UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉTUDES BIOCINÉTIQUES ET NUTRITIONNELLES DE RACINES TRANSFORMÉES DE CAROTTE EN CULTURE *IN VITRO*

EDITH BOUCHARD-MARCHAND
DÉPARTEMENT DE GÉNIE CHIMIQUE
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLÔME DE MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES
(GÉNIE CHIMIQUE)
AVRIL 2000

© Edith Bouchard-Marchand, 2000.

National Library of Canada
Bibliothèque nationale du Canada

Acquisitions and Bibliographic Services
Acquisitions et services bibliographiques

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

Our file Notre référence

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

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

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

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

0-612-53561-4

Canada

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé :

ÉTUDES BIOCINÉTIQUES ET NUTRITIONNELLES

DE RACINES TRANSFORMÉES DE CAROTTE EN CULTURE *IN VITRO*

présenté par : BOUCHARD-MARCHAND Edith

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

a été dûment accepté par le jury d'examen constitué de :

M. LEGROS Robert, Ph.D., président

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

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

M. ST-ARNAUD Marc, Ph.D., membre

REMERCIEMENTS

La réalisation de ma maîtrise a été facilitée par le support dynamique et soutenu de mes directeurs de maîtrise, de mes amis et de ma famille. Je voudrais remercier tout particulièrement mon directeur de maîtrise, Mario Jolicoeur, qui m'a d'abord initiée à la recherche et m'a guidée tout au long de mes travaux. Mon codirecteur Michel Perrier a également été d'une aide précieuse par ses connaissances très vastes en modélisation et en biotechnologie. Enfin, je remercie Guillaume Bécard, professeur à l'Université de Toulouse, pour m'avoir accueillie chaleureusement dans son laboratoire et pour avoir partagé avec moi une partie de ses connaissances.

Je voudrais également souligner la contribution très appréciée de tout le groupe de recherche du laboratoire de Biopro avec lequel j'ai eu beaucoup de plaisir à travailler. Enfin, je suis très reconnaissante envers mes amis Marc Lapointe, Annie Racine, Francine Beaudry et Steve L'Heureux, ainsi qu'à mes parents et mes soeurs pour leur soutien ininterrompu au cours de mes travaux de rédaction.

RÉSUMÉ

Les plantes terrestres peuvent parfois révéler des propriétés insoupçonnées qui procurent des avantages inestimables pour l'homme. Elle peuvent, entre autres, produire des molécules ou métabolites, issus du métabolisme secondaire, dont les propriétés antibiotiques, insecticides ou hormonales peuvent être d'un intérêt économique important. La production de métabolites secondaires par des cellules en suspension et de tissus végétaux (racines transformées, cals, embryons, etc.) en culture *in vitro* est étudiée depuis plusieurs décennies. La littérature ainsi que des données accumulées par des chercheurs du département de génie chimique de l'École Polytechnique semblent montrer que le potentiel de production de ces métabolites secondaires est directement influencé par le statut nutritionnel des cellules en culture. Par conséquent, une étude portant sur les comportements biocinétiques et nutritionnels des cellules végétales s'imposait afin de pouvoir éventuellement optimiser la production de métabolites secondaires. Une telle étude a été réalisée en utilisant des racines transformées de carotte comme système modèle.

Ce mémoire de maîtrise présente donc l'étude des phénomènes reliés à la nutrition et à la croissance de racines transformées de carotte en culture *in vitro*. Dans cette optique, des expériences en laboratoire ont été réalisées afin d'observer les dynamiques intracellulaires impliquant le phosphore, alimenté sous forme de phosphate inorganique (Pi), et l'azote, alimenté sous forme de NO_3, deux éléments essentiels pour les cellules. Les dynamiques intracellulaires et la compartimentation de ces nutriments dans les cellules ont été étudiées. Des analyses élémentaires sur les racines ainsi que des extractions de leur contenu intracellulaire ont été effectuées. Trois séries de cultures ont été réalisées avec des racines cultivées : 1) avec un milieu nutritif minimal limitant en Pi et en azote en mode cuvée en boîtes de Pétri; 2) avec un milieu nutritif enrichi non limitant en Pi et en azote en mode cuvée en boîtes de Pétri; 3) avec le milieu nutritif

enrichi alimenté en mode semi-continu en flacons agités. Un modèle biocinétique structuré développé par les chercheurs du département a été précisé en reliant la croissance des racines aux dynamiques et aux concentrations cellulaires en Pi et en phosphore, en azote et en glucides.

Le taux de croissance spécifique des racines a été influencé par les concentrations en Pi et en azote contenues dans le milieu de culture. En effet, le taux de croissance spécifique des racines a été de $0.0705 \pm 0.004\ d^{-1}$ pour la culture en milieu limitant comparativement à $0.174 \pm 0.006\ d^{-1}$ pour la culture en milieu enrichi alimenté en semi-continu. La croissance des racines a été représentée par une cinétique exponentielle avec un taux de croissance spécifique sous une forme de Teissier basé sur les concentrations intracellulaires en phosphate, en azote et en glucides. L'absorption du phosphate et de l'azote a été représentée par une cinétique de Michaelis-Menten à deux niveaux d'affinité pour les transporteurs. L'absorption des glucides a été représentée par une cinétique de Michaelis-Menten à un seul niveau d'affinité pour les transporteurs.

D'après les résultats des analyses cellulaires, élémentaires et intracellulaires, certaines hypothèses ont été posées quant aux dynamiques et aux niveaux de compartimentation du phosphate et de l'azote dans différents bassins. Quatre bassins différents ont été proposés. Les deux premiers bassins contiennent les nutriments sous forme libre dans le cytoplasme et la vacuole respectivement. Le phosphate libre est sous forme inorganique (Pi) et l'azote sous forme de NO_3, NO_2 ou de NH_4. Cependant, aucune distinction n'a pu être établie entre les formes libres contenues soit dans le cytoplasme ou soit dans la vacuole étant donné les techniques d'analyses intracellulaires disponibles. Un deuxième bassin fait référence aux contenus respectifs en phosphore et en azote de composés métaboliques, sans distinction entre les formes sous lesquelles ils se présentent. Enfin, un troisième bassin regroupe les contenus cellulaires minimaux en

nutriments pour que les cellules puissent exister, en excluant toutes autres formes libres ou stockées. Ce dernier bassin a été supposé constant sur la période de culture.

Les dynamiques de consommation et de distribution du phosphate et de l'azote dans les divers bassins ont également été observées et analysées. Tout d'abord, l'utilisation d'inocula composés de racines provenant de milieux où les nutriments étaient limitants a permis d'observer une dynamique initiale particulière durant la période de latence. Une fois acheminés dans l'espace cellulaire, le Pi et le N ont été orientés en parallèle vers les bassins respectifs en nutriments métaboliques et sous forme libre (cytoplasmique et vacuolaire indistinctement) avec une proportion presque trois fois plus grande pour les bassins métaboliques. Lorsque les bassins de nutriments métaboliques ont été saturés, le phosphate et l'azote absorbés ont été orientés en totalité vers les bassins de nutriments libres jusqu'à leur limite de saturation respective. Lorsque des conditions nutritionnelles favorables ont été atteintes pour les racines, la phase de croissance exponentielle a été initiée. Les concentrations des bassins de phosphate et d'azote libre étaient alors de 0.021 mmol Pi $\bullet g^{-1}$DW et 0.15 mmol N $\bullet g^{-1}$DW respectivement.

La capacité maximale d'accumulation des bassins de phosphate et d'azote libres observée expérimentalement a été de 0.23 ± 0.015 mmol Pi $\bullet g^{-1}$DW et de 1.20 ± 0.03 mmol N $\bullet g^{-1}$DW. Les contenus totaux maximaux de phosphate et d'azote cellulaires étaient alors de 0.286 ± 0.008 mmol P $\bullet g^{-1}$DW et de 3.71 ± 0.04 mmol N $\bullet g^{-1}$DW.

Lorsque le Pi ou l'azote extracellulaire a été totalement épuisé, la consommation des nutriments accumulés au niveau intracellulaire a débuté. Les bassins de nutriments sous formes libres ont alors été utilisés pour les besoins de croissance. À l'épuisement des bassins de formes libres, les bassins constitués de métabolites ont alors été libérés et

utilisés afin de maintenir la croissance. L'arrêt de la croissance a coïncidé avec l'épuisement du Pi ou de l'azote contenu dans les métabolites.

Les hypothèses reliées à la cinétique de croissance et à la compartimentation du phosphate et de l'azote dans les cellules ont été utilisées pour l'élaboration du modèle biocinétique. L'ensemble des hypothèses posées pour l'élaboration du modèle a permis de représenter fidèlement les résultats expérimentaux obtenus pour la culture en milieu limitant à partir de laquelle le modèle a été développé. En effet, la cinétique de croissance des racines simulée représente fidèlement les résultats expérimentaux en prédisant la phase de latence et la production totale de biomasse. Le taux de croissance spécifique prévu a toutefois été légèrement inférieur au taux observé expérimentalement, avec une valeur de $0.058 \pm 0.0005\ d^{-1}$ comparativement à $0.0705 \pm 0.004\ d^{-1}$. De plus, les dynamiques d'absorption et de consommation des nutriments étudiés aux niveaux intracellulaire et total dans les cellules ont été prédites par le modèle biocinétique : les taux d'absorption et de consommation ainsi que les concentrations maximales prédites ont été identiques aux résultats expérimentaux.

Certaines limitations ont toutefois été relevées lorsque le modèle a été confronté aux cultures réalisées en milieu enrichi. En premier lieu, étant donné que le taux de croissance simulé en milieu enrichi alimenté en semi-continu n'a atteint que $0.107\ d^{-1}$ comparativement à $0.174\ d^{-1}$ expérimentalement, il semble qu'une contribution reliée aux concentrations extracellulaires en Pi et en azote devrait être considérée dans le taux de croissance. En deuxième lieu, étant donné que la quantité de biomasse totale simulée dépasse largement la quantité de biomasse obtenue expérimentalement, soit 4.02 gDW comparativement à 1.84 g DW, il semble que la croissance des cellules ait été limitée par le manque d'espace ou d'oxygène dans les flacons. Ces limitations devraient donc être considérées dans une étape ultérieure afin d'assurer une représentation des

phénomènes biologiques observés pour les racines cultivées dans différentes conditions environnementales.

ABSTRACT

Many living organisms may offer numerous properties that can provide immeasurable advantages for the human being. More specifically, they can produce molecules or metabolites such as secondary metabolites having the following properties: anti-microbial, antibiotic, insecticide or hormonal, which can be of economic value. For many years, production of secondary metabolites by suspension cells and transformed roots in *in vitro* cultures have been studied. Literature and data compiled by the researchers of the Chemical Engineering Department of the École Polytechnique of Montréal tend to show that the potential production of these secondary metabolites is directly influenced by nutritional status of the cells. Therefore, a study on the biokinetic and nutritional behaviours of the cells is essential to eventually optimise the production of secondary metabolites. Such a study has been done using carrot hairy roots.

The first objective of this work was to study the phenomenon of nutrition and growth of the roots in an *in vitro* culture. This was accomplished by laboratory experiments performed to observe the intracellular dynamics related to phosphorus and nitrate, two important nutrients for root growth. Three series of cultures have been studied with roots in the following culture medium: 1) minimal medium with limiting phosphate and nitrate concentration in batch culture; 2) minimal-based medium with non-limiting phosphate and nitrate concentrations in batch culture; 3) minimal-based medium with non-limiting phosphate and nitrate concentrations in semi-continuous culture. The hypotheses proposed based on the study of nutritional and biokinetic behaviours have been used in a growth model developed by the member of the researcher group.

Specific root growth rate was significantly influenced by extracellular phosphate and nitrate concentrations. As a matter of fact, roots' specific growth rate observed for the

culture in limiting conditions of Pi and nitrate was 0.0705 ± 0.004 d^{-1} compare to 0.174 ± 0.006 d^{-1} obtained for the culture in semi-continuous culture in a non-limited culture medium. Specific roots' growth rate was represented by an exponential kinetic based on a Teissier function. Intracellular phosphate, nitrate and carbohydrates were considered in the specific root growth rate. Phosphate and nitrate uptake was represented by a Michaelis-Menten kinetic with a high affinity and a low affinity system for the root nutrient transporters. Carbohydrates uptake was represented by a single Michaelis-Menten kinetic.

Nutrient compartmentation has been studied based on the cellular and intracellular phosphate and nitrate analysis. Many hypotheses have been suggested in order to segregate phosphate and nitrate in three different pool class within the cells. The first pool contains the minimal amount of phosphorus or nitrogen required by a cell to exist such as DNA, RND, cells wall and membrane that is not related to growth. This pool is taken to stay constant all along the cultures for living cells. The second pool refers to the non-free phosphate and nitrate within the functional compounds that can reversibly give back free phosphate or nitrate. The last pools include free phosphate and nitrate located either in the cytoplasm or in the vacuole. The analytical methods used in this study did not allow differentiation between vacuolar and cytosolic nutrients.

Uptake and utilisation dynamics have been studied within the suggested pools. The inocula used for the cultures originated from a depleted-phosphate and –nitrate medium, therefore, roots' growth has shown a significant lag phase. Phosphate and nitrate uptake starts with transport of ion from the culture medium to cells' cytoplasm. From there, it seems that approximately one third of phosphate and nitrate fluxes was oriented to the free phosphate and nitrate pools and the remaining nutrients were oriented to the metabolites until the upper limit of these pools was reached. When the saturation limits of the metabolic phosphate and nitrate pool were reached, all the absorbed phosphate or

nitrate is oriented to the free nutrient pools. When favourable intracellular conditions have been reached for the cells, exponential growth was initiated.

Intracellular phosphate and nitrate concentrations were then 0.0243 mmol Pi • g^{-1}DW and 0.15 mmol N • g^{-1}DW respectively.

Finally, results have shown that the accumulation capacities in phosphate and nitrate of the roots were 0.23 ± 0.015 mmol Pi •g^{-1}DW for free phosphate and 1.20 ± 0.03 mmol N •g^{-1}DW for free nitrate. The total accumulation capacities were 0.286 ± 0.008 mmol P • g^{-1}DW for total phosphorus content and 3.71 ± 0.04 mmol N • g^{-1}DW for total nitrate content.

After complete depletion of phosphate and nitrate from the culture medium, consumption of accumulated nutrients has started. Free phosphate and nitrate are used in the first place to maintain root growth until complete utilisation. Then, functional compounds are degraded to liberated phosphate and nitrate in the cytoplasm; part of these nutrients was used for growth until complete depletion of both nutrients. This point has coincided with root growth interruption.

The hypotheses suggested for nutrient compartmentation and uptake dynamics were integrated in a structured growth model. These hypotheses have allowed showing the experimental results obtained from the culture in a limited medium. As a matter of fact, the growth kinetic observed in the culture was predicted accurately by the model: the lag phase was predicted as well as the total biomass production. However, the predicted growth rate was 0.058 ± 0.0005 d^{-1} compared to the one observed: 0.0705 ± 0.004 d^{-1}. Moreover, the model has predicted uptake and utilisation dynamics of phosphate and nitrate within the cells: uptake rates and maximum nutrient concentrations were similar.

However, a few limitations have been found when the model was tested with cultures in an enriched culture medium. First, the prediction of the root growth rate was only 0.11 d^{-1} compare to 0.17 d^{-1} observed for the semi-continuous culture. Therefore, it seems that extracellular phosphate and nitrate concentrations should be included in the root growth rate. Another limitation was the final biomass production predicted by the model largely higher than the experimental data. The predicted final biomass was 4.02 gDW compared to 1.84 gDW for the semi-continuous culture. In this case, it seems that because of the range of concentrations, metabolic activity and growth have been important, therefore causing an oxygen limitation for roots. These limitations should be regarded in the next step in order to consider all known biological phenomenon regarding root behaviours.

TABLE DES MATIÈRES

Remerciements iv

Résumé v

Abstract x

Liste des tableaux xviii

Liste des figures xix

Liste des sigles et abréviations xxvi

Liste des annexes xxxi

Chapitre premier: Introduction générale 1

1.1. CONTEXTE DU PROJET DE RECHERCHE 1

1.2. PROBLÉMATIQUE GÉNÉRALE 3

1.3. OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES DU PROJET DE RECHERCHE 6

1.4 ORGANISATION DU MÉMOIRE 8

Chapitre deux : Revue de la littérature 9

2.1. NUTRITION DES RACINES DE PLANTES 9

2.1.1. Rôles des divers nutriments minéraux 9

2.2. ABSORPTION DU PHOSPHATE PAR LES RACINES 11

2.2.1. Fonctions du phosphate 11

2.2.2. Disponibilité du phosphate 11

2.2.3. Transport transmembranaire du phosphate 13

2.2.4. Compartimentation intracellulaire du phosphate 17

2.2.4.1. Bassin cytoplasmique de phosphate 18

2.2.4.2. Bassin vacuolaire de phosphate 18

2.3. ABSORPTION DE L'AZOTE PAR LES RACINES 18

2.3.1. Fonctions de l'azote 18

2.3.2. Disponibilité de l'azote 19
2.3.3. Transport transmembranaire d'azote 21
2.3.4. Compartimentation intracellulaire de l'azote 23
2.3.4.1. Bassin cytoplasmique d'azote 23
2.3.4.2. Bassin vacuolaire d'azote 24
2.4. RÉACTIONS DES PLANTES FACE À DES LIMITATIONS NUTRITIONNELLES 24
2.4.1. Adaptations physiologiques 25
2.4.2. Adaptations morphologiques de la plante 27
2.4.3. Induction du métabolisme secondaire 27
2.4.4. Établissement d'une symbiose avec des champignons endomycorhiziens 28
2.5. MODÉLISATION DE LA CROISSANCE ET DE LA NUTRITION 30

Chapitre trois : Nutritional dynamic of daucus carota hairy roots 36
3.1 FINANCIAL SUPPORT 38
3.2 ABSTRACT 38
3.3 KEY WORDS 39
3.4 INTRODUCTION 39
3.5 MATERIAL AND METHODS 42
3.5.1 Biological material 42
3.5.2 Experimental Cultures 42
3.5.3 Analytical 43
3.5.4 Elementary analysis of cellular composition 44
3.5.5 Free intracellular Pi and N analysis 45
3.6 RESULTS 45
3.6.1 Root Growth Behaviour 46
3.6.2 Nutrition of D. carota Hairy Roots 48
3.6.2.1 Batch Cultures 48

3.6.2.2 Semi-Continuous Cultures 52
3.7 DISCUSSION 53
3.7.1 Effect of Initial Medium Composition on Root Growth 53
3.7.2 Pi and N Storage Capacities 54
3.7.3 Pi and N Intracellular Pool Dynamics 55
3.8 ACKNOWLEDGEMENTS 59
3.9 REFERENCES 59
3.10 LIST OF SYMBOLS 64

Chapitre quatre : Élaboration d'un modèle biocinétique structuré 65
4.1. INTRODUCTION 65
4.2. OBJECTIFS 66
4.3. MATÉRIELS ET MÉTHODES 66
4.3.1. Cultures de racines transformées 66
4.3.2. Simulation du modèle structuré 67
4.4. HYPOTHÈSES ÉMISES POUR L'ÉLABORATION DU MODÈLE STRUCTURÉ 68
4.4.1. Cinétique de croissance 68
4.4.2. Taux de croissance 69
4.4.3. Bassins de P 70
4.4.4. Bassins de N 75
4.5. DESCRIPTION DU MODÈLE STRUCTURÉ 76
4.6. MÉTHODE DE RÉSOLUTION NUMÉRIQUE DU MODÈLE ET ESTIMATION DES PARAMÈTRES 79
4.7. RÉSULTATS 82
4.7.1. Estimation des paramètres biocinétiques 82
4.7.2. Simulations des dynamiques nutritionnelles et de croissance des racines ... 86

4.7.2.1. Comportement du modèle développé avec les résultats de la culture en cuvée M3P 86

4.7.2.2. Évaluation comportementale du modèle face à une culture en milieu enrichi alimentée en semi-continu 89

4.7.2.3. Évaluation comportementale du modèle face à une culture en milieu enrichi en cuvée 92

4.8. DISCUSSION 95

4.8.1. Validation de la structure et des concepts fonctionnels du modèle 95

4.8.1.1. Phase de latence et taux spécifique de croissance 95

4.8.1.2. Absorption et compartimentation des nutriments 97

4.8.1.4. Maintenance 102

4.8.2. Limites du modèle 103

Conclusion générale **107**

Recommandations **112**

Bibliographie **114**

Annexes **129**

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1 Paramètres d'absorption pour l'assimilation du phosphate par différentes espèces végétales 16

Tableau 2.2 Constantes d'absorption pour l'assimilation de l'azote par différentes espèces végétales 22

Tableau 4.1 Paramètres biocinétiques estimés par le modèle ou obtenus expérimentalement 83

Tableau A.1 Solutions pour le milieu minimum 130

LISTE DES FIGURES

Figure 2.1 Schéma du déplacement de NH_4^+ à travers la membrane plasmique 21

Figure 3.1. (A and C) *D. carota* hairy roots growth in batch liquid culture using M-based medium at 3-fold Pi. in Petri dish containing 40 ml of medium. (B and D) *D. carota* hairy roots growth in semi-continuous liquid cultures in M-based medium at 25-fold Pi and 3-fold NO_3 in 250 mL shake flask containing 80 ml of liquid medium. Error bars represents standard deviation (n=5) 47

Figure 3.2. Pi and N dynamics in batch liquid culture of *D. carota* hairy roots in M-based medium at 0.12 mM Pi. (A) Pi and (B) N: Concentration in the culture medium. (C) Pi and (D) N: (Δ) Free intracellular concentration; (□) Cellular concentration. (E) Pi and (F) N utilization rates: (Open bars) Free intracellular pools; (solid bars) Cellular contents. The data points of (E) and (F) are calculated from the uptake rate from the medium. Error bars represents standard deviation (n=5) 48

Figure 3.3. Extracellular concentrations in batch liquid culture of *D. carota* hairy roots in M-based medium at 0.12 mM Pi. (A) Na^+. (B) K^+. (C) Mg^{2+}. (D) Ca^{2+}. (E) Cl^- and (F) SO_4^{2-}. Error bars represents standard deviation (n=5) 49

Figure 3.4. Mass balances calculated around *D. carota* hairy roots in batch liquid culture in M-based medium at 0.12 mM Pi. (A) Pi and (B) N: (□) Balance based on total content in the culture system; (Δ) Medium pH. (C) Pi and (D) N: Balance based on total content in the cells. Error bars represents standard deviation (n=5). 51

Figure 3.5. Dynamics of Pi and N in semi-continuous liquid culture of *D. carota* hairy roots in M-based medium at 25-fold Pi and 3-fold NO_3 in 250 mL shake flask containing 80 ml of liquid medium. (A) Pi and (B) N: Concentrations in the culture medium. (C) Pi and (D) N: (Δ) Free intracellular concentration; (□) cellular content. Error bars represents standard deviation (n=10). 52

Figure 3.6. Life cycle for free intracellular and stored P during a batch culture. Numbers in circles refer to the chronology of the processes. (①) Pi is transported across the cell membrane; (②) The Pi uptake is distributed towards free (P_c) and non-free metabolic (P_{cs}) pools, until the saturation limit is reached for P_{cs}. Then, (③) the Pi uptake goes towards the free Pi pools, P_c and P_{vs}. After complete Pi depletion from the culture medium, (④) free Pi pools are used at first for maintenance and cell division. After depletion of the free Pi pools, (⑤) Pi is obtained from the non-free P_{cs} pool. 55

Figure 4.1. Description schématique des étapes d'assimilation du Pi dans les différents bassins, tel que considéré pour l'élaboration du modèle. Les chiffres représentent une étape définie plus bas 73

Figure 4.2. Représentation schématique du déroulement d'une simulation numérique 80

Figure 4.3. Erreur de minimisation entre les résultats simulés et expérimentaux obtenue lors de l'estimation des paramètres biocinétiques par le modèle structuré 83

Figure 4.4. Courbe de croissance des racines de *D. carota* cultivées en cuvée dans des boîtes de Pétri dans un milieu liquide minimum M3P contenant 0.12 mM Pi. (——) Croissance obtenue par modélisation : (□) résultats expérimentaux. Les barres d'erreur correspondent à l'écart type (n = 5) 86

Figure 4.5. Concentrations extracellulaires, cellulaires et intracellulaires en P et en azote (NO_3 + NO_2 + NH_4) pour des racines de *D. carota* cultivées en boîtes de Pétri en milieu limitant M3P en mode cuvée. (A) (□) Concentration en Pi dans le milieu de culture, (B) (Δ) concentration en Pi intracellulaire et (□) concentration en P cellulaire. (C) Concentration en azote dans le milieu de culture. (D) (Δ) Concentration en azote intracellulaire et (□) cellulaire. (——) Résultats simulés. Les barres d'erreur correspondent à l'écart type (n = 5) 88

Figure 4.6. Concentrations extracellulaires en glucides pour des racines de *D. carota* cultivées en boîte de Pétri en milieu limitant M3P en mode cuvée. (A) Concentration en sucrose dans le milieu de culture ; (B) concentration combinée en glucose et fructose dans le milieu de culture. (——) Résultats simulés et (□) résultats expérimentaux. Les barres d'erreur sont calculées par l'écart type (n = 5) 89

Figure 4.7. Courbe de croissance des racines de *D. carota* cultivées en flacons dans un milieu enrichi alimenté en semi-continu. (— —) Croissance obtenue par modélisation ; (□) résultats expérimentaux. Les barres d'erreur correspondent à l'écart type (n = 2) 90

Figure 4.8. Concentrations extracellulaires, intracellulaires et cellulaires en P et en azote pour les racines de *D. carota* cultivées dans un milieu enrichi alimenté en semi-continu. (A) Concentration en Pi dans le milieu de culture, (B) (Δ) Concentration en Pi intracellulaire et (□) concentration en P cellulaire. (C) Concentration en azote dans le milieu de culture. (D) (Δ) Concentration en intracellulaire et (□) cellulaire. (——) Résultats simulés. Les barres d'erreur correspondent à l'écart type (n = 2) 91

Figure 4.9. Courbe de croissance des racines de *D. carota* cultivées en cuvée dans des boîtes de Pétri dans un milieu liquide enrichi. (——) Croissance obtenue par modélisation; (□) résultats expérimentaux. Les barres d'erreur correspondent à l'écart type (n = 5) 93

Figure 4.10. Concentrations extracellulaires, cellulaires et intracellulaires en P et en azote pour des racines de *D. carota* cultivées en boîte de Pétri en milieu enrichi en mode cuvée. (A) Concentration en Pi dans le milieu de culture, (B) (Δ) Concentration en Pi intracellulaire et (□) concentration en P cellulaire. (C) Concentration en azote dans le milieu de culture. (D) (Δ) Concentration en azote intracellulaire et (□) cellulaire. (——) Résultats simulés. Les barres d'erreur correspondent à l'écart type (n = 5) 94

Figure B.1 Concentrations des cations extracellulaires mesurés pour les racines cultivées en cuvée dans un milieu limitant M3P dans des boîtes de Pétri. 132

Figure B.2 : Concentrations des anions extracellulaires mesurés pour les racines cultivées en cuvée dans un milieu limitant M3P dans des boîtes de Pétri. 133

Figure B.3 : (A) Suivi de la biomasse, (C) de la concentrations cellulaire en phosphate et (E) azote et (B, D, F) des sucres extracellulaires mesurés pour les racines cultivées en cuvée dans un milieu limitant dans des boîtes de Pétri. 134

Figure B.4 : Concentrations des cations intracellulaires mesurés pour les racines cultivées en cuvée dans un milieu pauvre M3P dans des boîtes de Pétri. 135

Figure B.5 : Concentrations des anions intracellulaires mesurés pour les racines cultivées en cuvée dans un milieu pauvre M3P dans des boîtes de Pétri. 136

Figure B.6 : Concentrations des cations extracellulaires mesurées pour les racines cultivées en cuvée dans un milieu riche en phosphate et azote dans des boîtes de Pétri. 137

Figure B.7 : Concentrations des anions extracellulaires mesurées pour les racines cultivées en cuvée dans un milieu riche en phosphate et azote dans des boîtes de Pétri. 138

Figure B.8 : Suivi de la biomasse (A), de la concentrations cellulaire en phosphate (C) et azote (E) et des sucres extracellulaires (B, D, F) mesurées pour les racines cultivées en cuvée dans un milieu riche dans des boîtes de Pétri. 139

Figure B.9 : Concentrations des cations intracellulaires mesurés pour les racines cultivées en cuvée dans un milieu riche dans des boîtes de Pétri. 140

Figure B.10 : Concentrations des anions intracellulaires mesurées pour les racines cultivées en cuvée dans un milieu riche dans des boîtes de Pétri. 141

Figure B.11 : Concentrations des cations extracellulaires mesurées pour les racines cultivées en mode semi-continu dans un milieu riche en phosphate et azote dans des flacons. 142

Figure B.12 : Concentrations des anions extracellulaires mesurées pour les racines cultivées en mode semi-continu dans un milieu riche en phosphate et azote dans des flacons. 143

Figure B.13 : Suivi de la biomasse (A), de la concentrations cellulaire en phosphate (B) et azote (C) mesurés pour les racines cultivées en mode semi-continu dans un milieu riche dans des flacons. 144

Figure B.14 : Concentrations des cations intracellulaires mesurées pour les racines cultivées en mode semi-continu dans un milieu riche en phosphate et azote dans des flacons. 145

Figure B.15 : Concentrations des anions intracellulaires mesurées pour les racines cultivées en mode semi-continu dans un milieu riche en phosphate et azote dans des flacons. 146

