm, a mixing time lower than 2 min and a shear stress induced by the agitation lower than 60 s^{-1} was developed.

The scalability was validated in a 40 L bioreactor by culture of two species (*A* and *B*), with parallel growth studies in 3 L bioreactors. The growth rates were similar in 40 L and 3L for species *A*, but the growth rate was 30 % higher in the 40 L during the culture of species *B*. However, production was 50 % higher in the smaller scale bioreactor. These variations could not only be associated to a scale effect because differences in the nutritional state of the two cultures were observed during growth and production. The results of the 40 L bioreactor confirm the efficiency of the scale-up methods and should allow further scale-up to 150 L for the culture of plant cells. The major problems of these cultures with larger scale bioreactors were the evacuation of dissolved CO_2 and the production of foam. Thus, a system allowing the sterile removal of foam was developed.

The information obtained with the 40 L bioreactor was adapted for the development of the 150 L bioreactor. Suspending solid tests, k_{La} measures and mixing time evaluation were performed on a cold model to reach the conditions necessary for the cell growth. These tests indicated a tank having a H/D of 2 and a propeller

having a p/d of 1.5 was optimal. Moreover, simulations with a mathematical model indicated a gap between the propeller and the tank of 25 mm ensured a shear rate lower than 60 s^{-1} . These dimensions made it possible to reach a k_{La} of 15 h^{-1} , a suspension having an average uniformity coefficient of 63% and a mixing time lower than 2 minutes. This value is four times smaller than the characteristic transfer time of oxygen in typical cultures ($1/k_{La}$) and ensures that the oxygen mass transfer is uniform inside the tank. Furthermore, this mixing time is almost 360 times faster than the characteristic consumption of NH_4 which has highest consumption rate (9 mM /day). However, it was also shown that a mathematical model cannot predict the mass transfer performance of the 150 L bioreactor without better estimates of the coalescence rate on larger scale equipment.

Finally, a detailed description of the new bioreactor of 150 L is given with the dimensions verified by the experiments. The geometrical scaling of certain components of the 5 L bioreactor and other considerations allowed finalizing its dimensions. However, this new 150 L bioreactor will have to be validated in culture to determine its real performance.

TABLE DES MATIÈRES

| | |
|---|------|
| REMERCIEMENTS | iv |
| RÉSUMÉ | vi |
| ABSTRACT..... | viii |
| TABLE DES MATIÈRES | x |
| LISTE DES TABLEAUX | xiii |
| LISTE DES FIGURES | xiv |
| LISTE DES SYMBOLES..... | xvi |
| LISTE DES ANNEXES | xx |
| 1. INTRODUCTION | 1 |
| 1.1. Problématique | 2 |
| 1.2. Objectifs | 5 |
| 2. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE | 6 |
| 2.1. Développement de procédés | 6 |
| 2.2. Mise à l'échelle de procédés..... | 8 |
| 2.2.1. Analyse dimensionnelle et équation d'échelle..... | 11 |
| 2.2.2. Problèmes reliés à la mise à l'échelle de bioréacteurs | 17 |
| 2.4. Mise à l'échelle de bioréacteurs pour la culture de cellules végétales.... | 23 |
| 2.4.1. Cellules de plante | 23 |
| 2.4.2. Succès commerciaux | 25 |
| 2.4.3. Transfert d'oxygène | 26 |
| 2.4.4. Modèle prédictif et critère de mise à l'échelle..... | 27 |
| 2.4.5. Mélange triphasique et mise en suspension..... | 30 |

| | |
|--|----|
| 3. MÉTHODOLOGIE EXPÉRIMENTALE..... | 37 |
| 3.1. Modèles à froid | 37 |
| 3.2. Transfert gazeux..... | 39 |
| 3.2.1. Mesure du k_{La} | 39 |
| 3.3. Mélange | 42 |
| 3.3.1. Mesure du temps de mélange..... | 42 |
| 3.3.2. Description de la suspension et mesure de sa qualité..... | 43 |
| 3.4. Culture de cellules végétales en suspension..... | 44 |
| 3.4.1. Lignés cellulaires et maintien | 44 |
| 3.4.2. Culture en bioréacteur | 45 |
| 3.4.3. Conditions d'opération | 49 |
| 3.4.4. Échantillonnage et suivi..... | 50 |
| 3.4.5. Analytique..... | 51 |
| 4. RÉSULTATS ET DISCUSSION | 53 |
| 4.1. Mise en opération du bioréacteur de 50 L..... | 53 |
| 4.1.1. Lecture en ligne de l'OUR..... | 53 |
| 4.1.2. Comparaison de la croissance en 3 L et 40 L | 57 |
| 4.1.3. Stratégie d'évacuation de la mousse | 69 |
| 4.1.4. Conclusion | 71 |
| 4.2. Résultats des tests sur les modèles à froid..... | 72 |
| 4.2.1. Transfert d'oxygène | 72 |
| 4.2.2. Mise en suspension..... | 78 |
| 4.2.3. Temps de mélange..... | 81 |
| 4.2.4. Cisaillement et analogie couette..... | 84 |

| | |
|--|-----|
| 4.2.5. Conclusion | 90 |
| 4.3. Design final du 150 L..... | 90 |
| 4.3.1. Conclusion | 92 |
| 5. CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS | 94 |
| BIBLIOGRAPHIE | 96 |
| ANNEXES | 101 |

LISTE DES TABLEAUX

| | | |
|----------------|---|----|
| Tableau 2.1 : | Influence de l'échelle sur les mécanismes clefs..... | 9 |
| Tableau 2.2 : | Liste des outils connus pour le développement de procédé..... | 10 |
| Tableau 2.3 : | Équations d'échelle du régime dynamique | 15 |
| Tableau 2.4 : | Équations d'échelle du régime thermique..... | 16 |
| Tableau 2.5 : | Équations d'échelle du régime chimique..... | 16 |
| Tableau 2.6 : | Effets des critères de mise à l'échelle, Shuler (1992)..... | 19 |
| Tableau 2.7 : | Effets des critères de mise à l'échelle, Mavituna (1996)..... | 19 |
| Tableau 2.8 : | Temps caractéristiques..... | 22 |
| Tableau 2.9 : | Méthodes non-invasives | 34 |
| Tableau 2.10 : | Méthodes invasives | 35 |
| Tableau 3.1 : | Dimensions des réservoirs | 37 |
| Tableau 3.2 : | Dimensions des hélices..... | 38 |
| Tableau 4.1 : | Valeurs des paramètres de culture pour l'étude de sensibilité | 56 |

LISTE DES FIGURES

| | | |
|---------------|--|----|
| Figure 2.1 : | Modèles pour le développement de procédés | 7 |
| Figure 2.2 : | Modèles pour l'amélioration de procédés..... | 8 |
| Figure 2.3 : | Augmentation des coûts avec l'échelle | 11 |
| Figure 2.4 : | Effet de la géométrie de la cuve de 150 L sur le k_{La} | 28 |
| Figure 3.1 : | Bioréacteur de 3 L | 46 |
| Figure 3.2 : | Bioréacteur de 40 L | 48 |
| Figure 4.1 : | Étude de sensibilité de la lecture en ligne d'OUR | 56 |
| Figure 4.2 : | Croissance de l'espèce A en fonction des heures de culture | 59 |
| Figure 4.3 : | Taux de croissance de l'espèce A | 61 |
| Figure 4.4 : | Taux de dilution pour l'espèce A | 62 |
| Figure 4.5 : | Production totale de la molécule α par l'espèce A | 63 |
| Figure 4.6 : | Production totale de la molécule β par l'espèce A..... | 64 |
| Figure 4.7 : | Croissance de l'espèce B en fonction des heures de culture..... | 65 |
| Figure 4.8 : | Taux de croissance l'espèce B | 66 |
| Figure 4.9 : | Taux de dilution pour l'espèce B | 67 |
| Figure 4.10 : | Production totale de la molécule λ par l'espèce B | 68 |
| Figure 4.11 : | Système antimousse proposé | 70 |
| Figure 4.12 : | Effet de la géométrie de la cuve sur le k_{La} | 73 |
| Figure 4.13 : | Comparaison des performances des différents systèmes..... | 74 |
| Figure 4.14 : | Effet du pas de l'hélice sur le k_{La} | 76 |
| Figure 4.15 : | Effet du milieu sur la valeur du k_{La} | 77 |
| Figure 4.16 : | Effet du pas de l'hélice sur la qualité de la suspension | 79 |

| | |
|--|----|
| Figure 4.17 : Choix de la meilleur hélice | 80 |
| Figure 4.18 : Temps de mélange..... | 82 |
| Figure 4.19 : Analogie couette pour le calcul du cisaillement | 85 |
| Figure 4.20 : Analogie couette pour le calcul du cisaillement | 87 |
| Figure 4.21 : Simulation de Fortier (2002) pour le calcul du cisaillement | 87 |
| Figure 4.22 : Écart relatif entre la simulation de Fortier (2002) et l'analogie couette | 88 |
| Figure 4.23 : Analogie couette pour le bioréacteur de 150 L..... | 89 |
| Figure 4.24 : Coupe du bioréacteur de 150 L | 91 |
| Figure 4.25 : Vue d'ensemble du bioréacteur de 150L..... | 92 |

LISTE DES SYMBOLES

| | |
|---------------------------------|--|
| a | Exposant de la méthode de Rayleigh |
| $a_1, a_2, \dots a_n$ | Concentration molaire des réactifs ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) |
| A | Surface d'échange (m^2) |
| a | Angle d'inclinaison ($^\circ$) |
| b | Exposant de la méthode de Rayleigh |
| c | Exposant de la méthode de Rayleigh |
| C | Concentration ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) |
| $C_{\text{CO}_2\text{out}}$ | Concentration de gaz carbonique à la sortie ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) |
| C_p | Chaleur massique ($\text{kJ}\cdot\text{kg}^{-1}$) |
| $C_{\text{O}_2\text{ Sat}}$ | Concentration d'oxygène maximum dans la phase liquide ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) |
| $C_{\text{O}_2\text{ Dissous}}$ | Concentration d'oxygène dans la phase liquide ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) |
| C_s | Concentration de substrat ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) |
| C_{SO_4} | Concentration de sulfate ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) |
| CTR | Débit gaz carbonique transféré au milieu ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) |
| D | Diamètre de la cuve (mm) |
| d | Diamètre de l'hélice (mm) |
| d_a | Diamètre de l'aérateur (mm) |
| d_p | Diamètre d'une particule (mm) |
| DW | Masse sèche ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) |
| e | Émissivité |
| F | Force (N) |

| | |
|-----------|---|
| F_r | Facteur adimensionnel de cinétique réactionnelle |
| g | Gravité ($\text{m}\cdot\text{s}^{-2}$) |
| H | Hauteur de liquide (mm) |
| h | Coefficient de transfert de chaleur par convection ($\text{W}\cdot\text{m}^{-2}\cdot^\circ\text{C}^{-1}$) |
| H_a | Hauteur d'agitation (mm) |
| H_r | Débit de chaleur transféré pour tout le système (J/s) |
| i | Exposant de la méthode de Rayleigh |
| j | Exposant de la méthode de Rayleigh |
| k | Conductivité thermique ($\text{W}\cdot\text{m}^{-3}\cdot^\circ\text{C}^{-1}$) |
| K | Coefficient de diffusion du B-naphtol (mm/s) |
| k_{La} | Coefficient de transfert de l'oxygène (h^{-1}) |
| k_{LaC} | Coefficient de transfert du gaz carbonique (h^{-1}) |
| K_n | Coefficient de vitesse réactionnelle |
| K_{su} | Coefficient de transfert du substrat |
| K_t | Coefficient de transfert de masse général |
| L | Longueur (mm) |
| L_1 | Longueur caractéristique de la petite échelle (mm) |
| L_2 | Longueur caractéristique de la grande échelle (mm) |
| l | Rapport géométrique ($L_2\cdot L_1^{-1}$) |
| m | Indice de consistance ($\text{Pa}\cdot\text{s}^n$) |
| \dot{m} | Débit massique ($\text{kg}\cdot\text{s}^{-1}$) |
| N | Vitesse de rotation (RPS) |
| N_1 | Vitesse de rotation de la petite échelle (RPS) |

| | |
|------------|--|
| N_2 | Vitesse de rotation de la grande échelle (RPS) |
| n | Indice de rhéofluidifiance |
| N_{CD} | Vitesse d'agitation minimale de dispersion (RPS) |
| N_{JS} | Vitesse minimale de mise en suspension (RPS) |
| α | Exposant de la méthode de Rayleigh |
| OUR | Consommation d'oxygène ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) |
| P | Puissance (W) |
| p | Pas du ruban hélicoïdal (mm) |
| P_g | Puissance aérée (W) |
| Δp | Perte de charge (Pa) |
| Q | Débit volumique d'alimentation des gaz (vvm) |
| q | Débit volumique de fluide ($\text{m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$) |
| Q_{ch} | Débit de chaleur (J/s) |
| Q_T | Débit total d'alimentation des gaz (cc) |
| R | Rayon externe de la cuve (mm) |
| kR | Rayon externe du cylindre en rotation (mm) |
| R_m | Vitesse de réaction ($\text{mmol} \cdot \text{s}^{-1}$) |
| S | Facteur qui dépend de la géométrie de l'hélice |
| T | Température (K) |
| t | Temps |
| T_1 | Température de la petite échelle (K) |
| T_2 | Température de la grande échelle (K) |
| δT | Changement de température d'un fluide (K) |

| | |
|-------------|---|
| U | Coefficient global d'échange |
| V | Volume de liquide (L) |
| v | Vitesse caractéristique ($\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$) |
| W | Largeur de pale de l'hélice (mm) |
| WW | Poids humide ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) |
| X_p | Concentration de particules ($\text{kg}\cdot\text{L}^{-1}$) |
| ρ | Densité ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$) |
| ρ_L | Densité du liquide ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$) |
| ρ_s | Densité du solide ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$) |
| μ | Viscosité ($\text{Pa}\cdot\text{s}$) |
| μ_L | Viscosité du liquide ($\text{Pa}\cdot\text{s}$) |
| σ | Contrainte de cisaillement (Pa) |
| η | Viscosité de procédé ($\text{Pa}\cdot\text{s}$) |
| γ | Vitesse de cisaillement (s^{-1}) |
| ϕ | Fonction de nombres adimensionnels |
| Π_i | Nombres adimensionnels |
| Ψ | Expansion thermale du fluide |
| ξ | Constante de Stephan-Boltzman |
| ϑ | Facteur proportionnel à l'activité catalytique |
| Ω | Vitesse angulaire ($\text{rad}\cdot\text{s}^{-1}$) |

LISTE DES ANNEXES

| | | |
|------------|---|-----|
| ANNEXE A : | Dimensions des bioréacteurs..... | 102 |
| ANNEXE B : | Plans et montages expérimentaux | 104 |
| ANNEXE C : | Temps de mélange | 108 |
| ANNEXE D : | Mise en suspension dans un bioréacteur de 5 L | 110 |
| ANNEXE E : | Suivi des cultures..... | 118 |

1. INTRODUCTION

Les plantes ont été très longtemps la principale source de médicaments. Elles sont encore aujourd’hui cultivées et ensuite traitées afin d’en extraire les composés d’intérêt (Shuler et al., 1992). Afin d’obtenir une concentration maximum en principes actifs, la récolte des plantes doit se faire à des époques différentes, en fonction des parties que l’on désire récolter (Tanaka, 1982). De plus, la qualité de la récolte est souvent affectée par le climat, les maladies ou les insectes. Pour palier à ce manque de souplesse et à la lenteur de la production, la synthèse chimique est utilisée par plusieurs compagnies pharmaceutiques pour produire plus rapidement et à moindre coût des médicaments de toutes sortes. Par contre, les connaissances limitées en chimie et l’élaboration fastidieuse de nouvelles technologies rendent impossible la synthèse artificielle de nouvelles macromolécules plus complexes (Worstell, 2000). C’est pour cette raison et pour l’immense diversité des plantes que l’industrie retourne à la recherche de nouvelles molécules thérapeutiques d’origine végétale (AIChE, 1958; Doran, 1999).

Afin d’obtenir des résultats constants et reproductibles, les plantes doivent avoir une origine et une composition contrôlée en laboratoire. Une solution possible est la production de métabolites secondaires par la culture de cellules de plante en suspension. Cette approche offre l’avantage d’être reproductible par stabilisation des lignées et permet la régulation de la croissance et de la productivité. Par contre,

à partir de la découverte d'une molécule prometteuse, le chemin est encore long avant sa commercialisation.

1.1. Problématique

Les étapes de la mise en marché d'un nouveau médicament à partir de la découverte d'une nouvelle molécule sont :

- Le criblage (*Screening*)
- La découverte d'une molécule active (*hit*)
- La sélection d'une molécule d'intérêt (*lead*)
- L'identification d'un médicament potentiel (*Candidate drug*)
- L'étude d'un nouveau médicament (*Investigational New Drug*)
- Les tests précliniques
- Les phases I à III
- L'approbation par la FDA (*Federal Drug Administration*)
- Le lancement du nouveau médicament.

Le criblage consiste à faire des tests d'activité sur des cibles thérapeutiques diverses. Les molécules testées doivent être pures (30% -50%). À ce stade, une quantité de produit d'intérêt de l'ordre du mg est suffisante. Une molécule active sur une cible thérapeutique doit confirmer son activité en repassant des tests avec des molécules pures à 80%. La quantité minimale de produit nécessaire à ce

moment reste de l'ordre du mg. Une molécule est d'intérêt lorsqu'un travail sur la formulation et l'identification de structure est commencé ainsi que des tests préliminaires sur des animaux. Puisque l'échelle des tests augmente, la quantité de produit nécessaire augmente aussi. Pour détenir une molécule d'intérêt, la compagnie doit pouvoir produire des quantités de l'ordre du gramme d'une pureté de 90%. Un composé est considéré comme un médicament potentiel après que des tests sur sa stabilité aient été menés. C'est aussi à cette étape que sont menées des expériences visant à optimiser la structure du composé.

Des tests plus intensifs sur plusieurs espèces d'animaux sont ensuite effectués. Étant donné la nature des tests, la compagnie doit être apte à fournir des quantités allant jusqu'à 100g de composé pur à 95%. On dit qu'un nouveau médicament est à l'étude lorsque des kilos de composé doivent être produits afin d'effectuer des tests de stabilité, des profils de dégradation et des tests de toxicité. De plus, le procédé doit avoir évolué et être GLP (*Good Laboratory Process*). L'étude préclinique marque le début de la production semi-industrielle. La compagnie doit fournir assez de composé pour finaliser les tests de toxicité, le développement de la formulation ainsi que des tests sur des primates. Il y a aussi un début de réglementation visant à faire approuver le produit ainsi que le procédé par la FDA (*Federal Drug Administration*). pour avoir éventuellement accès au marché américain. C'est lors de la phase I que l'on débute les premiers tests sur un faible échantillon de personnes. Ensuite, les profils de dégradations sont complétés et l'entreprise est en possession d'une étude pharmacocinétique complète du composé. Lors des phases II et III la compagnie continue à se plier aux exigences de la réglementation tout en

se consacrant à la mise à l'échelle du procédé et à la production. Des tests de confirmation de l'efficacité du nouveau composé sont finalement menés sur un plus grand échantillon d'hommes et de femmes. Enfin, l'entreprise se penche sur une éventuelle stratégie de marketing pour ensuite faire approuver leur procédé et leur produit par la FDA avant la mise en marché.

Cependant, la productivité des cultures de cellules de plantes reste faible et leur utilisation est économiquement viable seulement si les métabolites produits ont une grande valeur commercial (Zhong 1995). Cohello (2000) propose 3 façon d'augmenter le rendement de production d'une culture de cellules végétales en suspension :

1. L'augmentation du taux de croissance
2. L'augmentation de la concentration cellulaire
3. L'amélioration des rendements en production par différentes techniques d'élicitation

Ces aspects ont été étudiés et grandement améliorés grâce au développement d'une stratégie efficace de contrôle des gaz dissous par Fiset (2000), à l'augmentation des taux de croissance et de la densité cellulaire par les travaux de Sirois (1997) et Cohello (2000) ainsi qu'à l'optimisation du transfert d'oxygène dans un bioréacteur de 5 L par Fortier (2002). Il est maintenant primordial de s'assurer que les techniques développées peuvent se mettre à l'échelle pour répondre aux demandes grandissantes de chaque étape du développement d'un nouveau médicament.

1.2. Objectifs

L'objectif principal de ce projet est de concevoir un bioréacteur de 150 L provenant d'une mise à l'échelle géométrique d'un bioréacteur de 5 L développé par Fortier (2002) pour la culture de cellules végétales à haute densité cellulaire en cuvée alimentée. La faisabilité d'une mise à l'échelle sera évaluée par la validation d'un bioréacteur de 40 L avec deux espèces (*A* et *B*). Le projet vise le maintien en 150 L des conditions favorisant la croissance, c'est-à-dire obtenir un coefficient de transfert d'oxygène (k_{La}) de 15 h^{-1} (Fortier 2002) pour une aération de 0.05 vvm, un temps de mélange inférieur à 2 min tout en limitant le cisaillement induit par le mobile d'agitation à 60 s^{-1} . Dans le cadre de ce projet, l'effet de la géométrie de la cuve, du pas du ruban hélicoïdale et du débit de bullage sur le transfert gazeux, les temps de mélanges et l'uniformité de la suspension cellulaire seront étudiés. De plus, une solution adéquate au problème de mousse sera développée. Enfin, cette étude servira de base pour la rédaction d'un manuel de conception d'un bioréacteur de 150 L.

2. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

2.1. Développement de procédés

Les grandes étapes du développement d'un procédé sont : la conceptualisation, l'exploration, le développement et l'implantation commerciale. La conceptualisation est l'étape où une idée se basant sur des principes théoriques ou expérimentaux est proposée. Grâce à l'exploration, plusieurs avenues pratiques sont étudiées afin de mettre en œuvre l'idée de départ. Le développement de la meilleure idée et son implantation commerciale termine le processus de développement.

Sie et Krishna (1998) répertorient quatre façons différentes de voir ces étapes de développement. La plus commune consiste à considérer chaque étape ayant une égale importance sans distinction d'investissements d'argent ou d'efforts. La deuxième tient compte de l'argent investi à chaque étape ainsi que des ressources toujours grandissantes nécessaires à l'implantation d'un procédé à l'échelle commerciale. La troisième considère le point de vue de la science et le fait qu'au départ une grande quantité de problèmes doivent être résolus. Lorsque le projet avance, les problèmes ainsi que les solutions techniques et économiques se précisent pour converger vers un procédé pouvant être commercialisé. La Figure 2.1 illustre ces trois approches.

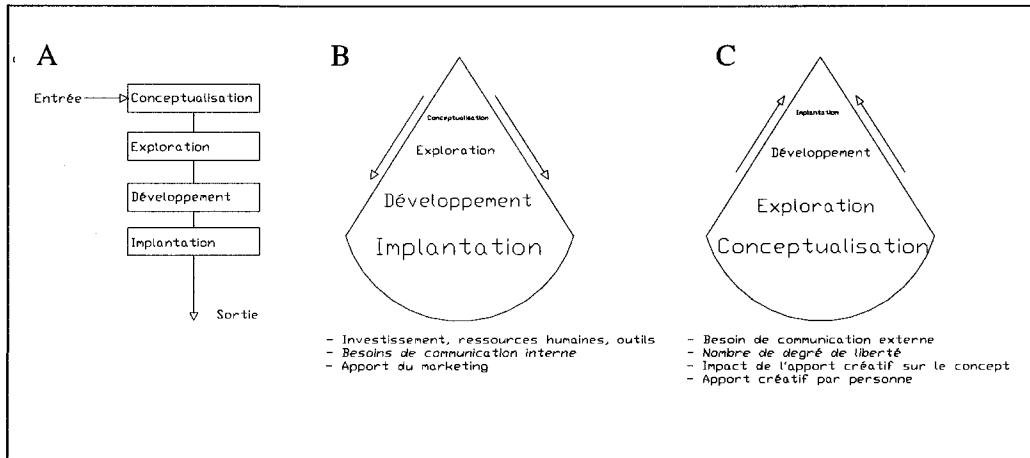


Figure 2.1 : Modèles pour le développement de procédés

A) Activités égales; B) Activités divergentes; C) Activités convergentes

Ces trois approches impliquent une augmentation de l'échelle de production graduelle jusqu'à la commercialisation du produit. Par contre, dans l'industrie, une augmentation d'échelle suit généralement une diminution d'échelle. En effet, plusieurs innovations et améliorations menant au développement de nouvelles technologies voient le jour en cherchant dans les laboratoires des solutions concrètes aux problèmes rencontrés sur des unités industrielles. La mise à l'échelle vers le bas devient donc un outil important et une étape incontournable du développement de nouveaux procédés industriels. La Figure 2.2 illustre bien la place de la mise à l'échelle vers le bas et vers le haut dans le développement ou l'amélioration d'un procédé.

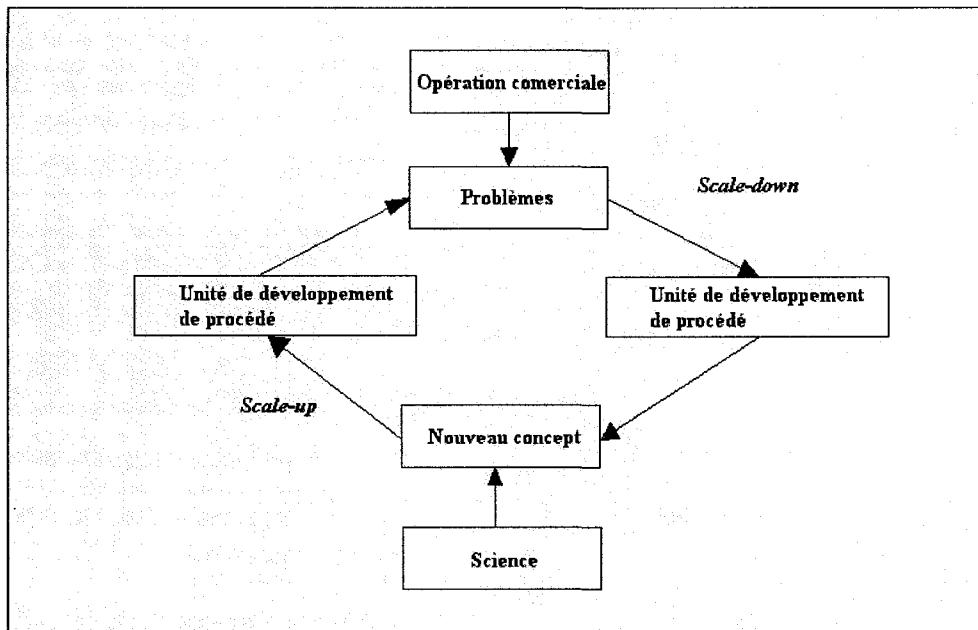


Figure 2.2 : Modèles pour l'amélioration de procédés

2.2. Mise à l'échelle de procédés

La mise à l'échelle ne correspond pas seulement à un changement de taille atteint en multipliant les dimensions caractéristiques par un facteur plus grand que 1. Pour augmenter la capacité d'une unité, il faut souvent modifier sa structure pour tenir compte des contraintes inhérentes à l'augmentation des dimensions (Trambouze, 1990).

Lors d'une mise à l'échelle de procédés il est important de séparer les systèmes complexes en système indépendants et d'examiner ces systèmes d'après les connaissances disponibles pour en identifier les éléments pouvant être

problématiques pour la mise à l'échelle (Johnstone et al., 1957 ; Trambouze, 1990).

Une liste de tous les mécanismes impliqués doit être faite pour tenir compte de leur rôle et de leur importance relative. Le Tableau 2.1 fait état de l'influence de l'échelle sur les mécanismes rencontrés dans les procédés chimiques (Trambouze, 1990).

Tableau 2.1 : Influence de l'échelle sur les mécanismes clefs dans les procédés

| Mécanismes | Variables importantes* | Influence de l'échelle |
|------------------------|----------------------------|------------------------|
| Cinétiques chimiques | T, C, P | Non |
| Thermodynamiques | T, C, P | Non |
| Transfert de chaleur | Vitesses locales, P, C | Indirecte |
| Transfert de matière | T, C , Turbulences | Indirecte |
| Transfert entre phases | Vitesses relatives, C, T | Indirecte |
| Convection forcée | Débits, Géométrie | Importante |
| Convection libre | P, C, T , Géométrie | Déterminante |

* T , Température; C , Concentration; P , Pression

Plusieurs outils permettent l'étude de ces mécanismes. Ils ont été répertoriés par Sie et Krishna (1998). Ceux-ci sont présentés dans le Tableau 2.2.

Tableau 2.2 : Liste des outils connus pour le développement de procédé

| Outils | Champ d'étude |
|------------------------|---|
| Modèles mathématiques | Corrélation et prédition Translation et intégration Étude de sensibilité |
| Mesures en laboratoire | Caractéristiques physiques |
| Réacteurs pilotes | Cinétique chimique Développement de catalyseur Rendement Procédure d'opération Démonstration de procédé Identification de problème |
| Modèles à froid | Hydrodynamique Comportement multiphasique Phénomènes d'échange Effets géométriques |

En somme, les étapes pour la mise à l'échelle d'un procédé sont l'élaboration d'un modèle mathématique, la recherche de certains paramètres physiques en laboratoire, l'étude des interactions entre les différents mécanismes à l'aide d'unités pilotes et la validation du modèle mathématique par des tests sur un modèle à froid. Une approche similaire en six étapes est aussi proposée par (Leng, 1991). La nécessité d'effectuer des tests sur un modèle à froid s'explique par des principes économiques. En effet, d'après Sie et Krishna (1998) l'importance des coûts reliés à la correction des erreurs à grandes échelles (Figure 2.3) implique une diminution obligatoire des incertitudes le plus tôt possible avant de passer à l'étape industrielle.

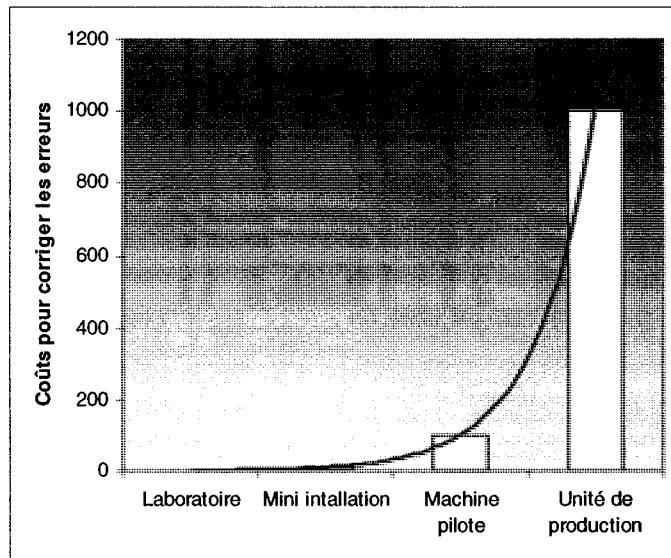


Figure 2.3 : Augmentation des coûts avec l'échelle

2.2.1. Analyse dimensionnelle et équation d'échelle

L'analyse dimensionnelle permet la modélisation de plusieurs phénomènes à l'aide de nombres sans dimension permettant ainsi leur mise à l'échelle. Elle repose sur le principe de similitude. Ce principe stipule que la configuration spatiale et temporelle d'un système physique est déterminée par des ratios de grandeur à l'intérieur d'un système et ne dépend pas de la dimension ni de la nature des unités à l'intérieur desquelles ces grandeurs sont mesurées (Johnstone et al., 1957). Il existe quatre types de similitude ; géométrique, cinétique, thermique et chimique. Un système est homologue à un autre lorsque les deux systèmes sont similaires géométriquement et présentent les mêmes compositions chimiques et propriétés physiques aux endroits correspondants.

En appliquant le théorème de Buckingham et la méthode des indices de Rayleigh (Johnstone et al., 1957), il est possible d'obtenir la solution de toute équation physique homogène sous la forme adimensionnelle suivante :

$$\phi(\Pi_1, \Pi_2, \dots) = 0 \quad (2.1)$$

Où Π_i représente tous les nombres sans dimension et toutes les constantes dimensionnelles. De cette façon un phénomène comme l'écoulement isotherme d'un fluide peut s'exprimer par des rapports de phénomènes. Voici à titre d'exemple cette théorie appliquée à l'écoulement isotherme d'un fluide qui fait intervenir la vitesse v , la longueur L , la force F , la densité ρ , la tension de surface σ et la gravité g .

$$\phi(v, L, F, \rho, \mu, \sigma, g) = 0 \quad (2.2)$$

La force F étant une variable dépendante il est utile de réarranger l'équation de la façon suivante :

$$\phi(v, L, \rho, \mu, \sigma, g)F = 1 \quad (2.3)$$

En appliquant la méthode des indices de Rayleigh et en remplaçant par les unités primaires on obtient :

$$[v]^o [L]^p [\rho]^q [\mu]^r [\sigma]^s [g]^t [F] = 0 \quad (2.4)$$

$$[L t^{-1}]^o [L]^p [m L^{-3}]^q [m L^{-1} t^{-1}]^r [m t^{-2}]^s [L t^{-2}]^t [m L t^{-2}] = 0 \quad (2.5)$$

En effectuant un bilan sur les exposants et en solutionnant pour les exposants δ , ϵ et θ on obtient alors :

$$a = -o - 2i - 2j - 2 \quad (2.6)$$

$$b = -o - i + j - 2 \quad (2.7)$$

$$c = -o - i - 1 \quad (2.8)$$

En substituant ces résultats dans 2.4 et en réarrangeant on obtient une relation contenant les nombres adimensionnels suivants :

$$\left[\frac{v L \rho}{\mu} \right]^{-o} \left[\frac{\rho v^2 L}{\sigma} \right]^{-i} \left[\frac{v^2}{L g} \right]^{-j} \left[\frac{F}{\rho v^2 L^2} \right] = 0 \quad (2.9)$$

où

$$\frac{F}{\rho v^2 L^2} = \phi \left(\frac{v L \rho}{\mu}, \frac{\rho v^2 L}{\sigma}, \frac{v^2}{L g} \right) \quad (2.10)$$

On retrouve de cette façon, les nombres de Reynolds, de Froude et de Weber qui peuvent être utilisés pour caractériser un écoulement isotherme. Si ces quantités restent constantes durant la mise à l'échelle, alors le procédé à grande échelle sera identique au modèle (Johnstone et al. 1957).