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

ADN	Adénosine di-phosphate
ATP	Adénosine tri-phosphate
cte	Constante dans la fonction sigmoïdale de l'équation 4.3.
d	Jour (*day*)
DW	Masse sèche (*dry weight*)
DW_r	Facteur de conversion de la masse humide de racine en mL d'eau, ayant une valeur de 0.1 [gDW $\bullet g^{-1}$WW]
é	Électron
evap	Taux d'évaporation du milieu liquide mesuré en boîte de Pétri, ayant une valeur de 7 ml en 120 jours de culture [mL $\bullet d^{-1}$]
inhipr	Indice de l'inhibition de la croissance des racines transformées associé à la concentration extracellulaire en phosphate inorganique
K1	Constante du taux de croissance des racines associée à la concentration intracellulaire en phosphate inorganique [gDW $\bullet$mmol^{-1}Pi]
K2	Constante du taux de croissance des racines associée à la concentration intracellulaire en azote inorganique [gDW $\bullet$mmol^{-1}N]
K3	Constante du taux de croissance des racines associée à la concentration intracellulaire en sucres [gDW $\bullet g^{-1}$glucides]
$K_{m,\Pi,P}$	Constante de basse affinité pour le phosphate [mmol $\bullet L^{-1}$]
$K_{m,\Pi,P}'$	Constante de basse affinité pour le phosphate durant la phase de latence [mmol $\bullet L^{-1}$]

$K_{m,I,P}$	Constante de haute affinité pour le phosphate [mmol $\bullet L^{-1}$]
$K_{m,I,P}'$	Constante de haute affinité pour le phosphate durant la phase de latence [mmol $\bullet L^{-1}$]
$K_{m,II,N}$	Constante de basse affinité pour l'azote [mmol $\bullet L^{-1}$]
$K_{m,I,N}$	Constante de haute affinité pour l'azote [mmol $\bullet L^{-1}$]
$K_{m,I,S}$	Constante de haute affinité pour les glucides [g glucides $\bullet g^{-1}$DW]
k_{pp}	Constante d'inhibition de la croissance face à la concentration extracellulaire en phosphate inorganique [mmol Pi $\bullet g^{-1}$DW]
K_s	Constante de croissance associé à un substrat [mmol $\bullet g^{-1}$DW]
$m_{r,N}$	Maintenance sur l'azote inorganique [mmol N $\bullet g^{-1}$DW $\bullet d^{-1}$]
$m_{r,P}$	Maintenance sur le phosphate inorganique [mmol Pi $\bullet g^{-1}$DW $\bullet d^{-1}$]
$m_{r,S}$	Maintenance sur les glucides inorganiques [g glucides $\bullet g^{-1}$DW $\bullet d^{-1}$]
N	Azote
N_b	Concentration en azote transformé nécessaire à la constitution minimale d'une cellule [mmol N $\bullet g^{-1}$DW]
N_c	Concentration en azote sous forme libre dans le cytoplasme [mmol N $\bullet g^{-1}$DW]
N_{cs}	Concentration en azote métabolique cellulaire [mmol N $\bullet g^{-1}$DW]
$N_{cs,max}$	Concentration maximale en azote métabolique cellulaire [mmol N $\bullet g^{-1}$DW]
$N_{cs,min}$	Concentration minimale en azote métabolique cellulaire [mmol N $\bullet g^{-1}$DW]
N_L	Concentration en azote sous forme libre dans le cytoplasme ou la vacuole [mmol Pi $\bullet g^{-1}$DW]

$N_{L,max}$ Concentration maximale en azote sous forme libre dans le cytoplasme ou la vacuole [mmol N • g^{-1}DW]

$N_{L,min}$ Concentration minimale en azote sous forme libre dans le cytoplasme ou la vacuole [mmol N • g^{-1}DW]

N_t Concentration totale en azote contenue dans les cellules [mmol N • g^{-1}DW]

N_{vs} Concentration en azote inorganique sous forme libre dans la vacuole [mmol N • g^{-1}DW]

P Phosphore

P_b Concentration en phosphate transformé nécessaire à la constitution minimale d'une cellule [mmol P • g^{-1}DW]

P_c Concentration en phosphate inorganique sous forme libre dans le cytoplasme [mmol Pi • g^{-1}DW]

P_{cs} Concentration en phosphate métabolique cellulaire [mmol P • g^{-1}DW]

$P_{cs,max}$ Concentration maximale en phosphate métabolique cellulaire [mmol P • g^{-1}DW]

$P_{cs,min}$ Concentration minimale en phosphate métabolique cellulaire [mmol P • g^{-1}DW]

Pi Phosphate inorganique

P_L Concentration en phosphate inorganique sous forme libre dans le cytoplasme ou la vacuole [mmol Pi • g^{-1}DW]

$P_{L,max}$ Concentration maximale en phosphate inorganique sous forme libre dans le cytoplasme ou la vacuole [mmol Pi • g^{-1}DW]

$P_{L,min}$ Concentration minimale en phosphate inorganique sous forme libre dans le cytoplasme ou la vacuole [mmol Pi • g^{-1}DW]

P_t	Concentration totale en phosphate contenu dans les cellules [mmol P • g^{-1}DW]
P_{vs}	Concentration en phosphate inorganique sous forme libre dans la vacuole [mmol Pi • g^{-1}DW]
S	Concentration extracellulaire totale en glucides [g glucides • g^{-1}DW]
S0	Concentration extracellulaire en sucrose [g sucrose • g^{-1} DW]
S_{ir}	Concentration intracellulaire en glucides des racines transformées [g glucides • g^{-1}DW]
$S_{r,crit}$	Concentration critique intracellulaire des racines transformées en glucides [g glucides • g^{-1}DW]
t	Temps [d]
V	Volume de milieu liquide [L]
$V_{max,II,P}$	Taux spécifique maximum à basse affinité de consommation du phosphate [mmol Pi • g^{-1}DW • d^{-1}]
$V_{max,II,P}'$	Taux spécifique maximum à basse affinité de consommation du phosphate durant la phase de latence [mmol Pi • g^{-1}DW • d^{-1}]
$V_{max,I,P}$	Taux spécifique maximum à haute affinité de consommation du phosphate [mmol Pi • g^{-1}DW • d^{-1}]
$V_{max,I,P}'$	Taux spécifique maximum à haute affinité de consommation du phosphate durant la phase de latence [mmol Pi • g^{-1}DW • d^{-1}]
$V_{max,II,N}$	Taux spécifique maximum à haute affinité de consommation de l'azote [mmol N • g^{-1}DW • d^{-1}]
$V_{max,I,N}$	Taux spécifique maximum à haute affinité de consommation de l'azote [mmol Ni • g^{-1}DW • d^{-1}]

$V_{max,I,S}$	Taux spécifique maximum de consommation des glucides [g glucides $\bullet g^{-1}$DW $\bullet d^{-1}$]
X	Masse sèche racinaire [gDW]
$Y_{N/r}$	Coefficient de rendement des racines en azote [mmol N $\bullet g^{-1}$ DW]
$Y_{P/r}$	Coefficient de rendement des racines en phosphate [mmol Pi $\bullet g^{-1}$ DW]
$Y_{S/r}$	Coefficient de rendement des racines en glucides [g glucides $\bullet g^{-1}$ DW]
$Y_{x/s}$	Coefficient de rendement des racines en substrat [g substrat $\bullet g^{-1}$ DW]
μ	Taux de croissance spécifique [d^{-1}]
μ_{hydro}	Taux spécifique d'hydrolyse des glucides par les racines transformées [g glucides $\bullet g^{-1}$ DW $\bullet d^{-1}$]
μ_{max}	Taux de croissance spécifique maximal [d^{-1}]

LISTE DES ANNEXES

Annexe A : Milieu de culture 129

Annexe B : Résultats expérimentaux 131

Annexe C : Programme pour le modèle biocinétique structuré utilisé au chapitre 4 147

Programme d'appel : Minip 148

Programme de minimisation : Oksmin2 150

Programme contenant les équations différentielles : Quatre21 152

Programme de résolution du système d'équations différentielles : Mji 155

CHAPITRE PREMIER

INTRODUCTION GÉNÉRALE

1.1. CONTEXTE DU PROJET DE RECHERCHE

La nature recèle une quantité inestimable de ressources qui peuvent être mises à profit pour la synthèse de molécules d'intérêts pharmaceutique et alimentaire ainsi que de produits d'usage courant. Ces molécules peuvent être produites à partir d'organismes vivants pour remplacer des procédés chimiques ou synthétiques tout en étant environnementalement acceptables. Plusieurs procédés biotechnologiques commerciaux sont déjà abondamment exploités à partir de micro-organismes, par exemple : la production d'alcool à partir de levures, de différents produits laitiers à partir de bactéries, de médicaments à partir de la culture de divers types de cellules (bactéries, levures, cellules d'insectes ou de mammifères) ou encore, d'engrais biologique à partir de bactéries, de moisissures et de champignons endomycorhiziens.

Certains métabolites dits secondaires peuvent également être produits à partir de cellules et de tissus végétaux. Les métabolites secondaires sont généralement produits en fin de cycle de la vie des plantes, lors du métabolisme secondaire, en dehors du métabolisme constitutif cellulaire associé à la croissance et à la maintenance cellulaire (glycolyse, respiration, etc.). Les métabolites secondaires peuvent être utilisés pour leurs propriétés antibiotiques, antiparasitaires, hormonales et pharmacologiques (Kieran et al., 1997). Des substances telles que les teintures, les saveurs naturelles ou les parfums ont toujours été extraites à partir de plantes entières. Or, la production à grande échelle de ces plantes est problématique car elle requiert une longue période de culture et elle est dépendante du climat. De plus, le rendement de production est réduit

par l'action d'agents pathogènes et par le fait que les métabolites secondaires d'intérêt ne sont produits que dans certaines parties des plantes.

Une solution à cette problématique consiste à utiliser des techniques de culture *in vitro*. Il est aujourd'hui possible de cultiver aseptiquement, en culture pure, des cellules de plantes sous formes de cellules différenciées en suspension, de racines transformées et d'autres formes (embryons, cals et autres tissus). Les cellules de plantes en suspension s'obtiennent à partir d'explants de tissus végétaux stérilisés en surface et mis en culture dans un milieu nutritif approprié (Constabel et Wetter, 1982). Les racines transformées, quant à elles, proviennent de racines de plante ayant été délibérément infectées par une bactérie, l'*Agrobacterium rhizogenes*, qui induit une maladie dite de la racine chevelue. Les racines sont alors identifiables par un allongement significatif des poils absorbants augmentant la surface de contact entre la racine et le sol. La transformation est d'ordre génétique avec l'incorporation de gènes responsables de la production d'auxines, hormones stimulant la croissance des racines, par un plasmide bactérien, le Ri T-DNA (Leach, 1983 cité par Tepfer, 1984). Cette maladie rend les tissus racinaires autonomes par rapport au reste de la plante et permet leur culture sur un milieu nutritif approprié sans hormone exogène (Tepfer, 1983).

Les racines transformées peuvent également être utilisées pour la culture de champignons endomycorhiziens qui sont des organismes vivant en symbiose obligatoire avec une plante. Ces champignons sont reconnus pour améliorer la croissance des plantes en augmentant leur absorption nette en nutriments (Schachtman et al., 1998) et en augmentant la résistance des plantes face aux micro-organismes pathogènes (St-Arnaud et al., 1995). Ils peuvent donc être utilisés afin de réduire la quantité de fertilisant qui doit être appliquée dans les champs pour assurer une production satisfaisante et la croissance de certaines communautés de plantes.

La production de métabolites secondaires constitue l'axe principal d'étude du groupe de recherche en biotechnologie végétale de Biopro de l'École Polytechnique de Montréal dans lequel ces travaux de maîtrise ont été réalisés. Différents designs de bioréacteurs ont été développés et étudiés afin d'assurer un bon transfert d'oxygène et de nutriments sans endommager l'intégrité physique des cellules ou des racines (Boudreau, 1999; Jolicoeur, 1998; Gaudette, 1997; Fortin et al., 1996; Jolicoeur et al., 1992). Par la suite, plusieurs projets ont été réalisés dans le but d'approfondir les connaissances au niveau de la croissance et de la nutrition des racines. Ce projet de maîtrise se situe à ce niveau, visant à élargir les connaissances sur les racines cultivées *in vitro*, étant donné que très peu de littérature traite de cet aspect. Les expériences ont été réalisées sur des racines transformées de carotte (Bécard et Fortin, 1988), *Daucus carota*, utilisées à titre de racines modèles afin de caractériser l'absorption des nutriments principaux et d'en relier les dynamiques à la croissance.

1.2. PROBLÉMATIQUE GÉNÉRALE

Les racines de plantes sont constituées de cellules qui se divisent principalement dans la région apicale, c'est-à-dire à l'extrémité des racines principales ainsi que des ramifications. Les nouvelles cellules qui se forment sont petites, de 10 à 50 µm et, avec la progression de la zone apicale par croissance, elles deviennent matures et grossissent pour atteindre une taille de 100 à 300 µm. Dans une racine en maturation, il existe plusieurs types de cellules, certaines vivantes, d'autres mortes. Certaines jouent un rôle structural (exemple : fibre), d'autres servent au transport des nutriments (exemple : xylème, phloème) ou au stockage des réserves (parenchyme) et d'autres produisent de nouvelles cellules pour la croissance secondaire (exemple : péricycle, cambium, phellogène). Ces cellules sont aussi organisées en tissus et ne sont donc pas homogènes dans la racines. Les cellules matures constituent également un lieu

privilégié pour la production de métabolites secondaires en réponse à divers stress tels que l'attaque d'organismes agresseurs (Rokem et Goldberg, 1985).

L'intérieur des cellules végétales est rempli par le cytoplasme, principalement constitué d'eau, de nutriments et de métabolites en solution, dans lequel baignent le noyau et différentes organelles telles que la vacuole. La vacuole est un corps d'inclusion pouvant représenter jusqu'à 95% du volume cellulaire pour les cellules matures et dans laquelle certains nutriments peuvent être stockés pour une utilisation ultérieure. Ainsi, la croissance n'est pas immédiatement interrompue en cas de limitation en nutriments. La vacuole assure également le maintien de la turgescence de la cellule, la séquestration de composés toxiques, le stockage de produits métaboliques, ainsi que la digestion de constituants cytoplasmiques (Marty, 1999). Enfin, elle est responsable du maintien de l'homéostasie protoplasmique, c'est-à-dire la régulation du pH et des ions cytoplasmiques, essentielle pour plusieurs réactions enzymatiques (Schachtman et al., 1998). L'homéostasie est assurée par une gestion interne des différents stocks et par des échanges membranaires via l'ajustement de l'activité des protéines de transport des nutriments (Clarkson, 1985).

Cette homéostasie est cruciale pour les cellules afin d'assurer le bon fonctionnement de leur métabolisme. Cependant, l'état physiologique, voire l'homéostasie, d'une cellule en métabolisme primaire sera différent de celui d'une cellule en métabolisme secondaire, lequel est étudié plus particulièrement (Kosegarten et al., 1997). Cette modulation de l'état physiologique se répercutera nécessairement par une modulation au niveau de la nutrition des cellules. L'étude des dynamiques régissant cette modulation nutritionnelle devient donc particulièrement importante.

Les cellules à l'intérieur des racines sont reliées entre elles par leur paroi cellulaire qui est composée de cellulose. Ces parois sont interconnectées via des canaux, les plasmodesmes, permettant la circulation d'un milieu nutritif alimentant les cellules.

Les cellules végétales sont isolées du milieu extérieur par une membrane plasmique qui est une barrière perméable sélective pour le transport des éléments nutritifs et des déchets métaboliques entre le milieu cellulaire et extérieur (extracellulaire) (Prescott et al., 1993). Le transport de nutriments à travers la membrane plasmique se fait par le biais de protéines de transport. De nombreuses études ont démontré l'existence de plusieurs types de transporteurs pour des nutriments majeurs tels que le phosphate et l'azote dont les caractéristiques (vitesse maximale d'absorption : V_{max} et affinité : K_m) varient en fonction des concentrations extracellulaires. En effet, l'absorption du phosphate et de l'azote pour plusieurs espèces végétales se produirait selon deux niveaux d'affinité pour les transporteurs (Crawford et Glass, 1998; Schachtman et al., 1998). L'affinité d'un transporteur pour un nutriment particulier est estimée par la mesure du taux d'absorption en fonction de différentes concentrations extracellulaires. La constante d'affinité d'un transporteur représente la concentration de l'ion pour laquelle le taux d'absorption est à la moitié de sa valeur maximale, V_{max}. Cette dernière est reliée au nombre de transporteurs par unité de surface de racine et à leurs caractéristiques intrinsèques (Le Bot et al., 1998). La constante K_m est influencée par les caractéristiques intrinsèques des transporteurs et non par leur quantité. Plus K_m est petit, plus l'affinité du transporteur pour cet ion est grande.

Les cinétiques d'absorption des nutriments principaux, le phosphate et l'azote, ainsi que leur dynamique de compartimentation dans les cellules ne sont que partiellement définies dans la littérature car très peu d'études traitent de la nutrition des racines transformées cultivées *in vitro* en relation avec la croissance. La compréhension des phénomènes impliqués étant essentielle à l'amélioration des procédés de production *in vitro* à partir des cellules végétales, ces travaux de maîtrise se sont concentrés sur des études de physiologie nutritionnelle.

Ce mémoire s'insère dans des travaux à long terme visant la modulation précise des conditions environnementales des cultures permettant d'optimiser la croissance des

racines et la production de métabolites secondaires d'intérêt.

1.3. OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES DU PROJET DE RECHERCHE

Les travaux réalisés dans le cadre de ce projet de maîtrise ont tenté d'élargir les connaissances au niveau des dynamiques intracellulaires grâce à des expérimentations sur des racines transformées et à l'élaboration d'un modèle biocinétique structuré. Ces travaux permettent donc de poser les bases pour un bioprocédé de production de racines de plante.

L'objectif principal de ce projet de recherche a été de caractériser la physiologie nutritionnelle de racines de carotte en culture *in vitro*. Dans cette optique, les sous-objectifs suivants ont été poursuivis :

- Développer une approche expérimentale simple permettant l'observation de phénomènes intracellulaires impliquant le phosphate et l'azote, soit des nutriments de première importance;
- Déterminer les dynamiques ainsi que les niveaux caractéristiques intracellulaires relatifs au phosphate et à l'azote;
- Développer un modèle biocinétique structuré reliant la croissance des racines aux dynamiques et aux contenus en nutriments phosphate et azote;
- Valider le modèle biocinétique structuré.

Afin de rencontrer ces sous-objectifs, trois séries principales d'expériences ont été réalisées en laboratoire en mode cuvée et semi-continu.

Cultures en cuvée :

- Racines cultivées en boîtes de Pétri dans un milieu minimum (M) (Bécard et Fortin, 1988) avec 3 fois la quantité de KH_2PO_4 : un tel milieu (M3P) semble être limitant à la fois en phosphate inorganique (Pi) et en azote (N) (Jolicoeur, 1998).
- Racines cultivées en boîtes de Pétri dans un milieu M (Bécard et Fortin, 1988) avec 3 fois la quantité de NO_3^- et 25 fois la quantité de KH_2PO_4.

Ces cultures ont été réalisées dans le but d'étudier les dynamiques d'absorption du phosphate et de l'azote extracellulaires, ainsi que les dynamiques de consommation de ces mêmes nutriments à partir de réserves dans les cellules. Enfin, la compartimentation du phosphate et de l'azote en plusieurs bassins dans les cellules a été étudiée.

Culture alimentée en semi-continu :

- Racines cultivées en flacons dans un milieu M liquide avec 3 fois la quantité de NO_3^- et 25 fois la quantité de KH_2PO_4. Le milieu a été renouvelé périodiquement afin de maintenir des concentrations non-nulles en Pi et en NO_3^- dans le milieu de culture.

Cette culture a permis de déterminer les dynamiques, les états de saturation et les effets du milieu extracellulaire.

Des analyses de phosphate et d'azote cellulaire et intracellulaire ont été réalisées pour les trois séries d'expériences dans le but de suivre les formes libres, le Pi et l'azote sous formes NO_3^-, NO_2^- et NH_4^+ par rapport aux autres formes cellulaires non libres (P-esters, acides aminés, etc.) qui se retrouvent dans la cellule. Les formes non libres n'ont pas été caractérisées et ont été traitées en bloc lors de cette étude.

Dans ce contexte, les hypothèses ayant guidé ces travaux de maîtrise sont :

- la croissance des racines transformées en culture *in vitro* est reliée à la composition intracellulaire en phosphate inorganique (Pi), en nitrate (NO_3^-) et en glucides;
- l'existence de plusieurs bassins en Pi et en N dont les dynamiques leur sont propres;
- la croissance peut être décrite par un modèle structuré basé sur des bassins intracellulaires des nutriments principaux Pi et N;
- la croissance des racines est homogènes pour toutes les cellules, peu importe leur âge et leur fonctions. Les concentrations en phosphate et en azote sont également homogènes dans toutes les cellules

1.4. ORGANISATION DU MÉMOIRE

Le présent mémoire est organisé de la façon suivante :

- Le chapitre deux présente une révision de la littérature axée sur la nutrition des plantes et cellules de plantes;
- Le chapitre trois, sous forme de publication, fait état des travaux de caractérisation nutritionnelle du système modèle, les racines transformées de carotte, en culture *in vitro*.
- Le chapitre quatre présente des travaux de modélisation structurée exploitant l'interprétation des résultats expérimentaux en culture *in vitro*. Ce chapitre est présenté sous forme d'article puisqu'il sera incessamment soumis à *Biotechnology and Bioengineering* avec les mêmes auteurs que le premier article;
- Une conclusion générale s'ensuit ;
- Finalement, des recommandations ont été formulées.

CHAPITRE DEUX

REVUE DE LA LITTÉRATURE

2.1. NUTRITION DES RACINES DE PLANTES

2.1.1. Rôles des divers nutriments minéraux

Les plantes ont besoin de plusieurs minéraux pour assurer leurs fonctions vitales et leur croissance; lorsqu'elles en manquent, leur croissance et leur survie en sont affectées.

Le soufre est un nutriment important pour les cellules, il est présent en grande quantité dans la cellule, particulièrement dans les protéines. Les groupes sulfhydryl (S^{-2}) peuvent être considérés comme un substitut à l'oxygène qui augmente la capacité des composés organiques à complexer les métaux (Clarkson et Hanson, 1980). Le soufre participe également directement aux réactions d'oxydoréduction (Bouma, 1975).

Le potassium (K^+) est le cation le plus abondant dans la cellule avec des concentrations cytoplasmiques autour de 100 mM (Clarkson et Hanson, 1980). Une telle concentration est nécessaire pour la conformation active de plusieurs enzymes qui participent aux mécanismes intermédiaires et aux biosynthèses (Evans et Sorger, 1966). De plus, cette concentration est essentielle pour neutraliser électrochimiquement les anions solubles et les macromolécules anioniques du cytoplasme qui contiennent peu de cations organiques. Par le fait même, le potassium contribue à maintenir le potentiel osmotique nécessaire pour une panoplie de mécanismes physiologiques tels que la

turgescence, le transport dans le phloème, les mouvements des feuilles et la croissance cellulaire (Clarkson et Hanson, 1980).

Le magnésium (Mg^{+2}), quant à lui, joue un rôle au niveau de l'activation des ATPases, il agit également à titre de messager secondaire pour l'activité des gènes (Prescott et al., 1993). Proportionnellement à son abondance dans l'environnement, le magnésium contribue à la neutralisation des glucides phosphatés, des nucléotides et des acides aminés et organiques (Mengel et Kirkby, 1978). Le manganèse peut toutefois se substituer au magnésium au niveau de plusieurs réactions impliquant l'oxygène.

Le calcium (Ca^{2+}) est impliqué dans plusieurs fonctions physiologiques, bien qu'il possède une mobilité faible dans le cytoplasme. Le Ca^{2+} joue principalement un rôle de messager secondaire et il participe à l'activation des protéines qui sont situées aux parois cellulaires et membranaires (Prescott et al., 1993). Enfin, il peut participer à de nombreuses interactions métaboliques de la même façon que le Mg^{2+} (Clarkson et Hanson, 1980).

Le chlore (Cl^-) joue un rôle au niveau du contrôle osmotique cellulaire et de la neutralisation des cations dans le cytoplasme étant donné qu'il est un contre-ion pour le K^+ (Clarkson et Hanson, 1980). Bien qu'il existe plusieurs composés chlorés impliqués dans des réactions biologiques, peu d'indications suggèrent que le chlore joue un rôle essentiel à la survie des plantes.

Enfin, le phosphate et l'azote sont deux nutriments très importants pour la croissance des cellules ; ils sont, en outre, tous deux accumulés pour maintenir la croissance lors de limitations. L'accumulation du phosphate et de l'azote dans les cellules implique

des dynamiques nutritionnelles n'ayant pas été clairement abordées en modélisation; ce sujet est donc traité de façon plus élaborée dans les sections suivantes.

2.2. ABSORPTION DU PHOSPHATE PAR LES RACINES

2.2.1. Fonctions du phosphate

Le phosphate est l'un des nutriments les plus importants pour la croissance des plantes puisqu'il est impliqué dans presque toutes les activités métaboliques et qu'il est accumulé par les cellules (Plaxton, 1998). Le phosphate se retrouve principalement sous forme d'esters : ADP et ATP. Il sert alors de monnaie énergétique à des procédés tels que la biosynthèse, le pompage d'ions, ou tout autre travail mécanique requérant de l'énergie au niveau de la cellule (Grm et al., 1980). Le phosphate forme des liens avec les acides nucléiques, les phospholipides et les nucléotides pyrimidine (Mitchell, 1968). Il est également un élément clef dans les protéines de phosphorylation pour le contrôle de l'expression des gènes et pour la régulation métabolique (Blevins et Reinbott, 1998). À pH neutre, le phosphate existe en part égale en anion monovalent ($H_2PO_4^-$) et divalent (HPO_4^{-2}); il contribue ainsi au pouvoir tampon de la cellule (Emsley et Hall, 1976). Les plantes qui sont soumises à des manques importants en phosphate inorganique (Pi) présentent une croissance anormale et des fonctions physiologiques déficientes (Blevins et Reinbott, 1998; Bieleski et Ferguson, 1983).

2.2.2. Disponibilité du phosphate

Une déficience en phosphate est un phénomène très courant, tant dans la nature que dans les cultures *in vitro*, étant donné la forte demande en phosphate des cellules. En plus d'être absorbé rapidement par les cellules, le phosphate est souvent peu disponible

dans l'environnement. Plusieurs facteurs affectent la disponibilité du phosphate tels que la forme du phosphate, le pH, la diffusion, ainsi que les interactions avec d'autres ions.

Les cellules ne peuvent absorber le phosphate que sous sa forme inorganique et préférablement sous sa forme complètement oxydée, c'est-à-dire orthophosphate $H_2PO_4^-$. La présence des formes monovalentes, $H_2PO_4^-$, ou divalentes, HPO_4^{-2}, est directement reliée au pH. Lorsque le pH est acide, le Pi sera présent sous une forme monovalente, alors que lorsque le pH est basique, il sera présent sous la forme divalente. L'absorption de phosphate est plus élevée lorsque le pH est autour de 5.0 et 6.0, alors que $H_2PO_4^-$ est dominant (Schachtman et al., 1998). De surcroît, seul le $H_2PO_4^-$ peut être accumulé dans les cellules (Bieleski, 1973).

Par ailleurs, il existe de nombreuses interactions entre l'ion phosphate et d'autres cations qui limitent la disponibilité du phosphate pour les plantes. Les ions NH_4^+ et Fe^{+2}, qui prédominent dans les sols alcalins, interagissent fortement avec le phosphate en formant un complexe précipité, ce qui a pour effet de le rendre inaccessible pour les plantes (Raghothama et al., 1998). Les milieux neutres ou basiques qui sont riches en Ca^{+2} présentent une réaction avec le Pi, le rendant également non disponible (Comeford, 1998). Une réduction de la consommation du phosphate a également été observée lorsque les cellules présentent une carence en Cl^- (Cerezo et al., 1997). Enfin, une limitation en phosphate dans le milieu de culture pourrait être responsable d'une réduction de l'absorption d'autres éléments (Cerezo et al., 1997). En effet, il a été observé qu'une faible disponibilité du Pi dans le sol limite la concentration en Mg^{+2} et Ca^{+2} dans les plantes (Reinbott et Blevins, 1997).

Étant donné les interactions entre le phosphate et d'autres éléments, le problème de la disponibilité du Pi subsiste lorsque le phosphate est présent en grande quantité. Dans

les cultures en champs, une proportion pouvant atteindre 75% du phosphate ajouté par fertilisation peut disparaître sous forme de complexes. Par conséquent, les agriculteurs doivent employer jusqu'à quatre fois plus de fertilisant que nécessaire pour leur champs de production (Goldstein, 1992). La concentration en Pi en solution (disponible) dépasse rarement 10 µM et ce, même dans les sols fertilisés, alors que la moyenne est généralement autour de 1.5 µM (Bieleski, 1973). Ces valeurs sont en dessous de la limite de haute affinité pour les transporteurs de phosphate (Barber et al., 1963).

En plus d'être présent en faible quantité sous sa forme inorganique, le taux de diffusion du phosphate dans l'environnement est problématique. Le phosphate est très immobile, ce qui entraîne la formation d'une zone dénuée de phosphate autour de la racine, après avoir été absorbé par la plante. En considérant la diffusion et la concentration du phosphate dans le sol, la limite supérieure d'absorption du Pi se situe entre 100 et 200 µm de la racine, d'où la contribution des poils à l'absorption des nutriments (Clarkson, 1985).

2.2.3. Transport transmembranaire du phosphate

La concentration en Pi dans la cellule dépasse largement la concentration extracellulaire : la concentration dans la cellule se situe autour de 5 à 20 mM alors que dans le sol, le Pi atteint à peine 10 µM. Il existe donc un gradient négatif dans la cellule et, par conséquent, le transport du phosphate nécessite un apport énergétique non négligeable (Bieleski et Ferguson, 1983). Le transport d'un ion phosphate ($H_2PO_4^-$) à travers la membrane plasmique se fait par co-transport avec deux protons ($2\ H^+/H_2PO_4^-$). Le pH est ajusté grâce aux pompes à protons qui retournent les deux H^+ vers le milieu extérieur par l'hydrolyse d'ATP (Emsley et Hall, 1976).

Afin de maintenir l'homéostasie, indépendamment des concentrations en phosphate extracellulaire, les cellules ont développé un système d'absorption à deux niveaux d'affinité pour des concentrations extracellulaires en phosphate faibles ou élevées (Beever et Burns, 1980b). Chaque système de transporteurs est régi par une cinétique de Michaelis-Menten, étant donné que le transport nécessite un apport énergétique. Le transporteur est une protéine attitrée à cette tâche. Par opposition, dans le cas où l'absorption serait directement proportionnelle à la concentration, l'absorption serait représentée par une cinétique linéaire et elle se produirait via un canal ionique (Bieleski, 1973). L'équation de Michaelis-Menten à deux niveaux d'affinité décrivant l'absorption du phosphate est la suivante :

$$\frac{\partial Pi}{\partial t} = -\left(V_{\max,I} \bullet \frac{Pi}{K_{m,I} + Pi} + V_{\max,II} \bullet \frac{Pi}{K_{m,II} + Pi} \right) \qquad (2.1)$$

où Pi est la concentration extracellulaire en ion phosphate inorganique. L'indice I réfère à un système de transport de haute affinité et l'indice II réfère à un système de transport de basse affinité pour le Pi. Le système de transport de haute affinité (K_m autour du µM) entre en fonction lorsque la concentration en Pi est faible dans le milieu de culture, tandis qu'un système de transport de basse affinité intervient lorsque la concentration en Pi extracellulaire est élevée (K_m autour de 500 µM) (Leggett et al., 1965).

Les valeurs des constantes d'absorption pour le transport du Pi sont très variables; elles dépendent de l'état physiologique des cellules (âge, état nutritionnel), ainsi que de l'espèce végétale. Elles sont également influencées par les conditions du milieu de culture, telles que la lumière, la température (Clarkson, 1985) et le pH (Lowendorf et

al., 1974). Les conditions du milieu de culture contenant les cellules avant l'inoculation, c'est-à-dire le transfert des racines dans un milieu frais, dont les concentrations sont connues, peuvent également influencer les constantes d'absorption. Il apparaît, en effet, que les racines ayant vécu dans un milieu limitant en phosphate peuvent absorber le phosphate plus rapidement lorsqu'il est disponible par la suite (Lee, 1982). Enfin, pour une plante entière, le ratio plantule/racine influence l'intensité de la demande en nutriments et, conséquemment, la valeur des V_{max} (Clarkson, 1985). Étant donné la multitude de facteurs influençant les paramètres d'absorption, il est très difficile de les comparer entre eux. Les valeurs obtenues pour différentes espèces sont présentées dans le tableau 2.1.

Une fois dans le cytoplasme, le phosphate peut être utilisé pour les activités métaboliques, la division cellulaire ou encore être stocké dans la vacuole lorsque sa concentration est suffisante. Le transfert du Pi entre le cytoplasme et la vacuole implique des paramètres thermodynamiques différents de ceux qui s'appliquent lors du transport du Pi entre le milieu de culture et le cytoplasme. Ceci s'explique par le fait que les concentrations impliquées dans le premier cas sont de l'ordre des mM comparativement à des µM dans le sol. Étant donné le gradient négatif de la vacuole par rapport au cytoplasme, le transfert du Pi ne nécessite pas d'apport énergétique (Schachtman et al., 1998). Le phosphate peut donc être stocké directement dans la vacuole et être utilisé lorsqu'il est requis: le Pi est alors transporté de la vacuole au cytoplasme sans transformation subséquente, mais en impliquant un apport énergétique.

Tableau 2.1 : Paramètres d'absorption pour l'assimilation du phosphate par différentes espèces végétales.

Espèces	$K_{m,II}$ mM	$V_{max,II}$ mmol•g^{-1}DW•d^{-1}	$K_{m,I}$ mM	$V_{max,I}$ mmol•g^{-1}DW•d^{-1}
Racines transformées :				
Daucus carota [a]	0.019	2.00	0.0076	0.0019
Plantes :				
Lycopersicon esculentum [b]	0.042	0.06048	0.0039	0.02448
Lycopersicon esculentum [c]	0.042	0.0576	0.0016	0.024
Milium sp. [b]	0.960	1.648	0.0035	0.262
Hordeum vulgare [b]	0.900	0.576	0.008	0.1569
Hordeum vulgare [d]	0.0066	0.06168		
Medicago sativa [b]	0.940	0.2606	0.0027	0.02448
Stylosanthes humilis [b]	0.303	0.545	0.0061	0.488
Champignons :				
Neurospora crassa [b]	0.37	9.11	0.00243	3.355
Neurospora crassa [e]	1.0	4.896	0.35	0.462
Glomus intraradices [a]	12	0.06	0.001	0.0028

[a] Jolicoeur, 1998

[b] Beever et Burns, 1980a

[c] Cress et al., 1979

[d] Lee, 1982

[e] Bieleski et Ferguson, 1983

2.2.4. Compartimentation intracellulaire du phosphate

La compartimentation a été définie par Oaks et Bidwell (1970) comme étant l'isolation métabolique de différentes portions d'un nutriment par une séparation physique ou non dans les organelles des cellules. L'analyse de différentes organelles a, en effet, révélé des discontinuités en concentration et en composition dans les différentes organelles. La compartimentation a ainsi été observée pour les glucides, les acides aminés et le phosphate (Bieleski, 1973). L'utilisation de phosphate radioactif (^{32}Pi) sur l'algue *Nitella sp.* a permis de compartimenter le Pi et le P-ester : les expériences de Smith (1966) ont montré que 90 % des P-esters se trouvaient dans le cytoplasme alors que la plus grande partie du Pi se trouvait dans la vacuole.

D'après les observations de Bieleski (1973), le Pi peut être séparé en deux bassins principaux : métabolique et non-métabolique. Le bassin métabolique contient le phosphate cytoplasmique tandis que le bassin non-métabolique fait référence au phosphate contenu dans la vacuole. Le phosphate cytoplasmique joue, en effet, un rôle central au niveau du métabolisme, du contrôle de sa concentration à titre de réactif biochimique et du mouvement avec le bassin vacuolaire (Lee, 1982). Le bassin vacuolaire, quant à lui, agit comme un tampon aux fluctuations cytoplasmiques résultant des variations environnementales de Pi. Lors d'une carence en Pi extracellulaire, le Pi vacuolaire est libéré dans le cytoplasme en réponse à la sévérité du manque en phosphate (Plaxton, 1998). Selon certaines études, la perméabilité de la membrane de la vacuole est relativement faible, mais elle augmente de façon appréciable lors d'une carence en Pi extracellulaire (Mimura, 1995).

2.2.4.1. Bassin cytoplasmique de phosphate

La concentration en Pi cytoplasmique a été observée comme étant maintenue autour de 5-10 mM, sauf dans le cas où la concentration extracellulaire en phosphate est très faible et qu'aucun stock ne peut être constitué (Schachtman et al., 1998). Même lorsque la cellule est cultivée *in vitro* dans des conditions limitantes en Pi, une partie du Pi est nécessaire dans le bassin cytoplasmique pour le fonctionnement normal des activités métaboliques. Lorsque la concentration en Pi dans le cytoplasme ne peut être maintenue à cause d'une limitation en Pi extracellulaire, le métabolisme est significativement affecté et la croissance est réduite (Clarkson, 1985).

2.2.4.2. Bassin vacuolaire de phosphate

La concentration en phosphate vacuolaire varie en fonction de la concentration en phosphate extracellulaire. Lorsque les racines se retrouvent dans un milieu sans phosphate, la vacuole se vide graduellement de son Pi, alors que la concentration en phosphate cytoplasmique varie très peu (Lee et Ratcliffe, 1983). La concentration maximale en Pi vacuolaire observée dépasse rarement 25 mM (Lee et al., 1990) tandis que des valeurs entre 25 et 35 mM se sont avérées être toxiques pour les cellules (Bieleski et Fergusson, 1983).

2.3. ABSORPTION DE L'AZOTE PAR LES RACINES

2.3.1. Fonctions de l'azote

L'azote est très important pour les cellules étant donné qu'il est impliqué dans plusieurs réactions enzymatiques et qu'il est essentiel pour la production de composants

cellulaires tels que les acides aminés, les protéines et les nucléotides (Needham, 1965 cité par Clarkson et Hanson, 1980).

La croissance semble être directement reliée à la concentration en nitrate présente dans le milieu ; il a en effet été observé dans le cas des cellules de *Panax ginseng* (Liu et Zhong, 1997) qu'elle a augmenté de façon significative lorsque la concentration extérieure en NO_3^- augmente de 0 à plus de 5 mM. Toutefois, lorsque la concentration en nitrate augmente au-delà de 10 mM jusqu'à 60 mM environ, la croissance n'a pas augmenté de façon significative. Finalement, une concentration en nitrate supérieure à 80 mM a montré des signes d'inhibition de la croissance pour les mêmes cellules.

2.3.2. Disponibilité de l'azote

L'azote est présent dans l'environnement sous différentes formes telles que le NO_3^-, le NH_4^+ et le N_2. Il peut également être présent sous forme organique telle que l'urée et les acides aminés. L'azote est généralement absorbé par les cellules sous forme de nitrate, même si l'ammonium est la forme sous laquelle le mécanisme cellulaire requiert le moins d'énergie (Bloom et al., 1992). En effet, l'absorption du NH_4^+, se faisant par diffusion facilitée selon un gradient électrochimique, est plus rapide que l'absorption du NO_3^- (Ullrich, 1992). De surcroît, une fois absorbé, le nitrate doit être transformé en ammonium pour être utilisé, tel que décrit par les réactions suivantes :

$$NAD(P)H + H^+ + NO_3^- \rightarrow NAD(P)^+ + NO_2^- + H_2O$$

Cette réaction se produit par l'action de l'enzyme nitrate réductase (NR). Le NO_2^- est ensuite transformé en NH_3 grâce à l'enzyme nitrite réductase (NiR) (Hewitt et al., 1975) :

$$NO_2^- + 6\,\acute{e} + 6\,H^+ \rightarrow NH_3 + H_2O + OH^-$$

Le NH_3 est ensuite utilisé via le cycle de la glutamine synthétase/glutamate synthétase (Ivashikina et Sokolow, 1997); il est également transformé en acides aminés nécessaires à la croissance.

L'absorption du NH_4^+, quant à lui, se fait par diffusion facilitée: une fois dans le cytoplasme, le NH_4^+ se dissocie partiellement en NH_3 et H^+ (figure 2.1). Le NH_3, un gaz hydrophobe, peut ressortir de la cellule vers le milieu extérieur par diffusion passive, étant donné la perméabilité de la membrane au NH_3, tandis qu'un proton demeure à l'intérieur (Pillbeam et Kirkby, 1992). Ainsi, à l'extérieur de la cellule, le NH_3 s'associe à nouveau à un ion H^+ pour former le NH_4^+ et lequel pénètre une fois de plus dans la cellule. Une grande quantité de protons sont ainsi acheminés dans le cytoplasme. Or, la cellule consomme une grande quantité d'énergie sous forme d'ATP pour extraire les ions H^+ de son métabolisme afin de maintenir son pH physiologique. Ce phénomène entraîne donc une toxicité associée à l'absorption du NH_4^+ (Cox et Reisenauer, 1973). Toutefois, malgré l'effet toxique associé au NH_4^+, il est indispensable à la croissance des plantes. Bien qu'il soit possible pour les racines de pousser en l'absence du NH_4^+, le taux de croissance est alors plus faible (Pillbeam et Kirkby, 1992).

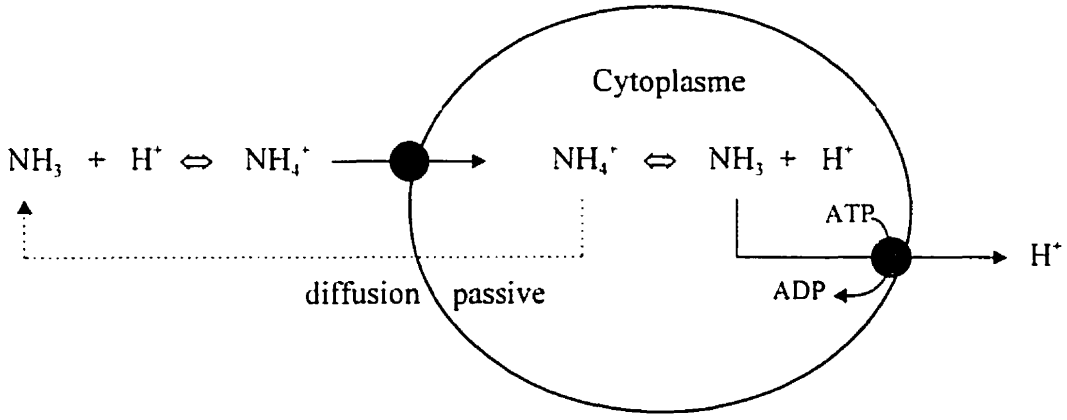

Figure 2.1 : Schéma du déplacement de NH_4^+ à travers la membrane plasmique.

2.3.3. Transport transmembranaire d'azote

Étant donné que la concentration en nitrate peut varier de trois à quatre ordres de magnitude (µM à mM) dans leur environnement, les plantes ont développé un système de transport actif comportant deux niveaux d'affinité de transporteurs : haute et basse affinité (Crawford et Glass, 1998). Le système de transport de basse affinité du nitrate est utilisé pour les besoins primaires des cellules tels que la production de métabolites ; il est moins sensible aux inhibiteurs métaboliques que le système de haute affinité (Glass et al., 1990).

Le transport de l'ion NO_3^- de basse et haute affinité se fait simultanément au co-transport de deux protons pour contrebalancer les charges à la suite de la dépolarisation de la membrane et du gradient de protons (Miller et Smith, 1996). Certaines expériences réalisées sur des graines de *Citroncirus webberi* cv Troyer et de *Citrus*

reticulata cv Cleopatra ont démontré que le système de transport du nitrate de basse affinité s'appliquait jusqu'à des concentrations de 1 mM (Cerezo et al., 1997) en dessous desquelles le transport de haute affinité interviendrait.

Les valeurs des constantes d'absorption varient considérablement d'un système à l'autre et selon les espèces dans le cas de l'azote tout comme dans le cas du phosphate. Le tableau 2.2 présente les valeurs des constantes d'affinité et les taux d'absorption pour différentes espèces.

Tableau 2.2 : Constantes d'absorption pour l'assimilation de l'azote par différentes espèces végétales.

Espèce	$K_{m,II}$ mM	$V_{max,II}$ mmol•g^{-1}DW•d^{-1}	$K_{m,I}$ mM	$V_{max,I}$ mmol•g^{-1}DW•d^{-1}
Citrus reticulata cv Cleopatra [a]			0.281	0.0648
Phaseolus vulgaris [b]	0.9-1.17	0.115-0.139	0.005-0.015	0.089-0.112
Arabidopsis thaliana [c]	0.5		0.005-0.2	
Zea mays [d]	0.02-0.1	0.72-1.92	0.006-0.02	0.072-0.1968

[a] Cerezo et al. 1997

[b] Breteler et Nissen, 1982

[c] Filleur et Daniel-Vedele, 1999

[d] Crawford et Glass, 1998

La concentration en azote cytoplasmique est maintenue relativement constante par l'échange d'ions entre l'influx, l'efflux et le transport via le xylème ou la vacuole (Crawford et Glass, 1998). Le nitrate absorbé dans l'épiderme des racines est dirigé selon quatre voies principales :

1. Réduction du NO_3^- en NO_2^- par des enzymes de nitrate réductase dans le cytoplasme;
2. Transformation du NO_3^- en efflux vers l'extérieur de la membrane plasmique;
3. Stockage dans la vacuole;
4. Transport via le xylème pour une translocation vers d'autres cellules.

2.3.4. Compartimentation intracellulaire de l'azote

La compartimentation de l'azote a été définie de la même façon que pour le phosphate par Oaks et Bidwell (1970). L'azote radioactif ($^{15}NO_3^-$) a été utilisé sur des cellules de carotte afin de compartimenter les composés azotés, particulièrement les acides aminés, entre l'espace cytoplasmique et vacuolaire (Cooke et al., 1992). Ces études ont également permis d'observer l'accumulation de l'azote sous forme d'acides aminés dans la vacuole.

2.3.4.1. Bassin cytoplasmique d'azote

D'après les expériences de Miller et Smith (1996), la concentration en azote cytoplasmique est maintenue autour de 10-35 mM, sauf dans le cas où la concentration en azote extérieur est très faible. L'azote cytoplasmique serait alors réduit en dessous du seuil de détection.

2.3.4.2. Bassin vacuolaire d'azote

L'accumulation de nitrate libre intracellulaire est reliée à la concentration en nitrate extracellulaire. D'après les expériences réalisées sur les racines de céréales (Miller et Smith, 1996 cité par Crawford et Glass, 1998), il a été observé que lorsque le nitrate est alimenté en quantité illimitée, la concentration d'azote vacuolaire peut atteindre jusqu'à 100 mM. Toutefois, l'accumulation de nitrate varie substantiellement selon l'espèce, les saisons, le climat, le statut nutritionnel, l'âge de la plante ou l'étape du développement.

L'accumulation vacuolaire de nitrite est très rare (Ivashikina et Sokolov, 1997), étant donné qu'il n'est qu'une étape intermédiaire de la nitrate réductase limitée par le taux de réaction du nitrite. La présence du NO_2^- serait plutôt le résultat de problèmes métaboliques étant donné qu'il est toxique pour les plantes (Beever et Burns, 1980a). Le NH_4^+, quant à lui, est généralement présent en faible concentration dans la vacuole ; l'accumulation de NH_4^+ est, en effet, très rare peu importe qu'il soit absorbé directement sous forme de NH_4^+ ou de NO_3^- (Salisbury et Ross, 1992).

2.4. *RÉACTIONS DES PLANTES FACE À DES LIMITATIONS NUTRITIONNELLES*

Tel que décrit précédemment, les plantes se retrouvent très fréquemment en conditions nutritionnelles limitantes. Elles ont ainsi développé plusieurs adaptations physiologiques et morphologiques pour pallier le manque de disponibilité des nutriments dans le sol et assurer leur survie à long terme (Theodorou et Plaxton, 1993).

Une ou plusieurs adaptations parmi les suivantes peuvent survenir :

1. Modification du taux de croissance pour s'ajuster au taux d'absorption des nutriments;
2. Acquisition plus efficace des nutriments;
3. Utilisation interne plus efficace des nutriments.

En plus d'entraîner des adaptations aux niveaux physiologiques et morphologiques, une déficience en nutriments induit normalement un métabolisme secondaire et favorise une association symbiotique avec un autre micro-organisme.

2.4.1. Adaptations physiologiques

La première réaction des plantes à une réduction de la quantité de nutriments disponibles est de puiser dans leurs réserves. Toutefois, en général, la quantité de nutriments accumulés ne suffit pas à subvenir aux besoins des cellules pour maintenir une activité métabolique normale à long terme. Par conséquent, les cellules ont développé d'autres adaptations.

Il a été observé dans le cas du phosphate et de l'azote, que les cellules peuvent augmenter l'efficacité de l'absorption des nutriments en améliorant l'affinité (K_m) (Lee, 1982) et le taux d'absorption (V_{max}) (Siddiqi et al., 1990). La précision des variations n'est pas encore claire: certaines expériences montrent que le V_{max} augmente et que le K_m demeure stable (Clarskon, 1985) alors que d'autres ont observé une diminution de V_{max} et K_m (Siddiqi et al., 1990). Une augmentation de l'affinité (réduction de K_m) et de la vitesse d'absorption a également été observée par Ivashikina et Sokolov (1997).

Par ailleurs, lorsque les racines sont transférées d'un milieu riche à un milieu pauvre, les cellules perdent rapidement leur réserve étant donné que l'efflux vers le milieu extérieur se poursuit au même taux que dans le milieu riche. Il est donc avantageux pour les cellules de s'adapter rapidement aux changements de concentrations extracellulaires afin de limiter la perte de nutriments par l'efflux (Clarkson, 1985). La réduction de la perméabilité de la membrane et la modification des constantes d'absorption ont lieu avant même que la croissance ne soit affectée, ce qui permet aux cellules de maintenir leurs activités métaboliques pour un certain temps (Drew et Saker, 1984).

Le phosphate étant très important pour les plantes, plusieurs adaptations visent à le rendre disponible. En effet, certaines espèces ont la capacité d'acidifier leur environnement simplement en extrudant des protons ou des acides organiques afin de compenser pour l'absorption des cations lors de l'absorption des anions. Le pH est alors réduit aux alentours de la surface de la racine, ce qui permet d'augmenter la solubilité du Pi et sa disponibilité pour les racines (Clarkson, 1985). Une augmentation de la production des enzymes phosphatases a également été observée à la suite d'une limitation en phosphate (Plaxton, 1998). La quantité de phosphatases étant plus élevée dans les milieux intracellulaire et membranaire, elles sont acheminées vers le milieu extracellulaire où le Pi y est rendu disponible par l'hydrolyse des P-esters.

En dernier recours, lorsque les plantes se retrouvent en stress sévère, elles peuvent libérer une quantité importante de Pi en dégradant leur ARN pour survivre temporairement (Plaxton, 1998). Par exemple, les quantités de CTP, ATP, HTP, et UTP ont été réduites de 70% à 80% dans des suspensions de cellules de *Catharanthus roseus* (Theodorou et Plaxton, 1993) et les niveaux d'ATP et d'ADP ont été réduits de

plus de 75% dans une suspension de cellules de *Brassica nigra* pauvres en Pi (Duff et al., 1989).

2.4.2. Adaptations morphologiques de la plante

Une déficience en nutriments entraîne généralement une redistribution de la croissance au niveau de diverses parties de la plante et des racines. Par exemple dans le cas d'une plante entière, la croissance des racines est avantagée par rapport à la croissance aérienne, afin d'explorer un plus grand volume de sol. Dans le cas des racines transformées, l'allongement des poils absorbants est favorisé pour augmenter la surface d'absorption des nutriments (Newsham, 1995). Lorsque les racines sont longues et fines, elles possèdent une aire de contact beaucoup plus grande par rapport au volume, ce qui leur permet de puiser davantage de nutriments (Bouldin, 1961). Toutefois, cet avantage est limité par le fait que les racines se compétitionnent elles-mêmes pour les mêmes nutriments (Nye, 1966).

2.4.3. Induction du métabolisme secondaire

Outre certaines adaptations directes au niveau physiologique et morphologique des racines de plante, plusieurs études ont démontré qu'un manque en nutriments peut faire intervenir un métabolisme secondaire au niveau de la plante, impliquant la production de métabolites secondaires.

Les métabolites secondaires sont des molécules complexes formées de plusieurs cycles benzéniques naturellement synthétisées par divers types de cellules (champignons, cellules végétales et animales) en réponse à un stress environnemental (nutrition, température, lumière, etc.) ou au contact d'un agent pathogène (Rokem et Goldberg,

1985). L'accumulation de métabolites secondaires aromatiques incluant les anthocyanes, les flavonoïdes et les alcaloïdes indoliques a ainsi été observée pour plusieurs espèces (Knobloch, 1982).

L'approvisionnement de ces molécules végétales à partir des plantes en conditions naturelles est souvent limité par plusieurs problèmes tels que la susceptibilité de la production aux instabilités environnementales et climatiques (Kurz, 1989). La complexité des structures moléculaires limite la rentabilité de procédés de synthèse par chimie fine. De plus, le peu de connaissances au niveau des processus biologiques impliqués nuit au développement à grande échelle de bioprocédés utilisant des micro-organismes ou des cellules (Toivonen, 1993). La culture de cellules végétales *in vitro* offre une approche alternative intéressante puisque la plante source possède une longue période de culture ainsi qu'un faible rendement en métabolite (Kieran et al., 1997). La culture de cellules *in vitro* permet de produire des métabolites sous des conditions contrôlées et reproductibles indépendantes des facteurs géographiques et climatiques.

Étant donné que la production de métabolites secondaires est reliée à l'état nutritionnel des cellules, des connaissances approfondies en nutrition cellulaire seront bénéfiques pour l'optimisation de la production de métabolites secondaires.

2.4.4. Établissement d'une symbiose avec des champignons endomycorhiziens

Une limitation en nutriments au niveau des racines de la plupart des espèces végétales favorise leur colonisation par des champignons endomycorhiziens. Ces derniers sont des organismes vivant en symbiose obligatoire avec des plantes.

L'association entre le champignon et la racine est bénéfique pour cette dernière étant donné que le champignon augmente l'absorption nette en nutriments au niveau de la racine par translocation. Ceci peut être accompli soit en augmentant l'aire d'échange avec le sol grâce aux hyphes du champignons qui se prolongent dans le sol, soit en mobilisant certaines sources de nutriments ou en excrétant des composés chélatants (Marshner et Dell, 1994). Les champignons endomycorhiziens ont la capacité d'absorber le Pi du sol sous certaines formes organiques qui ne sont pas disponibles directement pour les racines (Marshner et Dell, 1994). Les hyphes peuvent produire des phosphatases extracellulaires au niveau de la surface des racines mycorhizées qui catalysent la libération de complexes organiques phosphatés dans le sol (Bethlenfalvay et al., 1991).

Les champignons endomycorhiziens possèdent un mécanisme d'accumulation plus efficace avec une affinité plus grande que les racines normales: ils peuvent donc absorber le Pi jusqu'à une concentration plus faible que les racines (Bieleski, 1973). En effet, il a été observé pour la tomate mycorhizée que le champignon possède une constante de haute affinité plus faible ($K_m \approx 1.6$ µM) que les racines de cette plante non mycorhizée ($K_m \approx 3.9$ µM) pour des concentrations dans le sol allant de 1 à 20 µM (Cress et al., 1979). Au-delà de cette valeur, les deux K_m sont semblables, ce qui implique que les champignons endomycorhiziens sont plus efficaces pour absorber le Pi que les racines lorsqu'il est présent en faible concentration (haute affinité) et qu'à basse affinité, les racines ne tirent pas beaucoup d'avantages à la symbiose.

L'effet bénéfique des champignons endomycorhiziens est plus remarquable au niveau du Pi, bien qu'il arrive parfois que l'absorption d'autres nutriments peut également augmenter chez l'hôte (Marshner et Dell, 1994). Par exemple, le champignon peut absorber le nitrate dans le sol et en fournir à la plante par translocation (Sanders, 1983).

Cet avantage se manifeste lorsque la consommation est limitée par le taux de diffusion de l'ion dans le sol. Le nitrate est très mobile tandis que l'ion ammonium, qui est dominant dans les sols acides, est fortement adsorbé par le sol et il diffuse plus lentement. Enfin, des augmentations de l'absorption du zinc, du manganèse et du cuivre grâce à la mycorhization ont également été démontrées (George et al., 1995; Raven et al., 1971).

Les champignons endomycorhiziens peuvent également contribuer à l'augmentation de la résistance aux métaux lourds toxiques tels que le Cd et le Zn. Ils améliorent également la résistance ou altèrent les interactions des plantes contre certains pathogènes (St-Arnaud, 1994). Ils participent aussi à l'amélioration de l'absorption de l'eau (Davies et al., 1993), ce qui est particulièrement important lorsque les plantes vivent en milieux très secs. Les champignons peuvent donc agir en tant qu'engrais biologique permettant de réduire l'utilisation d'engrais et de pesticides chimiques, tout en améliorant la structure des sols (Tisdall et Oades, 1979). L'association entre les champignons et les racines est avantageuse par rapport à la fertilisation puisqu'une fois établie, elle peut durer pour tout le reste de la vie de la plante (Bethlenfalvay, 1992).

Étant donné la relation symbiotique obligatoire entre le champignon et la plante, il est primordial d'avoir un système modèle bien connu pour pouvoir étudier le comportement des champignons endomycorhiziens.

2.5. MODÉLISATION DE LA CROISSANCE ET DE LA NUTRITION

La modélisation constitue un outil précieux pour améliorer la compréhension des procédés de production de cellules vivantes et pour optimiser les conditions du milieu

de culture (Toda et Yabe, 1979). Elle peut également être utilisée dans le but d'estimer les paramètres biocinétiques propres à une espèce de micro-organismes ou de cellules en culture *in vitro* (Grm et al., 1980).

La croissance des cellules est l'un des phénomènes les plus importants à modéliser étant donné que pratiquement tous les autres comportements cellulaires y sont directement ou indirectement liés. Pour ce faire, différentes approches ont été développées telles que l'utilisation de cinétiques linéaires (Taya et al., 1989a) ou cubiques (Tough et al., 1995) basées sur des caractéristiques physiologiques. Une cinétique de croissance suivant une fonction linéaire a été utilisée par Taya et al., (1989a) pour décrire la croissance de racines de plante par l'allongement des ramifications, où chacune d'elles se développe selon un taux de croissance linéaire. La longueur et le diamètre des ramifications sont alors considérés, de même que le délai avant la formation d'une nouvelle ramification. Une cinétique de croissance selon une fonction cubique a été utilisée par Tough et al. (1995) pour décrire la croissance de pelotes sphériques de mycélium de champignons. La densité, le rayon et le nombre de sphères sont alors considérés. Une des principales limitations de ce modèle est de ne pas tenir compte des effets du transfert de masse et des concentrations extracellulaires en substrat sur la croissance (Tough et al., 1995).

La croissance a également été représentée par des cinétiques faisant intervenir les concentrations en nutriments limitants, généralement le phosphate ou le nitrate. Par exemple, la croissance des cellules de l'*Acer pseudoplatanus* L. a été modélisée par King (1977) en utilisant une cinétique de croissance exponentielle d'après l'équation de Michaelis-Menten. La cinétique de croissance tient alors compte des variations de concentrations en substrats contenus dans le milieu de culture et contrôlant la réaction (croissance). La forme de ces modèles est la suivante :

Bilan sur les cellules :

$$\frac{dX}{dt} = \mu \bullet X \tag{2.2}$$

où, selon Michaelis-Menten :

$$\mu = \mu_{\max} \bullet \frac{S}{K_s + S} \tag{2.3}$$

Bilan sur le substrat limitant :

$$\frac{dS}{dt} = -\mu \bullet \frac{X}{Y_{x/s}} \tag{2.4}$$

où S représente la concentration d'un substrat dans le milieu de culture et Y_{xs} représente le rendement de la biomasse par rapport à ce substrat.