Il est par contre impossible de garder tous les nombres dimensionnels constants puisque chaque phénomène varie différemment avec une augmentation de l'échelle. Pour deux systèmes homologues, si l représente le rapport des longueurs caractéristiques de chaque système, la vitesse caractéristique v varie de la façon suivante :

$$Re = \frac{\text{Forces d'inertie}}{\text{Forces visqueuses}} = cst \Rightarrow v \propto l^{-1} \quad (2.11)$$

$$Re = \frac{\text{Forces d'inertie}}{\text{Forces de gravité}} = cst \Rightarrow v \propto l^{1/2} \quad (2.12)$$

$$We = \frac{\text{Forces centrifuges}}{\text{Forces interfaciales}} = cst \Rightarrow v \propto l^{-1/2} \quad (2.13)$$

Il est possible d'obtenir l'égalité de seulement deux de ces nombres en changeant la nature du fluide à l'étude dans une des unités. C'est pour cette raison qu'il est important de bien connaître le procédé afin de déterminer le phénomène qui a une importance prédominante sur les autres. On appelle « régime » la force, le facteur d'écoulement ou de résistance contrôlant le taux de variation global de changement dans un procédé (Johnstone et al., 1957). Pour faire une mise à l'échelle représentative d'un procédé complexe, le régime doit être relativement pur et les taux de réaction doivent dépendre d'un seul groupe dimensionnel (Johnstone et al., 1957). De plus, les régimes doivent être identiques à petite et à

grande échelle. Il est possible de rencontrer des régimes statique, dynamique, thermique, chimique ou mixte. Le Tableau 2.3 présente les relations d'échelle qui correspondent à un procédé caractérisé par un régime dynamique. Le Tableau 2.4 montre celles du régime thermique et le Tableau 2.5 celles du régime chimique.

Tableau 2.3 : Équations d'échelle du régime dynamique

| Contrôle | *Équations d'échelle |
|--|---|
| <u>Viscosité</u> | |
| $\frac{\Delta p}{\rho v^2} = \phi \left(\frac{\rho v L}{\mu} \right)$ | $v = \frac{\mu}{\rho L} = \frac{v}{L}$, $q = \frac{\mu L}{\rho} = v L$, $\Delta p = \frac{\mu^2}{\rho L^2}$, $P = \frac{\mu^3}{\rho^2 L}$ |
| Transfert de masse : | Transfert de masse : |
| $\frac{K_t L}{D_{AB}} = \phi \left(\frac{\rho v L}{\mu}, \frac{\mu}{\rho D_{AB}} \right)$ | $K_t = \frac{D_{AB}}{L}$, $\dot{m} = D_{AB} L \Delta C$ |
| | <u>Systèmes homologues :</u> |
| | $v = P = \frac{1}{L}$, $q = L$, $\Delta p = \frac{1}{L^2}$ |
| | Transfert de masse : |
| | $K_t = \frac{1}{L}$, $\dot{m} = L$ |
| <u>Gravité</u> | |
| $\frac{\Delta p}{\rho v^2} = \phi \left(\frac{v^2}{Lg} \right)$ | $v = \sqrt{L}$, $q_v = L^{2.5}$, $\Delta p = \rho L$, $P = \rho L^{3.5}$ |
| | <u>Systèmes homologues :</u> |
| | $\rho = 1$ |
| <u>Tension de surface</u> | <u>Systèmes homologues :</u> |
| $\frac{\rho v^2 L}{\sigma} = cst$ | $v = \frac{1}{\sqrt{L}}$, $N = \frac{1}{L^{3/2}}$, $s = \frac{1}{L}$ |

* Chaque variable est un rapport de deux grandeurs ex : $N = N_2/N_1$

Tableau 2.4 : Équations d'échelle du régime thermique

| Contrôle | *Équations d'échelle |
|---|--|
| <u>Convection naturelle</u> | |
| $\frac{H_r}{kL\Delta T} = \phi\left(\frac{\psi g \Delta T L^3 \rho^2}{\mu^2}, \frac{C_p \mu}{k}\right)$ | $\Delta T = \frac{\mu^2}{\psi \rho^2 L^3}, H_r = \frac{k \mu^2}{\psi \rho^2 L^2},$ $h = \frac{k}{L}$ |
| <u>Systèmes homologues :</u> | |
| | $\Delta T = \frac{1}{L^3}$ |
| <u>Radiation</u> | |
| | $\frac{H_r}{\rho c_p v L^2 \delta T} = \phi\left(\frac{\rho c_p v}{\zeta e T^3}, \frac{T_1}{T_2}, \frac{\rho c_p v \delta T w}{k \Delta T}\right)$ $v = 1, \frac{k \Delta T}{w} = 1, H_r = L^2,$ $w = 1$ |
| * Chaque variable est un rapport de deux grandeurs ex : $N = N_2/N_1$ | |

Tableau 2.5 : Équations d'échelle du régime chimique

| Contrôle | *Équations d'échelle |
|--|---|
| <u>Réaction homogène</u> | |
| $\frac{K_n F_r (a_2 \cdots a_n) L}{v} = \phi\left(\frac{qa_1}{C_p \rho T}, \frac{qa_1 v}{H_r}\right)$ | $v = L, H_r = L, q = L^3,$ $J = L^3 = V$ |
| <u>Réaction hétérogène</u> | |
| | Avec activité semblable : |
| $\frac{K_n F_r (a_2 \cdots a_n) \vartheta}{v} = \phi\left(\frac{qa_1}{C_p \rho T}, \frac{Q_{ch} av}{H_r}\right)$ | $v = H_r = 1, q = L^2$ |
| * Chaque variable est un rapport de deux grandeurs ex : $N = N_2/N_1$ | |

Pour trouver la relation d'échelle adéquate selon les méthodes énoncées par Johnstone et al. (1957), il est important de connaître les facteurs qui influencent le procédé. On peut ensuite en déduire les nombres adimensionnels qui le caractérisent, déterminer le régime qui le contrôle et, si possible, trouver des relations d'échelle appropriées.

D'après Mavituna (1996), l'analyse dimensionnelle est un outil puissant mais comporte quelques faiblesses. En effet lorsqu'un changement de régime survient avec l'augmentation d'échelle, la méthode ne s'applique plus (Jhonstone et al. 1957 ; Mavituna, 1996). L'application formelle de l'analyse dimensionnelle mène souvent à des valeurs farfelues de consommation de puissance et de vitesse d'agitation (Mavituna, 1996). Enfin, la similarité géométrique sur laquelle s'appuie l'analyse ne peut pas toujours être conservée lors de la mise à l'échelle (Johnstone et al., 1957 ; Trambouze, 1990 ;Worstell, 2000).

2.3. Problèmes reliés à la mise à l'échelle de bioréacteurs

La nature unique des bioprocédés ajoute à la complexité et aux difficultés de la mise à l'échelle (Shuler et al., 1992 ; Reisman, 1993). Presque tous les bioréacteurs sont triphasiques, c'est-à-dire qu'ils mettent en présence les trois phases (gaz, liquide, solide). Pour cette raison les méthodes de modélisation fondamentales ne sont pas adéquates. En effet, dans la littérature les équations de transport sont développées pour des milieux homogènes (Bird et al., 1960). De plus, les bilans

doivent contenir des termes de transport dans les trois dimensions et les conditions limites deviennent vite très compliquées. Mavituna (1996) mentionne que des équations simplifiées pour l'écoulement, l'analyse dimensionnelle, des règles du pouce ainsi qu'une approche d'essais et erreur restent les principaux outils pour la mise à l'échelle des bioprocédés.

D'après Reisman (1993), chaque procédé impliquant des organismes vivants a quelque chose d'unique. Les organismes sélectionnés ou modifiés interagissent avec leur environnement et le modifie d'une façon très complexe. Des modifications de cet environnement par une augmentation d'échelle ou un changement dans les conditions d'opération entraînent des réactions imprévisibles de la part des cellules rendant souvent la mise à l'échelle non rentable. Il est spécifié dans l'article de Reisman (1993) qu'un simple changement dans la vitesse d'agitation ou dans la stratégie d'aération peut affecter le temps de mélange et de circulation, les coûts d'opération, la production de mousse, le cisaillement induit, la quantité de CO₂ dissous et la surface de contact gaz-liquide.

Shuler et al. (1992) affirment que les performances d'un bioprocédé doivent changer avec l'échelle. Les analyses dimensionnelles présentées par Shuler et al. (1992) et Mavituna (1996) en témoigne. Les différentes grandeurs pouvant être conservées pour une mise à l'échelle et leur influence lors d'une augmentation de volume de 80L à 10 000 L étudiée par Shuler et al. (1992) sont présentées dans le Tableau 2.6. D'autre part, une étude similaire est effectuée par Mavituna (1996) pour une augmentation d'échelle de 10 L à 10 000L et est présentée au Tableau 2.7.

Tableau 2.6 : Effets des critères de mise à l'échelle d'après Shuler et al. (1992)

| Critères | <i>P/V</i> | <i>N</i> | <i>ND</i> | <i>Re</i> | <i>Q_P/V</i> |
|---------------------------|------------|----------|-----------|-----------|------------------------|
| P/V constant | 1 | 0.34 | 1.7 | 8.5 | 0.34 |
| N constant | 25 | 1 | 5 | 25 | 1 |
| vitesse de pale constante | 0.2 | 0.2 | 1 | 5 | 0.2 |
| Re constant | 0.0016 | 0.04 | 0.2 | 1 | 0.04 |

Tableau 2.7 : Effets des critères de mise à l'échelle d'après Mavituna (1996)

| Critères | <i>P</i> | <i>P/V</i> | <i>N</i> | <i>ND</i> | <i>Re</i> |
|---------------------------|----------|------------|-----------|-----------|-----------|
| P/V constant | 10^3 | 1 | 0.22 | 2.15 | 21.5 |
| N constant | 10^5 | 10^2 | 1 | 10 | 10^{-2} |
| vitesse de pale constante | 10^2 | 0.1 | 0.1 | 1 | 10^{-3} |
| Re constant | 0.1 | 10^{-4} | 10^{-2} | 0.1 | 1 |

Shuler et al. (1992) affirment qu'une vitesse de rotation constante comme critère d'échelle implique un temps de mélange constant, qu'une puissance par unité de volume constante implique un transfert d'oxygène constant, qu'un nombre de Reynolds constant assure un schéma d'écoulement géométriquement similaire et qu'une vitesse en bout de pale constante permet de garder le cisaillement constant. Les relations suivantes découlent de l'analyse dimensionnelle appliquée à un régime dynamique d'un fluide agité mécaniquement.

$$P \propto N^3 D^5 \quad (2.14)$$

$$V \propto D^3 \quad (2.15)$$

$$Q_p \alpha ND^3 \quad (2.16)$$

$$\frac{P}{V} \alpha N^3 D^2 \quad (2.17)$$

$$\frac{Q_p}{V} \alpha N \quad (2.18)$$

Donc en fixant N et D on fixe toutes les quantités importantes mentionnées dans le Tableau 2.6. Puisque ces quantités ont différentes dépendances de N et de D , un changement dans l'échelle provoque inévitablement un changement dans l'environnement physique de la cellule. Comme l'explique la théorie (Shuler et al., 1992), lorsque ces changements affectent la distribution des réactifs où s'ils endommagent ou brisent les cellules, la réponse métabolique est différente d'une échelle à une autre.

Les deux principales limitations sur la taille d'un bioréacteur sont sa capacité à fournir aux cellules l'oxygène qui leur est nécessaire ainsi que le transfert de chaleur dégagé par l'activité métabolique des cellules (Shuler et al., 1992). Enfors et al. (2001) expliquent que le faible rendement en biomasse à grande échelle peut être dû à la production d'inhibiteur de croissance par les cellules et par des limitations locales en oxygène. Ces zones seraient provoquées par la présence d'un gradient de nutriments occasionnée par l'alimentation ponctuelle du bioréacteur. La mousse demeure aussi un problème de taille pour la mise à l'échelle d'un bioréacteur. En effet, la mousse qui sort d'un bioréacteur a pour effet de boucher les filtres de sortie ce qui provoque une augmentation de la perte de charge et une

diminution du débit de gaz. Il existe 2 façons de briser la mousse soit mécaniquement ou, chimiquement par l'ajout de surfactants. Par contre, ces agents ont pour effet de diminuer le transfert d'oxygène ou d'inhiber la croissance des cellules (Shuler et al., 1992). Enfin, si le H/D de la cuve demeure constant durant la procédure de mise à l'échelle, il y a une diminution dramatique du rapport Surface/Volume. Ces changements diminuent la contribution relative de l'aération de surface pour l'apport en oxygène et restreignent l'évacuation du CO_2 dissous. Une approche pour prédire les limitations possibles du futur bioréacteur est d'utiliser les temps caractéristiques de conversion et de transport. Le Tableau 2.8 montre les définitions des principaux temps caractéristiques. Il est alors facile de comparer certain phénomène sur une base de temps. Par exemple, s'il n'existe aucun système de contrôle d'oxygène dissous et que le temps caractéristique du transfert d'oxygène est plus petit que son temps caractéristique de consommation, alors le milieu sera saturé d'oxygène puisque le transfert d'oxygène est beaucoup plus rapide que la consommation. Cependant, si ces temps sont du même ordre de grandeur, la quantité d'oxygène dissous sera très basse.

En somme, Reisman (1993) rapporte plusieurs mises à l'échelle réussie de bioprocédé impliquant des bactéries ou des champignons. Ces succès sont d'après lui attribuables aux bonnes connaissances concernant le contrôle de la stérilité, aux développements des inocula, à la minimisation du cisaillement et à des stratégies de contrôle efficaces. À la lumière de ces informations, il est important pour faire une mise à l'échelle réussie, de bien comprendre l'environnement et les phénomènes entourant la culture des micro-organismes d'intérêt. La nature complexe et

difficilement prédictible du mélange triphasique implique aussi l'étude expérimentale de phénomènes dans des systèmes plus simples pour identifier par la suite les effets pouvant être additifs, égaux ou antagonistes.

Tableau 2.8 : Temps caractéristiques

| Procédés de transport : | Temps caractéristiques |
|--------------------------|---|
| Écoulement | $\frac{L}{v}$ ou $\frac{V}{Q}$ |
| Diffusion | $\frac{L^2}{D_{AB}}$ |
| Transfert d'oxygène | $\frac{1}{k_L a}$ |
| Transfert de chaleur | $\frac{V\rho C_p}{UA}$ |
| Mélange | $t = \frac{4V}{(1.5ND^3)}$ |
| Procédés de conversion : | Temps caractéristiques |
| Croissance | $\frac{1}{\mu}$ |
| Réaction chimique | $\frac{C_s}{r}$ |
| Consommation du substrat | $\frac{C_s}{R_m} (C_s \gg K_{su})$ $\frac{K_{su}}{R_m} (C_s \ll K_{su})$ |

2.4. Mise à l'échelle de bioréacteurs pour la culture de cellules végétales

2.4.1. Cellules de plante

En plus de tous les problèmes rapportés à la section précédente, la culture de cellules végétales en suspension comporte d'autres limitations. En effet, les cellules de plantes sont généralement moins bien connues que les cellules animales ou bactériennes en raison de la difficulté de trouver et d'isoler les gènes régissant leurs différentes fonctions métaboliques (Shuler et al., 1992). La cellule végétale contient environ 90-95 % d'eau par rapport à 80 % pour les bactéries à cause de la vacuole centrale. Leur taille relativement grande (10µm-100µm) et leur vacuole remplie d'eau les rendent extrêmement sensibles au cisaillement généré par l'aération et l'agitation (Kim et al., 1991 ; Doran, 1999). Plusieurs produits d'intérêt sont stockés dans leur vacuole et peuvent être cytotoxiques s'ils ne sont pas enlevés (Shuler et al., 1992). Les cellules végétales poussent sous forme d'agrégats ce qui provoque leur sédimentation et des limitations de transfert de masse en ce qui concerne la disponibilité des nutriments à l'intérieur des agrégats (Reisman 1993 ; Su 1995). Le degré d'agrégation change en fonction de l'augmentation d'échelle, même si l'agitation correspond à un transfert d'oxygène équivalent et à une vitesse de cisaillement équivalente (Shuler et al., 1992). Les suspensions cellulaires ont des caractéristiques rhéologiques qui changent beaucoup

tout au long d'une culture. Les suspensions cellulaires suivent une loi de puissance (Wagner et al., 1977 ; Tanaka, 1982) comme montré à l'équation 2.19.

$$\eta = m \cdot \gamma^{n-1} \quad (2.19)$$

Dans cette expression, m est l'indice de consistance (Pa·sⁿ) et n est l'indice de réhofluidifiance. Jolicoeur et coll. (1992) montrent une augmentation de m de 0.2 à 0.9 et une diminution de n de 0.8 à 0.1 lors d'une culture de *Catharanthus roseus*. Kato et al. (1978) ont répertorié des viscosité variant de 1.4×10^{-3} Pa·s à 1 Pa·s pour une culture de *Catharanthus roseus* et des viscosités allant de 2.2×10^{-3} Pa·s à 0.9 Pa·s pour une culture de *N.tabacum*. Les cellules végétales sont aussi sensibles à l'accumulation de composés volatiles qui sont des sous-produits de leur activité métabolique tels le dioxyde de carbone et l'éthylène (Shuler et al., 1992 ; Su, 1995). De plus. Su (1995) et Doran (1999) soulignent un problème de production de mousse et de croissance sur les surfaces des bioréacteurs. La croissance de ce type de cellules est aussi très lente (temps de division entre 20 h et 100 h) rendant les cultures très sensibles aux contaminations. Maintenir l'asepsie parfaite des équipements durant la culture est donc nécessaire à la croissance des cellules de plantes. Enfin, les cellules végétales sont totipotentes (Shuler et al. 1992), c'est-à-dire qu'elles ont la possibilité de se différencier même après avoir été cultivées pendant longtemps sous forme non-différenciée. De ce fait, elles peuvent perdre ou acquérir un potentiel de production à la suite de plusieurs cultures subséquentes (Shuler et al. Su 1995). Cet aspect rend l'influence de l'augmentation d'échelle sur

la production de métabolites secondaires difficile à évaluer. En effet, pour inoculer un bioréacteur d'échelle supérieure, un volume important d'inoculum doit être utilisé. Les nombreuses sous cultures nécessaires à la préparations de l'innoculum peuvent être à la base des différences dans les rendements en production observé lors d'une augmentation d'échelle.

2.4.2. Succès commerciaux

Les propriétés des cellules de plantes et les difficultés rencontrées lors de la mise à l'échelle ont rendu les succès commerciaux de cette technologie assez rares en Amérique du Nord. C'est au Japon qu'il semble y avoir le plus de développement dans ce domaine. En effet, Su (1995) rapporte que les premières mises à l'échelle réussies ont été effectuées au Japon par la compagnie Mitsui Petrochemical Industry Ltd pour la production de shikonine et de berberine et par Nitto Denko Co. pour la production de ginseng en bioréacteur de 2 000 L. Au japon, 12 brevets concernant la culture de cellules végétales ont été déposé en 1988, 8 en 1989 et 17 en 1990. Dans cette même revue de littérature, Su (1995) cite l'incapacité de la compagnie Plant cell Culture Technology Inc d'augmenter l'échelle à 500 L d'une culture de l'espèce d'*aralia cordata* qui aurait échoué à cause du retrait des gaz dissous et de la violence de l'aération. En utilisant une alimentation de gaz enrichi en CO₂ et en opérant le bioréacteur de façon semi-continue la compagnie aurait tout de même réussi le développement d'un système de culture grande échelle. Su (1995) rapporte aussi l'existence en Allemagne d'un bioréacteur pour la culture de

cellules de plantes en suspension de 75 000 L. Enfin, Doran (1999) cite dans son article les réussites de mises à l'échelle en cuves agitées effectuées par Curtin (1983), Hashimoto et al. (1982) et Rittershaus et al.(1990).

2.4.3. Transfert d'oxygène

Pour la mise à l'échelle, (Shuler et al. 1992) conseille de maximiser le transfert d'oxygène et de limiter le cisaillement causé par l'aération. Même si la demande en oxygène des cellules végétales est inférieure à celle des levures ou des bactéries (Doran 1999), le succès de la mise à l'échelle dépend de l'oxygénation suffisante de toutes les cellules dans le bioréacteur. Le taux d'oxygène transféré (OTR) au milieu doit être égal à la demande des cellules en oxygène (OUR). Le transfert de masse est modélisé par l'équation 2.20.

$$\frac{dC_{O_2\text{liquide}}}{dt} = k_L a (C_{O_2\text{gaz}} - C_{O_2\text{liquide}}) - OUR \quad (2.20)$$

Lorsque l'oxygène dissous est en contrôle, on peut écrire :

$$OUR = k_L a (C_{O_2\text{gaz}} - C_{O_2\text{liquide}}) \quad (2.21)$$

Kamen et al.(1993), soulignent que la plupart des échecs de mise à l'échelle proviennent de mauvais estimés de $k_L a$. Il affirme que le mouvement des fluides est

rarement identique à grande échelle. En effet, une augmentation de la capacité de l'aérateur avec l'échelle provoque une augmentation du nombre de bulles et favorise leur coalescence. Ceci provoque donc la diminution du coefficient de transfert k_{La} avec l'augmentation du volume de production. Le temps de coalescence de deux bulles en contact est de l'ordre de la milliseconde (Tse et al. 1998). Donc, l'agitation provoquant la rencontre de plusieurs bulles favorise la coalescence même dans les solutions électrolytiques où la coalescence est absente sans agitation (Tse et al. 1998).

2.4.4. Modèle prédictif et critère de mise à l'échelle

Les travaux de Fortier (2002) visaient à optimiser le bioréacteur conçu par Jolicoeur et al. (1992). Il montre par ses travaux que l'aérateur permettant le meilleur transfert d'oxygène dans un bioréacteur de 5 L ayant un H/D de 1.9 est un aérateur poreux. Il prouve qu'un ruban hélicoïdal assure une agitation douce de façon à obtenir des temps de mélange entre 5 et 30 secondes et suggère par simulations que la limite supérieure de cisaillement tolérée par les cellules végétales est d'environ 60 s^{-1} . Fortier (2002) conclut, grâce à son modèle prédictif du transfert d'oxygène, qu'une mise à l'échelle géométrique de 5 L à 150 L est possible mais que le transfert est limité par la surface de contact entre les phases dû à la coalescence tel que mentionné dans l'article de Su (1995). Il stipule, par ailleurs, que le rapport d_a/D doit demeurer constant pour conserver la même vitesse superficielle des bulles au diffuseur. Par contre, son modèle n'est plus valide si le

régime de bullage change car celui-ci ne repose sur aucune étude rigoureuse de la coalescence à grande échelle. De plus, son modèle ne tient pas compte de la présence de particules. D'après Fortier (2002) et Ozkan et al. (1999) la suspension cellulaire aurait pour effet de diminuer le k_{La} de façon significative. La Figure 2.4 montre les prédictions de Fortier (2002) pour le transfert d'oxygène dans l'eau lors de la mise à l'échelle géométrique d'un bioréacteur de 5 L à 150 L.

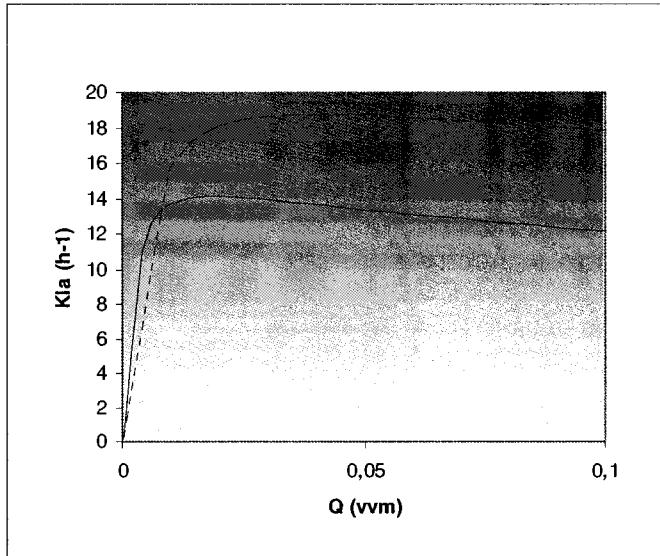


Figure 2.4 : Effet de la géométrie de la cuve de 150 L sur le k_{La}
 (.....) $H/D = 1.9$, Fortier (2002); (—) $H/D=3.6$, Fortier (2002)

Lorsque les rapport géométrique sont constants, Fortier (2002) propose d'utiliser la vitesse en bout de pale comme critère de mise à l'échelle pour la culture de cellules végétales afin d'assurer un cisaillement équivalent dans les deux systèmes. Le cisaillement en bout de pale doit tout de même être évalué pour différents entrefers pour identifier les vitesses d'agitation possible lors de l'opération de bioréacteurs à

plus grand volume. Tanaka (2000) a évalué un indice de stress hydrodynamique en étudiant la dissolution et le transfert de masse du B-naphtol à l'intérieur d'une culture de cellule de plante agitée et aérée. Il considère que le taux de transfert de masse d'une pastille de Beta-naphtol (cylindre 2mm longueur et de 2mm de diamètre) dans le bioréacteur est représentatif du stress hydrodynamique subi par les cellules. C'est-à-dire que ce qui provoque le bris de cellules affecte aussi la valeur du facteur de dissolution K . Il préconise qu'un bon critère de mise à l'échelle serait de maintenir l'indice de dissolution K du B- Naphtol inférieur à 4.4×10^{-3} cm/sec. Selon lui, il est aussi préférable de maintenir les cellules sous forme individuelles plutôt que sous forme d'agrégats pour améliorer leur résistance au stress hydrodynamique.

La relation de Metzner et Otto (1957) est une autre approche théorique possible pour évaluer le cisaillement dans une cuve agitée mécaniquement par un ruban hélicoïdal et s'énonce comme suit :

$$\gamma = K_s N \quad (2.22)$$

Pour les fluides où $n \geq 0.8$ alors la constante K_s pour un ruban hélicoïdal prend des valeurs entre 32.9 à 35.7 tandis que pour des fluides ayant un caractère réhofluidifiant plus prononcé ($n < 0.8$), K_s est évalué par la corrélation proposé par Brita de la Fuente (1996) :

$$K_s = \left[38.27 \left(\frac{W}{D} \right)^{-0.024} \left(\frac{H_a}{D} \right)^{-0.135} \right] (0.814)^{\frac{1}{n}} \quad (2.23)$$

Par contre, les propriétés rhéologiques changeantes et difficiles à évaluer des cultures de cellules de plantes rendent une telle approche moins pertinente. De plus cette approche évalue un cisaillement global dans la cuve et ne permet pas d'évaluer le cisaillement en bout de pale de l'agitateur. Doran (1999) rapporte que les cellules seraient sensibles à l'intensité du stress, mais aussi à la durée d'exposition à ce stress. Enfin, elle affirme que des observations ont permis de fixer la valeur maximale d'énergie pouvant être absorbée par les cellules à 10^7 J/m^3 .

2.4.5. Mélange triphasique et mise en suspension

Le mélange triphasique et la mise en suspension de particules sont des aspects peu traités par Fortier (2002). Il y a deux critères qu'il faut habituellement respecter lors de mélanges triphasiques, le N_{CD} et le N_{JS} . Ce sont des critères respectivement reliés au mélange gaz-liquide et liquide-solide (Brita de la Fuente 1996). Le premier est la vitesse d'agitation minimale nécessaire pour la dispersion adéquate des bulles et l'autre la vitesse d'agitation minimale pour la mise en suspension complète des particules. Dans le cadre des travaux de Fortier (2002), la technologie d'aération a permis d'améliorer significativement la dispersion et le transfert du gaz dans le bioréacteur. La vitesse d'agitation de 60 RPM semblait suffisante pour une mise en suspension adéquate. Avec une augmentation d'échelle, une diminution de la

vitesse d'agitation est nécessaire pour minimiser le cisaillement mais une mise en suspension complète doit tout de même être assurée.

En effet, une mise en suspension adéquate doit être performée durant la culture de cellules végétales pour maximiser la surface de contact entre les cellules et le milieu de culture ainsi que pour réduire les agrégats (Su 1995). Dans un article récent, Thorpe et al. (2003) expliquent que les mécanismes responsables de la mise en suspension de particules sont encore mal compris. D'après eux la viscosité du milieu, sa densité, la géométrie des particules, leur densité, leur concentration et la géométrie du système de mélange influencent grandement la mise en suspension de particules. Des corrélations permettent la prédiction de la vitesse minimale de mise en suspension pour des cuves agitées mécaniquement à l'aide de différentes turbines. C'est Zwietering (1958) qui a initié la majeure partie de ces études. Il a défini la vitesse minimale de mise en suspension N_{JS} comme la vitesse d'agitation à laquelle les particules ont un temps de résidence au fond de la cuve inférieur à 2 secondes. La relation en cuve agitée qui découle de ses expériences est présentée à l'équation 2.24.

$$N_{JS} = S \left(\frac{\mu_L}{\rho_L} \right)^{0.1} \left[\frac{\rho_s - \rho_{Lg}}{\rho_L} \right]^{0.45} d_p^{0.2} X_p^{0.1} D^{0.85} \quad (2.24)$$

Le critère Zwietering (1958) demeure une référence et a été utilisé par Kraume et al. (2001) dans ses expériences sur les cuves agitées. Par contre, cette relation ne fournit pas d'information sur les mécanismes impliqués et ne tient pas compte de

l'aération. Thorpe (2003) explique que les particules seraient entraînées vers le haut lorsqu'un niveau de stress critique est atteint. Lorsque la cuve est aérée, la vitesse d'agitation doit être augmentée afin d'atteindre ce cisaillement critique. Chapman et al. (1983) notent qu'une diminution soudaine dans le rapport Pg/P (Puissance aérée/ Puissance non-aérée) provoque une augmentation de la sédimentation correspondante et une diminution de l'effet de la différence de densité lorsqu'on se trouve en milieu aéré. Par exemple :

$$\text{Sous conditions non-aérées : } N_{js} \propto \Delta\rho^{0.4} \quad (2.25)$$

$$\text{Sous conditions aérées : } N_{js} \propto \Delta\rho^{0.22} \quad (2.26)$$

Chapman et al. (1983) expliquent donc que les bulles causent une diminution locale de la densité du milieu au centre de la cuve ce qui fait précipiter les particules. Une exception est tout de même notée par Thorpe (2003) pour les agitateurs à pompage descendant. En effet, le transport pneumatique généré par les bulles au fond de la cuve aiderait les particules à progresser vers le haut diminuant ainsi la vitesse de mise en suspension minimale requise. Bubbico et al. (1998) précisent qu'une augmentation de la quantité de particules favorise la dissipation de l'énergie utilisée pour la mise en suspension en augmentant la friction entre les différentes phases.

Les simulations et les modèles mathématiques avancés peuvent prédire adéquatement le comportement de solides en suspension dans un liquide (Montante et al., 2001). Par contre, les critères d'extrapolations avancés par les plus récentes études concernent les turbines et ne peuvent être généralisés aux mélanges triphasiques avec ruban hélicoïdal. Il ne semble exister aucun outil plus fiable que l'expérimentation pour s'assurer de la qualité d'une mise en suspension en milieu aéré. D'après les notes de cours d'agitation et de mélange de Tanguy (2003), il existe plusieurs méthodes pour étudier le comportement des mélanges multiphasiques. Parmi ceux-ci on compte les méthodes optiques au laser qui fonctionnent par absorption de la lumière à travers la cuve et les méthodes tomographiques. Boyer et al. (2002) ont fait une énumération de toutes les techniques de mesures invasives et non-invasives pour les mélanges triphasiques. Le Tableau 2.9 et le Tableau 2.10 contiennent une liste de ces techniques de mesures.

Tableau 2.9 : Méthodes non-invasives

| Techniques | Applications | Résultats | Limitations | Résolution spatiale | Résolution de temps |
|----------------------------------|--------------|---|---|---------------------|---------------------|
| | | Perte de charge | | 1D | + |
| Perte de charge | GL & GLS | Rétention de liquide Régime d'écoulement | Modèle requis Modèle requis | | |
| Différentiel de pression | GL & GLS | Régime d'écoulement Turbulence | | ----- | ++ |
| Désengorgement dynamique des gaz | GL & GLS | Dimension des bulles Distribution Rétention des phases | Modèle Requis Suspensions | Globale | Régime perm |
| Traceurs | GL & GLS | Rétention de liquide Mélange | Modèle compliqué Trouver un traceur | Globale | Régime perm |
| Conductimétrie | GL & GLS | Rétention de liquide | Électrolytes Besoin de calibration | 1D | + |
| Absorption de neutron | GL & GLS | Distribution des phases | Sécurité et \$\$ | Valeurs moyennes | ----- |
| Atténuation de la lumière | GL | Rétention de gaz Aire interfaciale | Cuve transparente Faible diamètre de cuve | Globale | + |
| Atténuation des ultrasons | GL | Rétention | Phase liquide continue Faible diamètre de cuve | Valeurs moyennes | + |
| Photographie et analyse d'image | GL | Dimension des bulles Formes des bulles Régime d'écoulement | Analyse quantitative de l'image | ++ | + |
| Radiographie | GL | Dimension des bulles Formes des bulles Régime d'écoulement | Sécurité Faible rétention gazeuse | ++ | + |
| RMN | GL & GLS | Rétention de liquide Vitesse des phases Efficacité de mouillage | Prix et dimension de l'équipement Pas d'O ₂ | ++ | + |
| Laser Doppler | GL | Vitesse du liquide Vitesse et forme des bulles | Liquide transparent Très faible rétention gazeuse | +++ | ++ |
| Polarography | GL & GLS | Cisaillement aux parois | Électrolyte de support Solutions aqueuses | +++ | ++ |
| Suivi de particules radioactive | GL & GLS | Champs de vitesses | Calibration pénible Radioactivité | + | + |

Résolution spatiale : +++ : <<1 mm ; ++ ~ mm; + : cm. Résolution de temps : +++ : ms; ++ : s; + : minute

Tableau 2.10 : Méthodes invasives

| Techniques | Applications | Résultats | Limitations | Résolution spatiale | Résolution de temps |
|------------------------------|--------------|----------------------------|-----------------------------|---------------------|---------------------|
| Sonde aiguille | GL & GLS | Rétention gazeuses | Faible rétention de solides | ++ | ++ |
| | | Vitesse des bulles | Fluides conducteurs | | |
| | | Distribution des bulles | | | |
| | | Forme des bulles | Modèle requis | | |
| Sonde de transfert thermique | GL & GLS | Aire interfaciale | Faible rétention de solides | ++ | ++ |
| | | Rétention gazeuse | Température homogène | | |
| | | Vitesse moyenne du liquide | Analyse du signal | | |
| | | | Grandes vitesses | | |
| Sonde à ultrasons | GL & GLS | Rétention gazeuses | Faible rétention gazeuse | + | + |
| | | Aire interfaciale | Bulles sphériques | | |
| | | Vitesse des bulles | Petites distances de mesure | | |
| | | Diamètre des bulles | | | |
| Tube pilote | GL & GLS | Direction de l'écoulement | Rétention gazeuse moyenne | + | + |
| | | Perte de charge | | | |
| | | Vitesse du liquide | | | |
| | | | | | |

Résolution spatiale : +++ : <<1 mm ; ++ ~ mm; + : cm. Résolution de temps : +++ : ms; ++ : s; + : minute

En somme, pour effectuer la mise à l'échelle d'un bioréacteur pour la culture de cellules végétales il faut tenir compte de la fragilité de celles-ci, de l'uniformité du transfert gazeux, de la mise en suspension, des cinétique de croissance, des taux de consommation, de la rhéologie complexe et dynamique du milieu ainsi que du caractère triphasique du mélange. De plus, dans un mélange triphasique, l'évaluation des interactions entre les phases est difficile et requiert du matériel coûteux. À la lumière de ces informations et de la complexité des interactions, les méthodes traditionnelles de mise à l'échelle comme l'analyse des nombres adimensionnels classiques et la modélisation mathématique ne peuvent prédire les performances d'un bioréacteur à plus grande échelle. Par contre, il est possible d'identifier différents problèmes reliés à la mise à l'échelle en effectuant des

cultures à grande échelle et des expériences sur des modèles à froids afin de s'assurer que les conditions nécessaires à la culture de cellules de plantes soient atteintes.

3. MÉTHODOLOGIE EXPÉRIMENTALE

3.1. Modèles à froid

Pour les mesures de k_{La} , de temps de mélange et de mise en suspension, deux réservoirs de 150 L ont été utilisés comme modèles à froid. De plus, des tests ont été menés dans le bioréacteur de 5 L développé par Fortier (2002). Les dimensions de chacun des réservoirs sont présentées au Tableau 3.1. Un schéma et une photographie de chaque réservoir sont présentés à l'annexe B. Les deux réservoirs de 150 L étaient en PVC.

Tableau 3.1 : Dimensions des réservoirs

| | <i>H</i> mm | <i>D</i> mm | <i>H/D</i> |
|-------------|------------------------------|------------------------------|-------------------|
| Réservoir 1 | 953 | 451 | 2.1 |
| Réservoir 2 | 1212 | 400 | 3.1 |
| 5 L | 283 | 150 | 1.9 |

L'hélice du bioréacteur de 5 L était en acier inoxydable 316. Les grandes hélices à rubans hélicoïdaux ont été construites au laboratoire en utilisant des tiges de fer, des gougeons de bois, des feuilles d'aluminium et du fibre de verre. Celles-ci ont été conçues avec les dimensions présentées dans le Tableau 3.2. Des photographies des mobiles artisanaux sont présentées à l'annexe B.

Tableau 3.2 : Dimensions des hélices

| | <i>H</i> Mm | <i>D</i> mm | <i>W</i> mm | <i>p</i> mm | <i>p/d</i> |
|------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------|
| Hélice 1 | 1030 | 351 | 80 | 527 | 1.5 |
| Hélice 2 | 810 | 400 | 89 | 400 | 1 |
| Hélice 3 | 810 | 400 | 89 | 600 | 1.5 |
| Hélice 4 | 810 | 400 | 89 | 800 | 2 |
| Hélice 5 L | 244 | 133 | 29 | 203 | 1.5 |

Les hélices artisanales étaient entraînées par un moteur (Cole Palmer, modèle 4554-10) contrôlé. La rotation de l'hélice du bioréacteur de 5 L était assurée par un moteur (Leeson, modèle 108226) contrôlé. Un débit d'air était alimenté aux réservoirs par un débitmètre contrôleur massique (Brooks, modèle 5850). La dispersion de l'air en bulle était assurée par une plaque poreuse (Pall inc.). La mesure de l'oxygène dissous s'effectuait par une sonde polarographique (Metler Toledo, modèle 4100). La mesure de la conductivité s'effectuait par une sonde à conductivité (Metler Toledo, modèle 7100). Un système (Omega, modèle OM-IQ-VmA-40) était responsable de l'acquisition de données des sondes tandis qu'un autre (Bioexpert inc., Québec, Canada) effectuait le contrôle du débit gazeux.

3.2. Transfert gazeux

D'après Prakash et Briens (1990), pour maximiser le transfert gazeux il est préférable de débuter l'introduction d'air dans le réservoir avant de le remplir de liquide. Cette étude rapporte qu'il est possible d'obtenir des coefficients de transfert plus élevés de 15 %, car cette méthode empêche l'eau de boucher les pores de la plaque d'aération. Tous les essais ont donc été effectués en injectant l'air avant le liquide dans les réservoirs.

3.2.1. Mesure du k_{La}

Shuler et al. (1992) proposent 3 méthodes pour mesurer le coefficient de transfert : la méthode en régime transitoire, la méthode au sulfate et la méthode en régime permanent. La méthode en régime transitoire consiste à injecter de l'air ou un mélange enrichi d'oxygène jusqu'à saturation du milieu en effectuant un suivi dynamique de l'évolution de la concentration d'oxygène dissous. On obtient le k_{La} en résolvant l'équation :

$$\frac{dC_{O_2\text{liquide}}}{dt} = k_L a (C_{O_2\text{Sat}} - C_{O_2\text{Dissous}}) \quad (3.1)$$

La résolution de l'équation différentielle donne une équation linéaire (équation 3.2).

$$\ln(C_{O_2Sat} - C_{O_2Dissous}) = -k_L a \cdot t + const \quad (3.2)$$

En présence de Cu^{2+} , le sulfure dans le sulfite (SO_3^{2-}) est oxydé en sulfate en une réaction d'ordre zéro. Cette réaction est très rapide de façon à ce que $C_{O_2Dissous}$ soit presque nul. La méthode au sulfate repose donc sur le principe que le taux de consommation d'oxygène soit proportionnel à la production de sulfate (1 mol de O_2 consommé = 2 mol de SO_4 produit) et s'illustre par l'équation :

$$\frac{1}{2} \frac{dC_{SO_4}}{dt} = k_L a C_{O_2Sat} \quad (3.3)$$

Cette méthode surestime probablement le k_{La} . En effet, la réaction prend place dans la couche limite entourant la bulle d'air, et crée un gradient qui favorise le transfert de l'oxygène vers le milieu.

La méthode en régime permanent est la meilleure d'après Shuler et al.(1992). Elle consiste à utiliser le bioréacteur comme un respiromètre. En ayant une bonne précision sur la lecture de l'oxygène à la sortie du bioréacteur et une mesure fiable de la concentration dans le milieu, il est possible par bilan de masse sur l'oxygène de trouver l'OUR et de calculer le k_{La} . En effet, un bilan global sur l'oxygène autour du bioréacteur permet d'obtenir l'OUR. En maintenant la concentration d'oxygène dissous constante, il est ensuite possible de calculer le k_{La} grâce à l'équation suivante :

$$k_L a = \frac{OUR}{C_{O_2 Sat} - C_{O_2 Dissous}} \quad (3.4)$$

Par contre, des problèmes de fiabilité du moniteur à oxygène ont rendu impossible la mesure de l'oxygène dans les gaz de sortie. Cette méthode n'a donc pas été retenue.

La méthode en régime transitoire sans cellule a donc été utilisée pour la plupart des mesures de k_{La} visant à caractériser les bioréacteurs. Les liquides utilisés étaient de l'eau ou du milieu de culture. L'oxygène en solution dans l'eau ou le milieu était tout d'abord expulsé par un dégazage à l'azote à débit constant et à vitesse d'agitation fixe. De l'air était ensuite injecté au même débit et à la même vitesse d'agitation. L'essai était arrêté lorsque la concentration d'oxygène atteignait sa valeur d'équilibre avec l'air. Seules les valeurs entre 20 % et 80 % de la concentration de saturation en oxygène en équilibre avec l'air ont été retenues afin de supprimer les effets de bouts. Les coefficients de corrélation linéaire R^2 étaient de l'ordre de 0.99. Trois essais ont été effectués pour chaque condition d'opération. L'erreur causée par le temps de réponse des sondes était plus petite que 6%. En effet, d'après Fortier (2002), le temps de réponse des sondes utilisées (Metler Toledo, modèle 4100) peut être négligé pour des mesures de k_{La} allant jusqu'à 360 h^{-1} , ce qui est largement au-dessus des k_{La} obtenus dans ce projet.

Enfin, pour mesurer le k_{La} en culture, l'aération a été coupée et la diminution de l'oxygène dissous a été suivie dans le temps pour en déduire l'OUR et le k_{La} . Une

seule mesure de ce type a été effectuée pour ne pas mettre en péril la culture en cours.

3.3. Mélange

3.3.1. Mesure du temps de mélange

La technique d'injection d'un traceur de sel a été utilisée pour mesurer les temps de mélange. Une sonde à conductivité (Metler Toledo, modèle 4100) placée dans le haut de la cuve mesurait l'évolution de la conductivité dans le temps. Les turbulences causées par l'aération et par l'agitation provoquaient trop de bruit pour une détermination précise des temps de mélange. Une cage en treillis de plastique a donc été placée au bout de la sonde de façon à créer une zone stagnante et ainsi diminuer le bruit conformément à ce que propose Pinelli (2001). Sans la cage, la lecture de la sonde oscille à environ 90 % de la valeur de l'augmentation totale de conductivité. La cage permet de diminuer ces oscillations à environ 10 % de la variation totale de conductivité. L'acquisition de données était assurée par un système (Omega, modèle OM-IQ-VmA-40). Pour chaque essai, 200 ml d'une solution saturée en NaCl a été versé rapidement à l'intérieur de la cuve à l'aide d'un bécher de 500 ml. Le temps de mélange était défini comme le temps nécessaire pour que la lecture de conductivité se stabilise sans que les oscillations ne dépassent 10 % de la variation totale de conductivité. Un exemple de résultat est présenté en annexe C.

3.3.2. Description de la suspension et mesure de sa qualité

L'eau a été utilisée pour représenter le comportement du bioréacteur sans cellule. Le milieu visqueux développé par les cultures de cellules végétales a été représenté par une suspension de résine XAD-7 (Sigma). Cette résine est constituée de grains de polymère sphérique d'environ 1 mm de diamètre qui ont une densité de 1050 kg/m³. Ceci correspond à la taille moyenne et à la densité de fins agrégats de cellules végétale. Par contre, la distribution de taille ne peut pas être considérée complètement uniforme. En effet cette résine est friable et peut être endommagée lors des essais. Aucune étude de la distribution de ces particules n'a été effectuer dans le cadre de ce projet. La préparation des solutions de résines était produite en humidifiant la résine. La masse humide de résine servait de base à l'élaboration des suspensions. Une concentration maximale de 400 g M.H. L⁻¹ de résine a été choisie pour représenter le milieu contenant une haute densité de cellules en suspension.

La mesure de la qualité de la suspension à l'échelle du bioréacteur de 5 L a pu être effectuée par la mesure de l'intensité lumineuse traversant la suspension à différentes hauteurs et par la prise d'échantillons de surface. Une lumière blanche et homogène était placée derrière le bioréacteur opaque. Une fenêtre rectangulaire était ménagée de chaque côté de celui-ci. Une photo du montage est présentée en annexe D. Une photo numérique était alors prise pour chaque condition d'aération et de vitesse d'agitation testée. L'uniformité de la suspension était mesurée en effectuant la différence d'intensité lumineuse entre le haut et le bas de la fenêtre à

l'aide d'un programme Matlab (annexe D). Cette méthode n'a pu être appliquée à la cuve de 150 L puisque la lumière blanche, en passant dans la cuve, était complètement absorbée par la suspension.

Des échantillons de surface ont donc été prélevés dans le bioréacteur de 150 L à l'aide d'une grosse seringue à embout modifié. La seringue était enfoncé à 5 cm de la surface et environ 20 ml de liquide et de résine était rapidement soustrait du réservoir. La masse de résine était ensuite pesée. Trois essais ont été effectués pour chaque condition d'opération testée.

3.4. Culture de cellules végétales en suspension

3.4.1. Lignés cellulaires et maintien

Les cellules végétales utilisées pour ce projet (A et B) ont été développées et stabilisées par le Dr. Robert Williams de la compagnie Phytobiotech Inc. Elles étaient cultivées dans un milieu nutritionnel B5 standard auquel ont été ajouté 0.2 mg L⁻¹ d'acide 2-4 dichlorophenoxyacétique, 0.1 mg L⁻¹ de kinétine, 30 g L⁻¹ de glucose et 5 mM d'ammonium citrate, (NH₄)₂HC₆H₅O₇. Une solution de KOH 1N permettait d'ajuster le pH à 5.5 avant la stérilisation (25 minute, 121°C, 1 bar).

Les suspensions cellulaires étaient maintenues sur un agitateur orbital (New-Brunswick Scientific, modèle Innova 5000) à 100 rpm dans des flacons de 1 L qui

contenaient un volume de 500 ml de suspension à une température contrôlée de 25 \pm 1°C. Les sous-cultures étaient effectuées lorsque le volume de cellules sédimentées (SCV) se situait entre 50 et 75% du volume de la suspension. La proportion de l'inoculum par rapport au volume total de sous-culture variait de 20 à 35 % selon la croissance des cultures.

3.4.2. Culture en bioréacteur

Les cultures de chaque espèce ont été menées parallèlement dans des bioréacteurs de 3L et de 40L.

3.4.2.1. Bioréacteur de 3 L

Le bioréacteur de 3 L était composé d'un réservoir en verre sur lequel reposait un couvercle en acier inoxydable (SS-316) usiné et fixé par l'utilisation de brides et d'un joint d'étanchéité. Le mobile d'agitation était une hélice à ruban hélicoïdal simple. Les dimensions de celle-ci ont été optimisées par Phytobiotech Inc. pour la culture de cellules végétales en suspension. L'aération se faisait par l'injection d'air stérile dans un diffuseur poreux cylindrique au fond de la cuve. Les dimensions du réacteur de 3 L sont présenté en annexe A.

Ce bioréacteur (Figure 3.1) était équipé d'une sonde (Metler Toledo, modèle 322756702) permettant un suivi en continu de l'oxygène dissous. La sortie des gaz

était reliée à un moniteur à infrarouge (Rosemount Analytical, modèle 880A) pour mesurer la concentration de gaz carbonique. L'agitation de la suspension était assurée par un moteur (Stir-Pak, modèle 4554-10, Cole Palmer) dont la vitesse était ajustée manuellement. L'instrumentation était reliée au système de contrôle Virgo (Altersis).

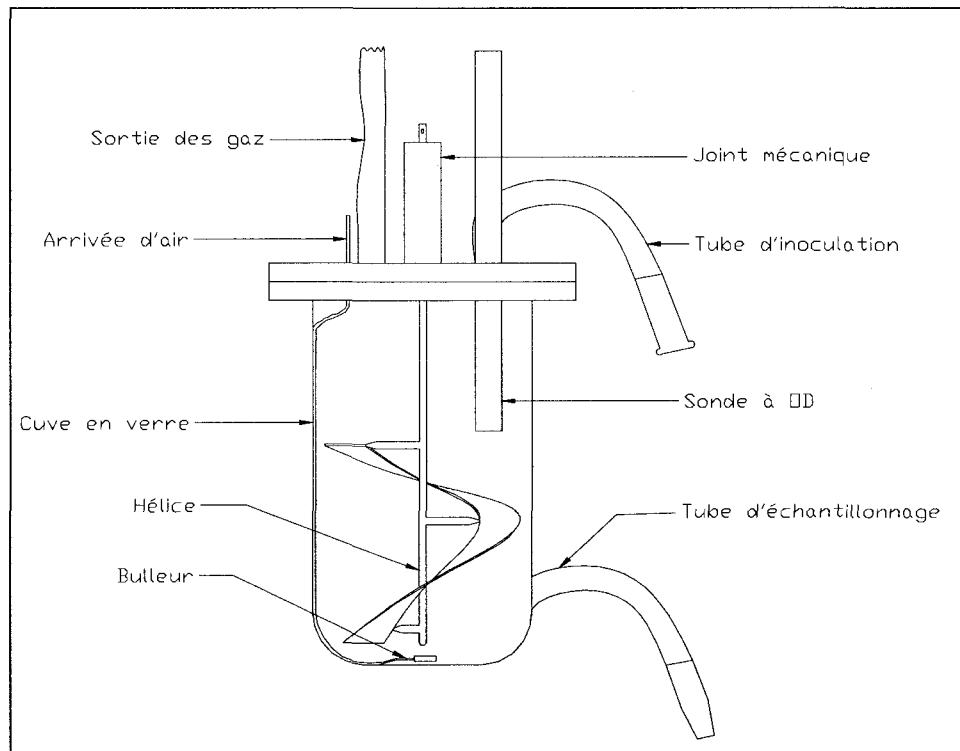


Figure 3.1 : Bioréacteur de 3 L

De plus, le bioréacteur comprenait un port d'échantillonnage, un port d'inoculation ainsi qu'un système d'alimentation de nutriment en continu. Celui-ci comprenait une bouteille de milieu, une bouteille d'une solution de phosphate (KH_2PO_4), une bouteille d'une solution d'ammonium ($(\text{NH}_4)_2\text{Citrate}$), une bouteille d'une solution

de glucose ainsi qu'une bouteille vide pour les ajouts ponctuels. Chaque bouteille était reliée au bioréacteur par des tubes (Masterflex). L'écoulement des nutriments était assuré par des pompes péristaltiques (Masterflex, modèle 7503-01) contrôlées par le système de contrôle Virgo (Altersis).

3.4.2.2. Bioréacteur de 40 L

Le bioréacteur de 40 L était composé d'un réservoir en acier (SS-316) maintenu étanche par un couvercle en acier inoxydable (SS-316) muni d'un joint d'étanchéité. Le maintien de la température dans le bioréacteur pendant la stérilisation *in situ* (125°C, 50 minutes) était assuré par une chemise dans laquelle de la vapeur était injectée. L'ouverture du couvercle était assurée par un système motorisé. Le mobile d'agitation était une hélice à ruban hélicoïdal simple. Les dimensions de celle-ci ont été optimisées par Phytobiotech Inc. pour la culture de cellules végétales en suspension. Un réservoir de 10 L contenant de l'huile de silicone (Sigma, Antifoam A) était raccordé à la sortie des gaz pour l'élimination de la mousse avant les filtres de sorties. L'aération se faisait par l'injection d'air stérile dans une plaque poreuse au fond de la cuve. Les dimensions du réacteur de 40 L sont présentées en annexe A.

Ce bioréacteur (Figure 3.2) était équipé de deux sondes (Metler Toledo, modèle 322756800) permettant un suivi en continu de l'oxygène dissous. Il était équipé d'une sonde à dioxyde de carbone dissous (YSI inc., modèle 8500). La sortie des

gaz était reliée à un moniteur à infrarouge comme celui décrit précédemment. L'agitation de la suspension était assurée par un moteur (LEESON, modèle 04017VK3D) et par des chicanes de surface. L'instrumentation ainsi que le système d'agitation étaient reliés au système de contrôle Virgo (Altersis).

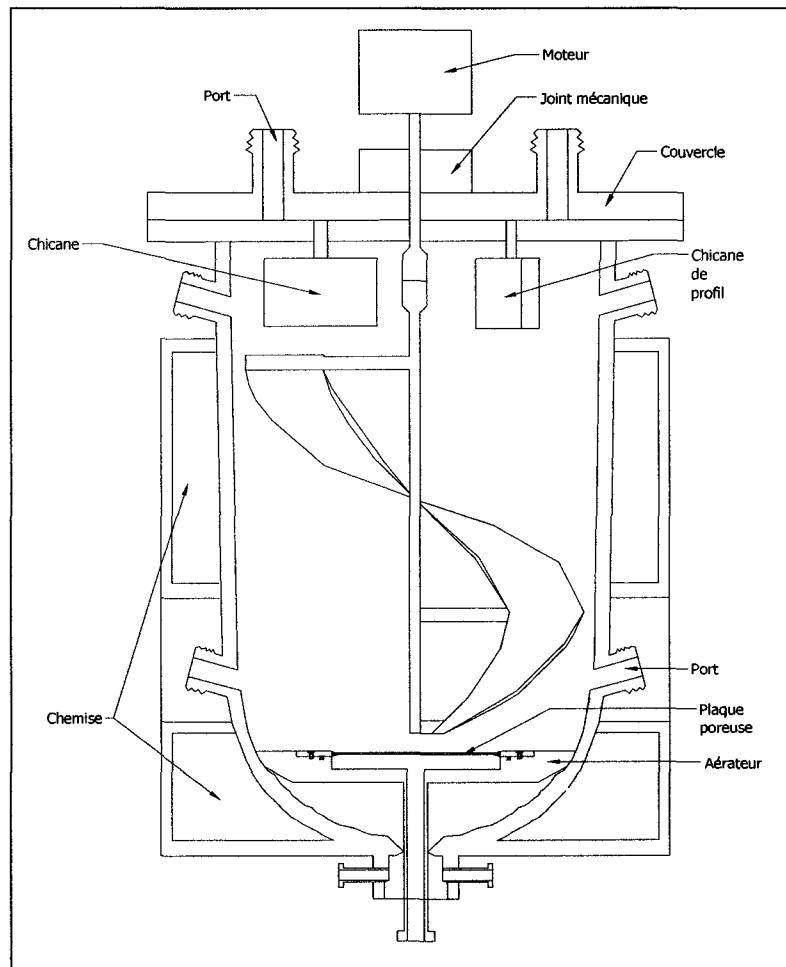


Figure 3.2 : Bioréacteur de 40 L

De plus, le bioréacteur comprenait un système d'échantillonnage pneumatique (Phytobiotech Inc., prototype n°1), un port d'inoculation ainsi qu'un système d'alimentation de nutriments en continu tel que décrit pour le bioréacteur de 3 L.

3.4.3. Conditions d'opération

Chaque bioréacteur se composait du même inoculum. Des cellules dans le même état physiologique de départ étaient nécessaires pour la comparaison des performances des deux technologies. Lors de l'inoculation, plusieurs flacons contenant environ 500 ml de suspension cellulaire étaient mélangés pour fournir la quantité totale d'inoculum nécessaire à la culture en bioréacteur de 40 L et de 3 L (25 % du volume total de culture). La concentration de départ visée devait être supérieure à 5 g DW L⁻¹ dans les deux bioréacteurs.

Des solutions de KH₂PO₄, de Glucose, de (NH₄)₂Citrate et des milieux pauvre en chlore étaient ensuite préparées comme solutions d'ajout. Chaque solution était stérilisée (125 °C, 25 min), branchée sur les bioréacteurs et ajoutée à l'aide d'une pompe péristaltique (Masterflex, modèle 7503-01). L'ajout en continu de milieu de culture se faisait au tout début de la culture et était modulé en fonction de la croissance et de la consommation des cellules. Après avoir doublé la concentration en biomasse sèche, une élicitation était induite par l'ajout d'un mélange hétérogène de résine XAD-7, XAD-16 (Sigma, Amberlite), de milieu concentré et de chitine (Sigma, C-7170) broyée.

L'agitation dans le bioréacteur de 3 L était maintenue à 60 rpm et celle dans le 40 L à 30 rpm. Ces vitesses correspondaient à des vitesses en bout de pale équivalentes mais à un cisaillement d'environ 60 s^{-1} dans le bioréacteur de 3 L et 30 s^{-1} dans celui de 40 L.

Les débits d'aération variaient entre 0.00 vvm et 0.06 vvm pour le 3 L et entre 0.005 vvm et 0.05 vvm pour le 40 L. La concentration d'oxygène dissous était maintenue à 120 % de saturation par le dosage de la quantité d'oxygène contenue dans le gaz d'alimentation par un système de débitmètre massique (Brooks, modèle 5850) et la quantité de gaz carbonique était contrôlée par l'augmentation ou la diminution du débit total d'alimentation. Le système d'alimentation en gaz était pris en charge par le système de contrôle Virgo (Altersis).

3.4.4. Échantillonnage et suivi

La période sur laquelle s'étendait une culture variait entre 2 semaines et 1 mois. Afin de suivre la croissance des cellules et la consommation des nutriments, des échantillons étaient prélevés à des fréquences de 1 par 2 jours à 2 par jour.

Le pH (Fisher, model 805mp) était alors mesuré, et un échantillon était filtré sur un filtre stérile (Fisher, 0.45 μm). Le milieu de culture recueilli était envoyé pour la quantification des sucres et des ions en solutions à l'aide d'un HPLC (Dionex). La masse humide était pesée, séchée (80°C , 6 h) puis pesée à nouveau. Une seule

mesure de biomasse a été prise par échantillon. Enfin, 0.15 g de biomasse sèche était ensuite broyée à l'aide d'un mortier et dissoute dans 8 ml d'eau pour permettre l'analyse des ions intracellulaires. Le compte cellulaire était obtenu en mélangeant 2 ml de suspension cellulaire à autant d'une solution enzymatique de cellulase (Sigma, C-8546), d'hemicellulase (Sigma, H-2125) et de pectinase (P-4716). Après 60 minutes d'agitation, 50 µL de tampon citrate était ajouté à 50 µL de la suspension cellulaire. Les cellules étaient ensuite observées au microscopes pour être comptées.

Après élicitation, les mêmes mesures étaient prises. De plus, une extraction au méthanol était effectuée sur la biomasse et sur la résine afin de récupérer les métabolites secondaires produits. Le solvant restait en contact avec la biomasse et la résine pendant une heure sur un agitateur orbital (New-Brunswick Sientific, Modèle G76D) pour être ensuite réfrigéré pour des analyses HPLC éventuelles.

3.4.5. Analytique

Les concentrations en ions et en glucose étaient déterminées par chromatographie en phase liquide. Les cations et les anions étaient analysés à l'aide d'un HPLC avec un détecteur électrochimique (Dionex) opéré en mode conductivité. La phase mobile était une solution aqueuse d'acide méthanosulfonique 20 mM alimentée à un débit de 0.9 ml min^{-1} pour les anions et une solution aqueuse de bicarbonate (35 mM Na_2CO_3 et 1.0 mM NaHCO_3) alimentée à 1.0 ml min^{-1} pour les cations. Une

pompe (Dionex) servait à l'alimentation des solutions. La commande de la pompe et de l'injecteur automatique (Spectra System, AS3500) ainsi que l'acquisition de données étaient assurées par le logiciel PeakNet 5.2 (Dionex).

Les glucides étaient analysés à l'aide d'un HPLC par un détecteur à indice de réfraction (ERC Inc, modèle 7515-A). La phase mobile était de l'eau déionisée alimentée à un débit de 0.25 ml min^{-1} par une pompe (Waters, modèle 501). La séparation (saccharose, glucose, fructose) s'effectuait à l'aide d'une colonne analytique (Biorad, Aminex HPX87C) maintenue à $80 \pm 3^\circ\text{C}$ par un élément chauffant (Mantech, modèle 7980). L'acquisition de données était prise en charge par le logiciel PeakNet 5.2 (Dionex).

4. RÉSULTATS ET DISCUSSION

4.1. Mise en opération du bioréacteur de 50 L

4.1.1. Lecture en ligne de l'OUR

Les variables mesurées pour suivre la respiration des cultures en bioréacteur de 50 L étaient l'oxygène dissous, le gaz carbonique à la sortie (CO_2out) et le gaz carbonique dissous dans la culture. L' OUR , le taux de consommation d'oxygène par les cellules, ne peut pas être mesuré directement. Par contre, il est possible de l'évaluer en résolvant les équations de transfert gazeux.

Les deux équations qui gouvernent le transfert gazeux dans le bioréacteur sont obtenues par bilans sur l'oxygène et sur le gaz carbonique. Dans le milieu de culture, on considère la concentration d'oxygène à saturation constante par rapport au temps de résidence de la bulle puisque l'oxygène est très peu soluble dans l'eau. En effet, une bulle d'air transférant une quantité d'oxygène négligeable aura environ la même concentration d'oxygène à l'entrée et à la sortie de la cuve. Le bilan sur l'oxygène est présenté à l'équation 4.1.

$$\frac{dC_{O_2}}{dt} = k_L a (C_{O_2Sat} - C_{O_2Dissous}) - OUR \quad (4.1)$$

Où C_{O_2Sat} est la concentration d'oxygène à saturation dans la phase liquide, $C_{O_2Dissous}$ est la concentration d'oxygène dissous, l'OUR est le taux de respiration des cellules et k_{La} est le coefficient de transfert d'oxygène.

Par contre, une production de gaz carbonique très faible provoque une diminution de la concentration à saturation avec l'augmentation du temps de résidence d'une bulle de CO₂. En effet, dans une bulle de CO₂ où la concentration est très faible, le transfert affecte la concentration maximale pouvant être contenu dans la phase liquide. L'augmentation du temps de résidence de la bulle affecte donc la force motrice dirigeant le transfert du gaz carbonique. Pour tenir compte de ce phénomène, Fiset (2000) fait intervenir une constante K_{DCO_2} pour modéliser le transfert dans ces conditions. Le bilan sur le CO₂ s'écrit donc :

$$\frac{dC_{CO_2}}{dt} = k_{LaC}(C_{CO_2out} * K_{DCO_2} - C_{CO_2Dissous}) + CTR \quad (4.2)$$

Où C_{CO_2out} est la concentration de gaz carbonique à la sortie, $C_{CO_2Dissous}$ est la concentration de gaz carbonique dissous, CTR est le taux de production de CO₂ par les cellules et k_{LaC} est le coefficient de transfert du carbonique.

La relation entre les coefficients de transfert volumique est montrée par les équations (4.3) et (4.4) (Guell et Giralt, 1994).

$$k_L a = k_L a_C \left(\frac{D_{O_2}}{D_{CO_2}} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (4.3)$$

$$k_L a \times 0.8 = k_L a_C \quad (4.4)$$

Où D_{O_2} et D_{CO_2} sont respectivement les coefficient de diffusivité de l'oxygène et du gaz carbonique dans l'eau.