De tels modèles sont dits non structurés étant donné qu'ils ne considèrent aucune différenciation entre les cellules (morphologie, âge, stade de développement, etc.) ou à l'intérieur des cellules (composition). Les cellules, X, sont considérées homogènes en tous points. Par conséquent, les modèles non structurés ne permettent pas d'améliorer la compréhension des phénomènes biologiques tel que peuvent le faire des modèles structurés. Les modèles structurés permettent de caractériser la biomasse, soit en considérant des grosseurs ou des âges de cellules différents, soit en considérant des effets phénoménologiques tels que la compartimentation des nutriments dans les cellules.

Dans cet ordre d'idées, différents modèles structurés ont été développés. Étant donné que certains nutriments sont accumulés dans les cellules, la croissance peut se poursuivre même après la disparition de ces nutriments du milieu de culture; il est donc plus logique que l'expression du taux de croissance spécifique dépende de la quantité de nutriments à l'intérieur des cellules (Nyholm, 1976). L'utilisation de la relation de Teissier (Toda et Yabe, 1979; Pazoutova et al., 1981) est donc préconisée pour décrire le taux de croissance spécifique puisqu'elle fait intervenir les concentrations intracellulaires en nutriments.

Afin de déterminer les concentrations intracellulaires en nutriments, les taux d'absorption des nutriments à l'intérieur des cellules doivent être décrits. Une approche mécanistique permet de décrire l'absorption d'un nutriment en une succession d'étapes : entrée du nutriment dans la cellule; assimilation s'il y a lieu et enfin, transport dans la cellule et utilisation au niveau du métabolisme (Le Bot et al., 1998). Une telle approche permet d'expliquer les facteurs affectant l'absorption de nutriments au niveau cellulaire et moléculaire.

L'absorption de nutriments a été décrite par des approches empiriques : par exemple, l'absorption du phosphate estimée d'après la capacité tampon du sol, celle-ci étant définie par le ratio entre les variations de P solide et en solution dans le sol (Barber et Silberbush, 1984). Une autre approche a également été considérée où le phosphate contenu dans le sol est divisé en fractions inorganiques et organiques, chacune d'elles étant déterminée par des constantes d'absorption de premier ordre évaluées de façon empirique (Jones et al., 1984). Enfin, Grant et Robertson (1997) ont estimé l'absorption du phosphate comme étant contrôlée par les concentrations en orthophosphate soluble à la surface des racines. La longueur des racines dans un volume donné doit alors être mesurée, ainsi que la concentration en phosphate

cellulaire. Cette approche semble intéressante dans le contexte de racines de plante cultivées en bioréacteur.

L'absorption des nutriments par les cellules peut également être représentée par une cinétique de Michaelis-Menten (Cress et al., 1979). Cette relation décrit l'absorption d'un nutriment en fonction de la concentration extracellulaire, de la vitesse maximale d'absorption (V_{max}) et de constantes d'affinité (K_m) pour les transporteurs protéiques relatifs à un nutriment en particulier. L'absorption d'un nutriment peut présenter un ou plusieurs niveaux d'affinité de transporteurs, selon les espèces et les nutriments impliqués (Schachtman et al., 1998).

Une telle cinétique d'absorption a été utilisée par Jolicoeur (1998) dans un modèle biocinétique structuré développé pour des racines de carotte transformées seules ou en symbiose avec des champignons endomycorhiziens. La croissance est alors représentée par une cinétique exponentielle avec un taux de croissance spécifique de type Teissier qui est fonction des concentrations intracellulaires en phosphate et en glucides, ainsi que de la concentration extracellulaire en azote. L'accumulation de phosphate et de glucides y est décrite et alimente la gestion de la croissance. L'absorption du phosphate est régie par une cinétique de Michaelis-Menten à double niveau d'affinité face aux transporteurs. L'absorption des glucides est représentée par une cinétique à un seul niveau d'affinité. Enfin, l'absorption du nitrate se produit selon une cinétique de Michaelis-Menten sans accumulation. Un tel modèle a permis de décrire adéquatement la croissance de racines en tenant compte des paramètres intracellulaires, ce qui permet d'améliorer la compréhension des phénomènes cellulaires.

Étant donné sa structure, ce modèle permet de tester la validité d'hypothèses posées, par exemple sur la compartimentation des nutriments dans les cellules, les cinétiques

d'efflux et d'influx, ainsi que d'autres phénomènes biologiques. Il peut également être adapté pour décrire des dynamiques de nutrition et de croissance des cellules selon divers modes de culture (cuvée, semi-continu) ou divers types de tissus (racines, cellules en suspension, cals, embryons, etc.). Enfin, il est possible d'inclure des bilans supplémentaires impliquant des voies métaboliques.

Ce modèle a donc été le point de départ de ces travaux de maîtrise étant donné que sa structure est simple et flexible et qu'il nécessite des suivis au niveau de la biomasse et des nutriments qui peuvent être obtenus en utilisant des techniques d'analyse simples. Plusieurs modifications ont toutefois été apportées à la structure de base étant donné qu'il présente plusieurs limites par exemple l'accumulation de nutriments azotés qui n'a pas été considérée.

CHAPITRE TROIS

NUTRITIONAL DYNAMIC OF DAUCUS CAROTA HAIRY ROOTS

INTRODUCTION

Ce chapitre présente les dynamiques d'absorption et de croissance des racines transformées de carotte cultivées *in vitro* sous différentes conditions environnementales. La compartimentation du phosphate et de l'azote, deux nutriments très importants pour les cellules, a également été étudiée.

Deux séries de cultures ont été réalisées avec des racines transformées cultivées dans un milieu limitant en cuvée d'une part et dans un milieu enrichi alimenté en semi-continu d'autre part. Il apparaît que les concentrations extracellulaires en phosphate et en azote influencent significativement le taux de croissance. En effet, le taux de croissance obtenu pour les racines cultivées en milieu limitant a été de $0.0705 \pm 0.004\ d^{-1}$ alors qu'un taux de croissance de $0.174 \pm 0.006\ d^{-1}$ a été observé pour les racines cultivées en milieu non limitant.

Des analyses élémentaires et intracellulaires ont été réalisées sur les racines, lesquelles ont permis de distinguer quatre bassins pour le phosphate et pour l'azote dans les cellules. Le premier bassin regroupe les quantités minimales en nutriments pour que les cellules puissent exister en excluant toutes les autres sources de nutriments stockés ou libres. Le contenu de ce bassin ne varie pas durant la culture. Le deuxième bassin regroupe les nutriments contenus dans les métabolites, sans distinction entre les formes sous lesquelles ils se présentent. Enfin, les troisième et quatrième bassins contiennent le phosphate ou l'azote sous formes libres dans le cytoplasme et la vacuole

respectivement sans distinction entre les deux étant donné les techniques d'analyse disponibles.

Les racines utilisées provenaient de milieux appauvris en phosphate et azote; le contenu des bassins étaient alors à leur limite inférieure. Lorsque les racines ont été transférées dans le milieu de culture plus riche, une période de latence importante a été observée. Durant cette période, les racines ont regarni les bassins de nutriments libres et métaboliques et jusqu'à l'atteinte de conditions nutritionnelles favorables. Ensuite, l'absorption du phosphate et de l'azote s'est poursuivie jusqu'à ce que les limites de saturation soient atteintes.

La capacité maximale d'accumulation des cellules a été de 0.23 ± 0.015 mmol Pi • g^{-1}DW et de 1.20 ± 0.03 mmol N • g^{-1}DW pour les bassins de phosphate et d'azote libres respectivement. Enfin, les concentrations en phosphate et en azote totaux dans les cellules ont alors été de 0.286 ± 0.008 mmol Pi • g^{-1}DW et de 3.71 ± 0.04 mmol N • g^{-1}DW.

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

NUTRITIONAL DYNAMIC OF *DAUCUS CAROTA* HAIRY ROOTS

Edith Bouchard-Marchand, Michel Perrier, Mario Jolicoeur *

BIOPRO R&D Center, Department of Chemical Engineering, École Polytechnique, P.O. Box 6079, Centre-ville Station, Montréal, Québec, Canada, H3C 3A7.

Running title: Nutritional Dynamic of *Daucus carota* hairy roots

***Corresponding Author**
Tel: 514-340-4711 ext. 4525
Fax: 514-340-4159
e-mail: mario.jolicoeur@ polymtl.ca

3.1 FINANCIAL SUPPORT

The Natural Science and Engineering Research Council of Canada provided scholarship to É. Bouchard-Marchand.

3.2 ABSTRACT

The objective of this work was to study the relationship between nutritional and growth behaviors of *Daucus carota* transformed roots. A minimal medium was used with variations in the initial concentrations of inorganic phosphate (Pi) and nitrate. Total

cellular and free intracellular analysis have been performed to assess the phosphorus, Pi and nitrogen contents within the available and non-available pools along the cultures. The growth rate of the roots was about 2 times lower in batch cultures compared to semi-continuous cultures where Pi and nitrate were maintained above zero. The maximum growth rate measured was of 0.174 ± 0.006 d^{-1} and the maximum Pi and N contents were of 0.286 ± 0.008 mmol Pi • g^{-1}DW and 3.71 ± 0.04 mmol N • g^{-1}DW respectively. Their storage compartmentation dynamics, their maximum free (Pi, NO_3^-, NO_2^-, NH_4^+) and non-free (phosphorus and nitrogen) contents of the cell have been evaluated. Free intracellular and total cellular analysis have suggested the presence of four distinct pools of Pi and N: the minimal amount of Pi or N required by a cell to maintain structural integrity, the free cytosolic and vacuolar Pi or N and finally, the non-free Pi and N pools considered to be some functional compounds.

3.3 KEY WORDS

Daucus carota, hairy root, nutrition, phosphate, nitrate, intracellular compartmentation.

3.4 INTRODUCTION

The use of *in vitro* plant cell and tissue cultures has been proposed for many decades as an attractive alternative to produce molecules of high therapeutic interest. Various approaches were developed, such as suspension cells, hairy roots, embryo and callus cultures (Flores, 1986). However, each of these approaches has shown variable specific yields which also differ with the culture approach, plant tissue origin and species. An important amount of work has been done on the development of scalable *in vitro* culture technologies with novel bioreactor configurations that are able to handle the highly non-newtonian shear-thinning behavior, the shear sensitivity of suspension cells (Doran, 1999; Jolicoeur et al., 1992; Tanaka et al., 1983) and the fragility of plant

tissues such as for hairy roots (Ramakrishnan et al., 1994; Dilorio et al., 1992; Hilton and Rhodes, 1990). Despite the development of highly efficient (in terms of mixing, mass transfer and low shear stress) culture technologies, the little industrial success obtained so far, to our knowledge, is mainly attributed to the low specific productivity of plant cells and tissues as compared to field cultures (Verpoorte et al., 1993; Hamill et al., 1987).

The use of elicitors such as chitin and jasmonic acid has been shown to enhance significantly the production yield of secondary metabolites for *in vitro* cultures of suspension cells (Gundlach et al., 1992) and for hairy roots (Singh et al., 1998; Toivonen, 1993) by inducing natural plant defence response against pathogens (Melan et al., 1993). Many culture parameters are presented in literature as critical parameters for optimal elicitation process: the time after inoculation when plant cells and hairy roots taken from batch cultures should be elicited (Rijhwani and Shanks, 1998); the subculture cycle to impose prior to elicitation (Rijhwani and Shanks, 1998) and the inoculum density (Lee and Shuler, 2000). In parallel, Mak and Doran (1993) have shown cell-cycle inhibition to enhance production of steroidal alkaloids by *Solanum aviculare*. However, optimal culture and elicitation conditions may be function of the metabolite to produce. The culture age, subculture cycle and inoculum mass effects are discussed in literature as a function of growth phase and rate and could also be interpreted as an effect of the plant cells nutritional status when eliciting.

During a batch culture, the medium composition is continuously evolving as the cellular nutrient content (Rijhwani et al., 1999; Glund et al., 1990). Phosphate as well as nitrogen deprivation have been shown to favour the production of secondary metabolites (Oksman-Caldentey et al., 1994; Dunlop and Curtis, 1991). However, the capacity of plant cells to accumulate nutrients (Theodorou and Plaxton, 1993) limits the relevance of relating growth to extracellular nutrient measurements. Intracellular

nutrient compartmentation studies using radio-labelling techniques for Pi and nitrogen (Bieleski and Furgussen, 1983) and NMR for ^{31}Pi (Rijhwani and Shanks, 1998; Lee and Ratcliffe, 1983) and ^{15}N (Breteler and Nissen, 1982) have shown that the intracellular Pi and nitrogen pools are highly dynamic with changes in extracellular concentration of nutrients. Pi and N starvation can cause major changes in the vacuolar Pi and nitrate pools (Lee et al., 1990) whereas the cytoplasmic Pi and N contents of roots is almost unaffected by a nutrient stress (Chapin and Bieleski, 1982). The importance of plant tissue nutritional status on metabolic response against pathogen aggression is also well known in the occurrence of a symbiotic association of a plant with a mycorrhizal (AM) fungus, an obligate symbiont (Pfeffer et al. 1998; Koide and Schreiner, 1992). The symbiosis requires inorganic phosphate (Pi) and/or nitrogen limiting culture conditions to be established (Bécard and Fortin, 1988) and to be viable (Jolicoeur, 1998; Schachtman et al., 1998).

Consequently, one may infer that the knowledge of the intracellular Pi and N dynamics may be one of the keys to significantly improve the secondary metabolites production level and reproducibility. The objective of this work was to characterize the nutritional behavior of hairy roots using *Daucus carota* as a model system. Hairy roots were chosen for their superior potential to produce some secondary metabolites as compared to suspension cells (Toivonen, 1993). Batch cultures were performed in Petri dish and semi-continuous cultures were performed in shake flasks with a periodic medium renewal in order to avoid complete depletion in Pi and nitrate in the culture medium. Root growth was followed with the extracellular macronutrients, intracellular Pi and nitrogenous compounds. This study focused on the evaluation of the global Pi and N forms that are unavailable (intrinsic cell content) and available (free and non-free) for cell metabolisms. This work establishes the basis for the development of a structured model relating growth to the nutritional status of the cells.

3.5 MATERIALS AND METHODS

3.5.3 Biological Material

Daucus carota hairy root cultures were maintained in 250 mL flasks by monthly transfers of ~ 0.6 g of fresh root (FW) in 80 mL fresh modified White medium (Bécard and Fortin, 1988). The flasks were maintained at (23±1)°C, in semi-continuous light and agitated at 120 rpm. Hairy roots have been transformed by *Agrobacterium rhizogenes* as described in Bécard and Fortin, 1988.

3.5.4 Experimental Cultures

Batch and semi-continuous cultures were both performed using ~ 0.32 g FW of roots obtained from 15 to 20 day old shake flask cultures. The medium used for the cultures was based on a minimum (M) medium (Bécard and Fortin, 1988) using KH_2PO_4 (Pi) and KNO_3. All culture media were sterilized in an autoclave for 30 minutes at 121°C, 1 atm.

Batch cultures were performed in Petri dish (9 cm in diameter) filled with 40 mL medium. The Petri dishes were kept in the dark at 23 ± 1°C. Liquid media based on the standard M medium (0.04 mM Pi and 3 mM NO_3^-) were assessed at 3-fold Pi. Roots were harvested twice a week for measurement of fresh and dry weights (80°C, 24h) as well as for elementary (cellular) and intracellular analysis. The culture media samples were frozen for further HPLC analysis.

Semi-continuous cultures were performed in 250 mL shake flasks containing 150 mL M-based enriched medium with 25-fold Pi and 3-fold NO_3^- which was periodically

renewed. The culture medium was sampled and analyzed every 3-4 days for Pi and nitrate contents and was changed when the Pi and NO_3^- concentrations were below 0.2 mM Pi and 3 mM NO_3^- respectively. At each medium exchange, the medium was withdrawn and the roots were weighted (fresh) within the flask before addition of fresh medium. Roots were harvested once a week for dry weight and intracellular and elementary analysis were performed. The medium was sampled at each medium exchange and frozen for further HPLC analysis.

3.5.5 Analytical

The liquid medium sampled for ion and carbohydrate analysis by HPLC was filtered (0.45 μm) and stored at –20 °C. Carbohydrates from the culture media (sucrose, glucose and fructose) were analyzed by a HPLC system consisting of a Waters model 6000A pump, a Gilson model 231/401 automatic injector, a Gilson model 132 refractive index detector, and a Hewlett-Packard model HP3394A integrator. Separation was achieved using a Biorad HPX-87C column maintained at 80 °C and water as the mobile phase flowing at a rate of 1.0 mL•min^{-1}.

Major ions (Cl^-, NO_2^-, NO_3^-, H_2PO4^-, SO_4^{-2}, K^+, NH_4^+, Na^+· Mg^{+2}, Ca^{+2}) were analysed using a Dionex (Dionex Canada Ltd, Oakville, Canada) HPLC system equipped with a gradient pump, an automated sampler and a pulsed electrochemical detector in the conductivity mode, controlled with the Dionex Al-450 software. Both anions and cations were analysed at (23±1)°C. Anions were separated using a 4 x 250 mm IONPAC AS4A-SC column, a guard column (IONPAC AG4A-SC), and an anion self regeneration suppresser (ASRS-1) to improve the signal-to-noise ratio. The mobile phase consisted of an aqueous bicarbonate buffer (1.8 mM Na_2CO_3/1.7mM $NaHCO_3$) solution flowing at a rate of 2.0 mL•min^{-1}. This allowed to separate, within 10 minutes, all major anions present in the M medium samples. Cations were separated using a 4 x

250 mM IONPAC CS-12 analytical column, a guard column (IONPAC CG-12 Guard column), and a cation self-regenerating suppresser (CSRS-1) to reduce signal-to-noise ratio. The mobile phase was an aqueous methanesulphonic acid (20 mM) solution flowing at a rate of 1 $mL \cdot min^{-1}$, which was suitable to separate the cations within 10 minutes.

3.5.6 Elementary Analysis of Cellular Composition

The fresh roots were rinsed with nanopure water for 15 seconds and weighed as such (wet weight) as well as after 24 hours drying at 80 °C (dry weight). Dried samples were crushed in scintillation vials before elementary analysis. Elementary analysis was performed in order to determine the cellular concentrations of organic phosphorus and Keijdhal total nitrogen (NTK) of the root cells.

The nitrogen analysis was started with a digestion on a bloc Tecator 1016 by heating the sample with sulfuric acid at 380 °C for 3.5 hours. The heating converts the nitrogenous compounds of the cells (proteins, peptides and amino acids) into nitrogenous compounds $(NH_4)_2SO_4$. The sample was then treated with salicylate and hypochlorite at 600°C to get a blue coloration which was read at 660 nm. The method was taken from Quickchem # 10-107-06-2-D of Lachat instruments which comes from EPA 350.1 which itself comes from 4500 N_{org} - C of Standard methods for the examination of water and wastewater. Nitrogen determination has been done according to the NTK method which analyses nitrogen under the form of NH_4^+ and NH_3 in solution and inorganic nitrogen that can be hydrolyzed in NH_4^+ and NH_3. NO_3^- and NO_2^- cannot be hydrolyzed, thus they are not included in the NTK. Total cellular nitrogen content was then calculated from NTK results added to the free intracellular NO_3^- and NO_2^- concentrations determined by HPLC.

The elementary phosphorus analysis was done using the Quickchem #10-115-01-1-C method (Lachat Instruments, Millwakee, Wi, USA) which is based on the Environmental Protection Agency EPA-365.4 method. The phosphorus analysis was performed by the digestion of the sample used for nitrogen analysis after heating. The orthophosphate ions from the cells react with ammonium molybdate and potassium tartrate to form a complex which was reduced with ascorbic acid to form a molybdophosphoric complex that was read at 880 nm. This method allow the measurement of total Pi content of the cells.

3.5.7 Free Intracellular Pi and N Analysis

The free intracellular root cell content in Pi, NO_3^-, NO_2^- and NH_4^+ was determined as follows. A fresh root sample was taken and rinsed with nanopure water as previously described. The sample was dried for 24 hours at 80°C in 20 mL glass scintillation vials. The dry roots were then crushed with a metallic spatula and accurately measured with a precision of ± 0.001g. The roots were finally suspended in 2.0 mL of nanopure water and agitated on the side on a rotary shaker at 80 rpm for 3 hours. The liquid was then filtered (0.45 μm) and analysed by HPLC for anions and cations. Other extraction methods have been assayed such as liquid nitrogen frozen, and wet root extraction in a micro mortar. The dried root method has given the more reproducible results. The methods used do not allow differentiation between cytoplasmic and vacuolar (and organelles) pools.

3.6 RESULTS

The nutritional characterization of cultured cells such as transformed roots required the evaluation of important parameters such as the specific uptake and utilization rates and the storage capacities of key nutrients such as inorganic phosphate (Pi) and NO_3^-

(unique source of nitrogen of the culture medium). Batch liquid cultures have been performed in Petri dish using a low (0.12 mM Pi, 3 mM NO_3^-) and a high (1 mM Pi, 12 mM NO_3^-) initial Pi and nitrate concentrations. Semi-continuous liquid cultures were achieved in shake flasks by periodic medium renewal in order to maintain non-zero Pi and NO_3^- concentrations in the culture medium. Medium renewal was stopped at steady-state of the total cellular phosphorus content. The uptake, storage and utilization dynamics of Pi and nitrogen (N) pools were followed as free intracellular Pi and N (the sum of NO_3^-, NO_2^- and NH_4^+) and total cellular Pi and N contents along the batch and semi-continuous cultures.

3.6.3 Root Growth Behavior

Root growth exhibited the standard behavior observed in batch cultures with a slight decrease in root dry weight in the days following inoculation. However, there was a significant difference in the maximum specific growth rate and lag duration observed between batch and semi-continuous cultures. In batch culture an exponential growth behavior has occurred from days 4-7 after inoculation to day 29 (Figure 3.1A and C) showing a 4 d lag. A maximum specific growth rate of 0.0705 ● 0.004 d^{-1} ($R^2 = 0.97$) has been observed. The root growth ceased at 45 d (Figure 3.1A) and a loss in total dry weight has occurred after 86 d of culture. In semi-continuous culture the maximum specific growth rate (exponential) was more than 2-fold higher when compared to batch cultures with a value of 0.174 ± 0.006 d^{-1} ($R^2 = 0.92$).

However, the growth behavior in semi-continuous cultures has not shown a significant lag period (Figure 3.1C and D). Exponential growth ceased at day 20 to 24, which was about 11 to 15 days before the last fresh medium change. The medium renewal strategy for the semi-continuous cultures has led to a maximum biomass of 1.8 ± 0.2 g DW as compared to 0.109 ± 0.003 g DW, after 45 d using the same inoculum quantity of 0.32

g FW. The semi-continuous culture conditions were limiting to root growth as the exponential growth ceased before the depletion in Pi and NO_3^- from the liquid medium.

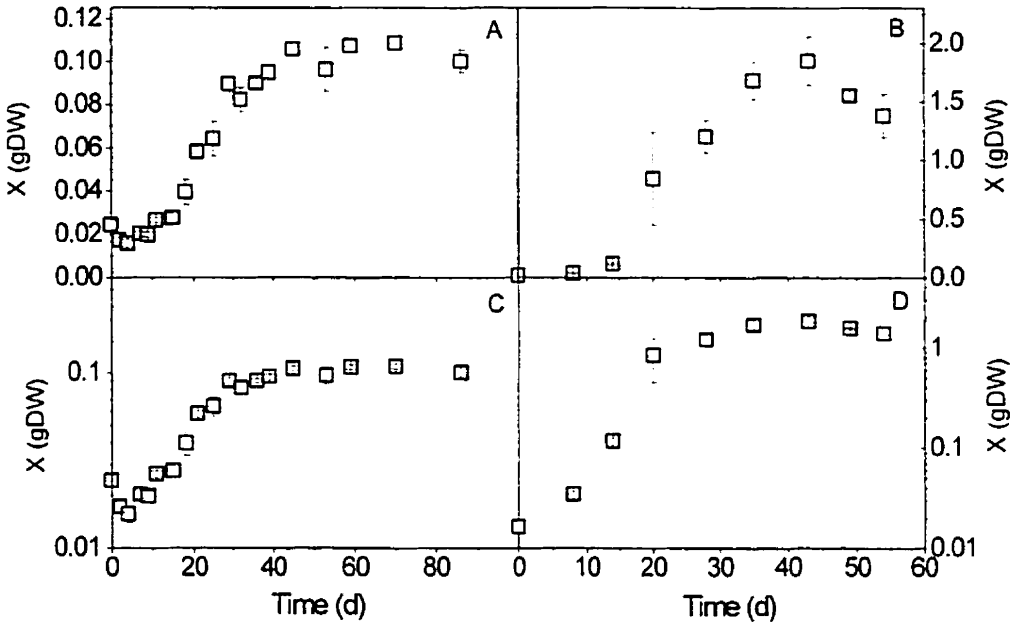

Figure 3.1 : (A and C) *D. carota* hairy roots growth in batch liquid culture using M-based medium at 3-fold Pi, in Petri dish containing 40 ml of medium. (B and D) *D. carota* hairy roots growth in semi-continuous liquid cultures in M-based medium at 25-fold Pi and 3-fold NO_3^- in 250 mL shake flask containing 80 ml of liquid medium. Error bars represents standard deviation (n=5).

3.6.4 Nutrition of D. carota Hairy Roots

3.6.4.1 Batch Cultures

Extracellular Pi and N were rapidly consumed by the roots and became undetectable (below the HPLC detection limits) at 21 d and 29 d respectively (Figure 3.2A and B).

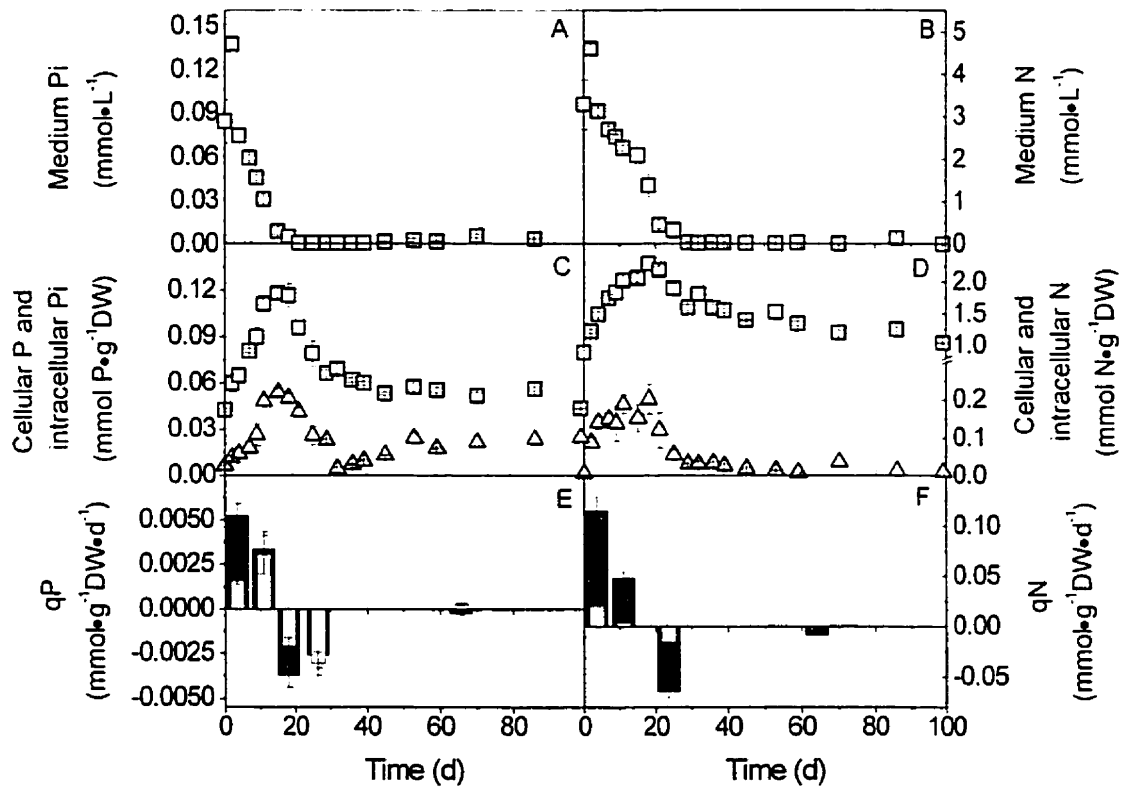

Figure 3.2: Pi and N dynamics in batch liquid culture of *D. carota* hairy roots in M-based medium at 0.12 mM Pi. (A) Pi and (B) N: Concentration in the culture medium. (C) Pi and (D) N: (Δ) Free intracellular concentration; ( ) Total cellular concentration. (E) Pi and (F) N utilization rates taken as the slope of cellular and intracellular concentrations: (Open bars) Free intracellular pools; (solid bars) Total cellular contents. The data points of (E) and (F) are calculated from the uptake rate from the medium. Error bars represents standard deviation (n=5).

Other measured ions (Figure 3.3) and carbohydrates (data not shown) were not completely depleted from the culture medium. Potassium and sodium ion were significantly consumed at day 29 and reached values of 0.23 ± 0.02 mmol K • L^{-1} and 0.13 ± 0.02 mmol Na • L^{-1}. The total cellular and free intracellular Pi and N contents per root dry weight, taken respectively as the total cellular content and as the total free concentrations of Pi and N were measured throughout the culture, without distinction between organelle (mainly the vacuole) or cytoplasmic origin.