En faisant l'hypothèse du régime permanent, il est possible de résoudre les deux bilans et d'isoler OUR :

$$OUR = \frac{-0.8 \times CTR \times (C_{O_2, Sat} - C_{O_2, Dissous})}{(C_{CO_2, out} \times K_{DCO_2} - DCO_2)} \quad (4.5)$$

Une étude de sensibilité permet de connaître la fiabilité de cette méthode d'évaluation d' OUR . Une expérience en culture a donc été conduite avec l'espèce A dans le bioréacteur de 40 L. Les données de suivi de culture ont d'abord été recueillies. L'aération a été arrêtée et la diminution de l'oxygène dissous ($C_{O_2, Dissous}$) a été suivie afin d'évaluer OUR et $k_L a$ par la technique de la pente (Aubry, 1994) (annexe E). Une évaluation de OUR pour différentes valeurs de K_{DCO_2} a été effectuée à l'aide de l'équation 4.5 et du modèle de Fiset (2000). Enfin, l'écart entre OUR présumé et OUR calculé à l'aide des paramètres de culture a pu être caractérisé. Le Tableau 4.1 présente les valeurs utilisées pour l'étude de sensibilité.

Tableau 4.1 : Valeurs des paramètres de culture pour l'étude de sensibilité

| Symboles | Identification | Valeurs | Unités | Justification |
|------------------|----------------------------|---------|----------|----------------------------|
| $C_{O_2Dissous}$ | Oxygène dissous | 90 | % | Contrôlé |
| CTR | Production de CO_2 | 2.7 | mmol/Lh | $CTR = f(CO_2out, Q_T, V)$ |
| OUR | Consommation | 1.2 | mmol/Lh | Pente de respiration |
| Q_T | Débit d'aération | 460 | cc | Contrôlé |
| k_{La} | Coefficient de transfert | 7 | h^{-1} | Pente de respiration |
| C_{O_2sat} | Concentration à saturation | 160 | % | Air enrichi |

En utilisant ces valeurs, la constante K_{DCO_2} et la concentration de gaz carbonique dissous ont pu être calculées. Ceci a permis l'estimation de l' OUR représenté par un point sur la Figure 4.1. Celle-ci présente aussi l'effet d'une variation de K_{DCO_2} sur la valeur d' OUR calculé.

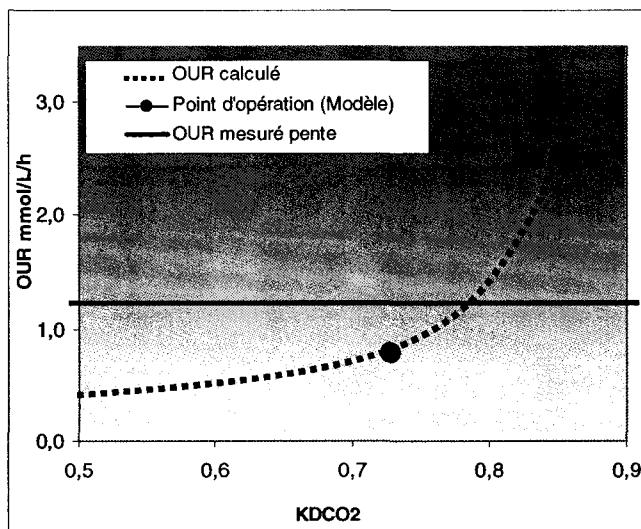


Figure 4.1 : Étude de sensibilité de la lecture en ligne d' OUR
 (—) OUR mesuré; (....) OUR calculé (●) OUR évalué par le modèle

Le calcul d'*OUR* en ligne pour les conditions du Tableau 4.1 (représentée par un point sur le graphique) est différente de la valeur mesurée. Ceci s'explique par la sensibilité de l'équation 4.5 à une variation de la constante K_{DCO_2} . Le modèle de Fiset (2000) fournit des valeurs de K_{DCO_2} entre 0.5 et 0.9 et permet d'évaluer la concentration de CO_2 dissous. Par contre, une variation de 10% de la valeur de cette constante fausse l'évaluation en ligne d'*OUR* d'environ 40%. C'est ce que représente la tendance exponentielle de la courbe à la Figure 4.1. Alors, même si la mesure de CO_2 dissous est exacte, la mesure d'*OUR* en ligne reste imprécise.

Le *CTR* et le CO_2 dissous demeurent de bons indices qualitatifs pour évaluer la respiration cellulaire. En effet, la quantité de CO_2 produite reflète l'activité métabolique et permet de voir l'augmentation ou la diminution de cette activité. Puisque ces mesures sont plus fiables, c'est le *CTR* ainsi que le CO_2 dissous et non *OUR* qui sera utilisé dans le cadre de ce projet pour suivre la respiration cellulaire.

4.1.2. Comparaison de la croissance en 3 L et 40 L

Les objectifs poursuivis par la validation en culture du bioréacteur de 40 L étaient de vérifier sa capacité à réaliser des cultures de cellules végétales en suspension, d'identifier des problèmes liés à des effets d'échelles et de mettre en évidence des modifications devant être apportées pour le design du bioréacteur de 150 L.

Pour ce faire, deux espèces (A et B) ont été cultivées en parallèle en bioréacteur de 3 L 40 L. Le même inoculum a été soumis aux mêmes conditions de culture et d'alimentation pour mieux isoler les effets d'échelle. Les deux bioréacteurs étaient donc opérés en cuvée alimentée et suivis de façon à soumettre les cellules aux mêmes conditions.

4.1.2.1. Culture de l'espèce A

La culture de l'espèce A a permis aux cellules des deux bioréacteurs d'avoir une phase de production équivalente d'environ 300 h. La Figure 4.2 présente la croissance en biomasse sèche, en biomasse humide et en concentration cellulaire. Un problème n'ayant pas été prévu est tout de même survenu lors de la culture de l'espèce A en 40 L. Une accumulation de CO₂ dissous a été observée à environ 24 heures de culture. Le débit d'alimentation a donc été augmenté pour diminuer la concentration en CO₂. L'augmentation du débit d'aération a entraîné du liquide et créé de la mousse provoquant ainsi une agglomération de cellules dans la tête du bioréacteur. Une augmentation de volume du bioréacteur en gardant *H/D* constant entraîne une diminution du rapport Surface/Volume selon l'expression 4.6.

$$\frac{\text{Surface}}{\text{Volume}} \propto V^{-1/3} \quad (4.6)$$

Il existait environ 4 fois moins de surface par unité de volume permettant de libérer la mousse générée à l'intérieur du bioréacteur de 40 L. Une plus grande quantité de mousse expulsé par une surface plus petite monte beaucoup plus rapidement dans la tête du bioréacteur. La mousse s'agglutinait donc dans la tête permettant aux cellules de surface de migrer à travers elle. Ces pertes (3 kg de biomasse humides) n'ont pas été considérées pour le calcul des taux de croissance.

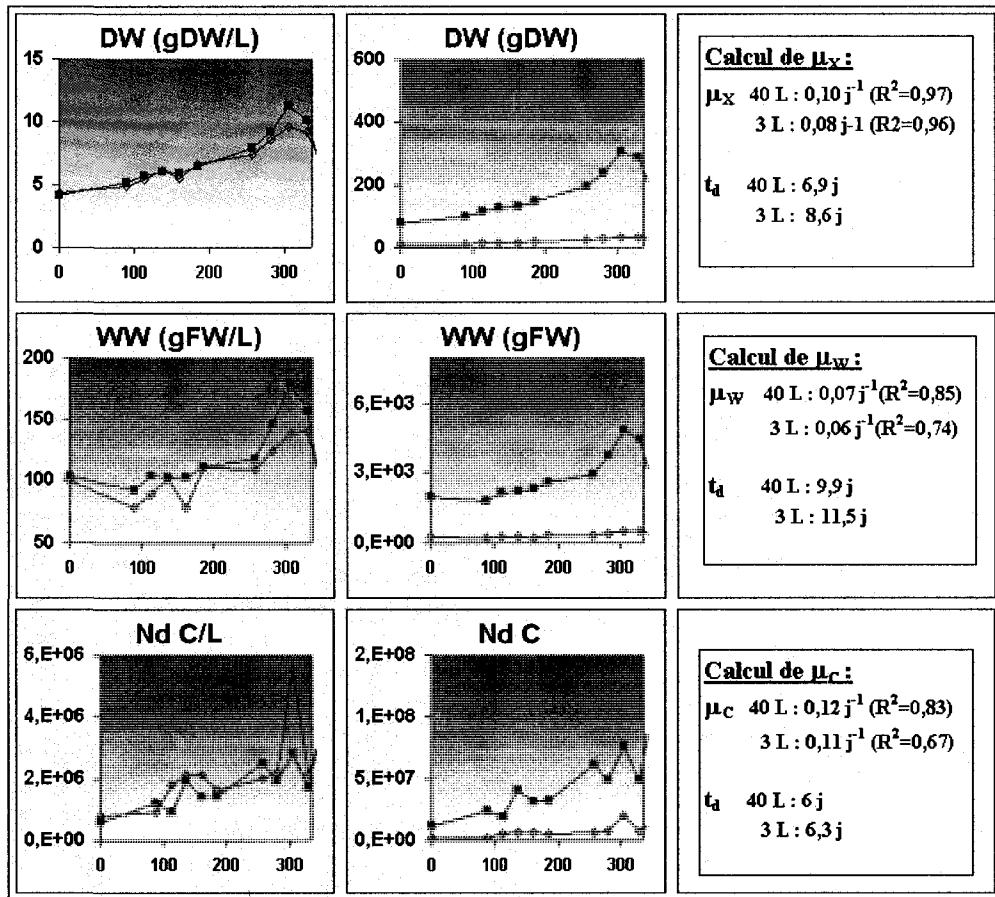


Figure 4.2 : Croissance de l'espèce A en fonction des heures de culture
(◊) bioréacteur de 3 L; (■) bioréacteur de 40 L

À la Figure 4.2 aucune bar d'erreur n'est présente puisqu'une seule mesure pour chaque point a été prise. On voit clairement à cette figure que les indices de croissance des deux cultures se suivent presque parfaitement. Les taux de croissance ont été calculés à partir des valeurs absolues pour tenir compte de la dilution. On voit sur le graphique que la régression offrant la meilleure linéarité ($R^2 = 0.97$) est celle des taux de croissance de la biomasse sèche. Le compte cellulaire étant une méthode visuelle subjective, il n'est pas surprenant d'obtenir des régressions de moins bonne qualité. La biomasse humide offre un bon indice de croissance seulement si la teneur en eau des cellules reste constante durant la culture. Les taux de croissance de la biomasse humide sont identique. Par contre, les indices les plus fiables de la croissance cellulaire sont les taux de croissance calculé à l'aide de la biomasse sèche. Ceux-ci semblent présentés une légère différence qui doit être vérifier par un calcul d'erreur approprié.

Le protocole de quantification de la biomasse sèche utilisé est identiques à celui de Sirois(1997). L'erreur sur la mesure de la biomasse sèche se chiffre, d'après lui, à environ 6 % tandis que l'erreur sur le volume est d'environ 5 %. En traçant la limite inférieur et supérieur des biomasse sèche et en traçant les pentes maximale et minimal entre les deux régression, il est possible d'évaluer l'erreur sur chaque taux de croissance. La Figure 4.3 montre que les taux de croissance dans le 3 L ainsi que dans le 40 L ne présentent pas de différences significatives.

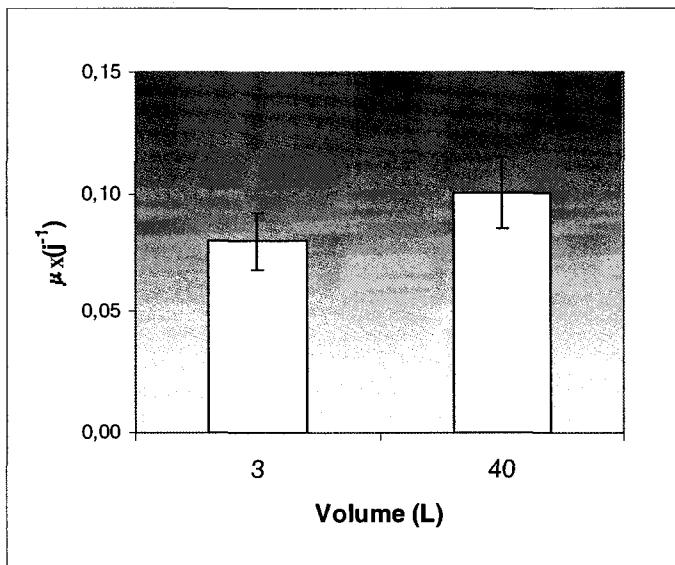


Figure 4.3 : Taux de croissance de l'espèce A

Durant ces deux cultures, l'oxygène dissous a été contrôlé à 120 % de la saturation en air. Le gaz carbonique dissous était en contrôle à 3 mmol/l pour les deux cultures. Les nutriments extracellulaires ainsi que les nutriments intracellulaires (annexe E) se suivent pour les deux cultures en phase de croissance. De plus, les taux de dilution, les ajouts de nutriments ainsi que les consommations ont été semblables durant toute la culture. La Figure 4.4 présente l'évolution des taux de dilution dans chaque bioréacteur.

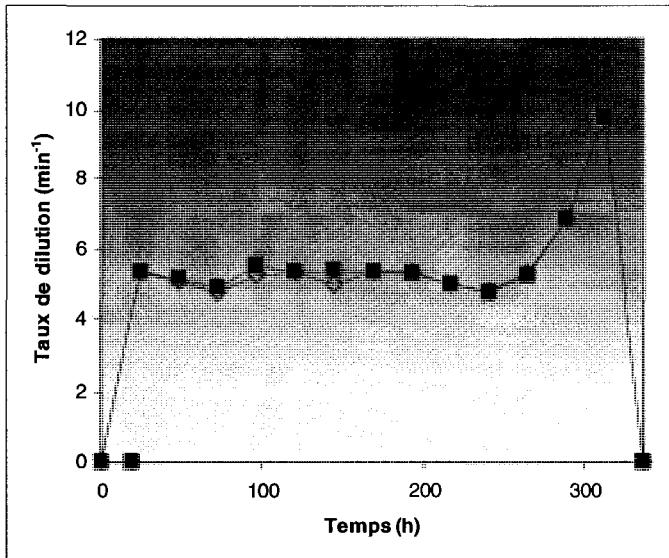


Figure 4.4 : Taux de dilution pour l'espèce A
 (◊) bioréacteur de 3 L; (■) bioréacteur de 40 L

Par contre, on peut constater en regardant les profils de CTR en annexe E, que la culture en 40 L montre beaucoup plus d'activités métaboliques et ce malgré la similarité dans le comportement des deux cultures. Les deux cultures consomme environ 5g/L de glucose quotidiennement, elles devraient donc dégager une quantité de gaz carbonique similaire. L'explication probable de cette différence réside dans le fait que les deux bioréacteurs étaient physiquement branchés sur deux moniteurs à CO₂ différents. Une erreur dans la calibration d'un des deux appareils pourrait donc être la cause de cette grande différence dans le profil des CTR.

En somme, il est raisonnable d'affirmer que les deux bioréacteurs en croissance offrent les mêmes performances pour l'espèce A. Par contre, si les cellules évacuées par la mousse dans le bioréacteur de 40 L avaient été prises en compte

dans le calcul des taux de croissance, les conclusions de cette analyse auraient pu être différentes.

Les résultats présentés aux Figure 4.5 et Figure 4.6 montrent que la production en 3 L est supérieure à celle en 40 L. On remarque, en observant les nutriments extracellulaires en production, que la concentration de ceux-ci est plus faible en 4 L qu'en 40 L et ne suit pas la même tendance. La concentration de phosphate extracellulaire dans le plus gros réacteur n'était pas nulle (0.1 mM) au moment de l'élicitation ce qui pourrait expliquer cette différence dans les rendements de production. En effet, d'après William et al (1993), la concentration en PO_4 doit être nulle au moment de l'élicitation pour maximiser le rendement de la période de production.

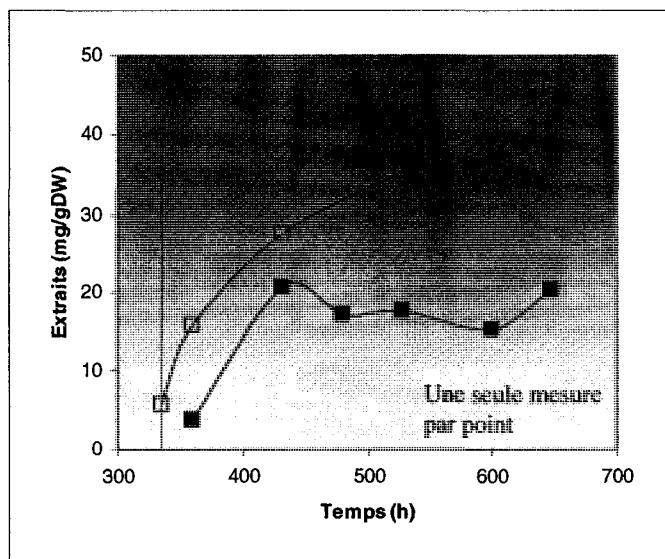


Figure 4.5 : Production totale de la molécule α par l'espèce A
 (□) bioréacteur de 3 L ; (■) bioréacteur de 40 L;

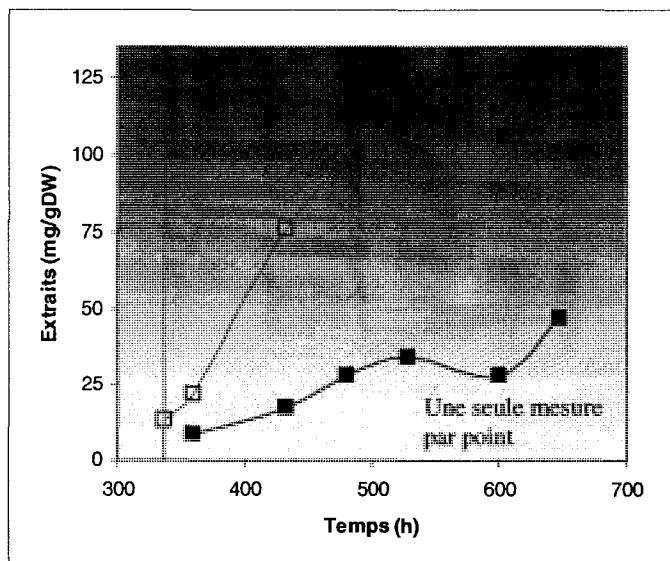


Figure 4.6 : Production totale de la molécule β par l'espèce A
 (□) bioréacteur de 3 L ; (■) bioréacteur de 40 L;

En somme, lors de la culture de l'espèce A, le même taux de croissance a été observé. Les nutriments intracellulaires et extracellulaires en croissance ont suivi la même évolution à un taux de dilution similaire. Le CTR était beaucoup plus faible pour le bioréacteur de 3 L. Par contre, les performances au niveau de la croissance en 40 L sont comparables à celles en 3 L et la consommation de sucre est identique pour les deux cultures. Enfin, ces résultats mettent en doute la fiabilité des appareils de mesure du gaz carbonique à la sortie.

Les différences au niveau de la production s'expliquent par la présence de phosphate à l'élicitation du 40 L. Enfin, les problèmes majeurs identifiés lors de la première culture à grande échelle ont été l'accumulation du CO_2 au début de la culture et la production de mousse par une augmentation du débit d'aération.

4.1.2.2. Culture de l'espèce B

La culture de l'espèce B s'est moins bien déroulée que la culture de l'espèce A. En effet, une surproduction de mousse et l'entraînement de liquide par une alimentation en gaz élevée a provoqué le colmatage des filtres de sortie et la perte de la culture. Cet incident est, par contre, survenu 4 jours après l'élicitation. La Figure 4.7 présente la croissance en biomasse sèche, en biomasse humide et en concentration cellulaire.

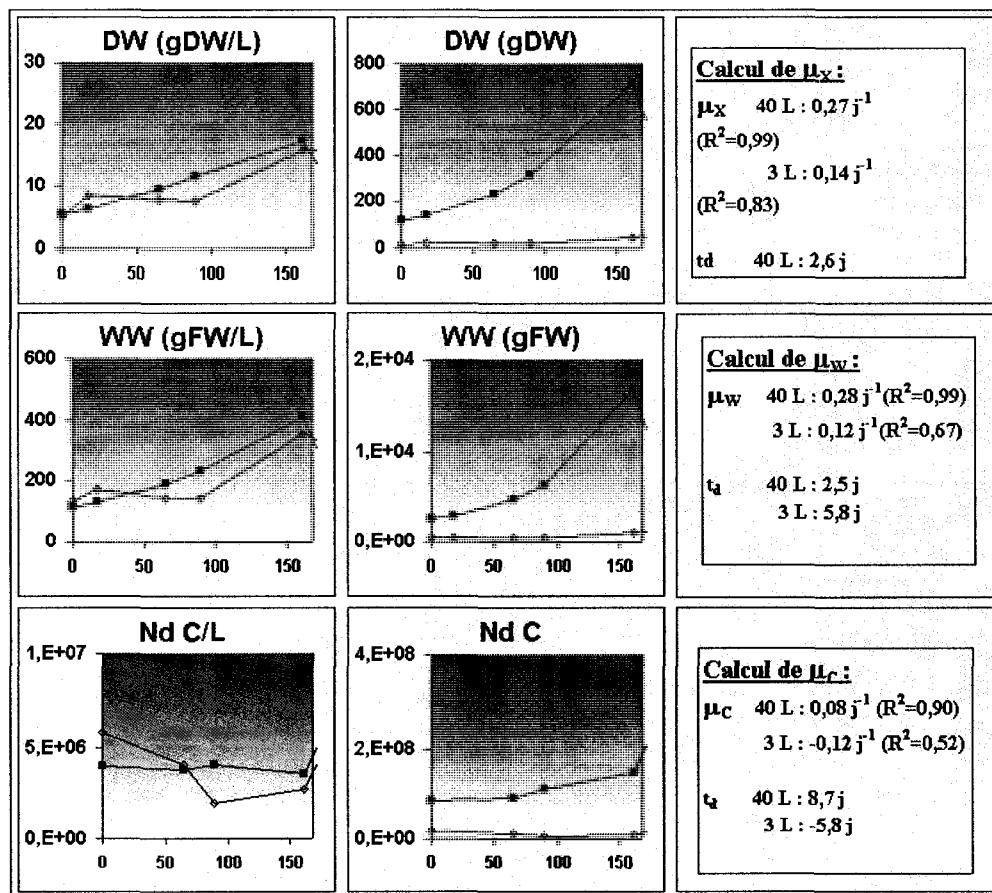


Figure 4.7 : Croissance de l'espèce B en fonction des heures de culture

(◊) bioréacteur de 3 L; (■) bioréacteur de 40 L

On voit clairement qu'il y a une diminution de la croissance au niveau du bioréacteur de 3 L suivi d'une rapide augmentation. Les taux de croissance ont été calculés à partir de la biomasse totale pour tenir compte de la dilution. Pour le bioréacteur de 3 L, la régression offrant la meilleure linéarité est celle utilisée pour calculer les taux de croissance avec la biomasse sèche. C'est donc la quantité de biomasse sèche totale qui a été utilisée pour les calculs des taux de croissance.

L'erreur sur la mesure de la biomasse totale a été évaluée de la même façon que pour la culture de A. La Figure 4.8 montre que les taux de croissance dans le 3 L ainsi que dans le 40 L, contrairement à la culture de A, présentent un écart.

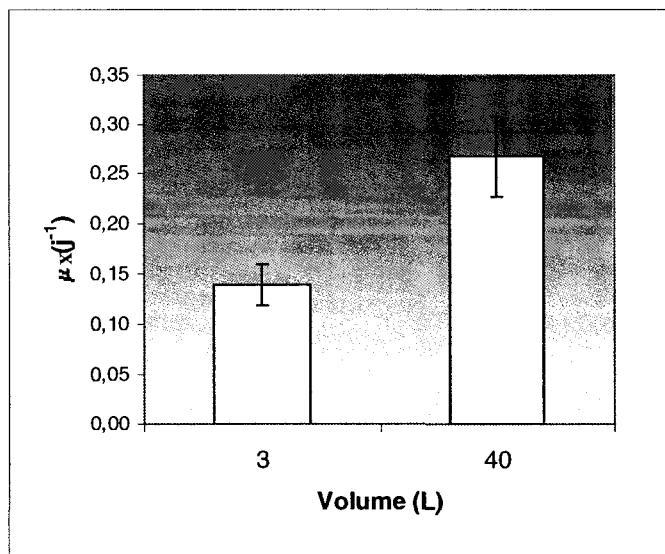


Figure 4.8 : Taux de croissance l'espèce B

Durant les deux cultures, l'oxygène dissous a été contrôlé à 120 % de la saturation en air. Le gaz carbonique dissous était en contrôle pour les deux cultures. De plus,

les taux de dilution, et les ajouts de nutriments ont été semblables durant toute la période de croissance. La Figure 4.9 présente l'évolution des taux de dilution dans chaque bioréacteur.

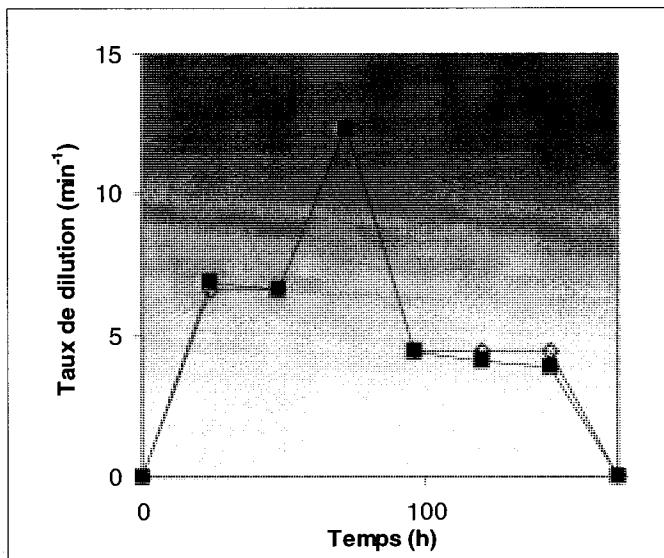


Figure 4.9 : Taux de dilution pour l'espèce B
 (◊) bioréacteur de 3 L; (■) bioréacteur de 40 L

Le ralentissement de la croissance dans le bioréacteur de 3 L est difficilement explicable en observant seulement les nutriments extracellulaires. En effet, les nutriments extracellulaires du 3 L et du 40 L en période de croissance semblent se suivre de très près (annexe E). Par contre, on observe un léger écart entre les deux bioréacteurs dans leur concentration de NH_4 extracellulaire ainsi que dans leur consommation d'ammonium respective. Au niveaux des nutriments intracellulaires, une différence marquée entre les niveaux de NH_4 est observée. En effet, l'ammonium intracellulaire initial 80% plus faible en 3 L (annexe E). Enfin,

les vitesses de consommation de l'ammonium par la culture en 3 L (annexe E) sont 30% inférieures à la consommation en bioréacteur de 40 L. Ces résultats montrent que la différence entre les taux de croissance peut être attribuable à un manque d'ammonium dans le bioréacteur de 3 L. Le ralentissement de la consommation de NH_4 pourrait aussi être la cause de plusieurs autres facteur n'ayant pas été quantifiés par cette étude et n'être qu'un signe de l'états des cellules dans le bioréacteur de 3 L.

Les résultats en production présentés à la Figure 4.10 montrent que la production en 3 L est 35 % supérieure à celle en 40 L. De plus, la production en 3 L semble avoir débuté avant l'élicitation.

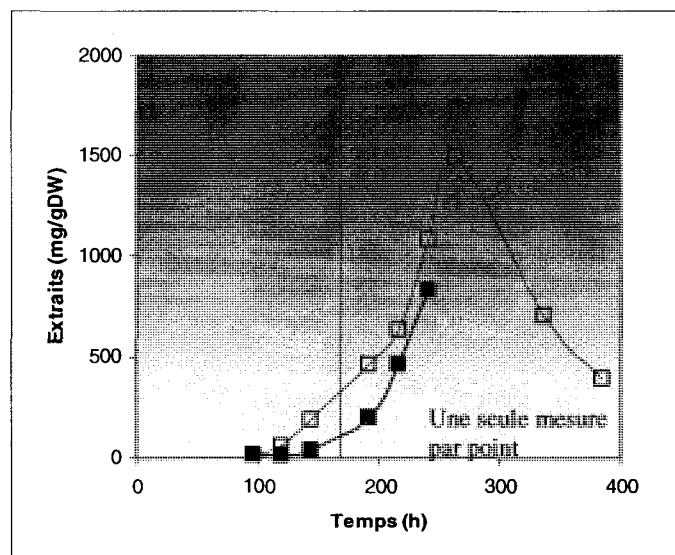


Figure 4.10 : Production totale de la molécule λ par l'espèce B
(□) bioréacteur de 3 L ; (■) bioréacteur de 40 L.

On remarque, en observant les nutriments extracellulaires en production (annexe E), que la concentration d'ammonium est plus faible en 3L qu'en 40 L. Cette limitation en ammonium a peut-être provoqué une élicitation avant l'ajout de l'éliciteur. Si le point à 150 h de culture dans le 3 L était surestimé, les deux productions augmenteraient en parallèle au même rythme et on pourrait conclure que les deux cultures produisent de façon similaire..

En somme, les différences entre les taux de croissance peuvent être expliquées par des vitesses de consommation de l'ammonium différentes et par des concentrations de NH_4 intracellulaire inférieur en bioréacteur de 3 L. Par contre, les performances en production sont similaires si on enlève le point à 150 h de culture. L'influence de l'augmentation d'échelle sur les performances n'a pas été identifiée. Enfin des quantités de métabolites secondaires équivalentes ont été produites dans les deux bioréacteurs production comparables et une croissance plus rapide observée en bioréacteur de 40 L permettent d'affirmer que la mise à l'échelle du bioréacteur pour la culture de cellules de plantes est possible.

4.1.3. Stratégie d'évacuation de la mousse

Lors des cultures de A et de B en 40 L, un système antimousse préventif spécial a été mis en place. Celui-ci se composait d'un récipient en verre contenant de l'huile de silicium connecté à la sortie des gaz du bioréacteur. L'antimousse n'a pu être ajouté directement dans la culture, car cela aurait causé une diminution du transfert

de masse. La mousse sortait du bioréacteur pour se désagréger dans l'antimousse. Ceci devait prévenir le colmatage des filtres de sortie. Cette stratégie a bien fonctionné, mais impliquait le remplacement de la bouteille d'antimousse lorsqu'elle était pleine ce qui multipliait les risques de contamination.

La solution adoptée pour prévenir ce genre de problème en 150 L est d'installer un système fixe permettant la vidange *in situ* ainsi que le remplacement de l'antimousse sans ouvrir le bioréacteur à l'air libre. La Figure 4.11 présente la solution retenue.

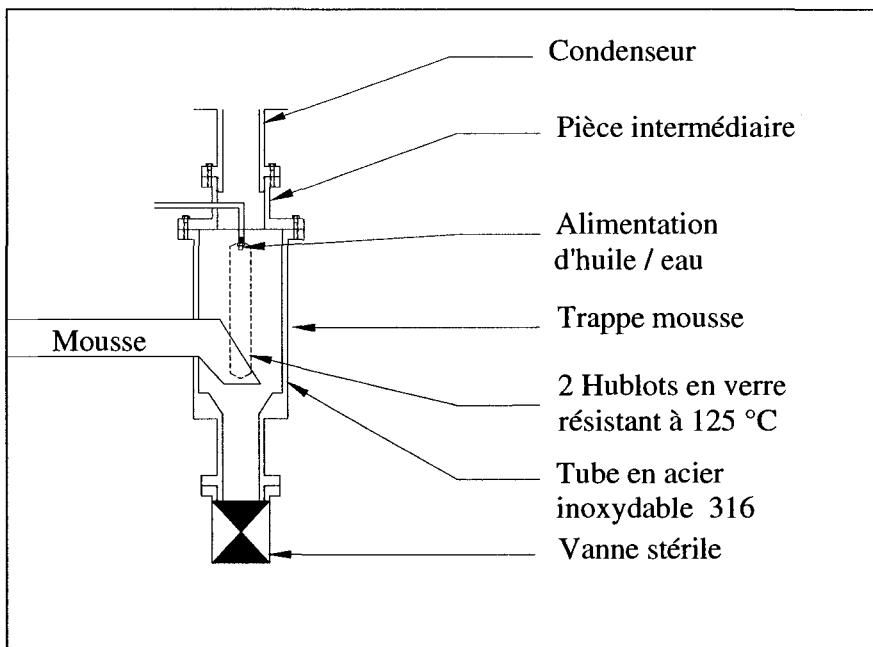


Figure 4.11 : Système antimousse proposé

La mousse est donc acheminée vers le système pour être dégradée dans l'antimousse. Un système d'alimentation en huile ou en eau assure une quantité de

liquide stérile suffisante pour détruire la mousse. Une vanne reliée à un système de vidange à l'eau chaude permet l'évacuation du trop plein de liquide.

Les solutions de destruction mécanique de la mousse ne sont pas efficaces puisque la plupart retourne les protéines causant la mousse à l'intérieur de la culture provoquant sa reformation. Cette stratégie permet de se débarrasser de la mousse, mais aussi d'une partie des cellules. De plus, elle permet d'éviter la perte de la culture par un colmatage des filtres.

4.1.4. Conclusion

En somme, la présente étude prouve que la lecture en ligne de l'OUR est impossible avec les moyens actuels. Pour avoir une lecture fiable de l'OUR, un moniteur à oxygène fiable devrait être utilisé à la sortie des gaz. Le bioréacteur de 40 L ne semble pas affecter la croissance cellulaire. De plus, la production semble être affectée par la mise à l'échelle de 3 L à 40 L. Ces différences pourraient toutefois être dues à une concentration de phosphate trop élevé à l'élicitation (espèce A) ou à une surestimation d'un des points expérimentaux (espèce B). Enfin, le désengorgement du CO₂ et la production de mousse semble être les principaux problèmes de la culture à grande échelle. Ils peuvent être contournés par une augmentation du débit des gaz d'alimentation et l'élaboration d'un système permettant d'extirper la mousse sans ouvrir le bioréacteur.

4.2. Résultats des tests sur les modèles à froid

4.2.1. Transfert d'oxygène

Dans le cadre de ce projet, l'étude du transfert d'oxygène et du k_{La} avait pour principaux objectifs d'obtenir un coefficient de transfert supérieur ou égal à celui dans le bioréacteur original de 5 L, de choisir la géométrie de la cuve et de l'hélice les plus favorables au transfert d'oxygène et d'évaluer l'effet de la vitesse d'agitation et de la respiration cellulaire sur le transfert gazeux.

Pour la première étude en 150 L, deux réservoirs ont été utilisés. Un réservoir conservant la similitude géométrique du bioréacteur de 5 L et ayant un rapport hauteur sur diamètre H/D de 2.1 et un autre plus haut ayant un H/D de 3.23. Ce dernier permettait l'étude qualitative des effets confondus de l'augmentation du temps de résidence des bulles, de l'augmentation de la vitesse d'agitation, d'une variation de la puissance volumique introduit par l'agitation, d'une différence dans les schémas d'écoulement et de pompage ainsi que des changement de rapports géométrique w/d sur le coefficient de transfert k_{La} . Les deux réservoirs étaient munis de diffuseur poreux. Les vitesses d'agitation ont été déterminées de façon à garder les vitesses en bout de pale constantes à 0.42 m/s en conservant un entrefer de 25 mm impliquant une vitesse de cisaillement en bout pale constant. Cette vitesse correspond à une vitesse d'opération non dommageable pour les cellules

végétales telles que vérifiées par Fortier (2002) et par l'expertise de Phytobiotech inc. Les rubans hélicoïdaux dans les deux cuves avaient un rapport pas sur diamètre p/d de 1.5. Des débits d'aération variables allant jusqu'à 0.1 vvm furent utilisés. La Figure 4.12 présente les résultats de cette première expérience.

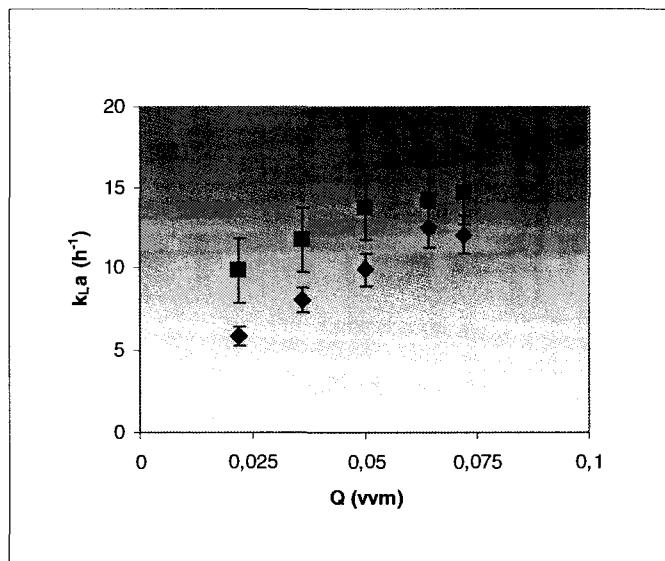


Figure 4.12 : Effet de la géométrie de la cuve sur le k_{La}
 (◆) $H/D = 3$, 23 RPM, eau; (■) $H/D = 2.1$, 20 RPM, eau;

Le transfert dans la cuve ayant un H/D de 3 est significativement inférieur à celui mesuré pour le H/D de 2.1. Ce résultat est conforme au modèle de Fortier (2002). En effet, comme le montre la Figure 4.12, une cuve de 150 L avec un H/D de 3.6 fournit de plus faibles coefficients de transfert qu'une cuve ayant un H/D de 1.9. Buchnolz et coll.(1978) souligne que pour le même volume, un trop faible diamètre de réservoir augmente le taux de coalescence et réduit l'aire interfaciale des bulles. Le choix judicieux des paramètres d'opération et de l'eau comme phase liquide

permet la comparaison des performances du système de 150 L avec celles des bioréacteurs de 5 L et de 40 L testées préalablement par Fortier (2002). La Figure 4.13 présente ces différences.

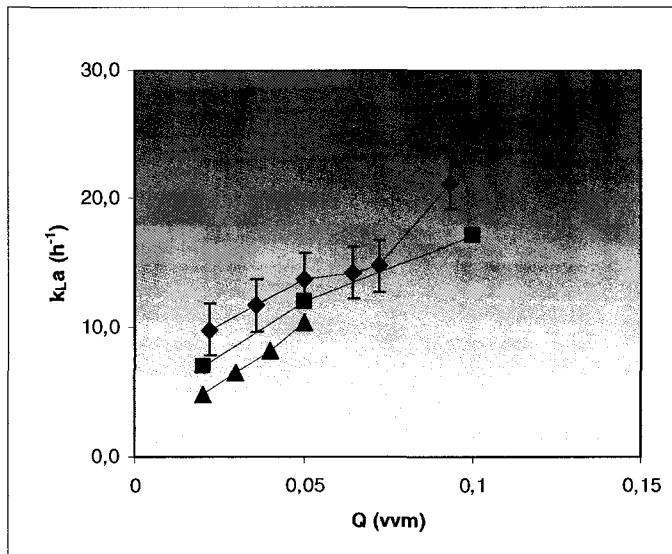


Figure 4.13 : Comparaison des performances des différents systèmes
 (■) 5 L, 60 RPM, eau; (▲) 40 L, 25 RPM, eau ; (◆) 150 L, 20 RPM, eau;

Pour des systèmes géométriquement et cinétiquement similaires, le schéma d'écoulement est le même (Johnstone, 1957). La relation entre le transfert de matière entre les deux échelle devient simple. En effet la similarité géométrique entraîne que le coefficient de transfert de masse dans la petite échelle devient $1/l$ fois celui dans l'unité industrielle (l étant le ratio Linéaire d'échelle). Il existe entre le bioréacteur de 5 L et celui de 150 L un facteur l de 2.64. On remarque à faible aération un k_{L_a} de 4.7 h^{-1} pour le 5 L et de 10 h^{-1} pour le 150 L. Le coefficient de transfert à petite échelle est environ $1/l$ fois celui en 150 L. En tenant compte de l'erreur expérimentale, on note que ce rapport est conservé tout au long de

l'augmentation du débit d'aération ce qui implique aucune altération de la similarité des deux régimes de bullage. On peut dire que les deux modèles semblent présenter les particularités de deux systèmes se rapprochant de la similitude cinétique. Ce qui nous permet de prévoir un k_{LA} supérieur sinon égal dans le 150 L. Bien que le bioréacteur de 40 L soit muni d'un aérateur poreux, son rapport géométrique H/D inférieur ne permet probablement pas un temps de contact suffisant entre les phases pour atteindre les performances des deux autres échelles.

Dans le cadre de ce projet, une étude sur la coalescence à grande échelle aurait certainement permis d'améliorer les prédictions théoriques de Fortier (2002). Cependant, les résultats obtenus permettent de choisir la cuve la moins haute ce qui correspond au rapport géométrique du bioréacteur original de 5 L. De plus, les performances du modèle à froid permettent d'atteindre un k_{LA} d'environ 15 h^{-1} . Ceci est suffisant en se basant sur les performances en culture du 40 L pour la culture de cellules de plantes en suspension.

Afin de, déterminer la meilleure géométrie d'hélice, les k_{LA} ont été calculés pour trois hélices différentes en fonction de la vitesse de rotation. La cuve ayant un H/D de 2.1 a été utilisée pour ces tests. La Figure 4.14 montre qu'il y a peu de différence entre les performances des hélices. Ce test ne permet donc pas de choisir la meilleure hélice. C'est par leur capacité à fournir une suspension homogène qu'il faudra les départager.

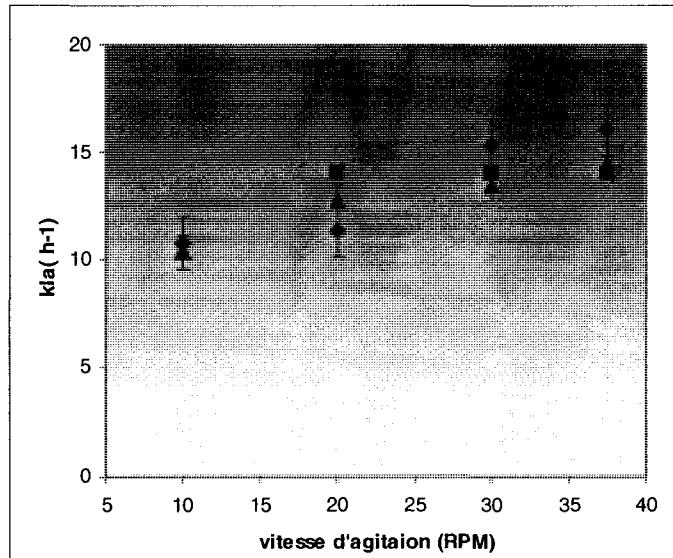


Figure 4.14 : Effet du pas de l'hélice sur le k_{La}
 (◆) P/D = 1; (■) P/D = 1.5; (▲) P/D = 2.

Les k_{La} dans l'eau sont très utiles pour comparer différents systèmes entre eux. Par contre, en les conditions sont très différentes culture. La viscosité est plus élevée et il y a présence de particules ce qui, selon Fortier (2002), diminue le transfert d'oxygène considérablement. Lors de la culture de l'espèce A en 40 L, on a observé un k_{La} de 7 h^{-1} . Celui-ci a été calculé en coupant l'alimentation d'air et en mesurant la pente obtenue par la diminution de la concentration d'oxygène dissous dans un intervalle de temps donné. Bird et al.(1960) démontrent à partir de bilans et de la lois de Fick, qu'une cinétique réactionnelle peut augmenter significativement le transfert. Shuler et al.(1992) soulèvent également ce point pour le cas de la consommation d'oxygène par les cellules, mais n'y fournit pas de réponse. De plus, la présence d'un électrolyte favorise la formation de petites bulles sans toutefois affecter leur coalescence (Tse et coll., 1998). Ceci pourrait améliorer le

transfert jusqu'à ce que les bulles soient trop petites et qu'elles se déchargent trop rapidement de leur oxygène.

Une expérience simple dans le bioréacteur de 5 L a été effectuée afin de connaître l'influence du milieu de culture sur le coefficient de transfert k_{La} . Plusieurs k_{La} dans le milieu de culture ont été mesurés et comparés avec ceux mesurés dans de l'eau et dans un milieu de culture 4 fois plus concentré en sels dissous (Figure 4.15).

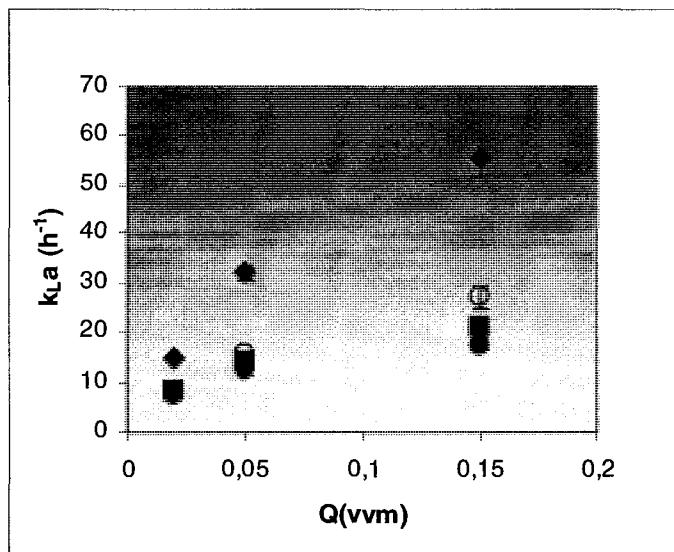


Figure 4.15 : Effet du milieu sur la valeur du k_{La}
 (○) Milieu 1x; (■) Eau; (●) Eau Fortier (2002); (◆) Milieu 4x;

Comme le démontre le graphique, le milieu a effectivement de l'influence sur le transfert de masse, mais seulement à une concentration 4 fois plus élevée en sels ou à débit d'aération d'environ 0.15 vvm. Le milieu à concentration habituelle se

comporte comme de l'eau à 0.05 vvm, mais on obtient une augmentation de 30 % à 0.15 vvm. Il a été observé durant ces expériences qu'à fort débit, la coalescence des bulles dans le milieu était moins prononcée que dans l'eau. Une surface de contact plus grande dans le milieu pourrait expliquer les différences entre les k_{La} . Cette étude prouve que des agents chimiques peuvent influencer le transfert de masse, c'est-à-dire, que des produits ou des sels contenus dans le milieu ou sécrétés par les cellules pourraient provoquer l'augmentation de la tension de surface, la diminution du diamètre des bulles ou l'amélioration du transfert d'oxygène.

Cette analyse complète l'étude du transfert d'oxygène pour ce projet. La cuve la moins haute ayant un H/D de 2 a été sélectionnée pour ses performances au niveau du transfert d'oxygène. Il a été montré que toutes les hélices testées offrent le même transfert de masse. Enfin, la composition chimique du milieu à faible concentration a peu d'influence sur le transfert d'oxygène lorsque le débit d'aération est de 0.05 vvm.

4.2.2. Mise en suspension

L'expérience de mise en suspension avait pour principal objectif la détermination de la meilleure hélice. La mesure de la densité lumineuse ne pouvait être utilisée pour étudier la suspension à grande échelle car la lumière était totalement absorbé par les particules dans la cuves. Alors, des échantillons de surface ont été prélevés pour différentes conditions d'opération. La vitesse d'agitation a été

progressivement augmentée de 10 à 40 RPM par pas de 10 RPM pour des concentrations de résine de 100, 200, 300 et 400 g/L et pour une aération 0.05 vvm. La qualité de la suspension a été évaluée en faisant le rapport entre la concentration de surface et la concentration moyenne de résine contenu dans le réservoir de 150 L. Il a ensuite été possible de calculer la variation de la qualité de la suspension en fonction de la vitesse d'agitation. Les Figure 4.16 et 4.20 présentent les résultats de ces expériences.

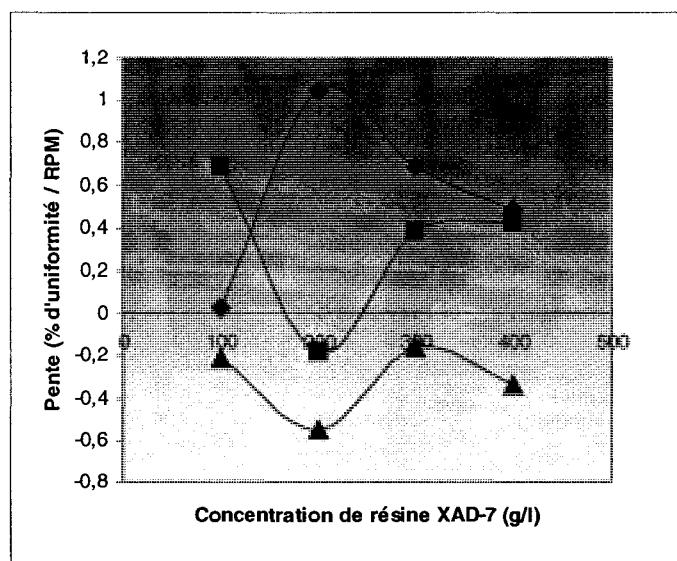


Figure 4.16 : Effet du pas de l'hélice sur la qualité de la suspension
 (◆) $p/d = 1$; (■) $p/d = 1.5$; (▲) $p/d = 2$

Pour chaque concentration de résine, la vitesse d'agitation est passée de 10 à 40 RPM par pas de 10 RPM et une pente a été calculé pour mesurer l'augmentation de la qualité de la suspension en fonction de la vitesse d'agitation. Les pentes calculées pour l'hélice possédant un rapport p/d de 2 sont toutes négatives. C'est-à-

dire que, pour chaque concentration de résine testée, l'augmentation de la vitesse d'agitation provoque une diminution de la qualité de la suspension. Ceci peut s'expliquer par la ressemblance de cette hélice à pas très grand avec une ancre. L'ancre ne fournissant qu'un faible pompage ascendant, les particules auraient tendance à changer de direction en frappant la pale de l'agitateur et à se déposer au fond. Ce qui expliquerait la diminution de la qualité de la suspension avec l'augmentation de la vitesse d'agitation. L'hélice ayant un p/d de 2 est donc éliminée. Les deux autres hélices présentent aussi de mauvaises performances pour certaines concentrations. Toutefois, celles-ci ne se répètent pas pour toutes les concentrations et peuvent être attribuables à des erreurs de mesure ou de manipulation. La Figure 4.17 présente les performances des deux autres hélices.

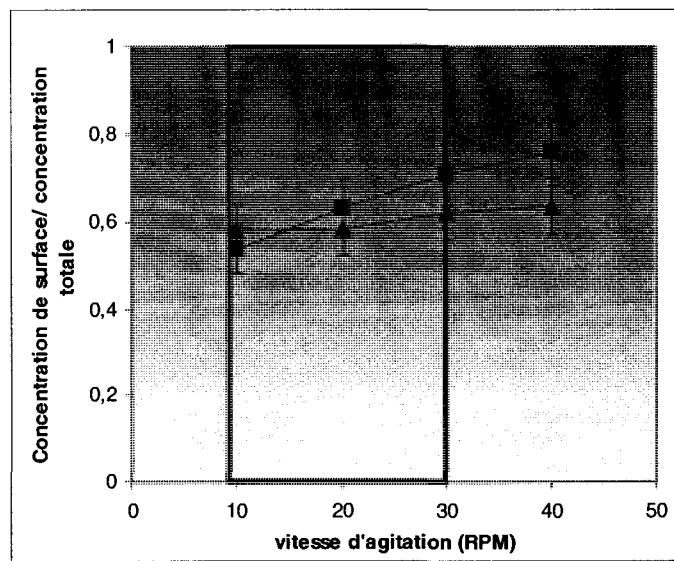


Figure 4.17 : Choix de la meilleur hélice

(■)P/D = 1; (▲) P/D = 1.5.

La Figure 4.17 présente le pourcentage d'uniformité de la suspension en fonction de la vitesse d'agitation. Encore une fois, les deux hélices offrent des performances similaires. Cette figure montre qu'il est possible de faire la mise à l'échelle géométrique de l'hélice ayant un p/d de 1.5 utilisée dans le bioréacteur de 5 L sans compromettre la qualité de la suspension. En effet, des tests similaires menés avec les mêmes concentrations de résines en bioréacteur de 5 L ne permettent pas de dépassé un degré d'uniformité de 30 % (résultats non publiés). Une hélice ayant un p/d de 1.5 et fournissant une suspension d'environ 60 % offre donc des performances suffisantes pour la culture de cellules en suspension.

En somme, une hélice se rapprochant de la géométrie d'une ancre n'offre pas de bonne performance pour la suspension de particules solides. De plus des rubans hélicoïdaux ayant des rapports p/d de 1 et 1.5 offrent des performances similaires. Des tests faisant varier le rapport W/d aurait pu fournir des résultats intéressants qui auraient permis d'augmenter l'efficacité de l'hélice choisi. Enfin, ces tests montrent que la mise à l'échelle géométrique de la technologie du mobile d'agitation du 5 L est possible pour un bioréacteur de 150 L.

4.2.3. Temps de mélange

Des temps de mélange ont été mesurés dans l'eau pour différentes vitesses d'agitation afin de connaître l'efficacité du mélange assuré par les rubans hélicoïdaux. L'eau a été choisi comme fluide à cause de la complexité d'utilisation

de l'agar ou de tout autre fluide rhéofluidifiant. Les temps de mélange ont été obtenus en injectant un traceur de sel et en suivant l'évolution de la conductivité à l'intérieur de la cuve. Une seule sonde de surface a été utilisée pour ces expériences. L'alimentation en air se faisait au rythme de 0.05 vvm tandis que la vitesse d'agitation variait de 10 à 30 RPM. La sonde était recouverte d'un treillis pour créer une zone stagnante autour de la zone du capteur afin de minimiser le bruit causé par la proximité des bulles d'air (annexe C). Un mélange adéquat était atteint lorsque les oscillations de la conductivité ne dépassaient pas 10 % de la variation de conductivité totale.

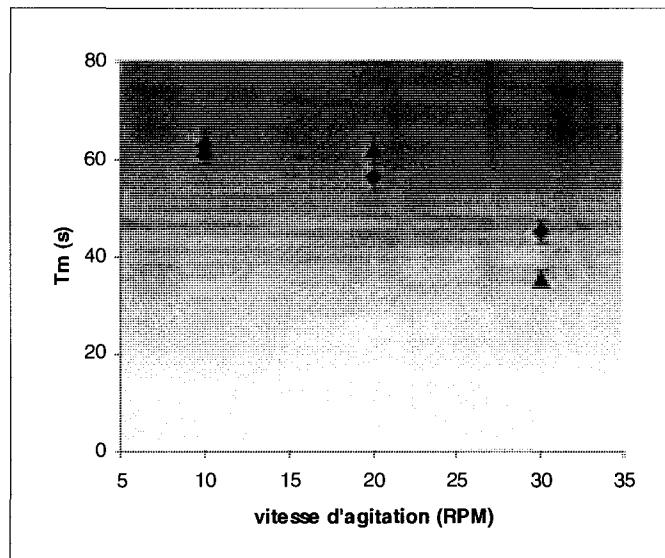


Figure 4.18 : Temps de mélange

(■)P/D = 1, 0.05 vvm, eau; (▲) P/D = 1.5, 0.05 vvm, eau.

Ces temps de mélange correspondent aux temps de mélange observés au début de la culture lorsque la culture est peu visqueuse (Zhong et coll., 1995). L'effet d'une

augmentation de la viscosité par l'augmentation de biomasse aura pour effet d'augmenter les temps de mélange. Pour la culture de cellules végétales, les temps de mélange doivent être négligeables par rapport au temps caractéristique de transfert et de consommation des substrats. Un coefficient de transfert d'oxygène de 15 h^{-1} dans l'eau a été mesuré en culture ce qui correspond à un temps caractéristique de 240 secondes, ce qui est 4 fois plus élevé que le temps de mélange maximal observé. On peut donc poser l'hypothèse que le système est parfaitement mélangé au point de vue du transfert d'oxygène. En culture, un k_{La} de 7 h^{-1} est observé. Pour atteindre la même uniformité de transfert que dans le modèle à froid le système de mélange devrait pouvoir atteindre des temps de mélange en culture d'environ 2 minutes. La vitesse de consommation la plus rapide pour les deux cultures est celle du NH_4 qui se chiffre à près de 9 mM/j . La constante de saturation correspond à la concentration à laquelle on observe la moitié de la croissance maximal (Shuler et al., 1992). D'après l'expertise de Phytobiotech inc, on observe un croissance maximale entre 5 et 7 mM de NH_4 en solution. Si la constante de saturation K_s est inférieure à la concentration dans le milieu, alors le temps caractéristique de consommation (Concentration dans le milieu/vitesse de consommation) serait d'environ 12 heures. Un temps de mélange de 2 minutes assure donc aussi une distribution uniforme des nutriments.

Une des principales faiblesses de cette analyse consiste à avoir utilisé une seule sonde pour un volume de culture de 150 L. De plus, l'étude des temps de mélange a été effectuée avec de l'eau alors que les suspensions cellulaires sont rhéofluidifiantes et beaucoup plus visqueuses à haute concentration cellulaire

($m = 0.2$ à $0.9 \text{ Pa}\cdot\text{s}^n$ et $n = 0.8$ à 0.1). Les temps caractéristiques de mélange et de transfert devraient être affectés par une augmentation de viscosité ce qui pourrait entraîner une non-homogénéité du transfert dans la cuve si le temps de mélange est augmenté de plus de 4 fois.

4.2.4. Cisaillement et analogie couette

L'augmentation de volume implique nécessairement une diminution de l'intensité de l'agitation pour prévenir la détérioration des cellules par le cisaillement en bout de pale. Le cisaillement est fortement lié à l'entrefer ainsi qu'à la vitesse d'agitation. Grâce aux travaux de Fortier (2002) le cisaillement maximal auquel peuvent être soumises les cellules végétales a été estimé à 60 s^{-1} . Les effets de l'entrefer et de la vitesse d'agitation ont ensuite été étudiés par simulation. Dans le cadre de ce projet, aucune simulation n'a été réalisée. Un calcul théorique du cisaillement a plutôt été effectué en utilisant l'analogie couette (Figure 4.19).

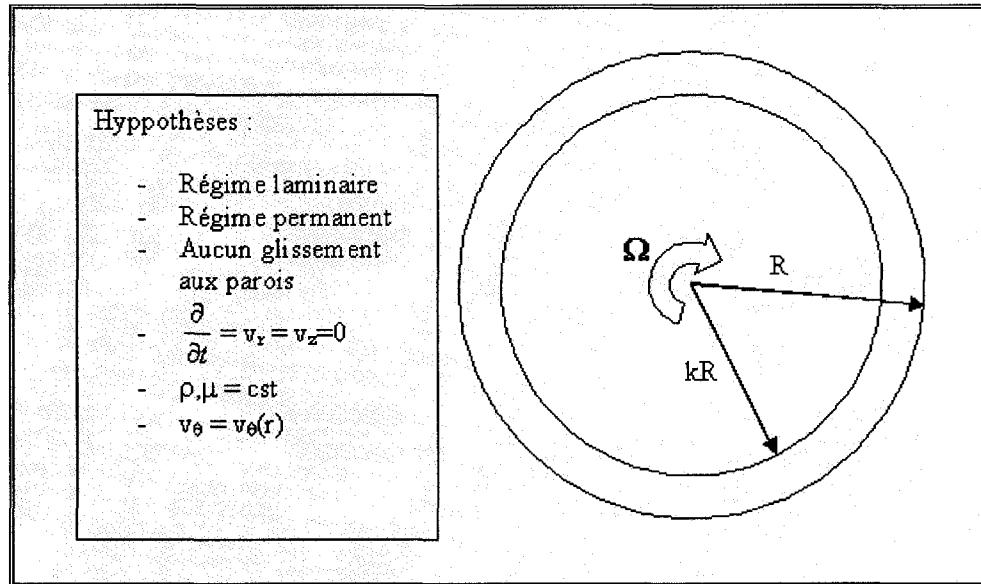


Figure 4.19 : Analogie couette pour le calcul du cisaillement

Dans la Figure 4.19 l'hélice est remplacée par un cylindre de rayon kR tournant à une vitesse Ω à l'intérieur d'une cuve cylindrique de rayon R . Pour le calcul du cisaillement on suppose un écoulement rampant, le régime permanent ainsi qu'aucun glissement au parois. On assume aussi la constance de la viscosité et de la densité. Voici le raisonnement théorique suivi pour établir le modèle prédictif de la vitesse de cisaillement en bout de pale.

En résolvant les équations de Navier Stokes on obtient :

$$v_\theta = \Omega R \frac{\left(\frac{kR}{r} - \frac{r}{kR} \right)}{\left(k - \frac{1}{k} \right)} \quad (4.19)$$

Sachant que le taux de cisaillement est :

$$\gamma(r) = -r \frac{\partial}{\partial} \left(\frac{v_\theta}{r} \right) \quad (4.20)$$

Alors :

$$\gamma(r) = \frac{1}{r^2} \left(\frac{2\Omega}{\left(\frac{1}{(kR)^2} - \frac{1}{R^2} \right)} \right) \quad (4.21)$$

Donc le cisaillement près du mobile d'agitation à $r \approx kR$ est :

$$\gamma(kR) = \left(\frac{2\Omega}{1 - \left(\frac{kR}{R} \right)^2} \right) \quad (4.22)$$

En prenant le cas limite où $kR \approx R$ alors le cisaillement peut s'exprimer par :

$$\gamma(kR) = 4\pi N \left(\frac{R^2}{R^2 - (kR)^2} \right) \quad (4.23)$$

En utilisant l'équation 4.22 avec les conditions testées par Fortier (2002) dans la simulation du bioréacteur de 5 L on obtient les résultats présentés à la Figure 4.20.

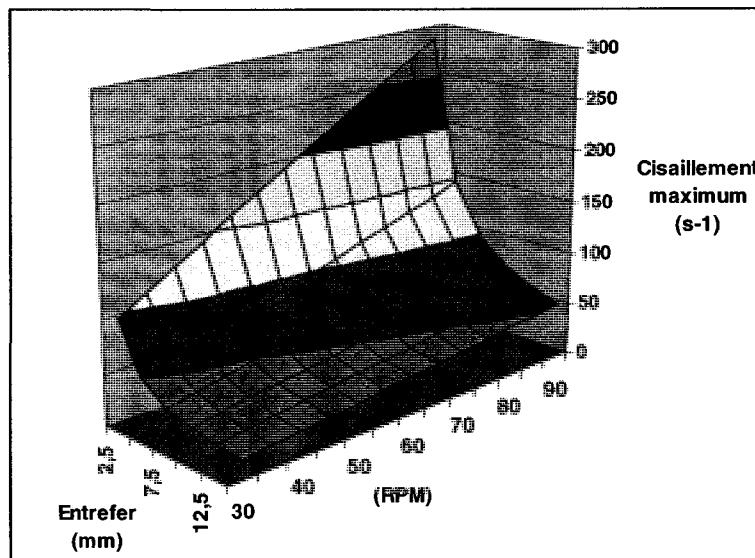


Figure 4.20 : Analogie couette pour le calcul du cisaillement

La Figure 4.21 montre les résultats obtenus par Fortier (2002) pour la simulation du cisaillement dans le bioréacteur de 5 L.

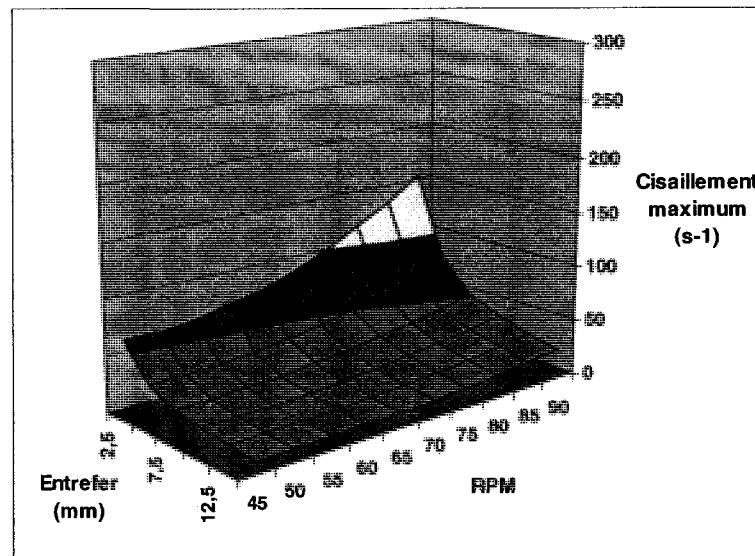


Figure 4.21 : Simulation de Fortier (2002) pour le calcul du cisaillement

La simulation de Fortier (2002) tenait compte de la nature rhéofluidifiante de la suspension cellulaire ($m = 0.5$, $n = 0.5$) et de la géométrie du bioréacteur de 5 L (annexe A). On remarque un écart significatif entre la simulation et le calcul par l'analogie couette. La Figure 4.22 montre les écarts pour chaque condition d'opération.

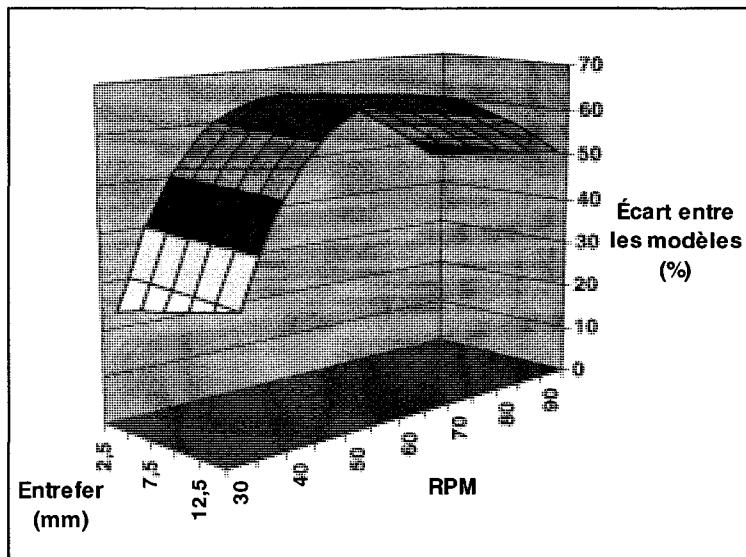


Figure 4.22 : Écart relatif entre la simulation de Fortier (2002) et l'analogie couette

Une approximation du cisaillement par l'analogie couette surestime la valeur du taux de cisaillement en bout de pale. En utilisant ce modèle pour fixer l'entrefer du bioréacteur de 150 L on s'assure d'une valeur de cisaillement réelle inférieure au critère de 60 s^{-1} . Par contre, trop de prudence au niveau de la détermination de l'entrefer pourrait nuire à l'hydrodynamisme et réduire les performances du bioréacteur. L'équation 4.22 peut être utilisé pour vérifier que la grandeur d'un

entrefer est sécuritaire. Les tests de mise en suspension et de transfert gazeux ont été effectués avec un entrefer de 2.5 cm. Cet entrefer correspondait à une distance sécuritaire pour empêcher le frottement de l'hélice contre la paroi de la cuve. Les résultats du modèle pour différents entrefers sont montrés à la Figure 4.23.