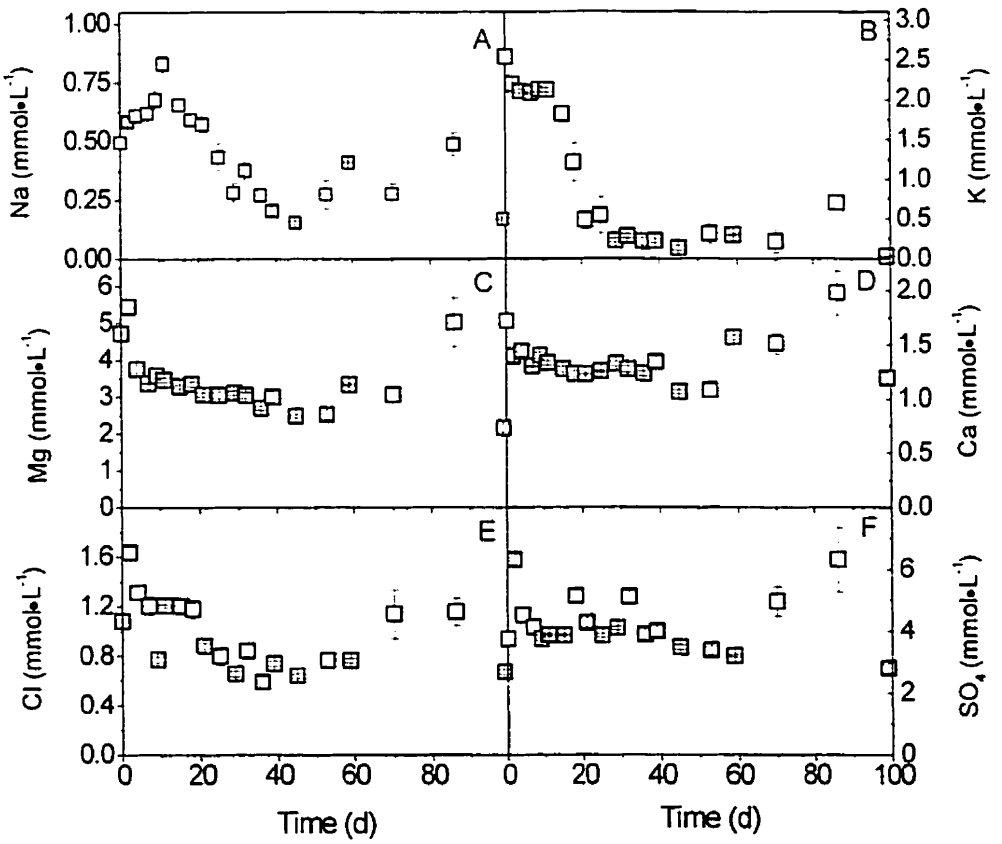

Figure 3.3 : Extracellular concentrations in batch liquid culture of *D. carota* hairy roots in M-based medium at 0.12 mM Pi. (A) Na^+. (B) K^+. (C) Mg^{2+}. (D) Ca^{2+}. (E) Cl^- and (F) SO_4^{2-}. Error bars represents standard deviation (n=5).

The total cellular and free intracellular Pi and N contents of the inoculum were low with 0.042 ± 0.001 mmol Pi • g^{-1} DW and 0.0065 ± 0.0007 mmol Pi • g^{-1} DW respectively, and with 0.87 ± 0.02 mmol N • g^{-1} DW and 0.0066 ± 0.003 respectively. The root cells rapidly increased their total cellular and free intracellular Pi and N contents after inoculation until medium depletion in these nutrients occurred (Figures 3.2C and D). Maximum total cellular contents of 0.118 ± 0.003 mmol Pi • g^{-1} DW and 2.3 ± 0.1 mmol N • g^{-1} DW were observed at 15 and 18 d respectively. Surprisingly, those maxima were respectively observed 6 and 11 d before Pi and N depletion of the culture medium. These time delays may have come from the high affinity limits of the transmembrane transport systems (Lee et al., 1990). The free intracellular Pi concentration first decreased to ~0 at 32 d and then recovered to a plateau of 0.023 ± 0.001 mmol Pi • g^{-1} DW while root growth reached a stationary phase. At first, the behavior of the free intracellular N pools was similar to that of Pi with a decrease until 29 d but then differed as it remained at ~0 mmol • g^{-1} DW. Thus, these results suggest a clear sign of Pi and N accumulation in the root cells since their growth was sustained for 20 d after medium depletion in Pi and N-based nutrients.

The free intracellular Pi content (cytoplasmic and vacuolar) accounted for more than 45 % of the total cellular content at the maximum and at the end of the culture (Figure 3.2C). However, only 10 % of the total N cellular content accounted for the intracellular content at the maximum (Figure 3.2D). This free to cellular N ratio was maintained during growth and decreased to 2 % at the end of the culture.

The sum of the Pi in the culture medium and the cellular Pi contained in the whole cells was not constant throughout the culture (Figure 3.4).

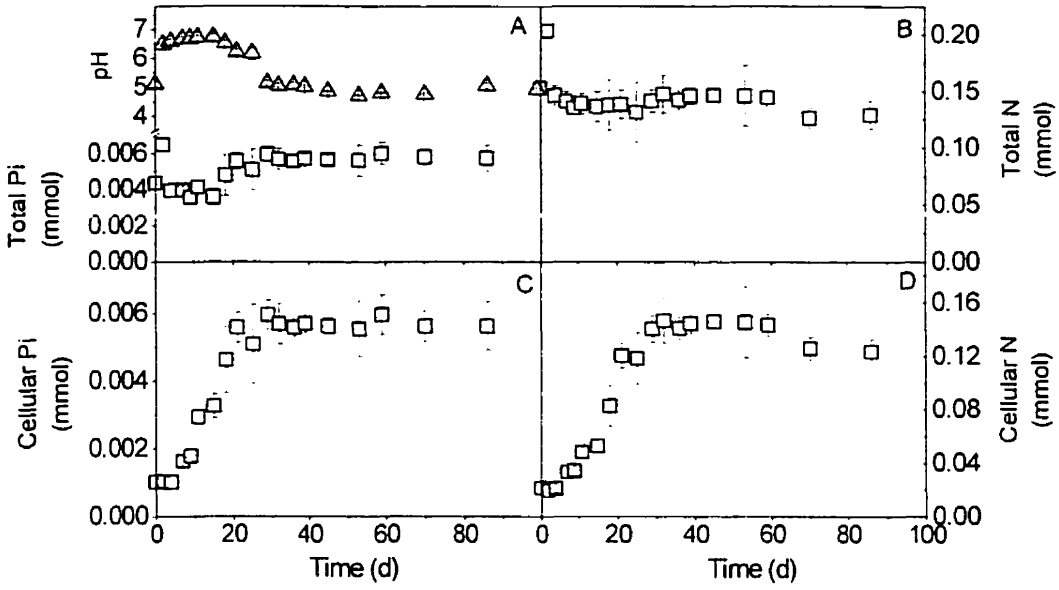

Figure 3.4 : Mass balances calculated around *D. carota* hairy roots in batch liquid culture in M-based medium at 0.12 mM Pi. (A) Pi and (B) N: (□) Balance based on total content in the culture system; (Δ) Medium pH. (C) Pi and (D) N: Balance based on total content in the cells. Error bars represents standard deviation (n=5).

The total amount of Pi in the dishes was lower for the first 15 d after inoculation and then increased to a stable value from day 29 to the end of the cultures. However, the evolution of the culture medium pH seemed to influence this behavior since the Pi solubility may have been affected by the high pH values of the first 15 d. An experiment with the same culture medium (sterilized) composition with its pH adjusted to 6.9 shows a Pi concentration of 30 μM shown as compared to 44 μM at the standard pH of 5.5. The total Pi contained in root cells has shown no significant efflux as it remained constant from day 29 to the end of the culture (Figure 3.4C). In the case of N (Figure 3.4D), as the total (medium and cell N) and cellular N contents evolved similarly suggesting a decrease from day 59 it is thought that some efflux from the cells

has been initiated from that day. This decrease in cellular N could not be related to cell lysis as the cellular Pi has stayed constant.

3.6.4.2 Semi-Continuous Cultures

Semi-continuous culture conditions with non-zero Pi and N extracellular concentrations were maintained for more than 35 days with the last medium exchange performed on that day (Figure 3.5). The culture was operated as a batch for the following 20 d. The liquid medium was then rapidly depleted in Pi and N (Figure 3.5A and B).

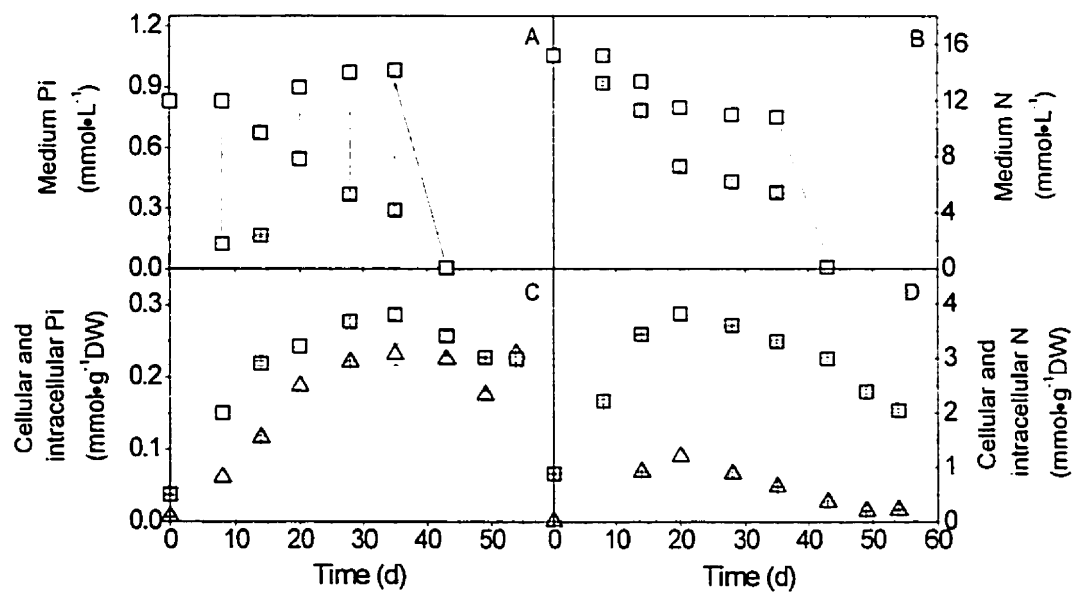

Figure 3.5 : Dynamics of Pi and N in semi-continuous liquid culture of *D. carota* hairy roots in M-based medium at 25-fold Pi and 3-fold NO_3^- in 250 mL shake flask containing 80 ml of liquid medium. (A) Pi and (B) N: Concentrations in the culture medium. (C) Pi and (D) N: (Δ) Free intracellular concentration; (□) total cellular content. Error bars represents standard deviation (n=10).

The free intracellular and total cellular Pi and N contents are presented in Figure 3.5C and D. The total cellular Pi content (Figure 3.5C) has increased from 0.042 ± 0.001 mmol Pi • g^{-1} DW (inoculation) to a maximum of 0.286 ± 0.008 mmol Pi • g^{-1} DW at 28 to 35 d. Free intracellular Pi concentrations have reached a plateau that may have represented the maximum intracellular value for this *D. carota* root line at 0.23 ± 0.02 mmol Pi • g^{-1}DW. The maximal total cellular N content was reached 10 d prior to Pi with a value of 3.81 ± 0.02 mmol N • g^{-1} DW (Figure 3.5D). Both cellular and intracellular values have reached a maximum at day 20, coincidentally with the end of the exponential growth behavior and then decreased significantly during the batch culture mode.

3.7 DISCUSSION

3.7.3 Effect of Initial Medium Composition on Root Growth

The roots' specific growth rate observed for semi-continuous culture was two times higher than for the batch cultures with a maximum value of 0.174 ± 0.006 d^{-1}. For batch cultures the maximum growth rate was of 0.0705 ± 0.004 d^{-1} which was similar to previous results obtained from airlift bioreactor using the same carrot hairy root line (Jolicoeur, 1998). It is known that Pi deficiency generally results in the reduction of roots growth rate (Bieleski and Ferguson, 1983) but it is interesting to observe that the growth lag seemed to be reduced for high Pi and N medium used in semi-continuous cultures. Moreover, the continuous medium renewal may have maintained the concentration of some essential elements sufficiently high to support rapid growth.

Results in batch cultures also suggest that the exponential growth initiation may require minimal phosphate and nitrogen contents as suggested by many authors (Bieleski, 1973; Clarkson and Hanson, 1980). The root inocula, which were taken from late

stationary phase Petri dish cultures, did not have sufficient amounts of Pi for growth to proceed readily after inoculation.

3.7.4 Pi and N Storage Capacities

For the experiments performed in semi-continuous cultures, the total cellular phosphate concentration has reached a maximum value of 0.286 ± 0.008 mmol Pi • g^{-1}DW which has remained constant from day 28 to 35 (Figure 3.5C). It seemed that experimental culture conditions has led to the maximum free Pi accumulation capacities for the *D. carota* hairy roots used in this study. The maximum free intracellular Pi content was of 0.231 ± 0.015 mmol Pi • g^{-1}DW which has represented a concentration of 25.7 mM on the basis of a wet-to-dry ratio of 10 for *D. carota* hairy roots (Jolicoeur et al., 1999). This concentration includes the cytosolic and the vacuolar Pi contents and is in accordance with values observed for typical plant tissues which can account for as much as 20 mM (Bieleski and Ferguson, 1983). A value of 14 mM is reported as the maximum vacuolar content for *Catharanthus roseus* hairy roots (Rijhwani et al., 1999). Lee et al. (1990) have observed a maximum vacuolar Pi content of 25 mM. For the period with constant cellular Pi content, 80% of the phosphorus contained in the root cells was in the free form of Pi. However, for nitrogen, the maximum cellular non-free content coincided with the end of the exponential growth at day 20 with 2.99 ± 0.04 mmol • g^{-1}DW and has decreased thereafter. The maximum intracellular free nitrate content observed was of 1.197 ± 0.025 mmol • g^{-1}DW or 133 mM and is also in the range of 100 mM NO_3^- reported for *Panax ginseng* cells (Miller and Smith, 1996). At this maximum value for *D. carota*, free nitrate has accounted for 30% of the total cellular N. When the intracellular pool is subtracted from the total cellular value a maximum N content is observed from day 20 to 35 with a value of 2.671 ± 0.013 mmol • g^{-1}DW. The free NO_3^- accumulation capacity was not reached for semi-continuous culture conditions and the maximum value observed seemed to have been

limited by the cessation of the exponential growth phase. No significant phosphate toxicity effect has been observed at the medium concentration of 1 mM Pi (Epstein, 1972).

3.7.5 Pi and N Intracellular Pool Dynamics

Results obtained from the batch cultures suggest that total cellular Pi and N are distributed into four distinct pools (Figure 3.6).

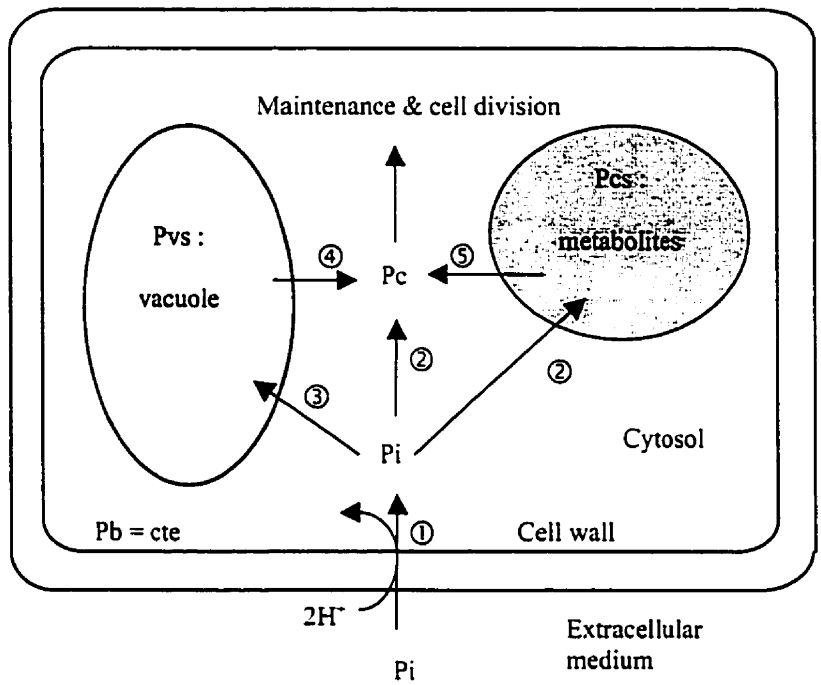

Figure 3.6 : Life cycle for free intracellular and stored P during a batch culture. Numbers in circles refer to the chronology of the processes. (①) Pi is transported across the cell membrane; (②) The Pi uptake is distributed towards free (P_c) and non-free metabolic (P_{cs}) pools, until the saturation limit is reached for P_{cs}. Then, (③) the Pi uptake goes towards the free Pi pools, P_c and P_{vs}. After complete Pi depletion from the culture medium, (④) free Pi pools are used at first for maintenance and cell division. After depletion of the free Pi pools, (⑤) Pi is obtained from the non-free P_{cs} pool.

Four successive phases were observed for the uptake and cellular utilization rates as shown on Figures 3.2 E and F. First, P_b, defined as the minimal amount of phosphorus required by a cell to exist as such with DNA, RNA, cell wall and membranes, cytoskeleton and other metabolites that are not related to growth. This P_b pool is considered to be constant all along the cultures for living cells. P_b was estimated to be of 0.0375 ± 0.002 mmol Pi • g^{-1}DW from the root cells used as inoculum, which was similar to the final value (cellular P – intracellular free Pi). The minimal amount of nitrogen (N_b) was estimated to be of 0.87 ± 0.02 mmol N • g^{-1}DW from the value at the beginning of the culture.

Before the initiation of the exponential growth phase in batch cultures (Figure 3.1C) the rate of increase in total cellular P was significantly higher than for free intracellular Pi as only 29 % of the total Pi uptake was directed towards intracellular Pi pools. The rate at which cellular Pi increased was of 0.0052 ± 0.0007 mmol Pi • g^{-1}DW • d^{-1}. This result also shows that the first amounts of Pi absorbed in days following inoculation were mainly (71 % of the total) directed towards some pools for which the compounds were not in the form of free Pi and could not be detected by HPLC. A similar behavior was observed for the semi-continuous cultures on day 4 with 70% of the Pi uptake being oriented towards non-detectable (by HPLC) cellular pools. The increasing rate of cellular P was of 0.014 ± 0.002 mmol Pi • g^{-1}DW • d^{-1} on day 4. The non-free Pi pool, called P_{cs}, is considered to be composed by some functional compounds such as Pi-esters or storage compounds such as polyphosphate (Bieleski, 1973) that can reversibly give back free Pi for growth and maintenance. The first free Pi pool to be replenished up to a physiological set point value is thought to be the cytoplasmic Pi pool (P_c). Then the vacuolar pool (P_{vs}) will receive the incoming Pi (Lee and Ratcliffe, 1983). Since no distinction can be made within the free Pi intracellular pools, P_L will be used to describe the total free intracellular Pi content.

The initiation of the exponential growth phase in batch culture (day 7) has coincided with a significant change in the rate of increase of the intracellular Pi (P_L) from 0.0016 ± 0.0002 mmol Pi • g^{-1}DW• d^{-1} ($R^2 = 0.97$) to 0.0031 ± 0.0011 mmol Pi • g^{-1}DW• d^{-1} ($R^2 = 0.73$). Both rates for cellular and intracellular Pi variations were then similar (Figure 3.2E) suggesting that the Pi uptake was totally oriented towards intracellular pools (P_c and P_{vs}). At that point P_{cs} was estimated to be of 0.021 mmol Pi • g^{-1}DW and P_L to be of 0.018 ± 0.004 mmol Pi • g^{-1}DW or 2 mM on the basis of the whole cell liquid volume. This value is in the range of 1.4 mM measured as cytoplasmic Pi using NMR by Rijhwani et al. (1999). However, results have shown an increase of the free Pi pool content at higher level, which is in accordance with a range of 5 to 10 mM generally presented in literature for the cytoplasmic Pi content (Lee et al., 1990).

After Pi depletion (day 15) from the culture medium, results suggest that both P_{cs} and P_L were used at first to sustain growth. The cellular rate of P utilization (65% of the total utilization rate) has exceeded intracellular Pi utilization rate suggesting, surprisingly, that a part of the Pi has come from the P_{cs} pool while the free P_L pool was not yet exhausted. Functional compounds must have been disassembled to generate some free Pi (Plaxton, 1998) and dead cells might have also released some Pi within the root network. At that point, the rate of cellular Pi consumption with a value of 0.0037 ± 0.0019 mmol Pi • g^{-1}DW • d^{-1} was similar (within experimental error) to the rate of uptake observed before the initiation of the experimental growth phase.

On day 24, both cellular and intracellular Pi rates of utilization were back to similar values suggesting that the metabolic P_{cs} pool was no longer contributing new Pi and the growth and maintenance was only supplied by the free P_L pool. Interestingly, the rates of utilization were similar to the rates of uptake at the beginning of the exponential growth phase. Therefore, it seems that the built-up kinetics for P_L and P_{cs} pools and

subsequent utilization rates are similar. The exponential growth phase ceased at day 32 which coincided with the measurement of the lower intracellular Pi value of 0.0041 ± 0.0014 mmol Pi • g^{-1}DW. The intracellular free Pi content then increased, reaching a plateau with 0.023 ± 0.001 mmol Pi • g^{-1}DW at stationary growth phase.

The dynamics of nitrogen management by the root cells was significantly different than that observed for Pi. First, the proportion of uptake in NO_3^- from the culture medium was mainly directed towards the non-free N pools. Only 20 to 30% of the NO_3^- uptake from the culture medium in batch and semi-continuous cultures was directed towards free pools. The free N pools could not be distinguished as cytoplasmic (N_c) or vacuolar (N_{vs}). Most of the nitrogen uptake was then transferred into functional compounds (N_{cs}) such as amino acids, enzymes, proteins, nucleic acids, etc. (Crawford and Glass, 1998). The NO_3^- uptake from the culture medium thus seemed to be closely related to root cell growth phase contrarily to Pi for which the cellular accumulation proceeded independently of the growth phase. After complete depletion of NO_3^- from the culture medium, the N required to support growth and maintenance came from functional compounds. Those compounds seemed to be readily available since the total free pool, N_L (N_c + N_{vs}), has never fallen to zero contrarily to P_L. It should be noted that only the general nutritional tendencies for nitrogen can be discussed here because of the global cell nitrogen decrease during the culture (Figure 3.4D). The net decrease in nitrogen of the culture system boundary can be explained from some efflux of nitrogenous compounds such as amino acids (Graham et al., 1981) and NH_3 from the equilibrium reaction with NH_4^+.

Finally, this study suggests the use of three distinct Pi and N pools to describe the nutritional dynamics involved in hairy root culture. However, the transposition of this simple model has to be validated with other plant species of higher pharmaceutical

interest. Also, the development of a structured model including the secondary metabolite production should be done.

3.8 ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank L. Lamboursain for helpful discussions and P. Daoust for reviewing the text.

3.9 REFERENCES

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

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

Bieleski RL, Ferguson IB. 1983. Physiology and metabolism of phosphate and its compounds. In: Inorganic Plant Nutrition. Encyclopedia of plant physiology (New series). A. Lauchi and R.L. Bieleski, editors, Springer-Verlag, New-York, USA, 442-449.

Breteler H, Nissen P. 1982. Effect of Exogenous and endogenous nitrate concentration on nitrate utilization by Dwraf Bean. Plant Physiol 79:754-759.

Chapin FS, Bieleski RJ. 1982. Mild phosphorus stress in barley and a related low-phosphorous-adapted barleygrass : phosphorus fractions and phosphate absorption in relation to growth. Physiol Plant 54:309-317.

Clarkson DT, Hanson JB. 1980. The mineral nutrition of higher plants. Ann Rev Plant physiol 31:239-298.

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

Dilorio AA, Cheetham RD, Weathers PJ. 1992. Growth of transformed roots in a nutrient mist bioreactor: reactor performance and evaluation. Appl Microbiol Biotechnol 37:457-462.

Doran PM. 1999. Design of mixing systems for plant cell suspensions in stirred reactors. Biotechnol Prog 15:319-335.

Dunlop DS, Curtis WR. 1991. Synergistic response of plant hairy-root cultures to phosphate limitation and fungal elicitation. Biotechnol Prog 7:434-438.

Epstein E. 1972. Mineral Nutrition of Plants : Principles and Perspectives. Wiley and Sons, New York.

Flores HE. 1986. Use of plant cell and organ culture in the production of biological chemicals. In : Applications of Biotechnology to Agriculture Chemistry. Lebaron H, Mumma RO, Honeycutt RC, Duesing JH, editors. Proc 190th Amer Chem Soc Symposium Series 190.

Glund K, Nürnberger T, Abel S, Jost W, Preisser J, Komor E. 1990. Intracellular Pi-compartimentation during phosphate starvation-triggered induction of an extracellular ribonuclease in tomato cell culture. In: Nijkamp HJJ, Van Der Plas LHW, Van Aartrijk J, editors. Current plant science and biotechnology in agriculture: Progress in plant cellular and molecular biology, Vol 9. Kluwer academic publishers, Dordrecht, Netherlands, pp 339-342.

Graham JH, Leonard RT, Menge JA. 1981. Membrane-mediated decrease in root exudation responsible for phosphorus inhibition of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation. Plant Physiol 68:548-552.

Gundlach H, Muller MJ, Kutchan TM, Zenk MH. 1992. Jasmomic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. Proc Natl Acad Sci USA 89:2389-2393.

Hamill JD, Parr AJ, Rhodes MJC, Robins RJ, Walton NJ. 1987. New routes to plant secondary products. Biotechnology 5:800-804.

Hilton MG, Rhodes MJC. 1990. Growth and hyoscyamine production of hairy roots cultures of *Datura stramonium* in a modified stirred tank reactor. Appl Microbiol Biotechnol 33:132-138.

Jolicoeur M. 1998. Optimisation d'un procédé de production de champignons endomycorhiziens en bioréacteur. PhD Thesis, École Polytechnique de Montréal, Canada.

Jolicoeur M, Chavarie C, Carreau PJ, Archambault J. 1992. Development of a helical-ribbon impeller bioreactor for high density plant cell suspension culture. Biotechnol Bioeng 39:511-521.

Jolicoeur M, Williams RD, Chavarie C, Fortin JA, Archambault J. 1999. Production of endomycorrhizae propagules in bioreactors. Biotechnol Bioeng 64:224-232.

Koide RT, Schreiner RP. 1992. Regulation of the vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. Annu. Rev. Plant Physiol Plant Mol Biol 43:557-581.

Knobloch KH. 1982. Uptake of phosphate and its effect on phenylalanine ammonia-lyase activity and cinnamol putrescine accumulation in cell suspension cultures of Nicotiana tabacum. Plant cell Rep 1:128-30.

Lee CWT, Shuler ML. 2000. The effect of inoculum density and conditioned medium on the production of ajmalicine and catharanthine from immobilized *Catharanthus roseus* cells. Biotechnol Bioeng 67:61-72.

Lee RB, Ratcliffe RG, Southon TE. 1990. ^{31}P NMR measurements of the cytoplasmic and vacuolar Pi content of mature maize roots : relationships with phosphorus status and phosphate fluxes. J Exp Bot 41:1063-1078.

Lee RB, Ratcliffe RG. 1983. Phosphorus nutrition and the intracellular distribution of inorganic phosphate in pea roots tips: A quantitative study using ^{31}P-NMR. J Exp Bot 34:1222-1244.

Mak Y, Doran PM. 1993. Effect of cell-cycle inhibition on synthesis of steroidal alkaloids by *Solanum aviculare* plant cells. Biotechnol Letters 15:1031-1034.

Melan AM, Dong X, Endara ME, Davis KR, Ausubel FM, Peterman TK. 1993. An *Arabidopsis thaliana* lipoxygenase gene can be induced by pathogens, abscisic acid and methyl jasmonate. Plant Physiol 101:441-450.

Miller AJ, Smith SJ. 1996. Nitrate transport and compartmentation in cereal root cells. J Exp Bot 47:843-854.

Oksman-Caldentey KM, Sevon N, Vanhala L, Hiltunen R. 1994. Effect of nitrogen and sucrose on the primary and secondary metabolism of transformed root cultures of *Hyoscyamus muticus*. Plant Cell Tissue Organ Cult 38:263-272.

Pfeffer PE, Shachar-Hill Y, Bécard G, Rolin D, Douds DD Jr. 1998. Nutrient transport and metabolism in the life cycle of arbuscular mycorrhizae as examined by NMR spectroscopy. In: Radical Biology: advances and perpectives on the function of plant roots. Flores HE, Lynch JP, Eissenstat D, Eds. American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland, USA, Vol 18, pp 178-187.

Plaxton WC. 1998. Metabolic aspects of phosphate starvation in plants. In : Phosphorus in plant biology : Regulatory roles in molecular, cellular, organism, and ecosystem processes, JP Lynch, J Deikman, editors, American Society of Plant Physiologists.

Quickchem method. Lachat Instruments, Millwakee, Wi, USA.

Ramakrishnan D, Salim J, Curtis WR. 1994. Inoculation and tissue distribution in pilot-scale plant root culture bioreactors. Biotechnol Techniques 8:639-644.

Rijhwani SK, Ho CH, Shanks JV. 1999. *In vivo* ^{31}P and Multilabel ^{13}C NMR Measurements for evaluation of plant metabolic pathways. Metabolic Engineering 1:12-25.

Rijhwani SK, Shanks JV. 1998. Effect of subculture cycle on growth and indole alkaloid accumulation by *Catharanthus roseus* hairy root cultures. Enzyme Microbiol Tech 22:606-611.

Schachtman DP, Reid RJ, Auling SM. 1998. Phosphorus uptake by plants : from soil to cell. Plant Physiol 116:447-53.