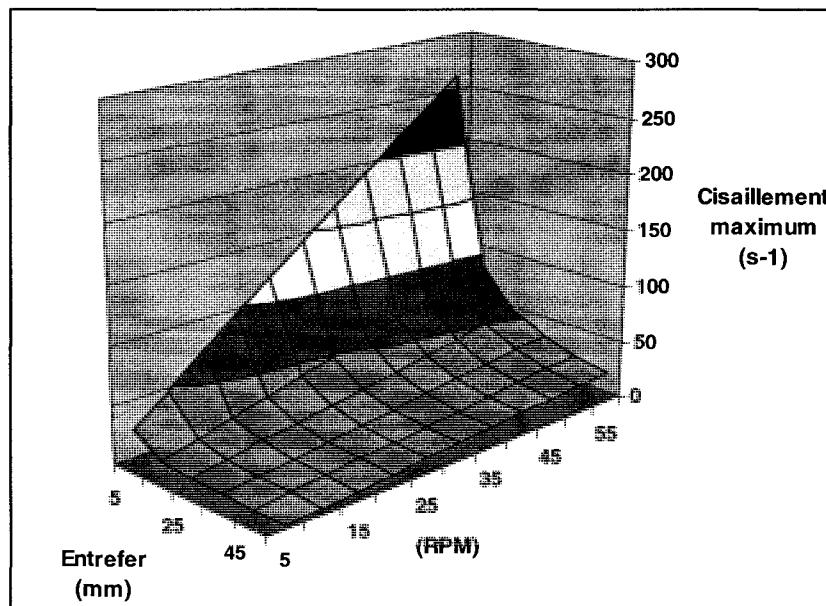


Figure 4.23 : Analogie couette pour le bioréacteur de 150 L

Comme le montre la Figure 4.23, le taux de cisaillement ne dépasse pas 50 s^{-1} à une valeur d'entrefer de 2.5 cm. Compte tenu du facteur de sécurité que nous procure l'imprécision du modèle, il est possible de choisir cet. Cette figure montre aussi que la vitesse d'agitation peut être augmentée jusqu'à 55 RPM sans craindre de dépasser la valeur de cisaillement maximale de 60 s^{-1} .

4.2.5. Conclusion

Le modèle prédictif du k_{LA} élaboré par Fortier (2002) ne permet pas de prédire les performances à grande échelle. Enfin, les tests sur les modèles à froid ont permis de choisir la cuve ayant un H/D de 2. Celle-ci permet un k_{LA} de 15 h^{-1} et une mise en suspension de 60 %. La surestimation du cisaillement par l'analogie couette permet d'affirmer qu'un entrefer de 25 mm pouvait être choisi sans risque d'atteindre le cisaillement maximum de 60 s^{-1} .

4.3. Design final du 150 L

Un des objectifs poursuivi par ce projet était la rédaction d'un document de conception technique. Les dimensions choisies par l'étude des paramètres critiques ne suffisent pas à l'élaboration d'un bioréacteur fonctionnel. Certaines dimensions et instructions supplémentaires doivent être spécifiées à l'entreprise responsable de la construction du bioréacteur. Cette section présente le bioréacteur final tel qu'il devrait être conçu. Certaines dimensions, telles que la dimension des chicanes et de l'aérateur, ont été obtenues par la mise à l'échelle géométrique du bioréacteur de 5 L optimisé par Fortier (2002). D'autres, par contre, reposent sur des considérations pratiques d'encombrement, d'opérabilité ou sur des systèmes déjà en fonction sur le bioréacteur de 40 L. La pertinence de présenter le design final du bioréacteur dans le cadre de ce projet repose sur le fait qu'une mise à l'échelle de cette importance a demandé une révision des protocoles d'inoculation, des techniques de stérilisation,

d'échantillonnage, d'élicitation et de récoltes ce qui a eu une influence directe sur le design du bioréacteur. La Figure 4.24 et la Figure 4.25 présente une vue de coupe et d'ensemble du bioréacteur.

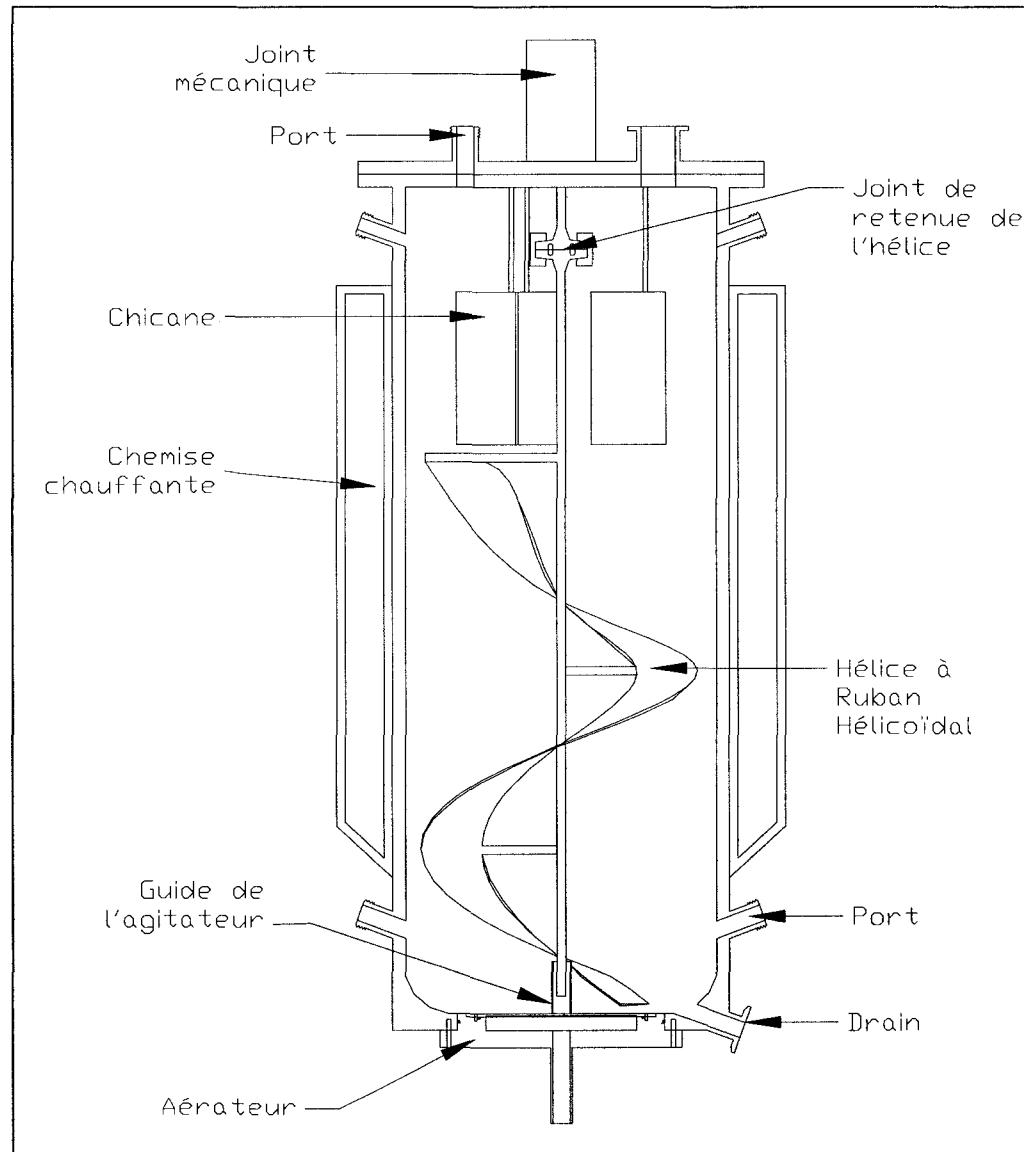


Figure 4.24 : Coupe du bioréacteur de 150 L.

La Figure 4.25 montre une vue d'ensemble du bioréacteur ainsi que le nombre et la position des ports.

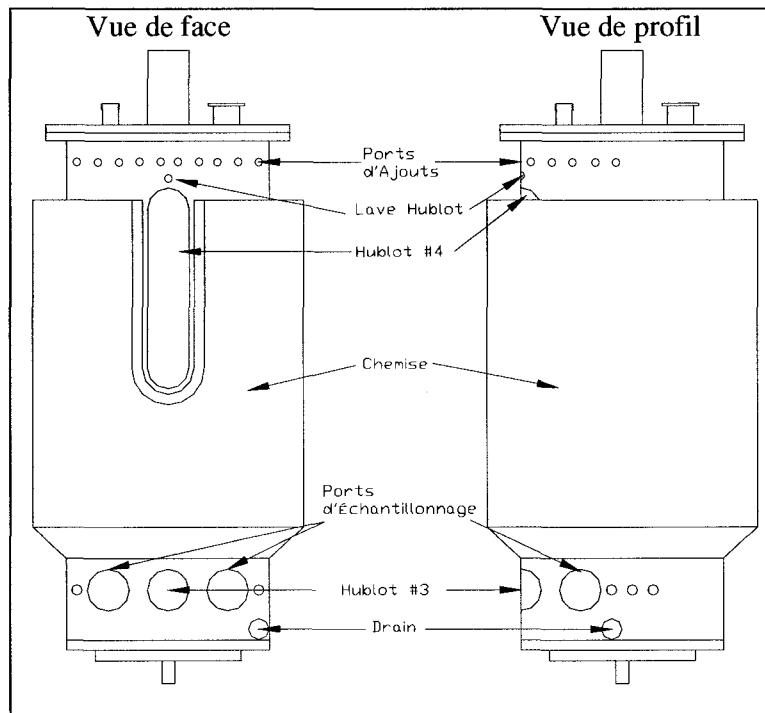


Figure 4.25 : Vue d'ensemble du bioréacteur de 150L

4.3.1. Conclusion

En somme, lors du design final d'un bioréacteur, les considérations scientifiques et expérimentales ne suffisent pas pour tout dimensionner. En effet de nombreuses préoccupations pratiques, économiques, légales, mécaniques et électriques se rajoutent et certaines dimensions sont fixées en se basant sur des systèmes déjà existants, des mesures standards de l'industrie, ou pour tenir compte de

l'encombrement stérique ou de l'opérabilité des systèmes. Dans le cas présent les facteurs critiques de croissance ont été préalablement identifiés par une validation en culture et des tests sur un modèle à froid ont été effectués, mais cette prudence ne garantit pas le succès de la mise à l'échelle. Une validation en culture du nouveau système devra donc être effectuée pour vérifier ses performances.

5. CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

Le bioréacteur de 40 L semble permettre une croissance égale ou plus rapide que dans le bioréacteur de 3 L. De plus, la production de l'espèce A semble être affectée par la mise à l'échelle de 3 L à 40 L, mais ces différences pourraient être dues à une élicitation lorsque le PO_4 extracellulaire était encore trop élevé. Au niveau de la croissance et de la production, aucun effet d'échelle flagrant n'a été noté à part le retrait du gaz carbonique et la production de mousse. L'opération d'un deuxième bioréacteur de 3 L avec le même inoculum aurait été utile pour vérifier la reproductibilité d'une culture à l'autre et mettre en évidence les effet d'échelle. L'évacuation du gaz carbonique peut facilement être effectué en augmentant le débit d'aération, mais provoque une génération importante de mousse. Une solution adéquate au problème de mousse a ensuite été proposée montrant que la culture de cellules de plantes pour la production de métabolites secondaires à grande échelle est possible.

Les tests sur les modèles à froid ont permis d'atteindre les objectifs de départ soit : un k_{La} de 15 h^{-1} en milieu aqueux, une suspension de 60 % et le dimensionnement d'un entrefer de 25 mm permettant d'opérer le bioréacteur sans risque d'atteindre le cisaillement maximum de 60 s^{-1} . Par contre, la complexité des phénomènes étudiés et le peu de temps alloué pour les tests, n'ont pas permis l'élaboration d'un modèle prédictif pour la mise à l'échelle. Les tests effectués lors de ce projet ont donc servi à caractériser le nouveau système de culture grande échelle en isolant les

phénomènes et non à bâtir un modèle mathématique regroupant l'ensemble de ceux-ci. La méthode de mise à l'échelle se basant sur des rapports géométrique constant a été validé. Il est donc possible d'adapter cette méthode de mise à l'échelle pour des volume plus grand. Par contre, l'augmentation d'échelle implique une diminution de la vitesse d'agitation pour maintenir une vitesse de cisaillement acceptable. Il est possible d'augmenter l'entrefer pour permettre une agitation plus vigoureuse et conserver des conditions culture adéquates. D'autre travaux devront être entrepris pour connaître les limites d'une telle méthode de mise à l'échelle. Une étude sur la coalescence à grande échelle permettrait probablement de compléter le modèle de Fortier (2002) et prédire le comportement du transfert gazeux à des échelles supérieures. De plus, un système de cuve transparente muni de capteur optique et d'une lumière puissante permettrait l'étude de la qualité de la mise en suspension permettant ainsi l'élaboration d'un modèle mathématique fiable.

Enfin, toutes les dimensions résiduelles et les systèmes périphériques nécessaires au bon fonctionnement d'un bioréacteur de 150 L ont été identifiés et des schémas du design final ont été présentés permettant la rédaction d'un manuel de conception complet. Par contre, une validation en culture du nouveau système devra être effectuée pour vérifier ses performances.

BIBLIOGRAPHIE

AUBRY D. 1994. Développement et commande d'un bioprocédé de production de sanguinarine à partir de la culture en suspension de cellules de plantes, Mémoire de maîtrise, École Polytechnique de Montréal, Canada.

BIRD R.B., STEWART W.E, LIGHTFOOT E.N. 1960. *Transport Phenomena*. New York . Wiley

BOYER C., DUQUENNE A., WILD G. 2002. « Measuring techniques in gas-liquid and gas-liquid-solid reactors ». *Chemical engineering science*. 57:3185-3215.

BRITA-DE LA FUENTE E., CHOPLIN L., TANGUY P.A. 1996. « Mixing with helical ribbon impellers: effect of higly shear thinning behavior and impeller geometry ». *Trans IChemE*. 75:45-52.

BUBBICO R., DI CAVE S., MAZZAROTTA B. 1998. « Agitation Power for Solid-Liquid Suspensions Containing Large Particles ». *The Canadian Journal of Chemical Engineering*. 76:428-432.

BUCHHOLZ H., BUCHLOLZ R., LÜCKE J., ET SCHÜGERL K., 1978. « Bubble swarm behavior and gas absorption in non-newtonian fluids in sparged columns ». *Chemical Engineering Science*, 33 : 1061-1070.

CHAPMAN C.M., NIENOW A.W., COOKE M. ET MIDDLETON J.C. 1983. « Particle-Gaz-Liquid Mixing in Stirred Vessels Part III : Three Phase Mixing ». *Chem. Eng. Res. Des.* 61 : 167-181

DORAN, P.M. 1999. « Topical Paper - Design of Mixing Systems for Plant Cell Suspensions in Stirred Reactors ». *Biotechnology Progress*. 15: 3. 319-335.

ENFORS S.O.ET AL. 2001. « Physiological responses to mixing in large scale bioreactors ». *Journal of Biotechnology*. 85:175-185.

FISSET S. 2000. Étude de l'effet des gaz dissous sur la croissance de cellules végétales en bioréacteur, Mémoire de maîtrise, École Polytechnique de Montréal, Canada.

FORTIER D. 2002. Optimisation d'un bioréacteur de 5 L pour la culture de cellules de plantes en suspension, Mémoire de maîtrise, École Polytechnique de Montréal, Canada.

GUELL C. ET GIRALT J. 1994. « Determination of KLa Values Using CO₂ Mass Balance Technique in a Coal Desulfurization Bioreactor ». *I and EC Research*. 33: 4. 950-956.

JOHNSTONE, EDGEWORTH R. 1957. *Pilot plants, models, and scale-up methods in chemical engineering* . New York, Toronto : McGraw-Hill.

JOLICOEUR, M., CHAVARIE C., CARREAU, P.J., ARCHAMBAULT, J. 1992. « Development of a helical-ribbon impeller bioreactor for high-density plant cell suspension culture ». *Biotechnology and Bioengineering*. 39:511-521.

KAMEN A., GARNIER A., ANDRÉ G., ARCHAMBAULT J. ET CHAVARIE C. 1993. « Determination of mass transfer parameters in surface aerated bioreactors with bubble entrainment », *Mass Transfer Parameters in Surface Aerated Bioreactors*.

KATO A., KAWAZOK S. et SOH Y. « Viscosity of broth of tobacco cells in suspension culture ». *J. Ferment. Technol.*, 56: 3. 224-228.

KIM D.I., CHO G.H., PEDERSEN H., et CHIN C.K. 1991. « A hybrid bioreactor for high density cultivation of plant cell suspensions ». *Applied Microb. Biotechnology*. 34 : 726-729.

KRAUME M., ZENHER P. 2001. « Experience with experimental standards for measurements of various parameters in stirred tanks : a comparative test ». 79 : A. 811-818

LENG, D.E. 1991. « Succeed at scale up ». *Chemical Engineering Process*. June: 23-31.

L'ÉCUYER-COHELO H. 2000. Développement d'un procédé pour la culture de cellules végétales à haute concentration, Mémoire de maîtrise, École Polytechnique de Montréal, Canada.

MAVITUNA F. 1996. « Strategies for Bioreactor Scale-up ». *NATO ASI Series E Applied Sciences - Advanced Study Institute*. 305: . 125-142.

METZNER A.B., OTTO R.E., 1957. « Agitation of non-newtonian fluids ». *AIChE journal*. 3: 1. 3-10.

MONTANTE G., MICALE G., MGELLI F., BRUCATO A. 2001. « Experiment and CFD predictions of solid particles distribution in a vessel agitated with four pitched blade turbines ». *Trans IChemE*. 79:A. 1005-1010.

OZKAN O., CALIMLI A., BERBER R., OGUZ H. 1999. « Effect of inert solid particles at low concentrations on gas-liquid mass transfert in mechanically agitated reactors ». *Chemical engineering Science*. 55:2737-2740.

PRAKASH A. ET BRIENS C.L. 1990 « Porous gas distributor in bubble columns. Effect of liquid presence on distributor pressure drop. Effect of start-up procedure on distributor performance ». *Canadian Journal of Chemical Eng*. 68: 204-210.

- PINELLI D., BUJALSKI W., NIENOW A.W., MAGELLI F. 2001. « Comparison of expérimental techniques for the mesurement of mixing time in gas-liquid systems ». *Chemical engineering technolgy*. 24:
- REISMAN H.B. 1993. « Problems in Scale-up of Biotechnology Production Processes ». *Critical Reviews in Biotechnology*. 13:3. 195-254.
- SIE S.T. & KRISHNA R. 1998. « Process Development and Scale up: 1. Process Development Strategy and Methodology ». , *Reviews in Chemical Engineering*. 14: 1. 47-88.
- SHULER M. L., KARGI F. 1992. *Bioprocess Engineering Basic Concepts*. New Jersey : Prentice Hall.
- SIROIS J. 1997. Modélisation et optimisation en continu d'un procédé de culture de cellules végétales, Mémoire de maîtrise, École Polytechnique de Montréal, Canada..
- SU, W.W. 1995. « Bioprocessing Technology for Plant Cell Suspension Cultures: Patents and Literature Review ». *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A - Enzyme Engineering and Biotechnology*. 50: 2.
- Conception des opérations d'agitation et de mélange, Notes de cours, 2002.
- TANAKA H. 1982. « Some properties of pseudocells of plants cells ». *Biotechnology and bioengineering*. 24: 2591-2596 .
- TANAKA, H. 2000. « Technological problems in cultivation of plant cells at high density ». *Biotechnol Bioeng*. 67:6. 775-90.

- THORPE R.B., STEVENSON P. 2003. « Suspension of Particles from the Bottom of Pipes And Stirred Tanks by gassed and Ungassed Flows ». *Canadian Journal of Chemical Engineering*. 81:3-4. 353-359.
- TRAMBOUZE, P. 1990. « Reactor Scaleup Methodology ». *Chemical Engineering Progress*. 86: 2. 23-31.
- TSE K., MARTIN T., MCFARLEANE C.M., NIENOW A.W. 1998. « Visualisation of bubble coalescence in a coalescence cell, a stirred tank and a bubble column ». *Chemical Engineering Science*. 53:23. 4031-4036.
- UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA. SCHOOL OF CHEMICAL ENGINEERING. 1958. *Scale-up in practice*. New York : Reinhold.
- WAGNER F. , NOGELMANN H. 1977. « Cultivation of plant tissue culture in bioreactor and formation of secondary metabolites ». *Plant tissue culture and its biotechnological application*. 245-252 .
- WILLIAMS, R.D., BÉDARD, C., CHAVARIE, C., ARCHAMBAULT, J. 1996. « Production of sanguinarine by elicited plant cell culture II. Further nutritional aspects ». *Journal of Biotechnology*. 46:107-120.
- WORSTELL H.J. 2000. « Succeed at Reactor Scale-Up ». *Chemical Engineering Progress*. 96:6 . 55-60.
- ZHONG J.-J., YU J.-T., YOSHIDA T. 1995. « Recent advances in plant cell cultures in bioreactors ». *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 11:4. 461-467.
- ZWIETERING N. 1958. « Suspending of solid particles in liquid by agitators ». *Chemical Engineering Science*. 8:244-253.

ANNEXES

ANNEXE A : Dimensions des bioréacteurs

Tableau A.1 : Dimensions des bioréacteurs

| Dimension | Unité | Bio. 3 L | Bio. 5 L | Bio. 40 L | Bio. 150 L |
|-------------------------------|-------|----------|----------|-----------|------------|
| Diamètre du réservoir(D) | mm | 130 | 150 | 350 | 457 |
| Hauteur de liquide (H) | mm | 234 | 280 | 415 | 914 |
| Rapport (H/D) | | 1.8 | 1.9 | 1.2 | 2.1 |
| Volume de liquide | L | 3 | 5 | 40 | 150 |
| Hauteur d'agitation (H_a) | mm | 159 | 240 | 350 | 787 |
| Rapport (H_a/H) | | 0.68 | 0.85 | 0.85 | 0.86 |
| Diamètre de l'hélice (d) | mm | 114 | 133 | 310 | 400 |
| Rapport d/D | | 0.87 | 0.90 | 0.90 | 0.88 |
| Largeur de pale (W) | mm | 25 | 30 | 65 | 89 |
| Rapport W/d | | 0.19 | 0.21 | 0.21 | 0.22 |
| Pas (p) | mm | 159 | 200 | 470 | 610 |
| Rapport p/d | | 1.39 | 1.52 | 1.52 | 1.52 |
| Nombre tours | | 1.1 | 1.2 | 0.72 | 1.33 |

ANNEXE B : Plans et montages expérimentaux

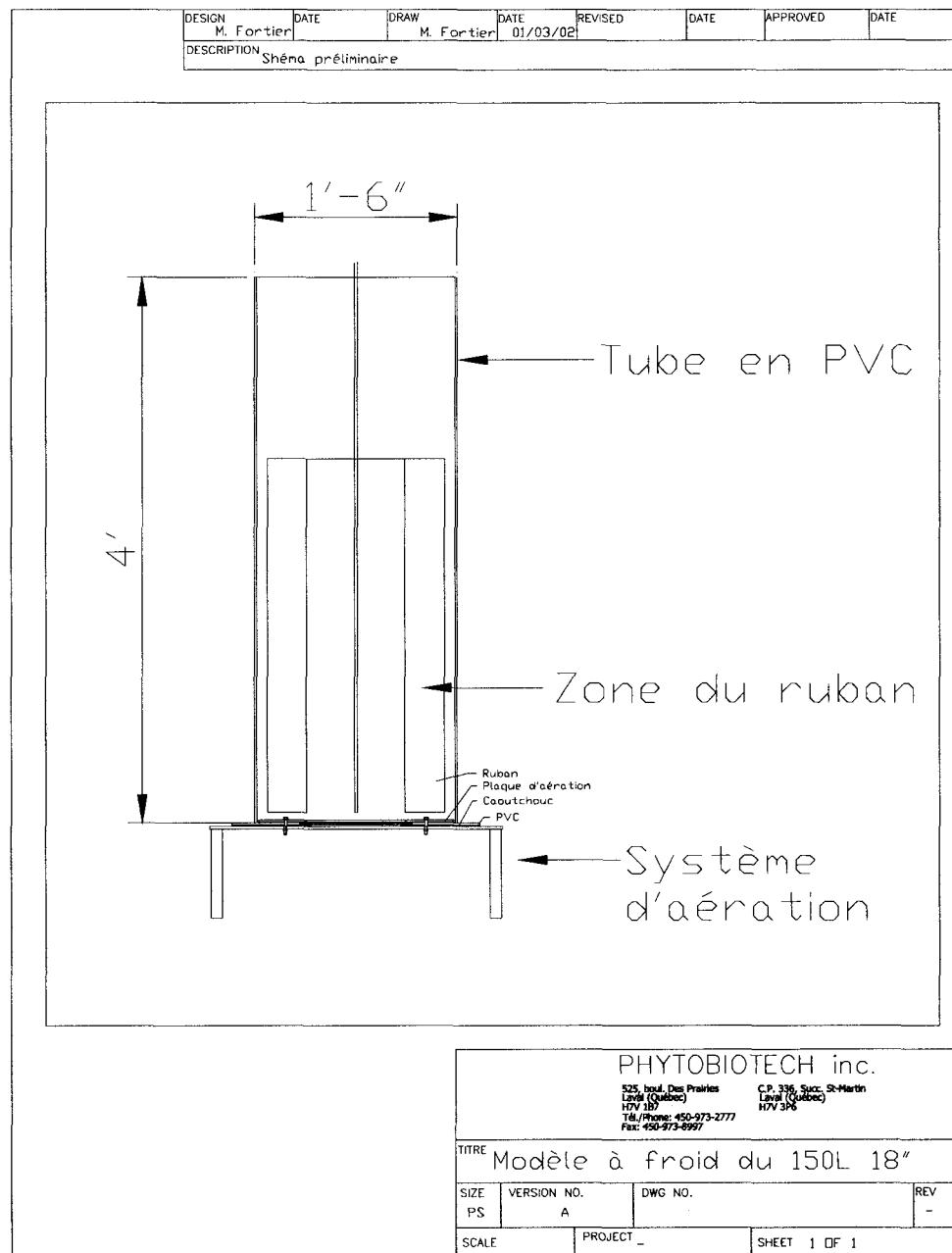


Figure B.1 : Modèle à froid H/D = 2

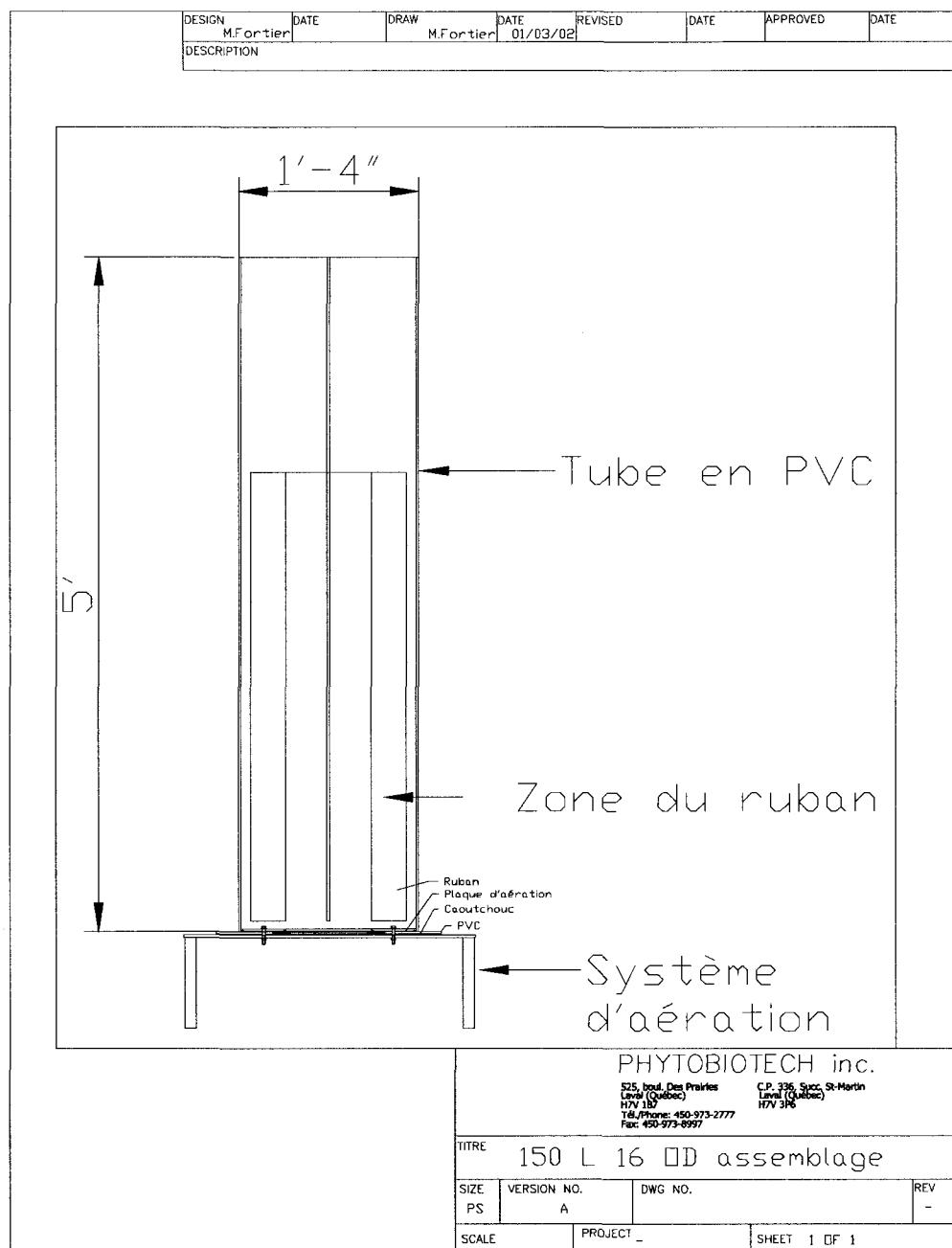


Figure B.2 : Modèle à froid H/D = 3

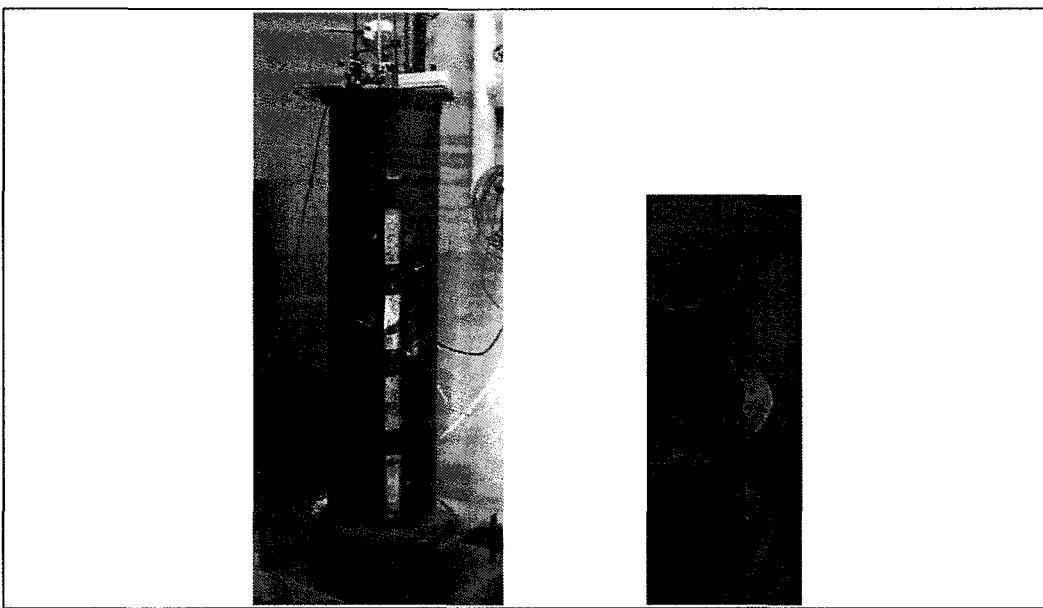


Figure B.2 : Modèle à froid $H/D = 3$ avec hélice $p/d = 1.5$

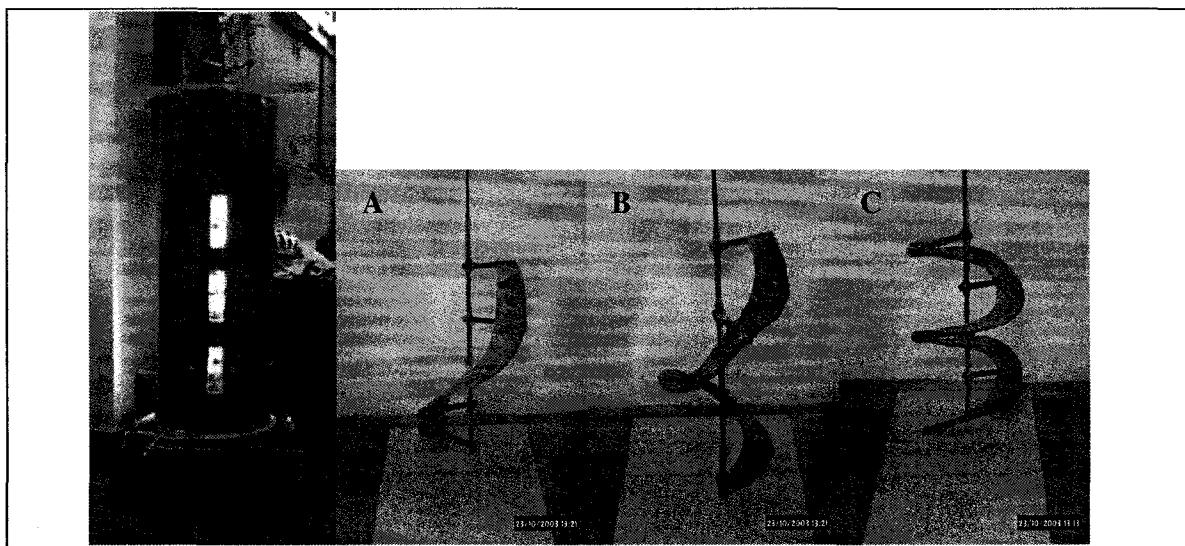


Figure B.4 : Modèle à froid $H/D = 2$ avec hélice
(A) $p/d = 2$; (B) $p/d = 1.5$; (C) $p/d = 1$.