Singh G, Gavrieli J, Oakey JS, Curtis WR. 1998. Interaction of methyl jasmonate, wounding and fungal elicitation during sesquiterpene induction in *Hyoscyamus muticus* in root cultures. Plant Cell Rep 17:391-396.

Tanaka H, Nishijima F, Suwa M, Iwamoto T. 1983. Rotating drum fermentor for plant cell suspension cultures. Biotechnol Bioeng 25:2359-2370.

Theodorou ME, Plaxton WC. 1993. Metabolic adaptations of plant respiration to nutritional phosphate deprivation. Plant Physiol 101:339-344.

Toivonen L. 1993. Utilization of hairy root cultures for production of secondary metabolites. Biotechnol Prog 9:12-20.

Verpoorte R, Van der Heijden R, Schripsema J, Hoge J.H.C, Ten Hoopen HJG. 1993. Plant biotechnology for the production of alkaloids: Present status and prospects. J Nat Prod 56:186-207.

3.10 LIST OF SYMBOLS

d	Day
DW	Dry weight
FW	Fresh weight
N	Nitrogen
N_b	Minimal nitrogen content required by a root cell to maintain its structural integrity [mmol N • g^{-1}DW]
N_c	Free cytoplasmic nitrogen ($NO_3^- + NO_2^- + NH_4^+$) pool concentration [mmol N • g^{-1}DW]
N_{cs}	Intracellular non-free nitrogen pool concentration composed of functional and storage compounds [mmol N • g^{-1}DW]
N_L	Total free intracellular nitrogen concentration [mmol N • g^{-1}DW]
NTK	Keijdhal total nitrogen
N_{vs}	Free vacuolar nitrogen ($NO_3^-+NO_2^-+NH_4^+$) pool concentration [mmol N • g^{-1}DW]
P	Phosphorus
P_b	Minimal phosphorus content required by a root cell to maintain its structural integrity [mmol P • g^{-1}DW]
P_c	Free cytoplasmic Pi pool concentration [mmol Pi • g^{-1}DW]
P_{cs}	Intracellular non-free phosphorus pool concentration composed of functional and storage compounds [mmol Pi • g^{-1}DW]
Pi	Inorganic phosphate
P_L	Total free intracellular Pi concentration [mmol Pi • g^{-1}DW]
P_{vs}	Free vacuolar Pi pool concentration [mmol Pi • g^{-1}DW]
q_p	Phosphate specific rate of accumulation [mmol Pi • g^{-1}DW • d^{-1}]
q_N	Nitrogen specific rate of accumulation [mmol N • g^{-1}DW • d^{-1}]
X	Hairy roots' dry mass [g DW]

CHAPITRE QUATRE

ÉLABORATION D'UN MODÈLE BIOCINÉTIQUE STRUCTURÉ

4.1. INTRODUCTION

À la lumière des résultats expérimentaux présentés au chapitre précédent, plusieurs hypothèses ont été posées quant aux dynamiques reliées à la nutrition et à la croissance des racines. La validation de ces hypothèses est importante étant donné que l'objectif ultime du groupe de recherche consiste à moduler les stress nutritionnels afin de maximiser la production de métabolites secondaires. Les cinétiques d'assimilation des nutriments principaux (Pi, NO_3^- et sucres) en relation avec la croissance des racines de carotte ont été approfondies dans ce chapitre à travers l'élaboration d'un modèle biocinétique structuré. Ce modèle a également permis l'estimation de paramètres biocinétiques propres aux racines transformées de carotte.

Les résultats des expériences réalisées en milieu liquide, dans des boîtes de Pétri en cuvée et dans des flacons en semi-continu, décrites au chapitre précédent ont été utilisés pour valider les hypothèses proposées. Les hypothèses reliées à la nutrition et à la croissance des racines ont été traduites en un modèle biocinétique structuré dont la structure de base a été élaborée par Jolicoeur (1998) pour décrire la relation symbiotique entre les racines transformées de carotte et le champignon endomycorhizien *Glomus intraradices*. Des modifications importantes ont été apportées au modèle original afin de l'adapter à la culture de racines transformées en l'absence du champignon et de refléter les nouvelles hypothèses posées. Les modifications apportées concernent la définition de l'erreur entre les résultats simulés et expérimentaux lors de l'étape d'estimation des paramètres, un transport de l'azote à

deux paliers d'affinité selon une cinétique de Michaelis-Menten et une hiérarchie de compartimentation du phosphate et de l'azote dans les cellules. Les précisions quant aux améliorations et innovations apportées au domaine de la modélisation structurée sont présentées en détail dans ce chapitre.

4.2. OBJECTIFS

L'objectif principal de ces travaux de modélisation était de décrire la physiologie nutritionnelle de racines de carotte transformées en culture *in vitro* par un modèle biocinétique structuré. Les sous-objectifs suivants ont été poursuivis :

- Préciser un modèle structuré élaboré par Jolicoeur (1998) ;
- Caractériser la physiologie nutritionnelle des racines transformées en culture *in vitro* :
    - poser des hypothèses concernant les cinétiques, la croissance et la compartimentation des nutriments principaux ;
    - estimer les paramètres biocinétiques de consommation;
    - valider la structure du modèle avec les données expérimentales.

4.3. MATÉRIELS ET MÉTHODES

4.3.1. Cultures de racines transformées

Les données des cultures réalisées en mode cuvée et semi-continu exposées au chapitre précédent ont été utilisées pour l'élaboration et la validation du modèle biocinétique structuré. La culture en cuvée a été réalisée en milieu limitant M3P (milieu M (Bécard et Fortin, 1988) avec 3 fois la quantité de Pi) et la culture en semi-continu a été réalisée

dans un milieu enrichi (milieu M avec 9 fois la quantité de NO_3^- et 25 fois la quantité de Pi). Une culture supplémentaire a été effectuée, laquelle a été réalisée dans des boîtes de Pétri identiques à la culture en M3P, contenant 40 mL du milieu liquide enrichi en phosphate et en nitrate utilisé pour la culture en semi-continu. Les boîtes de Pétri ont été conservées dans un environnement non éclairé à 23 ± 1 °C. Cinq boîtes ont été prélevées deux fois par semaine ; le milieu de culture a été échantillonné pour fins d'analyses ioniques au HPLC et les racines ont été analysées pour déterminer leur contenu en nutriments cellulaires et intracellulaires. Les techniques utilisées ont été décrites au chapitre précédent.

4.3.2. Simulation du modèle structuré

Le modèle structuré est constitué de bilans en régime transitoire qui ont été résolus par intégration numérique selon la méthode de Runge-Kutta d'ordre quatre (Dr. A. Fortin du département de Mathématiques appliquées). L'estimation des paramètres a été réalisée en comparant les courbes de simulation du modèle avec les résultats expérimentaux. L'erreur entre les deux courbes a été minimisée grâce à la méthode élaborée par Fortin (1996). Les détails de la structure du modèle sont présentés plus loin afin d'améliorer la compréhension. Toutes les simulations ont été effectuées à l'aide du logiciel Matlab (The MathWorks Inc., Natick, MA, USA) où un pas d'intégration de 0.5 jour a été utilisé. Les conditions initiales nécessaires pour le modèle sont les conditions du milieu de culture : masse sèche des racines inoculées, concentrations extracellulaires en Pi et en NO_3^- ainsi que les contenus en P et en N intracellulaires et totaux dans les cellules. De plus, le volume de milieu de culture et les concentrations en glucides extracellulaires et intracellulaires des inocula ont été considérés. La concentration en glucides intracellulaire est considérée comme nulle au moment de l'inoculation (Jolicoeur, 1998).

Afin de simplifier le texte, les orthophosphates seront identifiés par Pi, alors que les autres formes de phosphore dans les cellules seront identifiées par P. De plus, le terme général azote sera remplacé par NO_3^- quand il s'agit de composés azotés extracellulaires et par N lorsqu'il s'agit de composants azotés intracellulaires. En effet, les résultats expérimentaux montrent que plus de 95% du total des composés azotés extracellulaires (NO_2^-, NO_3^- et NH_4^+) sont présents sous forme NO_3^-.

4.4. HYPOTHÈSES ÉMISES POUR L'ÉLABORATION DU MODÈLE STRUCTURÉ

Les bilans décrivant la croissance et la nutrition des racines de carotte ont été établis d'après les cinétiques admises par la littérature. Plusieurs hypothèses ont également été posées afin de décrire l'assimilation des nutriments et la compartimentation dans les différentes parties des cellules.

Bien que les paramètres biocinétiques soient fonction des espèces, de l'âge ainsi que des conditions de croissance et de nutrition, la validité de ce modèle est assurée, étant donné que les paramètres biocinétiques peuvent être estimés par le modèle pour chaque espèce végétale par un programme de minimisation de l'erreur entre les résultats expérimentaux et simulés.

4.4.1. Cinétique de croissance

La première hypothèse posée concerne la croissance des racines qui se fait naturellement de façon apicale par les racines principales ainsi que via les ramifications. Phénoménologiquement, une croissance par ramifications peut être représentée par une forme exponentielle. Or, la littérature n'est pas unanime à ce sujet et présente des modèles variés de types linéaires et des variations multiples (Tough et al., 1995; Taya et al.,1989a). Toutefois, pour les racines transformées de carotte, il a

clairement été démontré qu'un modèle de type exponentiel est efficace et utile pour la description de leur croissance (Jolicoeur, 1998).

Une croissance apicale signifie que les nouvelles cellules ne sont formées qu'à des endroits spécifiques alors que d'autres cellules ne se divisent plus. La croissance n'est donc pas homogène dans les tissus racinaires, ce qui implique une hétérogénéité de l'état physiologique des cellules et de leur état nutritionnel. À ce titre, il est connu que les nouvelles cellules sont pratiquement non vacuolisées contrairement aux vieilles cellules dont près de 95% du volume peut être occupé par la vacuole (Bieleski et Ferguson, 1983). Dans les présents travaux, une hypothèse simplificatrice a dû être apportée afin de compenser pour le manque d'information disponible quant aux nombres d'apex racinaires par unité de masse de racines. Toutes les concentrations intracellulaires ont donc été considérées homogènes pour l'ensemble des tissus racinaires en culture. Il en est de même pour les nouvelles cellules formées qui se sont vues affecter des contenus en divers nutriments et éléments identiques au reste du tissu.

4.4.2. Taux de croissance

Le taux spécifique de croissance a été décrit par une cinétique de Teissier (Toda et Yabe, 1979) faisant intervenir les concentrations intracellulaires en P, en N et en glucides. Les contributions du Pi et du NO_3^- ont été calculées à partir des concentrations cellulaires totales dans les cellules afin de respecter un bilan de masse entre l'absorption d'un nutriment (Pi ou NO_3^-) destiné à la division cellulaire (voir l'équation 4.5) et la quantité utilisée pour la formation de nouvelles cellules dans le taux spécifique de croissance (voir l'équation 4.1). Cette forme du taux spécifique de croissance présuppose que les réactions biochimiques cellulaires sont gérées à partir des concentrations intracellulaires totales en réactifs. Ceci entraîne toutefois une incohérence au niveau du calcul du taux spécifique de croissance puisque lorsque les

cellules se retrouvent en situation limitante en Pi (ou NO_3^-) et qu'elles ont épuisé toutes les sources de P (ou de N) disponibles dans la cellule, la croissance devrait s'interrompre. Or, même lorsque la croissance est interrompue à cause de déficience en nutriments, les cellules contiennent une quantité de P et de N nécessaire à leur constitution de base et au maintien d'une activité métabolique minimale. Par conséquent, le taux spécifique de croissance ne serait pas nul. Afin d'éviter une telle incohérence, un test logique a dû être ajouté dans le modèle afin d'imposer un taux spécifique de croissance nul lorsque tous les autres bassins de P sont épuisés.

Le taux maximal de croissance spécifique a été déterminé d'après les résultats expérimentaux obtenus pour la culture réalisée en semi-continu. Il est possible de croire que, puisque les racines ont été cultivées dans un milieu où ni P, ni N, ni aucun autre nutriment mesuré n'a été limitant, la croissance était au maximum de son potentiel. Enfin, un terme d'inhibition de la croissance par une concentration extracellulaire élevée en Pi a été posée.

4.4.3. Bassins de P

Les hypothèses émises au troisième chapitre quant à la compartimentation des nutriments dans la cellule ont permis de distinguer les quatre bassins suivants :

- P_b : P constituant les éléments essentiels de base, excluant toutes formes libres et réserves que ce soit pour qu'une cellule puisse exister;
- P_c : Pi libre dans le cytoplasme ;
- P_{vs} : Pi libre dans la vacuole ;
- P_{cs} : P contenu dans les composés métaboliques tels que les enzymes, protéines, acides aminés, esters et autres pouvant être réversiblement remis en disponibilité sous une forme libre.

Étant donné qu'aucune technologie expérimentale n'a été disponible en laboratoire permettant de distinguer entre les deux formes de Pi libre, soit P_c et P_{vs}, elles ont été traitées comme une seule entité : P_L. De plus, étant donné le manque d'information, une hypothèse a été posée à l'effet que les nouvelles cellules formées contiennent la même quantité de P que les cellules mères, c'est-à-dire $P_t = P_{cs} + P_L + P_b$, même si en réalité, les nouvelles cellules formées sont généralement très peu vacuolisées.

Les concentrations maximales et minimales des différents bassins de P ont été déterminées à la lumière des résultats des analyses cellulaire et intracellulaire obtenus lors des expériences réalisées en cuvée et en semi-continu. Le développement global élaboré au chapitre trois est repris ici afin de faciliter la présentation des principes ayant orienté l'écriture du modèle structuré.

Les valeurs minimales des bassins ont été déterminées à la fin des cultures ou, de manière équivalente, en regard des inocula utilisés provenant de milieux limitants, alors que le contenu en P est à sa valeur la plus faible. Les résultats d'analyse intracellulaire ont permis de déterminer la valeur de $P_{L,min}$ étant donné que le Pi intracellulaire n'était pas nul à la fin de la culture. Par contre, le P contenu dans les métabolites (P_{cs}) est complètement épuisé lorsque les racines se retrouvent dans des conditions limitantes en Pi. Enfin, P_b, qui est posé constant tout au long de la culture, a été déterminé par la différence entre les concentrations en P cellulaire et intracellulaire au moment de l'inoculation puisque les racines provenaient d'un milieu appauvri en nutriments. Dans le cas où cette concentration minimale diminuerait davantage, les cellules commenceraient à détruire des molécules vitales pour en dégager le P et se maintenir en vie. Toutefois, à partir de ce moment, si une source de Pi n'était pas disponible pour les cellules, elles mourraient rapidement.

Les concentrations maximales en P ($P_{L,max}$ et $P_{cs,max}$) ont été déterminées d'après les résultats de la culture réalisée en semi-continu. La valeur maximale du Pi libre (cytoplasmique et vacuolaire) ($P_{L,max}$) a été déterminée selon la concentration maximale observée par analyse intracellulaire. Enfin, la somme de $P_{L,max}$, P_b et $P_{cs,max}$ équivaut à la valeur observée par analyse cellulaire; il est donc possible de déterminer la valeur de $P_{cs,max}$ par différence.

Les hypothèses concernant l'absorption du Pi ont été élaborées à la lumière des résultats obtenus dans la culture réalisée en milieu limitant M3P. Tout d'abord, l'augmentation du Pi intracellulaire en milieu limitant M3P débute lentement et augmente ensuite plus rapidement (figure 3.2C); ce changement de pente correspond précisément au début de la croissance exponentielle. Lorsque les cellules provenant d'un milieu limitant sont transférées dans un milieu plus riche, elles doivent d'abord regarnir leurs métabolites avant de pouvoir croître de façon exponentielle. Il semble, en effet, que la période de latence de la croissance corresponde à l'étape à faible taux d'absorption pour le phosphate. Les paramètres reliés à l'absorption (transporteurs) du Pi semblent avoir été affectés par le stade de croissance. Ceci a effectivement été observé lorsque les cellules ont été cultivées dans un milieu dont les concentrations permettaient à peine l'atteinte du taux spécifique maximal de croissance. Le système d'absorption opérait alors bien en dessous de son K_m et seulement à une petite fraction de son V_{max} (Beever et Burns, 1980b). Les paramètres reliés à l'absorption du Pi pour la période de latence ont donc été considérés différents des valeurs en phase de croissance exponentielle et ont été nommés $V_{max,I,P}$', $V_{max,II,P}$', $K_{m,I,P}$' et $K_{m,II,P}$'. Cette observation n'a pas été vérifiée dans le cas du NO_3^- où le taux d'absorption du NO_3^- durant la phase de latence est élevé par rapport au reste de la croissance. Il n'y a donc pas lieu de réduire les paramètres d'absorption pour ce nutriment durant la phase de latence.

Les hypothèses concentrant la compartimentation du P dans les cellules et les étapes d'assimilation du Pi sont représentées schématiquement à la figure 4.1. Les mêmes hypothèses ont été posées pour l'absorption de l'azote.

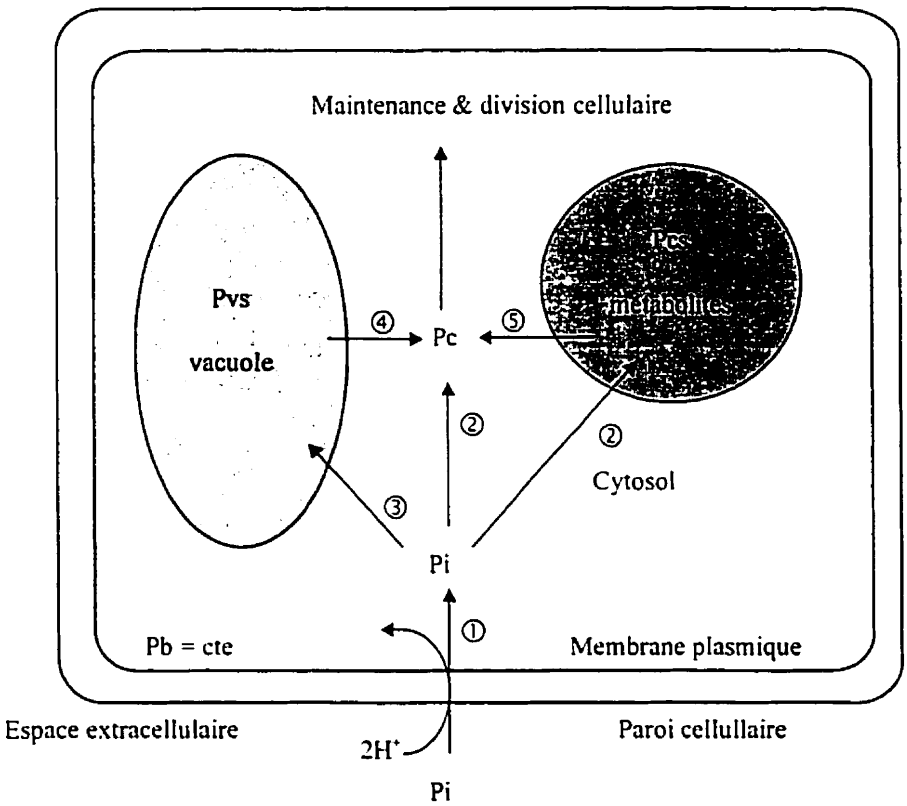

Figure 4.1 : Description schématique des étapes d'assimilation du Pi dans les différents bassins, tel que considéré pour l'élaboration du modèle. Les chiffres représentent les différentes étapes définies ci-bas.

La séquence d'absorption du Pi dans les compartiments débute par le transport du Pi du milieu de culture au milieu cellulaire (figure 4.1, étape ①). Le Pi est ensuite orienté en parallèle vers les bassins de Pi libre (P_L) et métabolique (P_{cs}) (figure 4.1, étape ②). D'après les résultats expérimentaux présentés au chapitre trois, il semble que

l'assimilation se soit produite de façon plus importante en direction du bassin P_{cs} pour combler les manques au niveau des protéines, des enzymes et des autres composants métaboliques nécessaires pour l'initiation de la croissance. Le bassin de P métabolique a donc reçu 71 % du Pi absorbé alors que le bassin de Pi libre a reçu le reste. L'absorption du Pi s'est poursuivie vers ces deux bassins, jusqu'à ce que le bassin de P métabolique contienne la quantité maximale ($P_{cs,max}$). Ensuite, lorsque des conditions favorables ont été atteintes par les racines, la phase de croissance exponentielle a été initiée et le Pi absorbé est dirigé en totalité vers le bassin de Pi libre cytoplasmique et/ou vacuolaire jusqu'à sa valeur totale maximale ($P_{L,max}$) (figure 4.1, étape ③). Selon la littérature (Bieleski et Ferguson, 1983), les besoins en Pi libre dans le cytoplasme sont comblés avant l'accumulation de Pi dans la vacuole. Toutefois, aucune distinction n'a pu être apportée entre P_c et P_{vs}, dû à un manque de capacité analytique.

À partir du moment où la concentration en Pi dans le milieu de culture a été virtuellement nulle (sous le seuil de détection des appareils HPLC), les stocks de Pi libre ont été utilisés pour maintenir la croissance. Les premiers stocks à avoir été utilisés sont ceux directement assimilables par les cellules, c'est-à-dire le Pi contenu dans la vacuole et le cytoplasme (P_L) (figure 4.1, étape ④). Ensuite, les stocks de Pi libre ont été utilisés jusqu'à épuisement, après quoi le P contenu dans les composés métaboliques a pu être utilisé. Les composés métaboliques (P_{cs}) libèrent alors du Pi libre jusqu'à ce qu'ils soient entièrement consommés (figure 4.1, étape ⑤). Il a alors été observé que la concentration en Pi cytoplasmique augmente légèrement, suggérant qu'une plus grande quantité de P est libérée à partir des composés métaboliques que ce qui est requis pour la maintenance et la division cellulaire alors presque nulle.

4.4.4. Bassins de N

La compartimentation intracellulaire des nutriments azotés a été abordée de la même façon que pour le P. L'azote se présente sous trois formes ioniques dans le milieu : NO_2^-, NO_3^- et NH_4^+. Toutefois, les nutriments azotés ont été traités comme un seul composé en additionnant les trois formes mesurées. D'après les résultats des analyses cellulaire et intracellulaire comparés, les bassins suivants ont été identifiés :

- N_b : N constituant les éléments essentiels de base pour qu'une cellule puisse exister, en excluant toutes formes libres et réserves que ce soient;
- N_c : N libre dans le cytoplasme sous les formes NO_3^-, NO_2^- et NH_4^+;
- N_{vs} : N libre dans la vacuole sous les formes libres : NO_3^-, NO_2^- et NH_4^+;
- N_{cs} : N contenu dans les composés métaboliques tels que les enzymes, protéines, acides aminés, etc. et pouvant être réversiblement remis en disponibilité sous une forme libre.

Les formes de N libres N_c et N_{vs} ont été traitées comme une seule entité : N_L pour les mêmes raisons que pour le P.

Les concentrations maximales et minimales des différents bassins de N ont été déterminées de la même façon que décrit précédemment pour le P. Lors de la première étape d'absorption du NO_3^-, celui-ci est orienté en parallèle vers les bassins de N métabolique et libre. D'après les résultats expérimentaux, le NO_3^- absorbé est orienté à 77 % vers le bassin N_{cs} alors que le bassin de N libre (N_L) recevrait la différence jusqu'à ce que le bassin N_{cs} contienne la quantité maximale ($N_{cs,max}$). Les autres étapes de la séquence d'absorption de l'azote ont été supposées identiques à celles du Pi.

4.5. *DESCRIPTION DU MODÈLE STRUCTURÉ*

Le modèle est constitué de bilans en régime transitoire décrivant la croissance des racines, l'assimilation du Pi, du NO_3^- et des glucides, ainsi que le transfert de l'eau du milieu aux tissus racinaires nouvellement formés.

En premier lieu, une croissance de type exponentielle est proposée :

$$\frac{\partial X}{\partial t} = \mu \bullet X \tag{4.1}$$

où

$$\mu = \mu_{\max} \bullet (1 - e^{-K1 \bullet P_i}) \bullet (1 - e^{-K2 \bullet N_i}) \bullet (1 - e^{-K3 \bullet S_r}) \bullet \left(\frac{k_{pp}}{k_{pp} + P^{inhipr}} \right) \bullet f1 \tag{4.2}$$

$$f1 = f_{\max} \bullet \frac{e^{(-cte \bullet (P_{cr} - 0))}}{1 + e^{(-cte \bullet (P_{cr} - 0))}} \tag{4.3}$$

où le taux spécifique de croissance suit une forme de Teissier (Jolicoeur, 1998); il est fonction des concentrations cellulaires en P, en N et en glucides. Un facteur d'inhibition relié à la concentration extracellulaire en Pi (Epstein, 1972, cité par Bieleski et Fergusson, 1983) est intégré par le k_{pp}. La relation f1 est une fonction sigmoïdale utilisée afin d'adoucir la courbe aux conditions limites.

Le Pi contenu dans le milieu de culture est consommé par les racines selon une cinétique de Michaelis-Menten à deux niveaux d'affinité (Cress et al., 1979). Ainsi, la concentration en Pi dans le temps est exprimée comme suit :

$$\frac{\partial P}{\partial t} = -\left(V_{\max,I,P} \bullet \frac{P}{P + K_{m,I,P}} + V_{\max,II,P} \bullet \frac{P}{P + K_{m,II,P}} \right) \bullet \frac{X}{V} \tag{4.4}$$

La variation du contenu total en P dans les cellules des racines est exprimée par la relation suivante :

$$\frac{\partial P_t}{\partial t} = \left(V_{\max,I,P} \bullet \frac{P}{P + K_{m,I,P}} + V_{\max,II,P} \bullet \frac{P}{P + K_{m,II,P}} \right) - P_t \bullet \mu - m_{r,P} \qquad (4.5)$$

où Pi est utilisé pour la croissance (μ) et consommé par la maintenance (m_r). La maintenance représente la quantité de phosphate nécessaire pour certaines activités métaboliques telles que le transport des nutriments dans la cellule, la motilité de la cellule et l'ajustement de l'osmolarité. Le Pi est ensuite réparti dans les bassins intracellulaires selon les cinétiques observées lors des expériences réalisées au chapitre trois et décrit précédemment.

La disparition du NO_3^- du milieu de culture, liée à l'absorption cellulaire, se fait par un système similaire au Pi, à double affinité (Crawford et Glass, 1998):

$$\frac{\partial N}{\partial t} = -\left(V_{\max,I,N} \bullet \frac{N}{N + K_{m,I,N}} + V_{\max,II,N} \bullet \frac{N}{N + K_{m,II,N}} \right) \bullet \frac{X}{V} \qquad (4.6)$$

La variation du contenu total en N dans les cellules des racines est exprimée par la relation suivante :

$$\frac{\partial N_t}{\partial t} = \left(V_{\max,I,N} \bullet \frac{N}{N + K_{m,I,N}} + V_{\max,II,N} \bullet \frac{N}{N + K_{m,II,N}} \right) - N_t \bullet \mu - m_{r,N} \qquad (4.7)$$

La disparition du sucrose (S0), source de glucides, contenu dans le milieu de culture est exprimée par la relation suivante développée par Jolicoeur (1998) :

$$\frac{\partial S}{\partial t} = -\left(\frac{\partial S0}{\partial t}\right) - \left(V_{\max,I,N} \bullet \frac{S}{S + K_{m,I,S}} \bullet \frac{X}{V}\right) \tag{4.8}$$

où

$$\frac{\partial S0}{\partial t} = -\mu_{hydro} \bullet \frac{X}{V} \tag{4.9}$$

où μ_{hydro} représente le taux d'hydrolyse du sucrose présent dans le milieu en glucose et en fructose, les racines n'ayant pas la capacité d'utiliser directement le sucrose. La variable S représente les concentrations combinées en fructose et en glucose dans le milieu de culture. La cinétique d'absorption des glucides (glucose et fructose) par les racines a été exprimée par une cinétique de Michaelis-Menten à un seul niveau d'affinité tel que couramment utilisée. La quantité de glucides présents dans les cellules est représentée par la variable S_{ir} dont la variation en fonction du temps est exprimée comme suit:

$$\frac{\partial S_{ir}}{\partial t} = \left(V_{\max,I,N} \bullet \frac{S}{S + K_{m,I,S}}\right) - (Y_{s/r} + S_{ir}) \bullet \mu - m_{r,s} \tag{4.10}$$

où m_{rs} est le coefficient de maintenance associé aux glucides; $Y_{s/r}$ est le rendement en glucides par rapport à la masse sèche de racines.

Finalement, le volume de liquide (V) dans les cultures varie dans le temps de la façon suivante :

$$\frac{\partial V}{\partial t} = -\mu \bullet X \bullet DWr - evap \tag{4.11}$$

où DW_r est le ratio masse humide/sèche qui tient compte de la perte en eau associée à l'accroissement du volume de racines. En effet, 10 g de racines humides (WW)

représentent 1 g de racines sèches (DW). Ainsi, il y a environ 9 g d'eau dans 10 g de racines humides; ce qui équivaut environ à 9 ml H_2O/gDW.

4.6. MÉTHODE DE RÉSOLUTION NUMÉRIQUE DU MODÈLE ET ESTIMATION DES PARAMÈTRES

En plus de permettre la validation des hypothèses proposées, le modèle permet d'estimer les paramètres biocinétiques propres aux racines. Tout d'abord, chaque paramètre à estimer par le modèle a été initialisé à une valeur retrouvée dans la littérature. Les équations différentielles ont été résolues numériquement selon la méthode de Runge-Kutta pour chaque pas d'échantillonnage tel que représenté schématiquement à la figure 4.2. Un pas de temps de 0.5 jour a été utilisé pour 200 pas d'échantillonnage, ce qui correspond à 100 jours de culture. Lorsque le temps correspond à un jour d'échantillonnage, l'erreur entre les résultats estimés par le modèle et les résultats expérimentaux est calculée. Les données expérimentales suivantes ont été comparées avec les résultats estimés par le modèle et ont été considérées dans le calcul de l'erreur.

- la masse sèche de racines (notée X dans les bilans);
- la concentration extracellulaire en P (P);
- la concentration extracellulaire en azote : la somme de NO_3^-, NO_2^- et NH_4^+ (N);
- la concentration cellulaire totale en P (P_t);
- la concentration cellulaire totale en N (N_t);
- la concentration extracellulaire en sucrose (S0);
- la concentration extracellulaire en fructose + glucose (S).

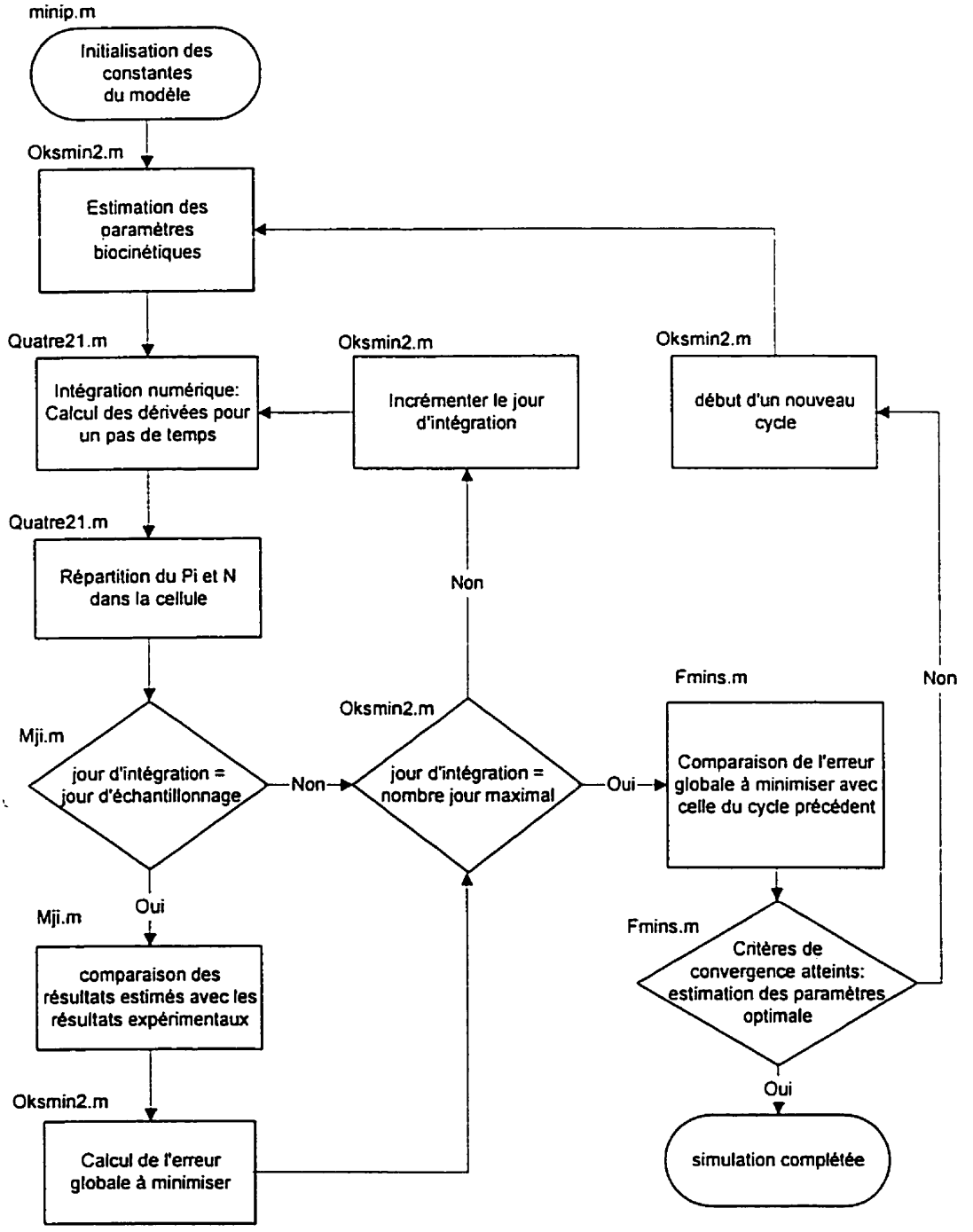

Figure 4.2 : Représentation schématique du déroulement d'une simulation numérique.

L'erreur pour un jour d'échantillonnage est calculée par la somme des carrés de la différence entre les valeurs obtenues par le modèle et les valeurs expérimentales à chaque jour d'échantillonnage.

$$erreur = \sum_{i=1}^{n} \left(\frac{x_i - x_{i,exp}}{x_{i,max} - x_{i,min}} \right)^2 \qquad (4.12)$$

où x_i est le paramètre dont le résultat expérimental est comparé avec le résultat du modèle pour chaque paramètre (i) énuméré ci-haut.

L'erreur globale a été obtenue par la sommation des erreurs calculées à chaque jour d'échantillonnage pour un cycle de minimisation. Cette erreur a été minimisée en la comparant avec l'erreur globale obtenue lors du cycle précédent d'après la méthode de minimisation de l'erreur contenue dans la sous-routine de Matlab impliquant l'algorithme de Nelder-Mead (Nelder et Mead, 1985). Les estimés des paramètres biocinétiques inconnus ont ainsi été modifiés à chaque cycle de minimisation afin de trouver la meilleure combinaison permettant d'atteindre les critères de convergence. Les paramètres qui ont été estimés par le modèle selon cette procédure sont :

- les taux de maintenance ($m_{r,P}$, $m_{r,N}$, $m_{r,S}$);
- les constantes d'affinité ($K_{m,I,P}$, $K_{m,II,P}$, $K_{m,I,P}'$, $K_{m,II,P}'$, $K_{m,I,N}$, $K_{m,II,N}$, $K_{m,I,S}$) ;
- les taux d'absorption maximaux ($V_{max,I,P}$, $V_{max,II,P}$, $V_{max,I,P}'$, $V_{max,II,P}'$, $V_{max,I,N}$, $V_{max,II,N}$, $V_{max,I,S}$);
- les contributions du P, du N et des glucides au taux spécifique de croissance (K1, K2, K3);
- le coefficient d'inhibition de croissance relatif au Pi extracellulaire (k_{pp});
- le rendement en sucrose par rapport à la biomasse sèche ($Y_{s/r}$)

La plupart des paramètres biocinétiques inconnus tels que les paramètres d'absorption, les coefficients de maintenance et les coefficients de croissance pour chaque nutriment ont été estimés par le modèle d'après les résultats obtenus en milieu limitant M3P. Certains paramètres tels que les coefficients d'inhibition relatif au Pi extracellulaire et les paramètres d'absorption de basse affinité du Pi ont toutefois été estimés d'après les résultats obtenus pour la culture en semi-continu réalisée dans un milieu enrichi. Ces paramètres font, en effet, intervenir des phénomènes qui ne se produisent pas dans des conditions limitantes. Une fois les paramètres biocinétiques déterminés, le modèle a été confronté aux cultures réalisées en milieu enrichi afin de vérifier la validité des hypothèses posées. Les fichiers Matlab utilisés pour la modélisation sont présentés à l'annexe B.

4.7. RÉSULTATS

4.7.1. Estimation des paramètres biocinétiques

Un des premiers sous-objectif de la modélisation était d'estimer les paramètres biocinétiques propres aux racines de carotte. Tel que décrit à la section 4.6, ces paramètres ont été estimés en minimisant l'erreur entre la simulation et les résultats expérimentaux (X, P, P_t, N, N_t, S, S0) obtenue pour la culture en milieu limitant M3P. À chaque cycle de minimisation, l'erreur a diminué jusqu'à ce que l'estimation des paramètres soit optimale (figure 4.3). Les valeurs des paramètres du modèle sont présentées au tableau 4.1.

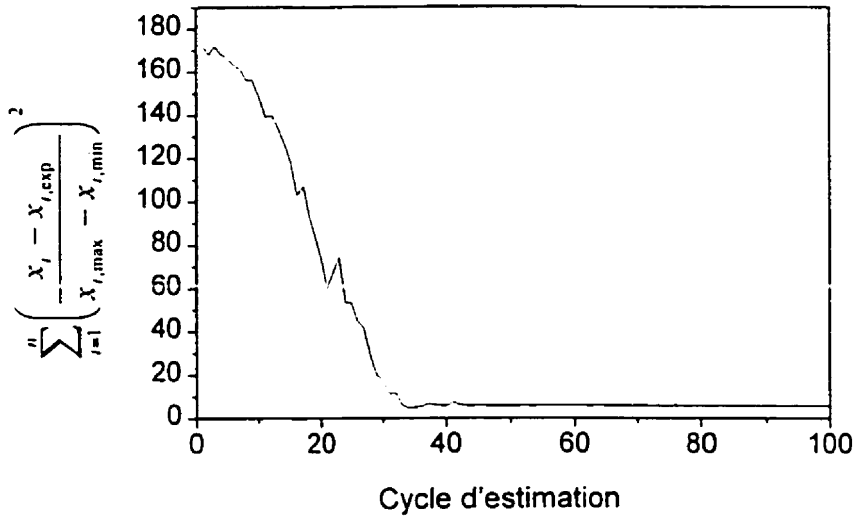

Figure 4.3 : Erreur de minimisation entre les résultats simulés et expérimentaux obtenue lors de l'estimation des paramètres biocinétiques par le modèle structuré.

Tableau 4.1 : Paramètres biocinétiques estimés par le modèle ou obtenus expérimentalement.

Variables	Valeurs	Unités	Références
inhipr	2.44	adimensionnel	Jolicoeur (1998)
S_{rcrit}	0.32	g glucides • g^{-1}DW	"
μ_{hydro}	0.61	g glucides • g^{-1}DW • d^{-1}	"
N_b	0.865	mmol N • g^{-1}DW	Expérimental
$N_{cs,max}$	1.75	mmol N • g^{-1}DW	"
$N_{L,max}$	1.20	mmol N • g^{-1}DW	"
$N_{L,min}$	0.066	mmol N • g^{-1}DW	"
P_b	0.0357	mmol P • g^{-1}DW	"
$P_{cs,max}$	0.021	mmol P • g^{-1}DW	"
$P_{L,max}$	0.23	mmol Pi • g^{-1}DW	"

Tableau 4.1 (suite) : Paramètres biocinétiques estimés par le modèle ou obtenus expérimentalement.

Variables	Valeurs	Unités	Références
$P_{L,max}$	0.23	mmol Pi • g^{-1}DW	"
$P_{L,min}$	0.0066	mmol Pi • g^{-1}DW	"
μ_{max}	0.174	d^{-1}	"
K1	4.27	gDW • $mmol^{-1}$ P	estimé par le modèle
K2	7.16	gDW • $mmol^{-1}$ N	"
K3	12.56	g DW • g^{-1} glucides	"
$K_{m,I,P}^{*}$	0.046	mmol Pi • L^{-1}	"
$K_{m,II,P}^{*}$	7.9	mmol Pi • L^{-1}	"
$K_{m,I,P}$	0.046	mmol Pi • L^{-1}	"
$K_{m,II,P}$	7.9	mmol Pi • L^{-1}	"
$K_{m,I,N}$	0.91	mmol N • L^{-1}	"
$K_{m,II,N}$	9.1	mmol N • L^{-1}	"
$K_{m,I,S}$	0.097	g glucides • g^{-1}DW	"
k_{pp}	16	mmol Pi • g^{-1}DW	"
$m_{r,P}$	0.00002	mmol P • g^{-1}DW • d^{-1}	"
$m_{r,N}$	0.007	mmol N • g^{-1}DW • d^{-1}	"
$m_{r,S}$	0.00088	mmol glucides • g^{-1}DW • d^{-1}	"
$V_{max,I,P}^{*}$	0.009	mmol Pi • g^{-1}DW • d^{-1}	"
$V_{max,II,P}^{*}$	0.039	mmol Pi • g^{-1}DW •.d^{-1}	"
$V_{max,I,P}$	0.032	mmol Pi • g^{-1}DW • d^{-1}	"
$V_{max,II,P}$	0.039	mmol Pi • g^{-1}DW • d^{-1}	"
$V_{max,I,N}$	0.113	mmol N • g^{-1}DW • d^{-1}	"
$V_{max,II,N}$	0.50	mmol N • g^{-1}DW • d^{-1}	"
$V_{max,I,S}$	0.094	g glucides • g^{-1}DW • d^{-1}	"
$Y_{s/r}$	0.45	g glucides • g^{-1}DW	"

La contribution du P au taux spécifique de croissance (K1) a été à la moitié de sa valeur maximale lorsque la concentration en P intracellulaire a été de 0.16 mmol Pi • g^{-1}DW, alors que la concentration maximale atteinte dans la culture en milieu M3P a été de 0.12 mmol Pi • g^{-1}DW (figure 3.2C). La contribution de N (K2), quant à elle, a été à la moitié de sa valeur maximale lorsque la concentration intracellulaire en N a été de 0.094 mmol N • g^{-1}DW, laquelle a été dépassée même pour l'inoculum (figure 3.2D). Enfin, la contribution des glucides (K3) a été à la moitié de sa valeur maximale lorsque la concentration en glucides a été de 0.06 g glucides • g^{-1}DW, ce qui a été rapidement atteint même dans le milieu M3P. Cela suggère que les glucides et le NO_3^- n'ont pas limité la croissance, contrairement au phosphate.

Le coefficient d'inhibition de la croissance (inhipr) relié à une concentration élevée en Pi extracellulaire a été estimé à 2.44 par le modèle, alors que la constante k_{pp} a été estimée à 16 mmol Pi • g^{-1}DW. Le facteur global d'inhibition de la croissance a été à la moitié de sa valeur maximale lorsque la concentration extracellulaire était de 3.1 mM Pi; il a donc été négligeable dans les conditions de culture où la concentration maximale en Pi extracellulaire a été de 0.087 mM pour le milieu M3P (figure 3.2A).

Le coefficient de maintenance estimé pour le P a été de 0.00002 mmol P • g^{-1}DW • d^{-1}; la maintenance représentait alors moins de 0.3 % du taux d'absorption en milieu M3P et moins de 0.06 % en milieu non limitant. En ce qui concerne le N, le coefficient de maintenance a été évalué à 0.007 mmol N • g^{-1}DW • d^{-1} et, par conséquent, la maintenance représentait moins de 4 % de l'absorption par les racines en conditions limitantes et moins de 2 % en conditions non limitantes. Enfin, dans le cas des glucides, le coefficient de maintenance a été estimé à 0.00088 mmol glucides • g^{-1}DW • d^{-1}; la maintenance représentait alors moins de 0.95 % du taux d'absorption des glucides dans les cultures en milieu M3P et en semi-continu.

4.7.2. Simulations des dynamiques nutritionnelles et de croissance des racines

4.7.2.1. Comportement du modèle développé avec les résultats de la culture en cuvée M3P

Le modèle a été développé d'après les comportements expérimentaux observés pour la culture en milieu limitant M3P. La prédiction du modèle en ce qui a trait à la croissance est présentée à la figure 4.4.

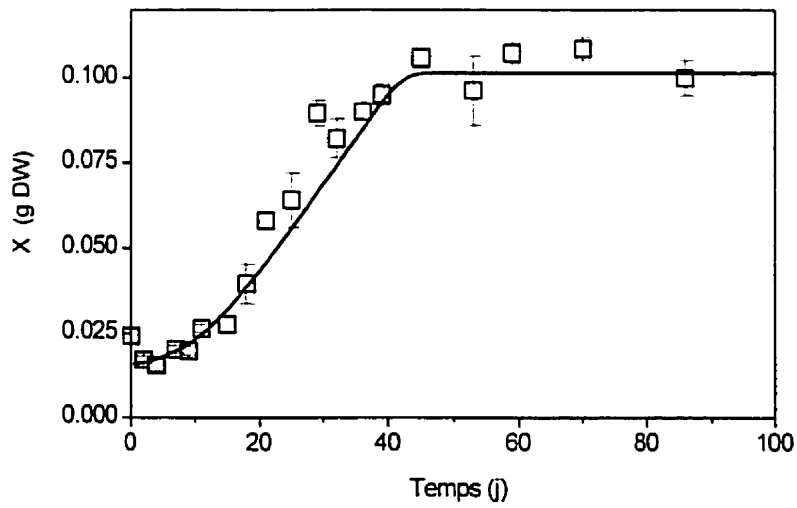

Figure 4.4 : Courbe de croissance des racines de *D. carota* cultivées en cuvée dans des boîtes de Pétri dans un milieu liquide minimum M3P contenant 0.12 mM Pi. (——) Croissance obtenue par modélisation ; (□) résultats expérimentaux. Les barres d'erreur correspondent à l'écart type (n = 5).

Tout d'abord, la phase de latence, d'une durée d'environ sept jours (figure 3.1) a été prévue par le modèle. Les racines ont ensuite atteint un taux spécifique de croissance de 0.0705 ± 0.004 d^{-1} alors qu'un taux spécifique de croissance de 0.058 d^{-1} a été prévu par le modèle. La quantité de biomasse finale obtenue par le modèle a été similaire à celle obtenue en réalité avec 0.091 gDW et 0.108 ± 0.002 gDW par boîte de Pétri respectivement.

Les cinétiques d'assimilation du Pi et du NO_3^- obtenues par le modèle sont présentées à la figure 4.5 en comparaison avec les résultats expérimentaux. L'hypothèse selon laquelle les taux d'absorption du phosphate ont été réduits durant la phase de latence a permis de représenter l'absorption du Pi de façon représentative des résultats expérimentaux. Les concentrations maximales en P total et Pi intracellulaires simulées par le modèle ont été identiques aux résultats expérimentaux.

En ce qui concerne le N cellulaire, les hypothèses concernant la compartimentation et la séquence de remplissage des différents bassins a permis de représenter les dynamiques d'absorption et de consommation du N obtenu expérimentalement. La concentration maximale en N cellulaire total obtenu pour le modèle correspond au maximum obtenu expérimentalement, soit 2.28 mmol N • g^{-1}DW (figure 4.7D). Les concentrations en N intracellulaire simulées sont surestimées par rapport aux données expérimentales. Toutefois, ces résultats doivent être mis en perspective de deux phénomènes possibles non considérés par le modèle. Tout d'abord, une perte probable de NH_4^+ qui, se transformant en NH_3 gazeux, peut se diffuser facilement à travers la membrane cellulaire et disparaître dans l'atmosphère ; ensuite, une sécrétion extracellulaire de molécules azotées (acides aminés) qui ne sont pas mesurées par HPLC.

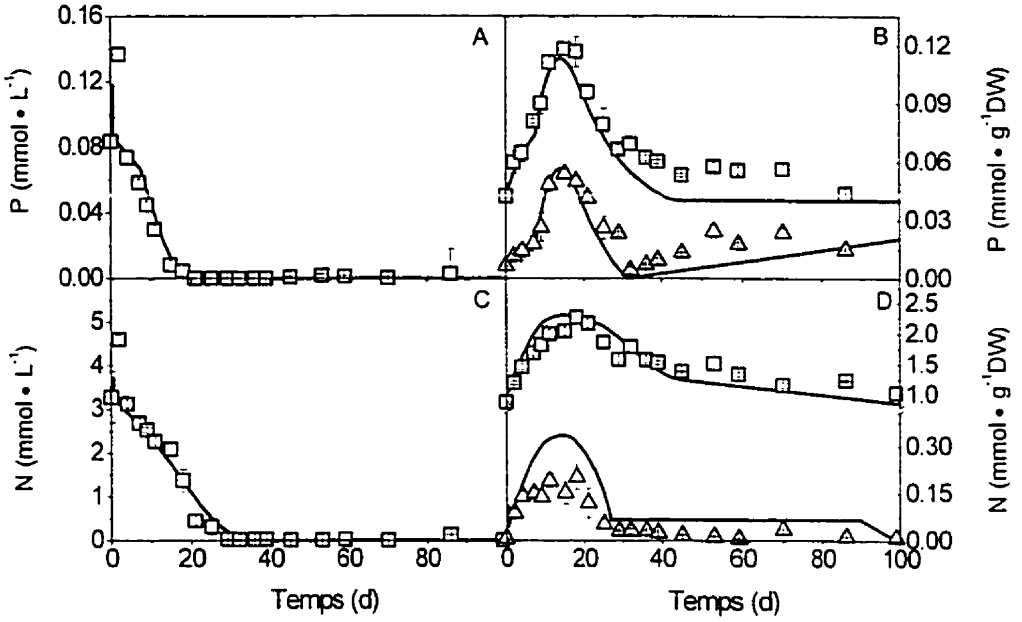

Figure 4.5 : Concentrations extracellulaires, cellulaires et intracellulaires en P et en NO_3^- pour des racines de *D. carota* cultivées en boîtes de Pétri en milieu limitant M3P en mode cuvée. (A) (□) Concentration en Pi dans le milieu de culture, (B) (Δ) concentration en Pi intracellulaire et (□) concentration en P cellulaire. (C) Concentration en NO_3^- dans le milieu de culture. (D) (Δ) Concentration en NO_3^- intracellulaire et (□) cellulaire. (——) Résultats simulés. Les barres d'erreur correspondent à l'écart type (n = 5).

Enfin, en ce qui concerne les glucides, très peu de résultats permettent de valider les hypothèses émises pour l'élaboration du modèle. En effet, plusieurs problèmes ont été rencontrés avec l'appareil HPLC utilisé pour les glucides et les analyses n'ont pu être reprises. Les résultats de sucrose des jours 7, 9 et 11 semblent impossibles (figure 4.6A), de même que les résultats de la concentration combinée de fructose et glucose pour les jours 21, 25 et 29. En considérant les tendances générales des résultats

expérimentaux, il apparaît que la disparition simulée du sucrose du milieu de culture s'est produite plus tôt qu'au niveau expérimental ; la vitesse de disparition a toutefois été similaire. De plus, la concentration extracellulaire combinée en fructose et en glucose simulée a suivi globalement la même tendance que les résultats expérimentaux.

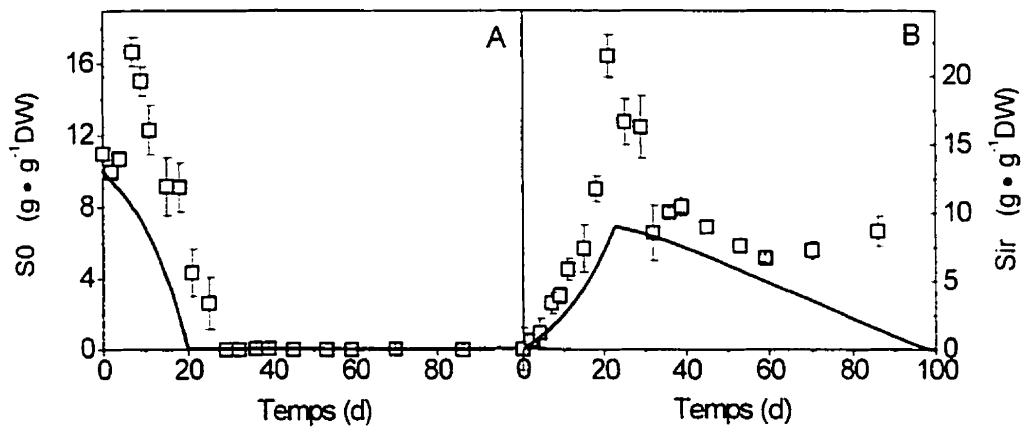

Figure 4.6 : Concentrations extracellulaires en glucides pour des racines de *D. carota* cultivées en boîte de Pétri en milieu limitant M3P en mode cuvée. (A) Concentration en sucrose dans le milieu de culture ; (B) concentration combinée en glucose et fructose dans le milieu de culture. (——) Résultats simulés et (□) résultats expérimentaux. Les barres d'erreur sont calculées par l'écart type (n = 5).

4.7.2.2. Évaluation comportementale du modèle face à une culture en milieu enrichi alimentée en semi-continu

Le modèle développé sur les bases de la culture effectuée en cuvée en milieu M3P a été confronté aux résultats de la culture réalisée en milieu enrichi en semi-continu (voir chapitre trois) avec les conditions initiales de modélisation propres à cette culture. Les simulations ont convergé vers un taux spécifique de croissance significativement inférieur à celui qui a été observé expérimentalement (figure 4.7).

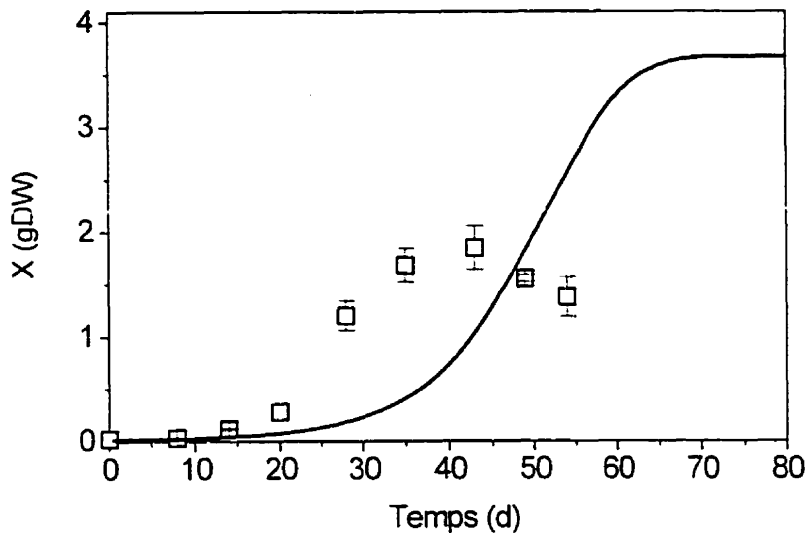

Figure 4.7 : Courbe de croissance des racines de *D. carota* cultivées en flacons dans un milieu enrichi alimenté en semi-continu. (——) Croissance obtenue par modélisation : (□) résultats expérimentaux. Les barres d'erreur correspondent à l'écart type (n = 2).

Un taux spécifique de croissance de 0.174 ± 0.001 d^{-1} a été observé expérimentalement alors que le modèle a prévu un taux de 0.107 d^{-1}. La quantité de biomasse totale finale prévue par le modèle, 4.02 g DW par flacon, est également supérieure à la biomasse totale observée expérimentalement, 1.84 g DW par flacon (figure 3.1).

Les observations présentées au chapitre trois à l'effet que les racines ont rapidement été en état de limitation en oxygène et/ou d'espace, paramètres non couverts par le modèle développé, pourraient expliquer la divergence obtenue en terme de la biomasse sèche (X) maximale. La différence quant au taux spécifique de croissance pourrait provenir du renouvellement du milieu de culture en d'autres nutriments essentiels non couverts

par le modèle et ayant été limitants pour la culture en milieu M3P utilisée pour le développement du modèle.

Les dynamiques d'absorption simulées pour le Pi ont été plus rapides que les dynamiques observées expérimentalement (figure 4.8B). Les concentrations maximales en P total et en Pi intracellulaire prédites ont été identiques aux résultats obtenus expérimentalement. Enfin, la réduction du P simulé observée à partir du jour 40 lorsque

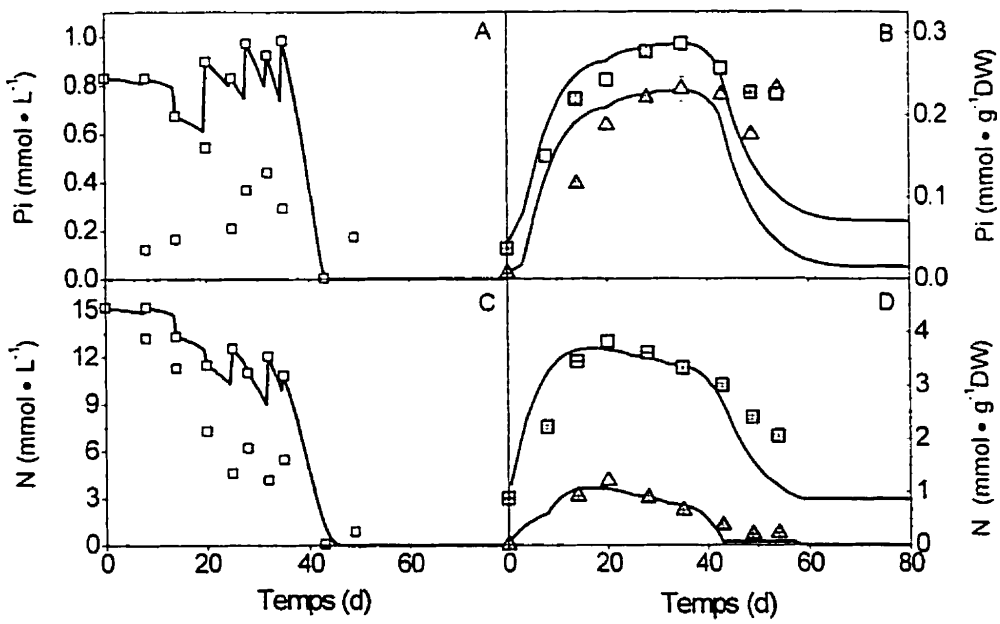

Figure 4.8 : Concentrations extracellulaires, intracellulaires et cellulaires en P et en N pour les racines de *D. carota* cultivées dans un milieu enrichi alimenté en semi-continu. (A) Concentration en Pi dans le milieu de culture, (B) (Δ) Concentration en Pi intracellulaire et (□) concentration en P cellulaire. (C) Concentration en NO_3^- dans le milieu de culture. (D) (Δ) Concentration en intracellulaire et (□) cellulaire. (——) Résultats simulés. Les barres d'erreur correspondent à l'écart type (n = 2).

le Pi avait complètement disparu du milieu de culture s'est produite plus tôt qu'au niveau expérimental. Dans le cas du NO_3^-, les dynamiques d'absorption simulées ont également été plus rapides que les dynamiques observées au niveau expérimental. Les concentrations maximales en N cellulaire total et intracellulaire sont toutes deux identiques à la prédiction du modèle (figure 4.8D).