ANNEXE C : Temps de mélange

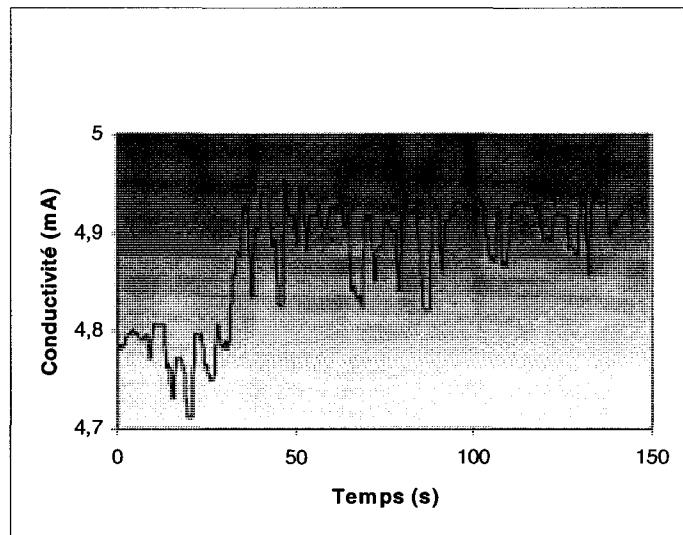


Figure C.1 : Temps de mélange sans treillis autour de la sonde

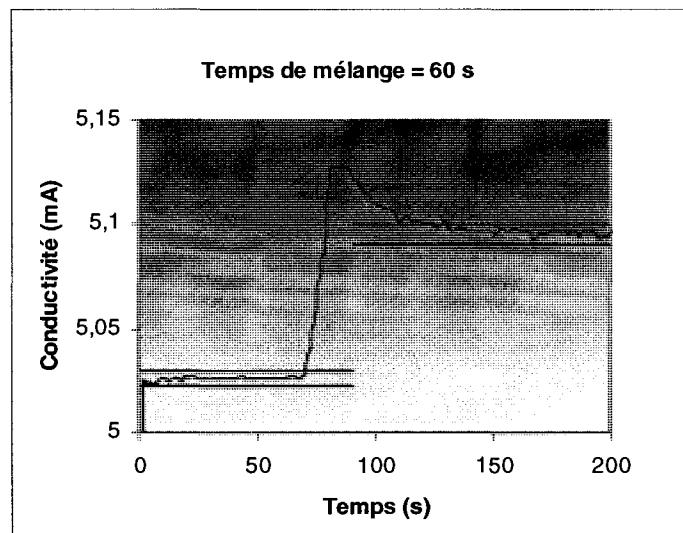


Figure C.2 : Temps de mélange avec treillis autour de la sonde

Le temps de mélange est déterminé lorsque l'oscillation de la conductivité ne dépasse pas 10 % de l'augmentation totale de conductivité.

ANNEXE D : Mise en suspension dans un bioréacteur de 5 L

Objectif :

Déterminer la vitesse minimale de mise en suspension totale et homogène.

Description sommaire :

Réacteur opaque muni d'une plaque d'aération ainsi que d'un moteur rotatif à vitesse variable relié à un ruban hélicoïdal.

Description détaillée :

Un tube de verre de 152 mm de diamètre interne et de 457mm de hauteur est retenu par des brides à une plaque d'aération et à un support métallique. Un joint d'étanchéité empêche les fuites au bas de la colonne. Un tube d'alimentation d'air est situé sous le support métallique. Le couvercle est muni d'un joint mécanique permettant de faire la jonction entre le moteur et le ruban hélicoïdal. Du papier d'aluminium est placé autour du tube de verre pour rendre le système opaque. Deux fenêtres en vis-à-vis sont aménagées dans le papier opaque pour permettre à la lumière d'un néon de passer à travers la suspension.

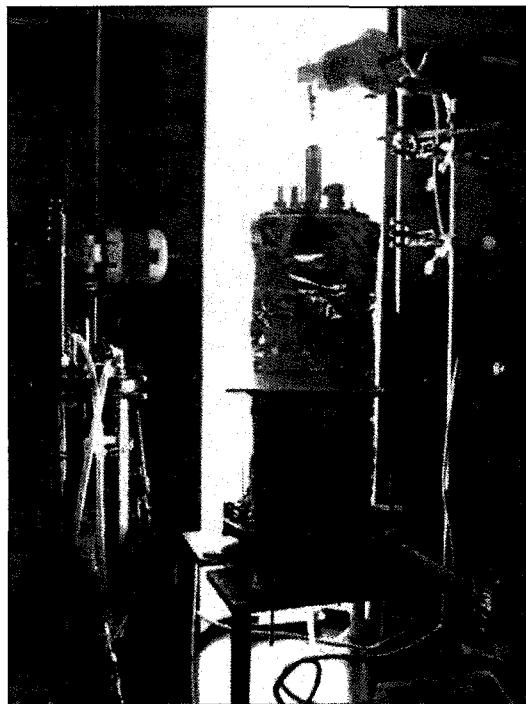


Figure D.2 : Montage

Principe :

À l'aide de ce système un observateur peut prendre des photos d'une suspension de résine à différentes conditions d'opération. Ceci permet d'observer la répartition des grains de résine en fonction de la hauteur et de faire une analyse numérique de l'intensité lumineuse.

Code MATLAB pour l'analyse de l'image:

```

clear

Fig_name='c:\temp\RPM min\résinerouge\photo4avril\21rpmcrop.jpg';

[full_image] = imread(Fig_name);
mat_rgb = imread(Fig_name);           %Matrice 3D (hauteur, largeur, (rouge vert ou bleu))

%INFO ABOUT PICTURE
info = imfinfo(Fig_name);
size_x = info.Width;
size_y = info.Height;
for j=1:size_x                         %vecteur x
    x(j,1)=j;
end
for i=1:size_y                         %vecteur y
    y(i,1)=i;
end
for k=1:3
    for j=1:size_x
        for i=1:size_y
            mat_rgb_d(i,j,k)=double(mat_rgb(i,j,k));
        end
    end
end

%ANALYSE 2D DES TROIS SPECTRES
for k=1:3
    for j=1:size_x                     %Création des courbes du HAUT vers le BAS (1 = luminosité la plus élevée du spectre)
        crbs(j,k)=0;
        for i=1:size_y                 %sommation en y
            crbs(j,k)=plus(crbs(j,k),mat_rgb_d(i,j,k));
        end
    end
    for j=1:size_x
        %SUM RGB
        crbs(j,4)=crbs(j,1)+crbs(j,2)+crbs(j,3);
        %SUM RG
        crbs(j,5)=crbs(j,1)+crbs(j,2);
    end
    %Normalisation
    for k=1:5
        crbs_n(:,k)=crbs(:,k)/max(crbs(:,k));
    end
    %Boucle 5-10-15
    saut=5;
    nbcass=0;

```

```

for nb_seg=5:saut:15
    clear length_slope vect_red vect_green vect_blue vect_redgreen slopes xdelta
delta_slopes
%ANALYSE DES PENTES
%Divise la longeur par nb_seg pentes
length_slope=floor(size_x/nb_seg);

for i=1:nb_seg
    for m=1:length_slope %analyse de la pente
        vect_red(m,:,:,i)=[m crbs_n(((i-1)*length_slope)+m,1)]; %construction du
vecteur de la pente Rouge
        vect_green(m,:,:,i)=[m crbs_n(((i-1)*length_slope)+m,2)]; %construction du
vecteur de la pente Verte
        vect_blue(m,:,:,i)=[m crbs_n(((i-1)*length_slope)+m,3)]; %construction du
vecteur de la pente Bleu
        vect_redgreen(m,:,:,i)=[m crbs_n(((i-1)*length_slope)+m,5)]; %construction du
vecteur de la pente Bleu
    end
    slopes(i,:,:,1)=[((i-1)*length_slope)+(length_slope/2)
mean(gradient(vect_red(:,:,2,i)))]; % pentes Rouge
    slopes(i,:,:,2)=[((i-1)*length_slope)+(length_slope/2)
mean(gradient(vect_green(:,:,2,i)))]; % pentes Verte
    slopes(i,:,:,3)=[((i-1)*length_slope)+(length_slope/2)
mean(gradient(vect_blue(:,:,2,i)))]; % pentes Bleu
    end
    % % de variation pr la précédente
    for k=1:3
        for i=2:nb_seg
            xdelta(i-1,1)=slopes(i,1,1);
            delta_slopes(i-1,1,k)=100*abs((slopes(i,2,k)-slopes(i-1,2,k))/slopes(i-
1,2,k));
            if delta_slopes(i-1,1,k)>700
                nbcass=nbcass+1;
                cassure(nbcass,:)=[nbcass nb_seg i xdelta(i-1,1) ];
            end
        end
    end
end

%FILTRATION DES PENTES SIGNIFICATIVES

%PLOTS
figure(1+nb_seg);

subplot(2,2,1);image(full_image);title('Photo');text(20,0.5*size(mat_rgb_d,2),'Haut')
;text(size(mat_rgb_d,2)-50,0.5*size(mat_rgb_d,2),'Bas');
    subplot(2,2,3);
        plot(x,crbs(:,:,1)/max(crbs(:,:,1)), 'r-',x,crbs(:,:,2)/max(crbs(:,:,2)), 'g-
',x,crbs(:,:,3)/max(crbs(:,:,3)), 'b-');axis([0 max(size_x) 0 1]);
        legend('Red', 'Green', 'Blue',3);
    subplot(3,2,2),mesh(x,y,mat_rgb_d(:,:,1)),title('Red');%legend('Red',0);
    subplot(3,2,4),mesh(x,y,mat_rgb_d(:,:,2)),title('Green');%legend('Green',0);
    subplot(3,2,6),mesh(x,y,mat_rgb_d(:,:,3)),title('Blue');%legend('Blue',0);

    figure(2+nb_seg);

subplot(2,2,1);image(full_image);title('Photo');text(20,70,'Haut');text(420,70,'Bas'
);
    subplot(2,2,3);
        plot(x,crbs(:,:,1)/max(crbs(:,:,1)), 'r-',x,crbs(:,:,2)/max(crbs(:,:,2)), 'g-
',x,crbs(:,:,3)/max(crbs(:,:,3)), 'b-');axis([0 max(size_x) 0 1]);
        legend('Red', 'Green', 'Blue',3);
        subplot(2,2,2),bar(slopes(:,:,1,1),[slopes(:,:,2,1) slopes(:,:,2,2)
slopes(:,:,2,3)]),title('Local gradient');
        colormap([1 0 0;0 1 0; 0 0 1]);
    subplot(2,2,4);

```

```

plot(xdelta,delta_slopes(:,1,1),'rs',xdelta,delta_slopes(:,1,2),'gs',xdelta,delta_slopes(:,1,3),'bs'),title('% variation de la pente locale');
end

cassure;
%LOCALISATION DE LA CASSURE

A=size(cassure);
j=1;
k=1;
l=1;

% Initialisation des matrices 5:10:15
cassure_5=[];
cassure_10=[];
cassure_15 [];

%Classement des résultats par sectionnement 5:10:15

for i=1:size(cassure,1)
    if cassure(i,2)==5
        cassure_5(j,:)=[cassure(i,:)];
        j=j+1;
    end
    if cassure(i,2)==10
        cassure_10(k,:)=[cassure(i,:)];
        k=k+1;
    end
    if cassure(i,2)==15
        cassure_15(l,:)=[cassure(i,:)];
        l=l+1;
    end
end

cassure_5;
cassure_10;
cassure_15;

%COMPARAISON DES RÉSULTATS POUR 5:10:15 SECTION ET DÉTERMINATION DES CASSURES
%RÉCURENTES

REPONSE=0;
ECART=[];
for i=1:size(cassure_5,1)
    for j=1:size(cassure_10,1)
        rapport = abs(cassure_5(i,4)-cassure_10(j,4))/(size_x/cassure_5(i,2))*100;
        if rapport< 30
            REPONSE=1; % Il ya une cassure à cet endroit
        else
            REPONSE=0; % Il n'y a pas de cassure à cet endroit
        end
        ECART(j,:)=[(cassure_5(i,4)+cassure_10(j,4))/2 rapport REPONSE ];
    end
    for k=1:size(cassure_15,1)
        rapport = abs(cassure_5(i,4)-cassure_15(k,4))/(size_x/cassure_5(i,2))*100;
        if rapport< 30
            REPONSE=1; % Il ya une cassure à cet endroit
        else
            REPONSE=0; % Il n'y a pas de cassure à cet endroit
        end
        ECART((size(ECART,1))+1,:)=[(cassure_5(i,4)+cassure_15(k,4))/2 rapport REPONSE ];
    end
end
for i=1:size(cassure_10,1)
    for k=1:size(cassure_15,1)
        rapport = abs(cassure_10(i,4)-cassure_15(k,4))/(size_x/cassure_10(i,2))*100;
        if rapport< 55
            REPONSE=1; % Il ya une cassure à cet endroit
        end
    end
end

```

```

    else
        REPONSE=0; %0 = Il n'y a pas de cassure à cet endroit
    end

    ECART((size(ECART,1))+1,:)=[(cassure_10(i,4)+cassure_15(k,4))/2 rapport
REPONSE ];
    end
end
ECART;

for i=1:size(ECART,1)
    if ECART(i,3)==1
        for nb_seg=5:saut:15

            figure(1+nb_seg);
            subplot(2,2,3)
            hold on
            plot([ECART(i,1) ECART(i,1)], [0 1], 'k-')
            hold off

            figure(2+nb_seg);
            subplot(2,2,3)
            hold on
            plot([ECART(i,1) ECART(i,1)], [0 1], 'k-')
            hold off
        end
    end
end

%DÉTERMINATION DE LA DIFFÉRENCE DE LUMINOSITÉ DE CHAQUE COULEUR rouge,vert et bleu

    DELTA=[];
for j=1:3
    haut=0;
    for i=1:10
        haut=haut+crbs(i,j);
    end
    moyhaut=haut/10;

    bas=0;
    for i=1:10
        bas=bas+crbs(size(crbs,1)-i,j);
    end
    moybas=bas/10;
    if j==1
        couleur=1;%'rouge';
    end
    if j==2
        couleur=2;%'vert';
    end
    if j==3
        couleur=3;%'bleu';
    end
    DELTA(j,:)= [couleur moybas/moyhaut];
end
DELTA
Rouge=1
Vert=2
bleu=3
Pointfinalrouge=crbs(size_x,1)/max(crbs(:,1))
Valeur=crbs(size_x,1)

```

Observations et limites :

Lorsque la quantité de lumière passant à travers la suspension est homogène en fonction de la hauteur visible (le montage ne permet pas de voir le bas de la

colonne), la concentration de résine est considérée uniforme dans la zone photographiée. Cependant, ces images ne donnent aucune information sur la complétion de la mise en suspension. C'est-à-dire que même s'il y a une distribution uniforme de la résine sur la hauteur, ce n'est pas toute la résine qui est en suspension. Il reste toujours de la résine dans le fond de la cuve.

Résultats :

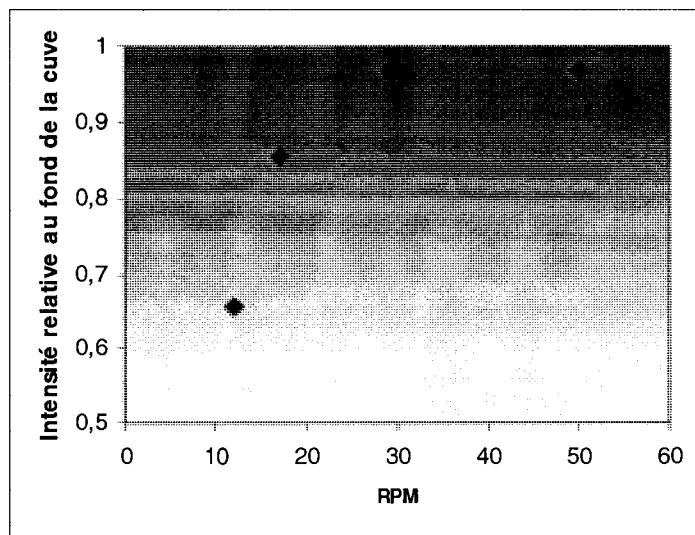


Figure D.1 : Vitesse de mise en suspension uniforme

La mise en suspension totale devrait aussi être étudiée. Une méthode, développée par Zwietering (1958), consiste à mesurer la vitesse de rotation pour un temps de résidence des grains au fond de la cuve de 1-2 sec. Pour des systèmes où les particules sont lourdes, le critère de mise en suspension totale peut être atteint avant le critère de mise en suspension uniforme. L'inverse peut se produire avec des particules plus légères. La Figure D.2 présente le montage à exécuter pour étudier la mise en suspension totale dans des réacteurs à petite ou grande échelle :

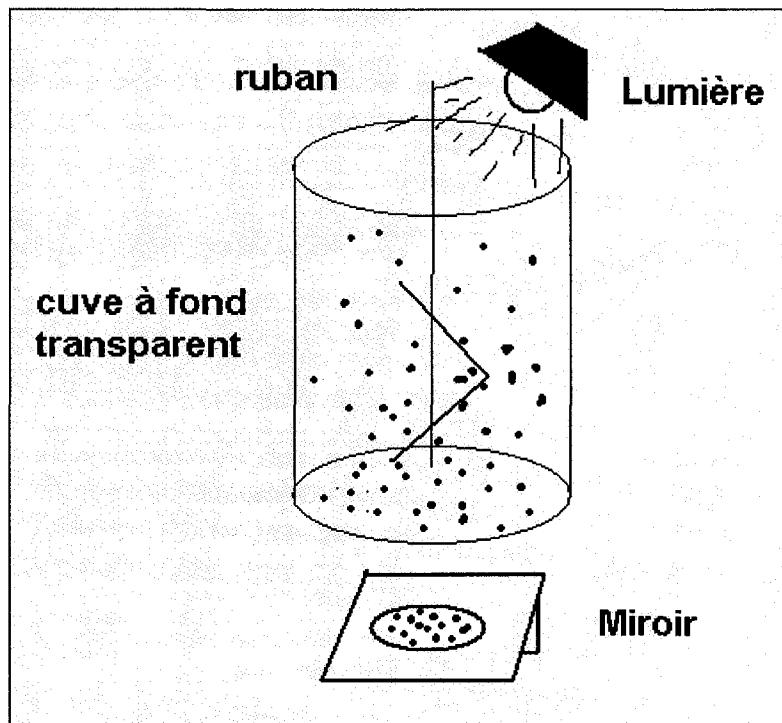


Figure D.2 : Détermination du RPM de mise en suspension totale

ANNEXE E : Suivi des cultures

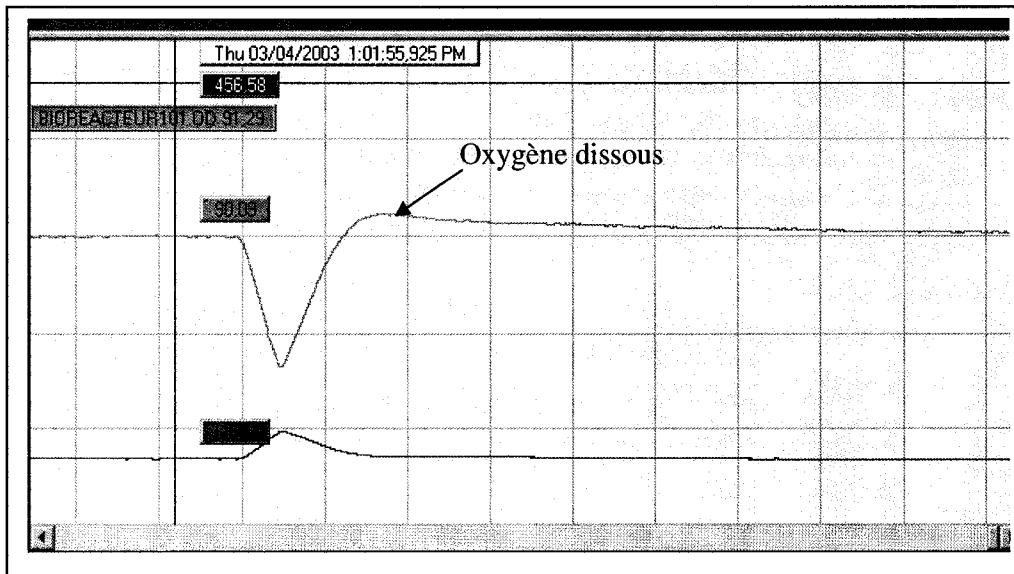


Figure E.1 : Coupure de l'aération

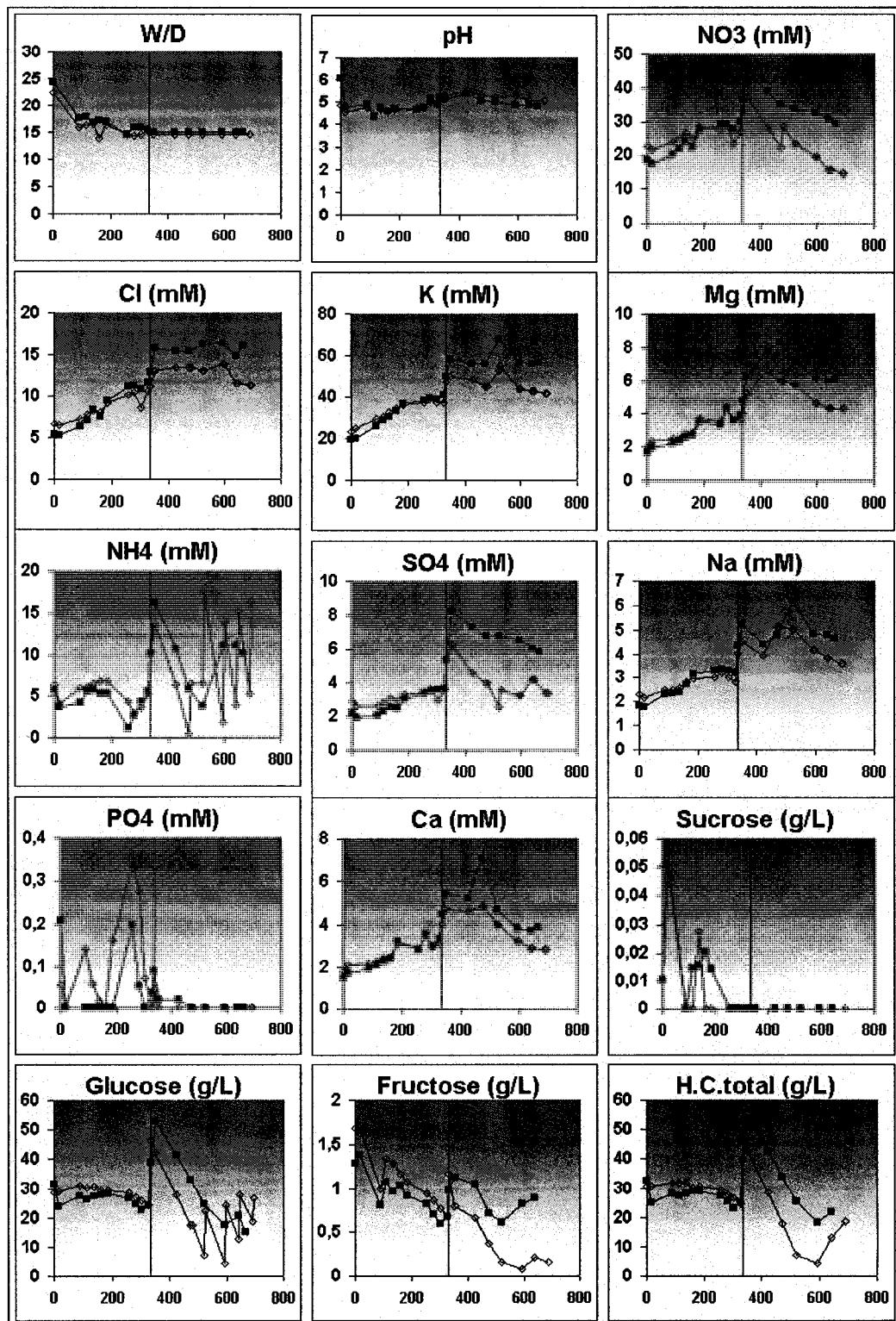


Figure E.2 : Nutriments extracellulaires pour l'espèce A vs heures de culture
 (◊) bioréacteur de 3 L; (■) bioréacteur de 40 L

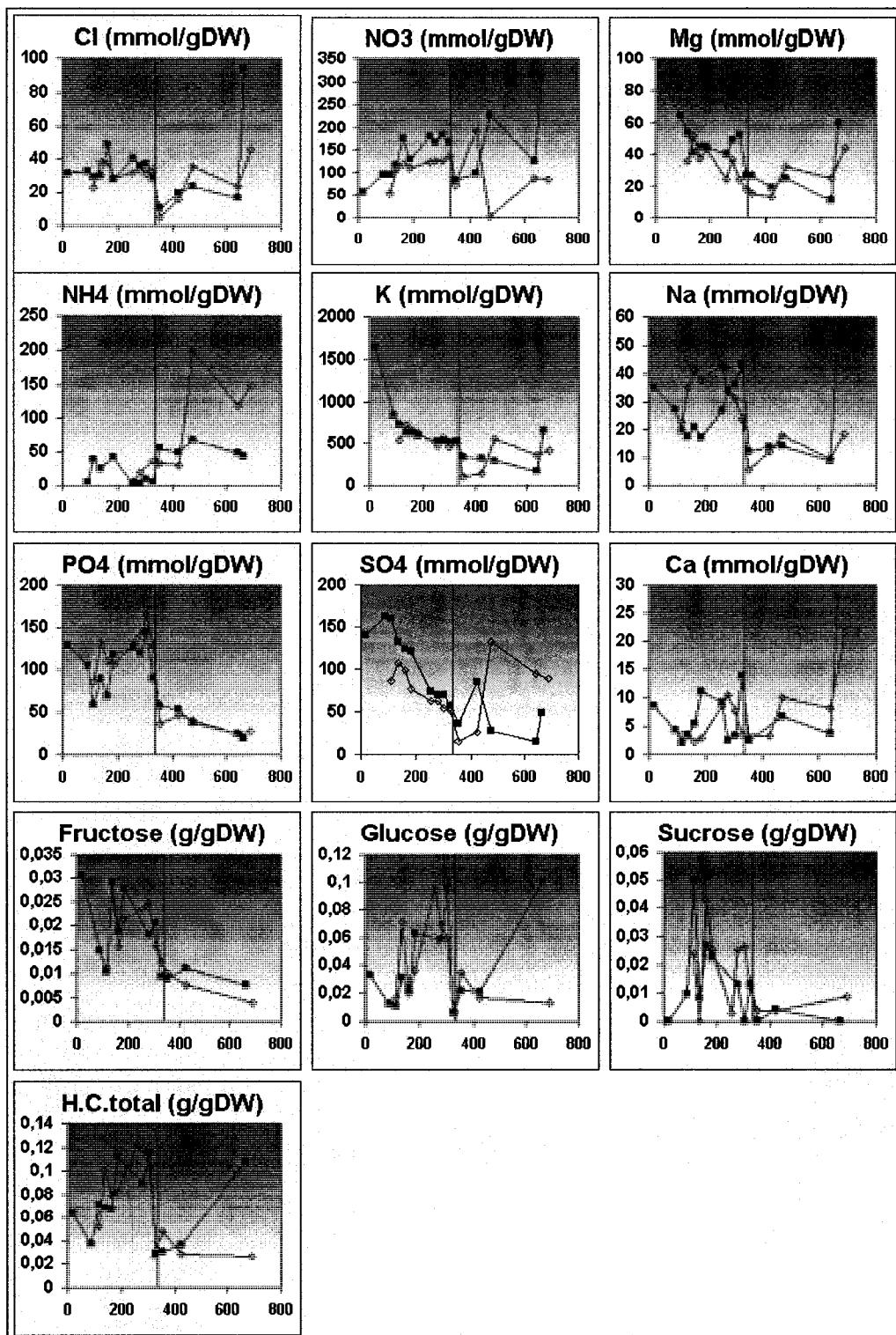


Figure E.3 : Nutriments intracellulaires pour l'espèce A vs heures de culture
 (◊) bioréacteur de 3 L; (■) bioréacteur de 40 L

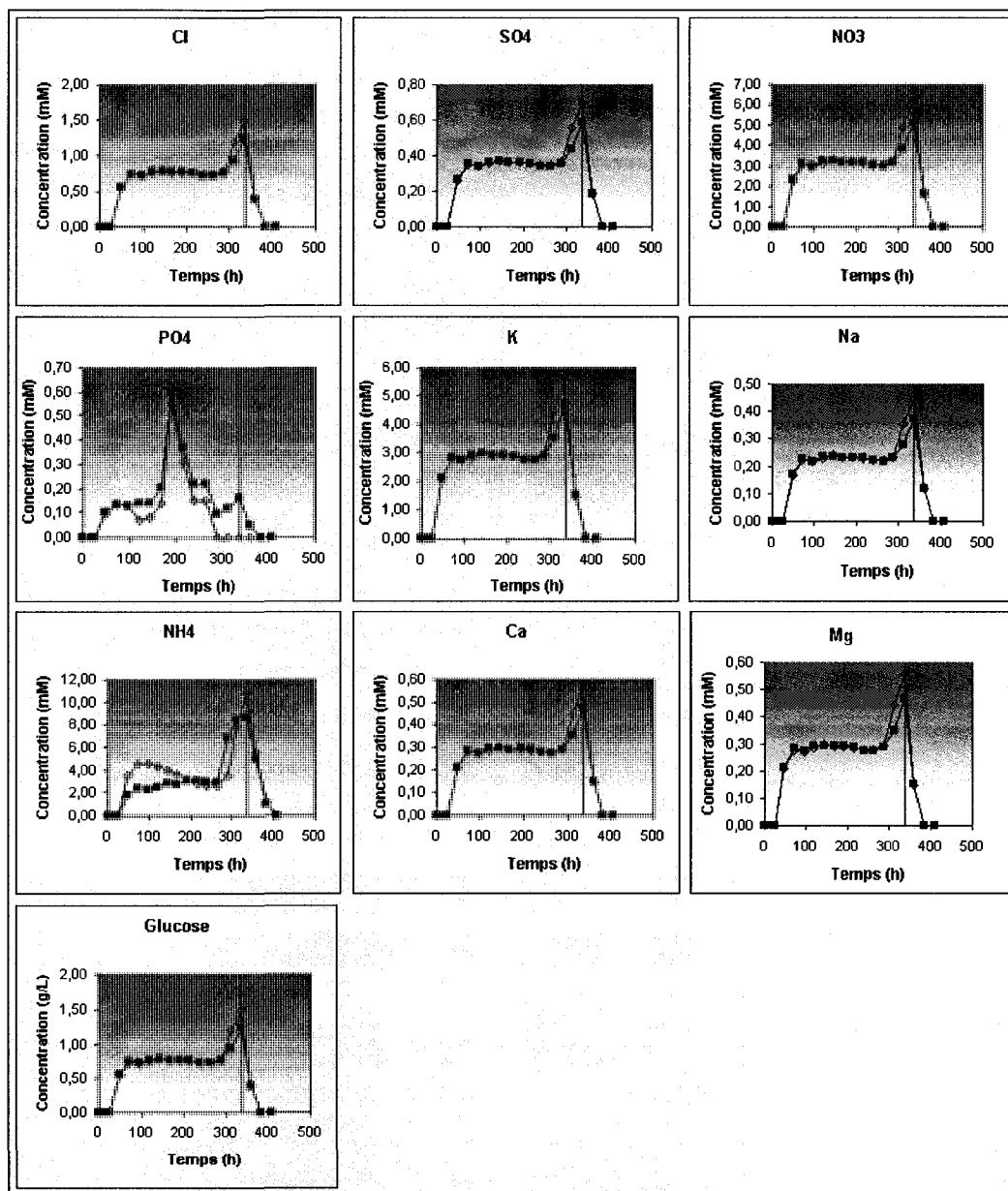


Figure E.4 : Ajouts quotidiens pour l'espèce A
 (◊) bioréacteur de 3 L; (■) bioréacteur de 40 L

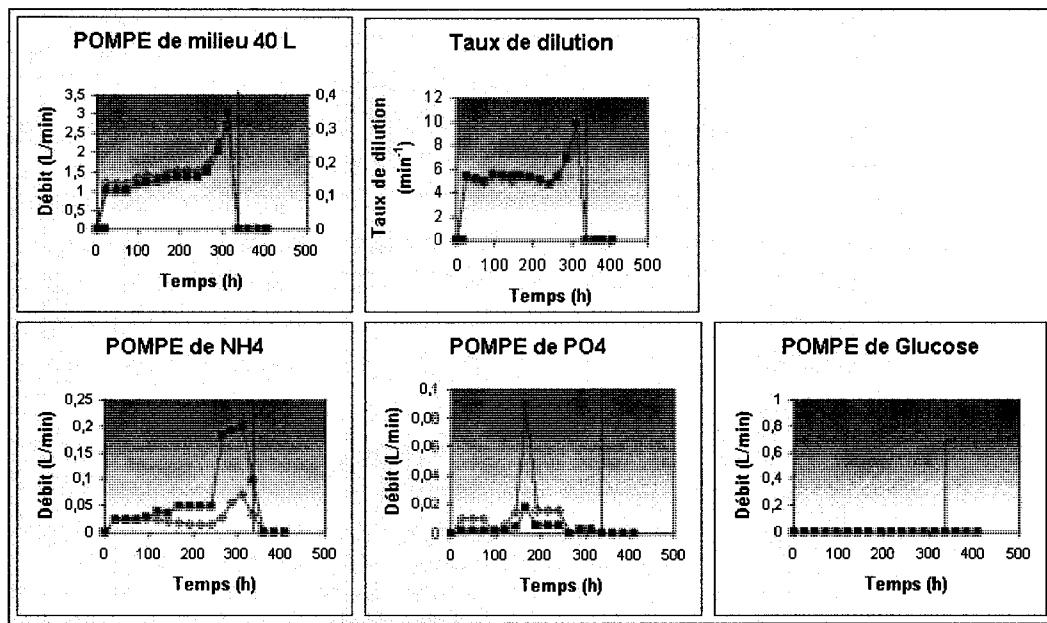


Figure E.5 : Débit des pompes pour l'espèce A

(◊) bioréacteur de 3 L; (■) bioréacteur de 40 L

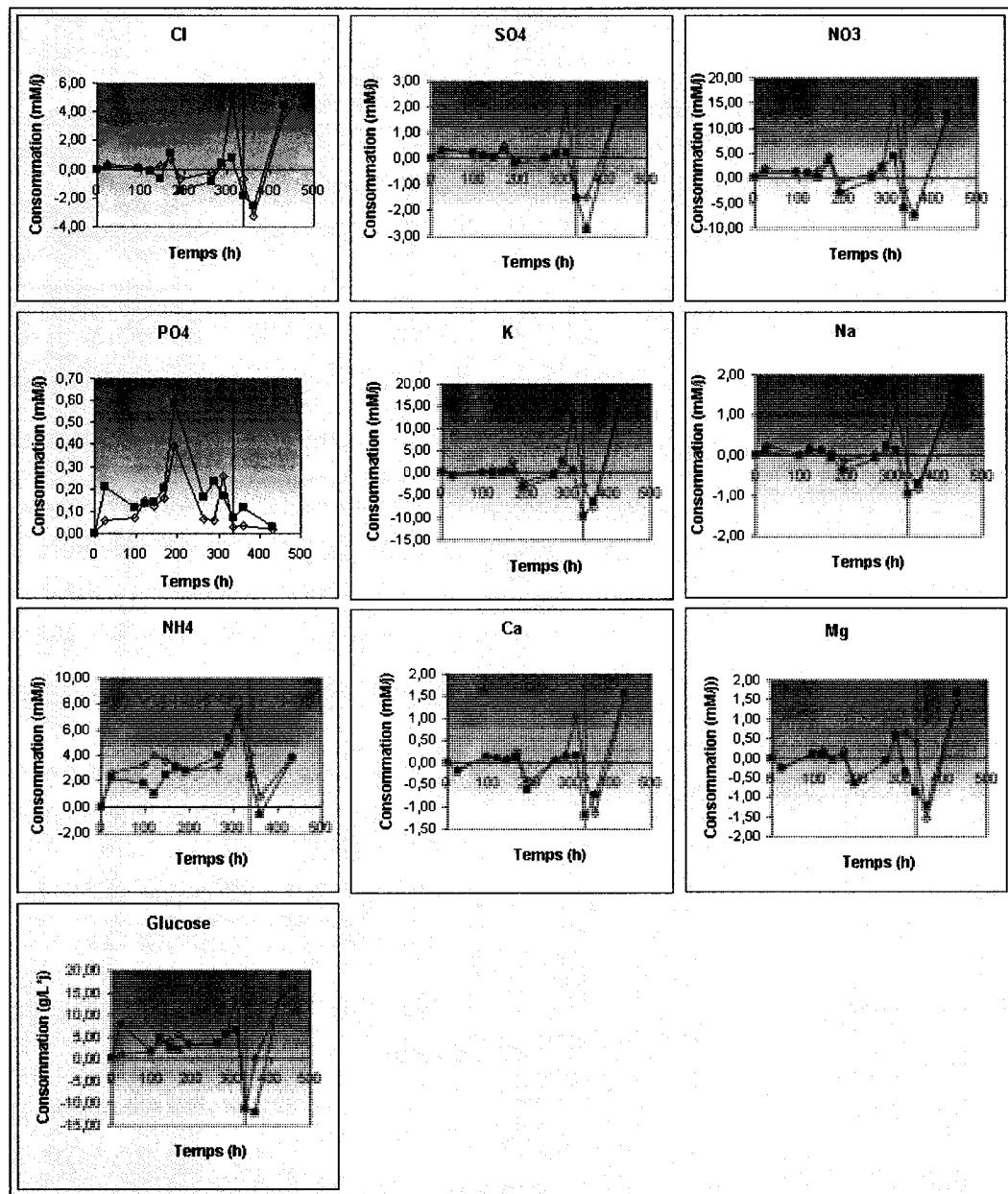


Figure E.6 : Vitesse de consommation des nutriments pour l'espèce A

(◊) bioréacteur de 3 L; (■) bioréacteur de 40 L

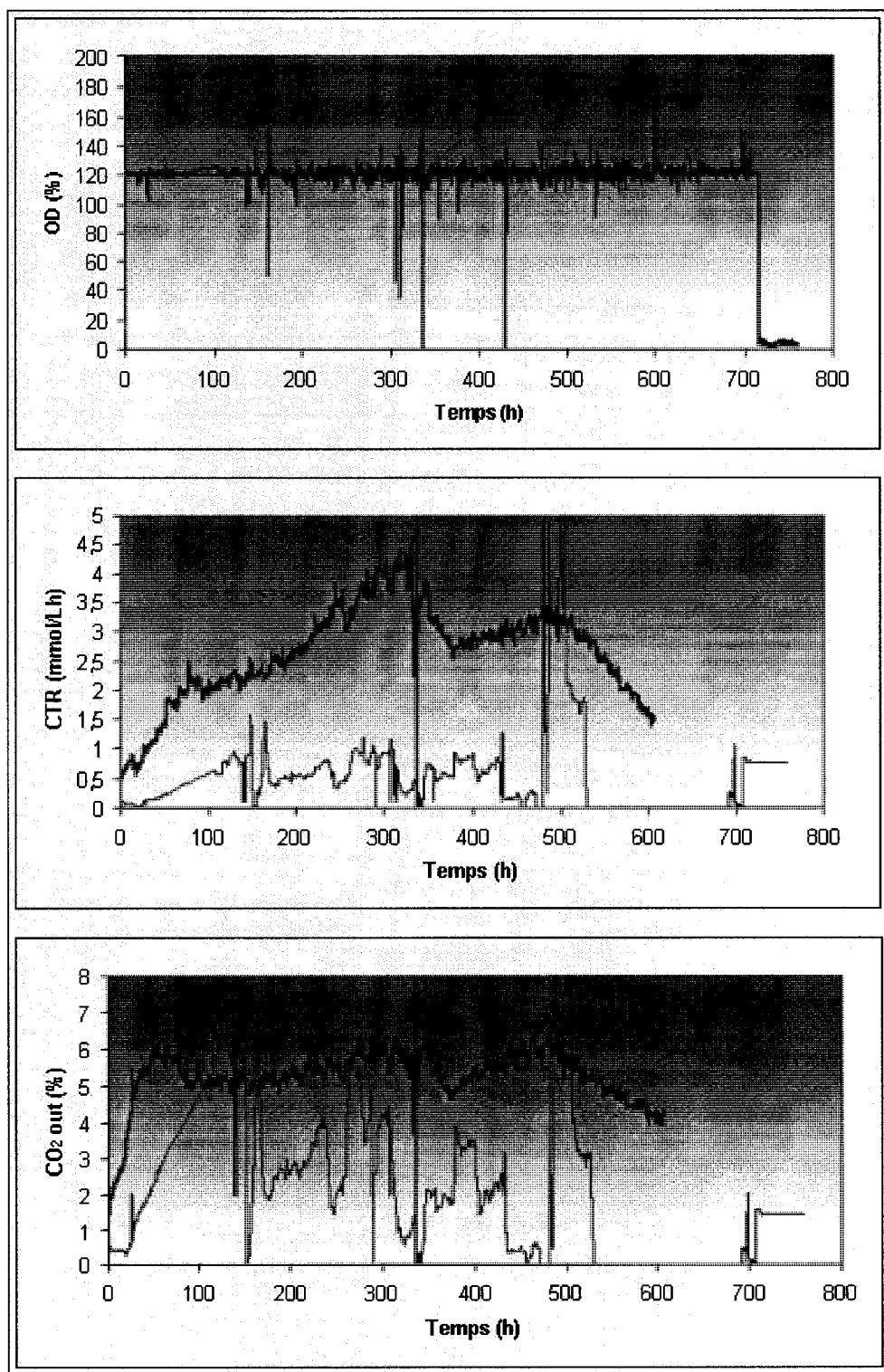


Figure E.7 : Acquisition de données pour l'espèce A

(—) bioréacteur de 3 L; (—) bioréacteur de 40 L

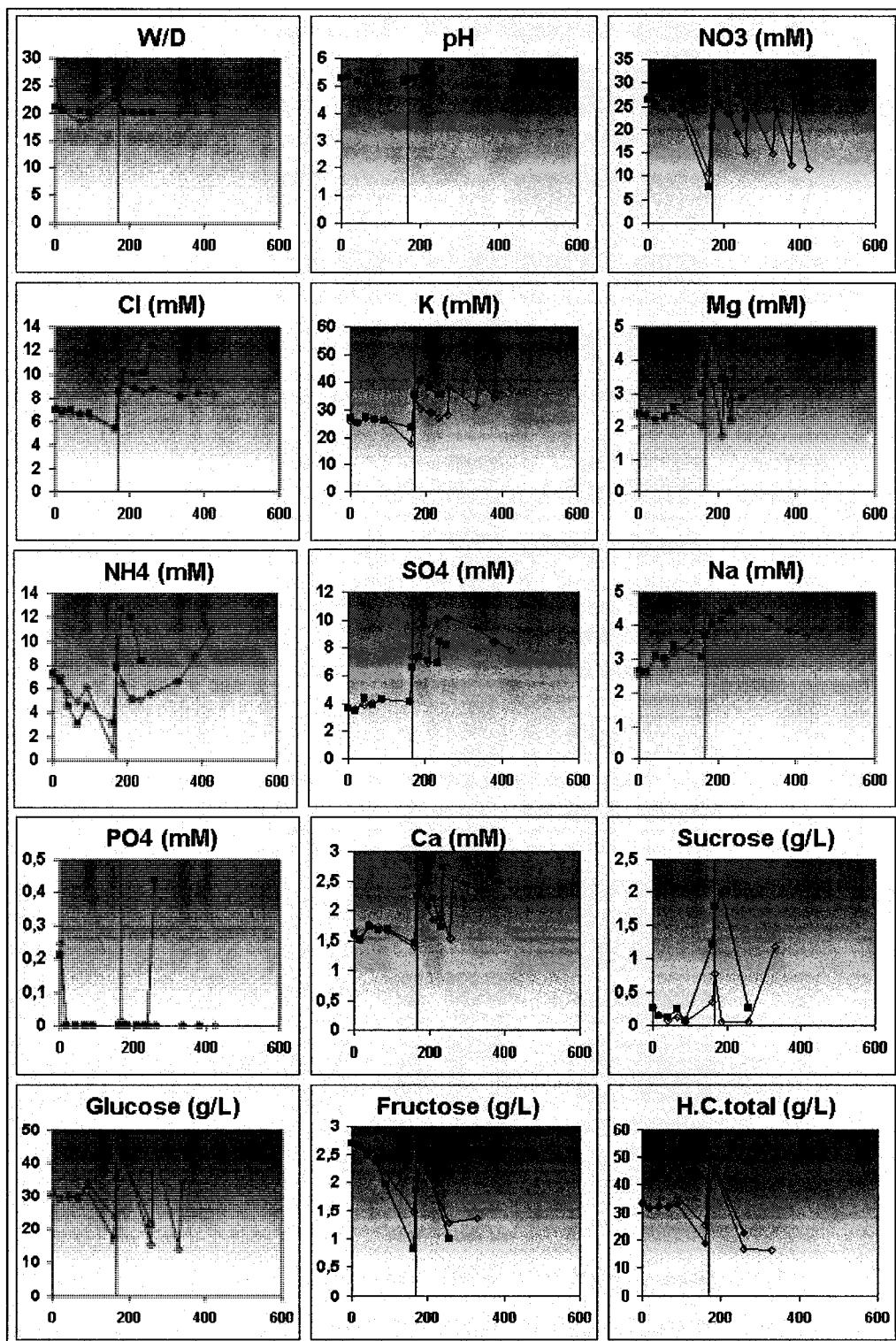


Figure E.8 : Nutriments extracellulaires pour l'espèce B vs heures de culture

(◊) bioréacteur de 3 L; (■) bioréacteur de 40 L

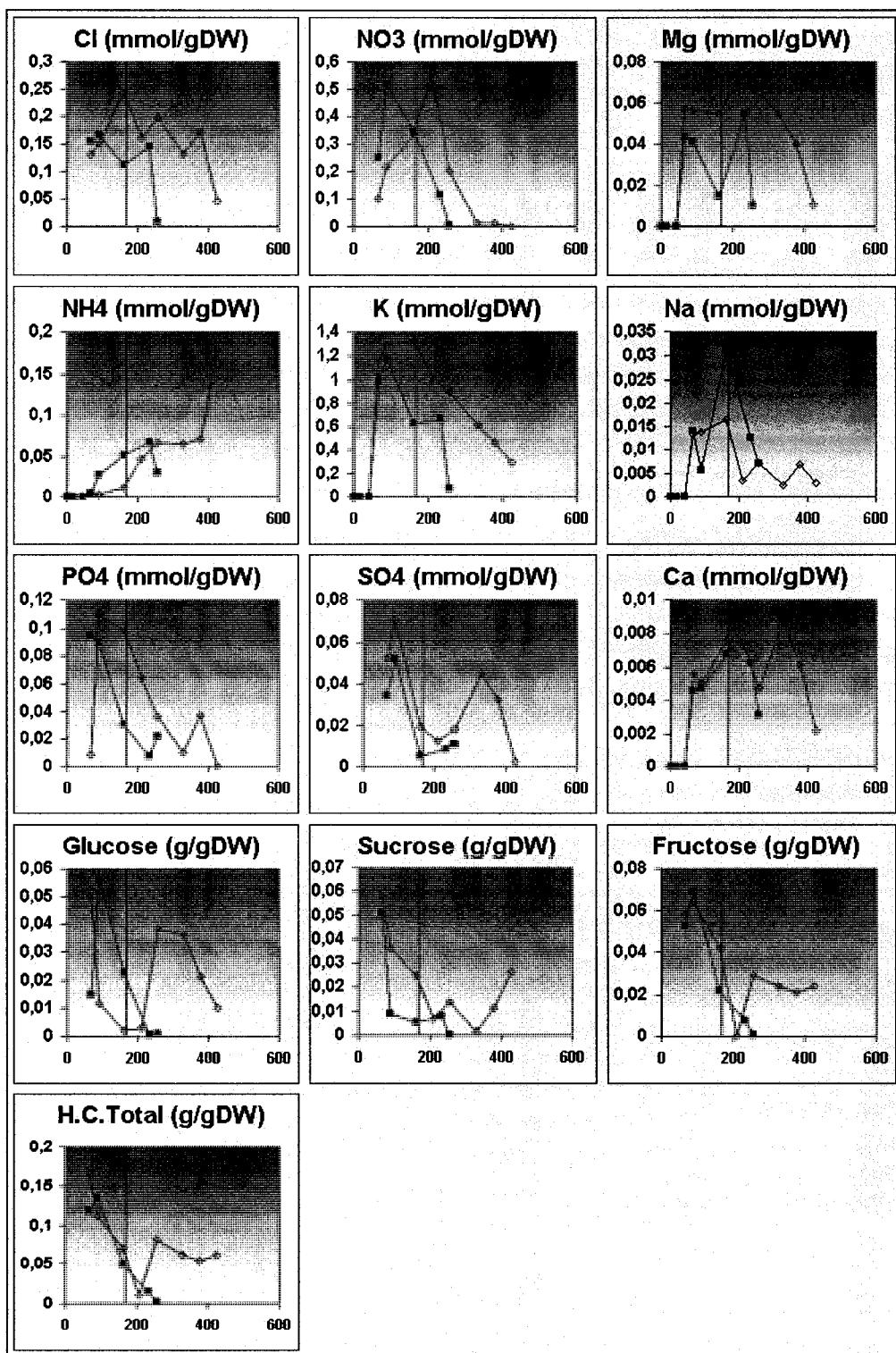


Figure E.9 : Nutriments intracellulaires pour l'espèce B vs heures de culture

(◊) bioréacteur de 3 L; (■) bioréacteur de 40 L

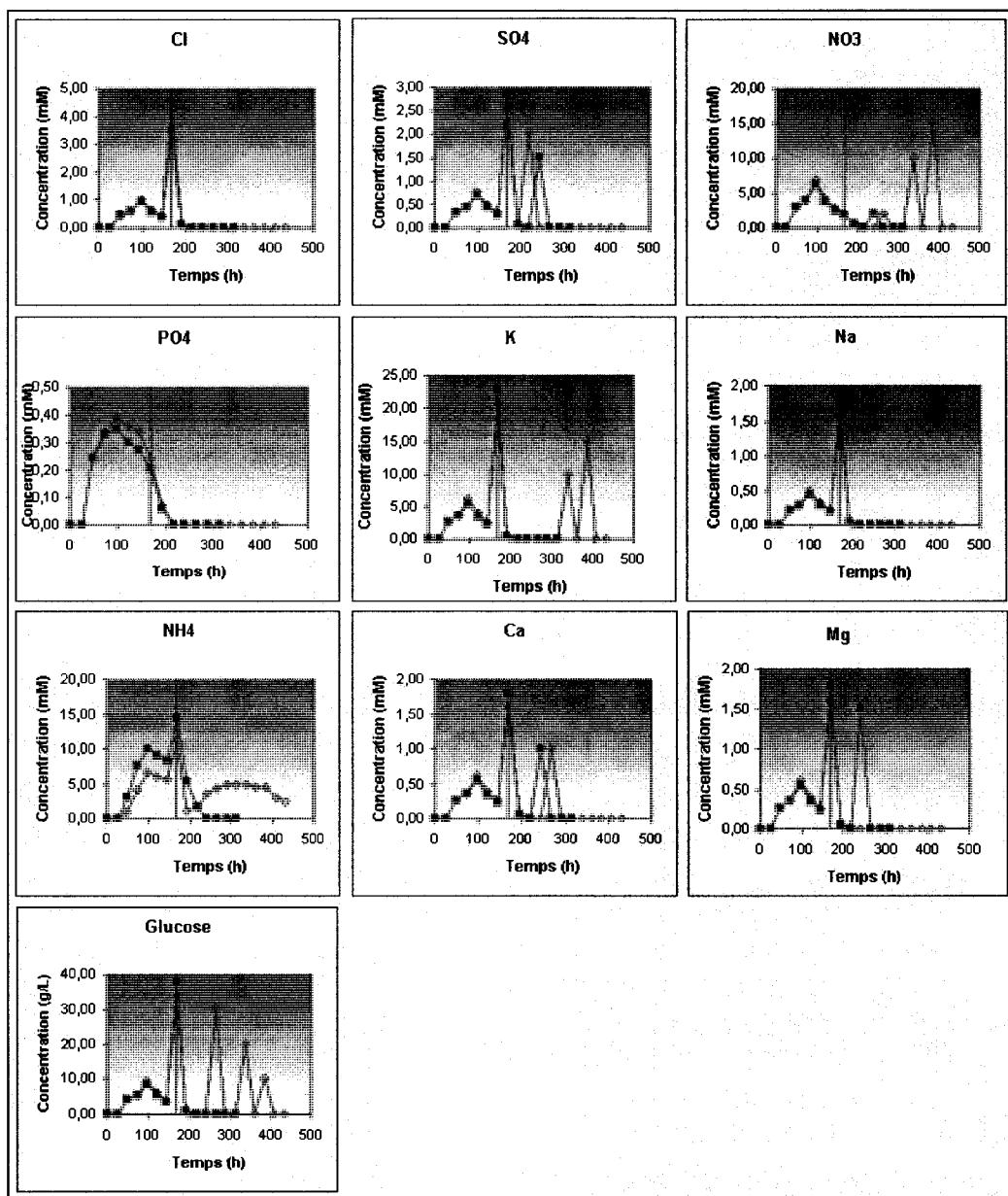


Figure E.10 : Ajouts quotidiens pour l'espèce B

(◊) bioréacteur de 3 L; (■) bioréacteur de 40 L

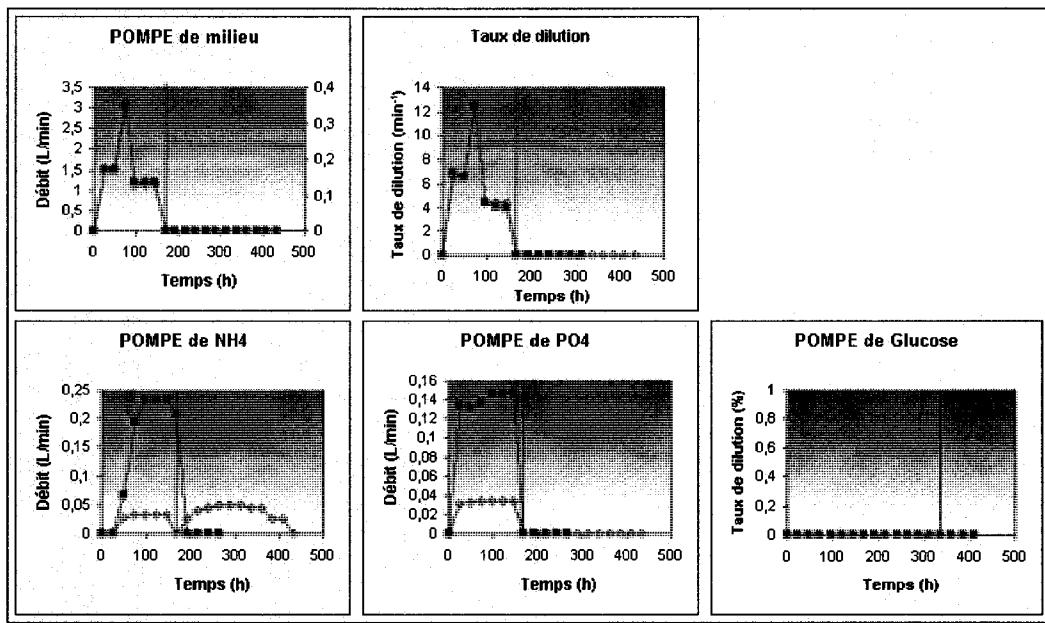


Figure E.11 : Débit des pompes pour l'espèce B

(◊) bioréacteur de 3 L; (■) bioréacteur de 40 L

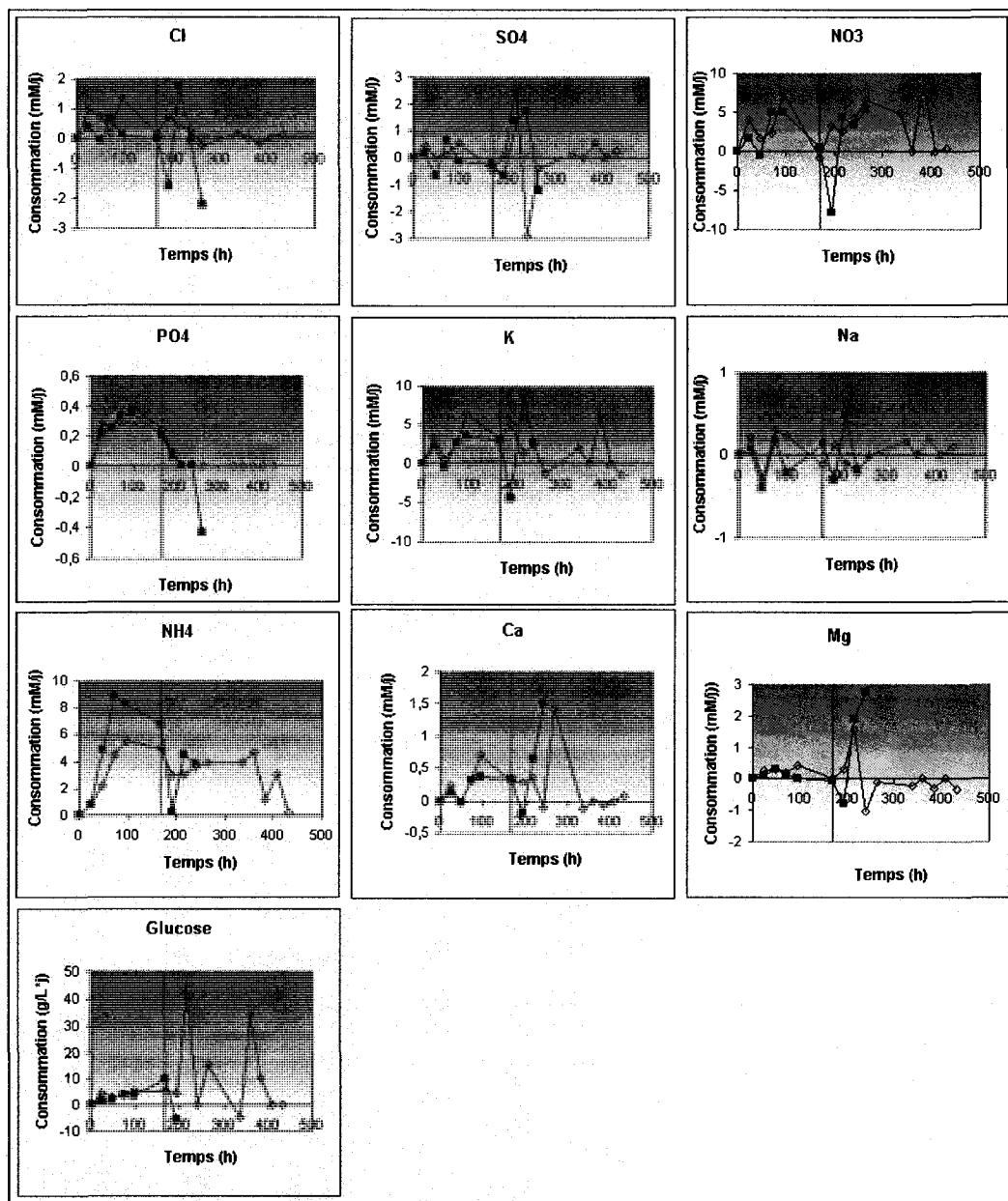


Figure E.12 : Vitesse de consommation des nutriments pour l'espèce B

(◊) bioréacteur de 3 L; (■) bioréacteur de 40 L

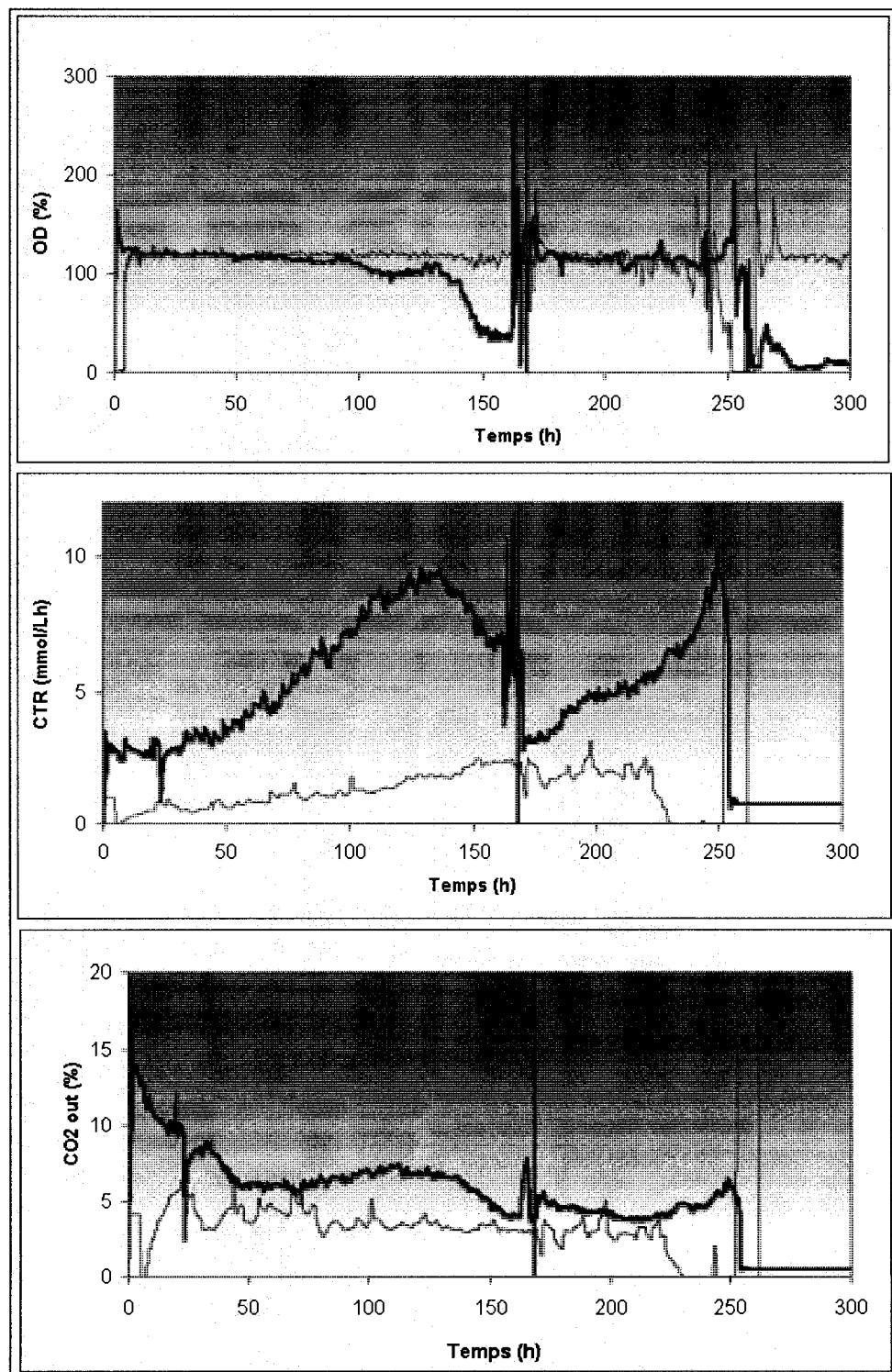


Figure E.13 : Aquisition de données pour l'espèce B

(—) bioréacteur de 3 L; (—) bioréacteur de 40