Enfin, bien que les dynamiques d'absorption du Pi et du NO_3^- simulés étaient similaires aux résultats expérimentaux, les taux de disparition du Pi et du NO_3^- prédits par le modèle étaient beaucoup plus lents que ce qui a été observé expérimentalement (figure 4.8A et C). Ceci laisse croire que certains artefacts sont survenus dans l'échantillonnage ou l'analyse des concentrations du milieu de culture. En effet, la rétention de quantités variables de milieu de culture par la masse de racine compacte lors des changements de milieu a pu survenir, faussant alors les résultats des concentrations extracellulaires en Pi et en NO_3^-. De plus, à cause de la croissance importante, une réduction significative de la quantité d'eau due à l'absorption par les cellules a possiblement augmenté les concentrations des ions dans le milieu de culture par rapport à ce qui est prévu. Finalement, d'après les résultats de pH, il semble que le milieu ait été plus basique au début de la culture, ce qui a alors réduit la quantité de phosphate disponible pour les cellules. Tous ces paramètres influencent l'absorption du Pi par les racines et n'ont pas été considérés par le modèle (voir chapitre deux).

4.7.2.3. Évaluation comportementale du modèle face à une culture en milieu enrichi en cuvée

Finalement, le modèle a aussi été confronté à une culture réalisée en milieu enrichi en mode cuvée afin d'éviter les effets reliés au renouvellement du milieu de culture. Il était attendu que le modèle ne représenterait pas parfaitement les résultats expérimentaux d'une telle culture puisque plusieurs paramètres qui ne sont pas

considérés dans le modèle y étaient limitants. Par exemple, une croissance aérienne importante a certainement réduit la surface d'absorption réelle des nutriments, par rapport à la surface d'absorption considérée par le modèle. De plus, étant donné que le milieu de culture était enrichi, l'activité métabolique et la croissance y étaient importantes, entraînant ainsi une limitation en oxygène.

Il était donc attendu que le taux spécifique de croissance prévu par le modèle soit plus important que celui observé expérimentalement (figure 4.9). Le taux spécifique de croissance observé expérimentalement était de 0.053 ± 0.004 d^{-1} comparativement à un taux de 0.083 d^{-1} obtenu par le modèle.

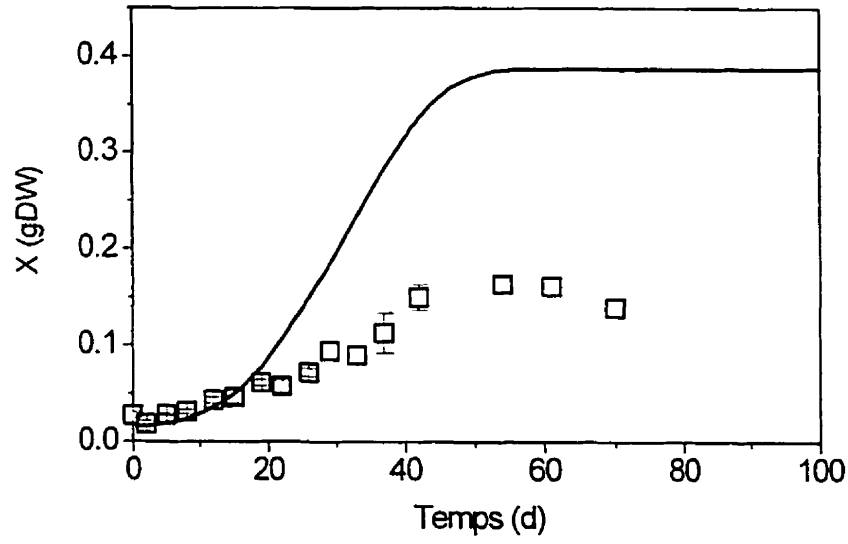

Figure 4.9 : Courbe de croissance des racines de *D. carota* cultivées en cuvée dans des boîtes de Pétri dans un milieu liquide enrichi. (——) Croissance obtenue par modélisation; (□) résultats expérimentaux. Les barres d'erreur correspondent à l'écart type (n = 5).

De plus, les vitesses d'absorption du Pi et du NO_3^- ont également été plus rapides étant donné que l'aire d'absorption était surestimée (figure 4.10). Les concentrations maximales prédites ont toutefois été plus faibles avec 0.244 mmol P • g^{-1}DW et 2.84 mmol N • g^{-1}DW comparativement aux valeurs expérimentales: 0.272 mmol P • g^{-1}DW et 3.16 mmol N • g^{-1}DW.

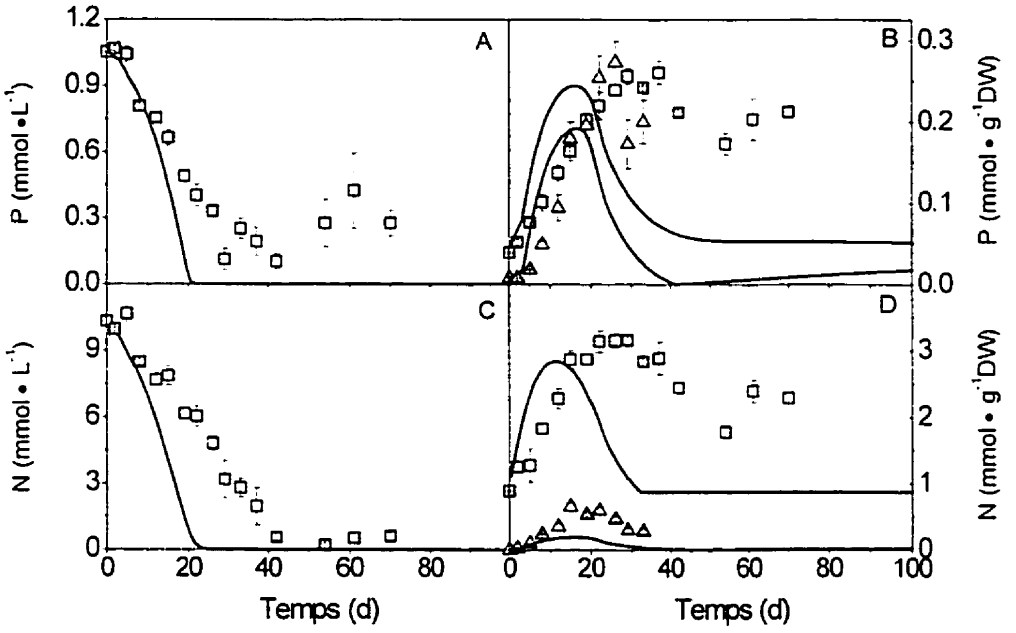

Figure 4.10 : Concentrations extracellulaires, cellulaires et intracellulaires en P et en N pour des racines de *D. carota* cultivées en boîte de Pétri en milieu enrichi en mode cuvée. (A) Concentration en Pi dans le milieu de culture, (B) (Δ) Concentration en Pi intracellulaire et (□) concentration en P cellulaire. (C) Concentration en NO_3^- dans le milieu de culture. (D) (Δ) Concentration en N intracellulaire et (□) cellulaire. (——) Résultats simulés. Les barres d'erreur correspondent à l'écart type (n = 5).

Les concentrations maximales en P total et en Pi intracellulaire prédites ont été identiques aux résultats obtenus expérimentalement.

Au niveau intracellulaire, la concentration maximale prédite pour le N a été de 0.496 mmol N $\bullet g^{-1}$DW alors qu'elle a été de 0.65 mmol N $\bullet g^{-1}$DW expérimentalement. Enfin, les concentrations en Pi intracellulaire obtenues expérimentalement entre les jours 15 et 25 étaient vraisemblablement erronées puisque ces valeurs surpassent les concentrations en P cellulaires qui englobent le P intracellulaire et cellulaire. La cinétique du Pi intracellulaire simulée ne peut donc pas être comparée à de telles valeurs.

4.8. Discussion

4.8.1. Validation de la structure et des concepts fonctionnels du modèle

Les bilans et les hypothèses posées lors de l'élaboration du modèle biocinétique structuré ont permis de représenter fidèlement les résultats obtenus expérimentalement pour la culture en milieu limitant M3P, laquelle a été utilisée pour développer le modèle.

4.8.1.1. Phase de latence et taux spécifique de croissance

La durée de la phase de latence observée expérimentalement correspond à celle prévue par le modèle grâce à une réduction de la vitesse maximale d'absorption de haute affinité ($V_{max,I,P}$) et de l'affinité ($K_{m,I,P}$) pour le Pi, ainsi qu'à la compartimentation du P et du N dans les cellules. En effet, le Pi et le NO_3^- absorbés durant la phase de latence

ont été partagés entre les bassins libres et métaboliques selon une proportion autour de 25 % et 75 % respectivement dans les deux cas.

Une forme du taux spécifique de croissance tenant compte des concentrations intracellulaires en glucides, en P et en N totales (NO_3^- + NO_2^- + NH_4^+) a permis de représenter le taux spécifique de croissance obtenu expérimentalement pour la culture en cuvée en milieu M3P. La constante relative à la contribution du P (K1) au taux spécifique de croissance a été estimée à 4.27 gDW • $mmol^{-1}$ P ; une telle constante entraîne une contribution maximale du P à la croissance de 0.489. Le P réduit donc à lui seul le taux spécifique de croissance de moitié pour la culture en milieu M3P. Une constante similaire à K1 a été estimée par Jolicoeur (1998) pour les racines de *D. carota* en considérant les concentrations en Pi intracellulaire uniquement. Une valeur de 9.2 gDW • $mmol^{-1}$ P a été rapportée : cette estimation est supérieure à la valeur estimée par le modèle, ce qui suggère que le Pi est davantage limitant pour la croissance dans ce modèle.

La constante K2 relative à la contribution du N au taux spécifique de croissance a été estimée à 7.16 gDW•$mmol^{-1}$ N; la contribution résultante du N a augmenté rapidement jusqu'à 1 dès le début de la culture, ce qui suggère que les concentrations en NO_3^- n'ont pas limité la croissance des racines. Enfin, la contribution des glucides (K3) à la croissance a été évaluée à 12.56 g DW • g^{-1} glucides ; grâce à une telle contribution les glucides n'ont pas limité la croissance. Une valeur équivalente de 12.92 g DW • g^{-1} glucides a été estimée par Jolicoeur (1998).

Le taux spécifique maximal de croissance obtenu expérimentalement et utilisé pour développer le modèle a permis d'obtenir un taux spécifique de croissance simulé équivalent à celui observé expérimentalement pour la culture en cuvée dans un milieu limitant M3P. Le taux maximal de croissance obtenu expérimentalement pour la

culture en semi-continu a été de 0.174 ± 0.001 d^{-1}, comparativement à 0.24 d^{-1} rapporté par Taya et al. (1989b) pour des racines de carotte cultivées en bioréacteur. Une telle valeur ne permettait pas de représenter les résultats expérimentaux de façon satisfaisante compte tenu des contraintes au niveau de l'absorption du Pi et du NO_3^- qui dépend de la croissance. Il est donc possible de croire que chaque lignée de racines transformées possède un taux de croissance qui lui est propre.

Par ailleurs, les constantes d'inhibition associées au Pi extracellulaire, k_{pp} et inhipr ont été évaluées à 16 mmol Pi • g^{-1}DW et 2.44 respectivement, ce qui est plus élevé que les valeurs estimées par Jolicoeur (1998) avec 0.9 mmol Pi • g^{-1}DW et 1.87. Le modèle a été développé par Jolicoeur avec des cultures réalisées en milieux appauvris en Pi, c'est pourquoi des coefficients d'inhibition plus faibles convenaient. Les paramètres d'inhibition s'applique à chaque culture en particulier : ils ne sont pas propre aux racines comme telle. De telles valeurs estimées par le modèle reflètent le fait que des concentrations extracellulaires aussi élevées que celles des cultures en milieu enrichi (1 mM Pi) n'ont pas entraîné de toxicité significative pour les cellules. En effet, aucune perturbation de la croissance n'a été notée pour les deux cultures réalisées avec un milieu enrichi : la phase de latence était équivalente à celle observée pour la culture en milieu M3P et le taux spécifique de croissance était plus élevé dans le cas de la culture en milieu enrichi en semi-continu qu'en milieu limitant, tel qu'attendu.

4.8.1.2. Absorption et compartimentation des nutriments

La réduction des vitesses maximales d'absorption du Pi durant la phase de latence a permis de simuler une concentration en P suivant la même tendance que celle observée expérimentalement pour la culture en M3P tant au niveau cellulaire qu'intracellulaire. De plus, grâce à cette hypothèse, la disparition simulée du Pi extracellulaire, laquelle est reliée à l'absorption de Pi, s'est d'abord produite lentement, jusqu'au début de la

phase de croissance exponentielle, après quoi le Pi a disparu rapidement du milieu de culture.

Les paramètres biocinétiques de l'équation de Michaelis-Menten ont été estimés par le modèle : le taux maximal d'absorption en Pi pour les transporteurs de haute affinité ($V_{max,I,P}$) a été estimé à 0.009 mmol Pi • g^{-1}DW • d^{-1} pour la période de latence et à 0.032 mmol Pi • g^{-1}DW • d^{-1} lorsque la croissance exponentielle a été initiée. La constante de haute affinité ($K_{m,I,P}$), quant à elle, est demeurée à 0.046 mmol Pi • L^{-1} durant toute la croissance; une modification de ce paramètre en haute affinité n'a pas été nécessaire pour représenter la courbe d'absorption durant la phase de latence. En ce qui concerne les transporteurs de basse affinité, le taux maximal d'absorption ($V_{max,II,P}$) et la constante d'affinité ($K_{m,II,P}$) se sont maintenus à 0.039 mmol Pi • g^{-1}DW • d^{-1} et 7.9 mmol Pi • L^{-1} respectivement tout au long de la culture. Étant donné que la concentration initiale en Pi extracellulaire pour la culture en milieu M3P était faible (0.087 mmol Pi • L^{-1}), l'absorption du Pi s'est produite uniquement via les transporteurs de haute affinité tout au long de la culture. En effet, la constante d'affinité correspond à la concentration extracellulaire en Pi pour laquelle l'absorption est à la moitié de la valeur maximale. La vitesse d'absorption du Pi par les transporteurs de basse affinité était donc presque nulle, alors que l'absorption par les transporteurs de haute affinité était élevée. Les transporteurs de basse affinité n'étant pas impliqués dans la culture en milieu M3P, seule la vitesse d'absorption du Pi de haute affinité a été modifiée avant le début de la phase de croissance exponentielle.

Les valeurs des paramètres d'absorption estimés pour le Pi sont dans le même ordre de grandeur que les valeurs rapportées dans la littérature, telles que présentées dans le chapitre deux. Des taux d'absorption maximaux de 0.0076 mmol Pi • g^{-1}DW • d^{-1} et 0.019 mmol Pi • g^{-1}DW • d^{-1} ont été estimés par Jolicoeur (1998) pour les transporteurs de haute et basse affinité respectivement pour les racines transformées de *D. carota*.

Les constantes d'affinité, quant à elles, ont été estimées à 0.0018 mmol Pi • L^{-1} et 2.0 mmol Pi • L^{-1} pour le système de haute et basse affinité respectivement. Les taux d'absorption maximaux et les constantes d'affinité estimés par Jolicoeur (1998) sont tous plus faibles que les valeurs estimées par le modèle, mais les résultats demeurent dans le même ordre de grandeur. Enfin, les autres paramètres d'absorption rapportés dans la littérature ont été déterminés pour des espèces végétales différentes et des plantes entières contrairement à des racines transformées. Par conséquent, aucune conclusion ne peut être tirée en comparant les paramètres d'absorption.

En ce qui concerne le NO_3^-, l'absorption en milieu limitant M3P fait intervenir les deux systèmes de transporteurs puisque la concentration initiale dans le milieu de culture est du même ordre de grandeur que le K_m de basse affinité (figure 3.2B). Le taux maximal d'absorption du NO_3^- pour les transporteurs de basse affinité ($V_{max,II,N}$) a été estimé à 0.50 mmol N • g^{-1}DW • d^{-1} ; la constante d'affinité correspondante ($K_{m,II,N}$) a été évaluée à 9.1 mmol N • L^{-1}. Le taux maximal d'absorption pour les transporteurs de haute affinité a été estimé à 0.113 mmol N • g^{-1}DW • d^{-1} et la constante d'affinité a été évaluée à 0.91 mmol N • L^{-1}. Les valeurs des constantes d'absorption estimées par le modèle sont légèrement plus élevées que les résultats rapportés dans la littérature tel que présentés au tableau 2.2. Toutefois, de grandes différences entre les valeurs rapportées dans la littérature sont acceptables étant donné qu'il s'agit d'espèces de plantes différentes et de racines transformées contrairement à des plantes entières.

Les hypothèses relatives à la compartimentation du P en différents bassins a permis de simuler les dynamiques expérimentales d'absorption du Pi dans les cellules. Le bassin de P regroupant les éléments essentiels de base pour les cellules (P_b) a été maintenu à 0.0357 mmol P • g^{-1}DW tout au long de la culture. Cette valeur est semblable à celle estimée par Jolicoeur (1998) : 0.027 mmol P • g^{-1}DW. Étant donné que les inocula utilisés provenaient de milieu appauvri, les bassins de phosphate étaient à leur valeur

minimale au début de la culture. Le bassin de P métabolique était nul tandis que le bassin de Pi libre contenait 0.0066 mmol Pi $\bullet g^{-1}$DW afin de maintenir une activité métabolique minimale. Après avoir été transférées dans un milieu plus riche, les racines ont absorbé le phosphate qui a été utilisé pour regarnir les bassins en P métabolique et sous forme libre. Le bassin de P métabolique a alors augmenté jusqu'à sa valeur maximale de 0.021 mmol P $\bullet g^{-1}$DW ayant possiblement été l'élément déclencheur du début de la croissance exponentielle. Les cellules ayant atteint des conditions favorables, la croissance exponentielle a été initiée. Le bassin cytoplasmique (P_L) contenait alors 0.0243 mmol Pi $\bullet g^{-1}$DW.

À partir du début de la phase de croissance exponentielle, le Pi absorbé a été dirigé en totalité vers le bassin de Pi libre (vacuolaire et/ou cytoplasmique) jusqu'à une valeur maximale ($P_{L,max}$) estimée à 0.23 mmol Pi $\bullet g^{-1}$DW. La concentration maximale en P total cellulaire alors obtenue a été de 0.286 mmol P $\bullet g^{-1}$DW (figure 3.2C). La concentration maximale en Pi intracellulaire est semblable aux résultats obtenus par Mimura (1995) qui a rapporté une concentration maximale en P vacuolaire de 0.225 mmol Pi $\bullet g^{-1}$DW. Enfin, des concentrations en Pi cytoplasmique de 0.045-0.09 mmol Pi$\bullet g^{-1}$DW (Schachtman et al., 1998) et de 0.05 mmol Pi $\bullet g^{-1}$DW (Jolicoeur, 1998) ont été rapportées. Ces valeurs sont semblables aux résultats estimés par le modèle bien qu'il n'ait été possible de délimiter de façon analytique chacun des deux bassins de Pi sous forme libre dans la cellule.

Finalement, lorsque le Pi extracellulaire a été complètement épuisé, le Pi contenu dans le bassin de Pi libre a été utilisé en premier lieu jusqu'à épuisement. Ensuite, le P stocké sous forme de métabolites dans P_{cs} a été libéré afin d'être disponible pour la croissance. Il semble donc que le P ait été transformé de façon réversible du bassin P_{cs}, étant donné qu'il a été libéré au même taux que sa formation pour être utilisé pour la croissance.

Dans le cas du N, la compartimentation a été abordée de la même façon que pour le P. Tout d'abord, la concentration en N constituant les éléments essentiels de base pour les cellules (N_b) a été estimée à 0.865 mmol N $\bullet g^{-1}$DW, alors que la concentration initiale minimale en N libre dans la cellule ($N_{L,min}$) était de 0.066 mmol N $\bullet g^{-1}$DW. La concentration en N cytoplasmique est faible; il semble que cette concentration soit bien en dessous de la concentration en N normalement maintenue par les cellules lors de la croissance normale des cellules. En effet, d'après Miller et Smith (1996), la concentration en N cytoplasmique se situe autour de 0.09 à 0.315 mmol N $\bullet g^{-1}$DW. Le NO_3^- absorbé après l'inoculation est partagé entre les bassins métaboliques et libre, jusqu'à ce que le bassin métabolique soit saturé ($N_{cs,max}$) à une valeur estimée à 1.75 mmol N $\bullet g^{-1}$DW. Cette concentration n'a pas été atteinte avant le début de la croissance exponentielle, ce qui permet de croire que seule une fraction du bassin métabolique est absolument nécessaire pour la croissance, contrairement au phosphate. Les concentrations en N métabolique et libre étaient alors de 0.66 mmol N$\bullet g^{-1}$DW et 0.15 mmol N $\bullet g^{-1}$DW respectivement lors de l'initiation de la croissance exponentielle. Le NO_3^- absorbé ensuite est entièrement dirigé vers le bassin de N libre jusqu'à ce que le contenu maximal ($N_{L,max}$), 1.197 mmol N $\bullet g^{-1}$DW, soit atteint. La concentration totale maximale en N cellulaire observée a été de 3.71 ± 0.04 mmol N $\bullet g^{-1}$DW (figure 3.2 D). La concentration maximale en N vacuolaire observée par Miller et Smith (1996) se situe autour de 0.9 mmol N $\bullet g^{-1}$DW, ce qui est similaire à la valeur estimée par le modèle en considérant que cette dernière englobe les bassins de N libre vacuolaire et cytoplasmique. Toutefois, seules les tendances générales ne peuvent être considérées ici étant donné un efflux en composés azotés non mesurés tels que les acides aminés et le NH_3 à cause de la réaction d'équilibre avec NH_4^+ (figure 3.4D).

Les résultats expérimentaux des glucides sont très limités et parfois erronés; par conséquent, le modèle peut difficilement être validé sous cet aspect. Le taux maximal d'absorption des glucides ($V_{max,I,S}$) et le coefficient d'affinité ($K_{m,I,S}$) ont été estimé à 0.094 mmol glucides • g^{-1}DW • d^{-1} et 0.0967 mmol glucides•L^{-1} respectivement. Ces valeurs sont semblables aux valeurs estimées par Jolicoeur (1998), où $V_{max,I,S}$ et $K_{m,I,S}$ ont été estimés à 0.094 g glucides • g^{-1}DW • d^{-1} et 0.097 g glucides • g^{-1}DW respectivement. L'absorption des glucides se poursuit tant que S_{ir} est plus petit que S_{rcrit} ; ce dernier a été évalué à 0.32 g glucides • g^{-1}DW par le modèle. Cette valeur est supérieure à celle obtenue par Jolicoeur (1998) équivalent à 0.11 g glucides • g^{-1}DW. Le coefficient de rendement des glucides par rapport à la biomasse a été estimé par le modèle à 0.45 mmol glucides • g^{-1}DW, comparativement à une valeur estimée de 0.38 mmol glucides • g^{-1}DW par Jolicoeur (1998). Enfin, le taux d'hydrolyse des glucides dans le milieu de culture en glucose et fructose (μ_{hydro}) a été estimé à 0.61 g glucides • g^{-1}DW • d^{-1} par le modèle, ce qui est identique à la valeur rapportée par Jolicoeur (1998).

4.8.1.4. Maintenance

Le coefficient de maintenance estimé par le modèle pour le P a été de 0.00002 mmol P • g^{-1}DW • d^{-1}; cette valeur est faible comparativement à la valeur estimée par Jolicoeur (1998) : 0.00058 mmol P•g^{-1}DW • d^{-1}. La quantité de P nécessaire pour le maintien du métabolisme des cellules est également beaucoup plus faible : 0.23 % de l'absorption totale en Pi en milieu limitant et 0.006 % de l'absorption totale en Pi en milieu non limitant comparativement à 5% de l'absorption pour des cultures en milieu limitant contenant 0.02 mM Pi, 0.04 mM Pi et 0.12 mM Pi (Jolicoeur, 1998)

Le coefficient de maintenance relatif au N estimé par le modèle a été de 0.007 mmol N • g^{-1}DW • d^{-1} ; cette valeur est relativement élevée comparativement au taux de maintenance pour le Pi puisqu'elle correspond à 4 % et 2 % du taux d'absorption en conditions limitantes et non limitantes respectivement.

Finalement, dans le cas des glucides, le coefficient de maintenance a été estimé à 0.00088 mmol glucides • g^{-1}DW • d^{-1}, ce qui est comparable à la valeur obtenue par Jolicoeur (1998) : 0.00062 mmol glucides • g^{-1}DW • d^{-1}. La maintenance représente alors 1 % du taux d'absorption des glucides.

Le terme de maintenance peut être vu comme un paramètre d'ajustement du modèle ; il ne possède pas une valeur biologique réelle. Les différences entre les valeurs obtenues ici et celles de Jolicoeur (1998) sont donc uniquement liée à des différences au niveau du

4.8.2. Limites du modèle

La validation du modèle avec les cultures réalisées en milieu enrichi, soit en mode cuvée ou semi-continu, est globalement satisfaisante bien que quelques limites aient été soulevées. Ces limites devraient être considérées dans une étape ultérieure à ce projet de maîtrise, afin de tenir compte d'un maximum de facteurs pouvant influencer les dynamiques de croissance et d'absorption.

En premier lieu, le taux spécifique de croissance prédit pour la culture en semi-continu est plus faible que celui observé expérimentalement. Ceci pourrait tout d'abord s'expliquer par l'abondance renouvelée d'autres micronutriments non mesurés (Bieleski et Ferguson, 1983), étant donné les changements de milieu. Par ailleurs, les

résultats obtenus portent à croire que le taux spécifique de croissance pourrait dépendre des concentrations en Pi ou en NO_3^- extracellulaires en plus des concentrations intracellulaires tel que considéré par Toda et Yabe (1979) pour des cellules de *Saccharomyces carlsbergensis.* Ceci permettrait de réduire le taux spécifique de croissance en milieu limitant et de l'augmenter davantage lorsque les concentrations du milieu ne sont pas limitantes.

De plus, lorsque de nouvelles cellules sont formées, elles sont généralement très peu vacuolisées; par conséquent, elles ne devraient pas contenir les mêmes quantités de P et de N stockés que les cellules plus vieilles, contrairement à ce qui est considéré dans le modèle. Ce dernier tient compte de concentrations homogènes dans toutes les cellules, peu importe leur âge et leur stade de développement. La concentration en P (ou en N) nécessaire pour les besoins de divisions cellulaires, et conséquemment pour le calcul du taux spécifique de croissance, est alors surestimée. Cette concentration étant surestimée, la valeur de K1 (et K2) doit être faible pour compenser, ce qui réduit considérablement le taux spécifique de croissance calculé dans le cas des cultures en milieu enrichi. Il serait donc nécessaire de considérer une distribution non homogène de la concentration en P dans les cellules, afin de réduire la quantité en P (et en N) utilisée pour la croissance et de mieux représenter la réalité.

En deuxième lieu, le taux spécifique de croissance simulé, dans le cas de la culture en mode cuvée en milieu enrichi, est plus élevé que celui observé dans la réalité. De plus, le modèle prévoit que la croissance se poursuit plus longtemps que ce qui est observé expérimentalement dans cette culture et dans celle réalisée en semi-continu. Ces deux situations de limitation de la croissance au niveau expérimental pourraient être reliées au fait que d'autres éléments non considérés dans le modèle aient pu être limitants. En effet, aucun des ions contenus dans le milieu de culture et mesurés par HPLC, incluant le Pi et le NO_3^-, n'a été complètement consommé (annexe A).

Il est donc fort probable que l'oxygène ait été limitant, étant donné que les racines ont été cultivées dans un milieu où les nutriments principaux étaient abondants et l'activité métabolique importante. Dans le cas de la culture en cuvée, les boîtes de Pétri ont été scellées par une épaisseur de Parafilm™ qui constitue une membrane perméable pour l'oxygène. Or, étant donné la quantité importante de racines dans un espace restreint, l'échange d'oxygène à travers la membrane était vraisemblablement insuffisant pour subvenir à la demande.

Cet enjeu s'appliquait également dans le cas de la culture en semi-continu étant donné que les racines ont atteint une masse très dense. Le fait que la croissance exponentielle ait cessé avant la fin des changements de milieu en témoigne (voir le chapitre trois). Grâce à l'abondance en Pi et en NO_3^-, les racines ont envahi rapidement tout l'espace qui leur était disponible en se développant de façon très compacte (Boudreau, 1999). Lorsque l'oxygène est limitant, la quantité d'énergie (ATP) produite par respiration et disponible dans la cellule est également réduite de même que la capacité de la cellule à assimiler les nutriments lorsque des moyens énergétiques sont impliqués (H^+/PO_4^-, H^+/NO_3^-). Étant donné que le modèle ne prévoit pas ce phénomène et qu'il considère que la croissance et l'absorption se produisent selon la disponibilité des nutriments, ils ont nécessairement été surestimés. Une déficience en Pi peut également causer une réduction de la capacité et des taux de respiration, tel qu'observée par Parsons et al., (1999). La respiration étant restreinte, la croissance des cellules est également altérée de même que les concentrations cellulaires.

En troisième lieu, d'après les résultats obtenus expérimentalement, la biomasse totale de racine a atteint un plateau à la fin de la croissance exponentielle et ensuite, la biomasse totale a redescendu. Ceci est généralement dû à des phénomènes de mortalité

cellulaire liée à une limitation sévère en nutriments qui n'ont pas été considérés dans le modèle.

En dernier lieu, la compartimentation du P et de N a été limitée par le manque d'information concernant le bassin vacuolaire et les métabolites. En effet, aucune distinction n'a pu être apportée entre le Pi ou le N libre dans le cytoplasme ou dans la vacuole; par conséquent, il a été impossible de déterminer les capacités d'accumulation des cellules en Pi et en N dans la vacuole. De plus, aucune distinction n'a pu être apportée entre les différentes formes sous lesquelles se trouvaient le P et le N dans les métabolites et les bassins contenant les nutriments minimaux pour l'existence des cellules.

Ces limitations devraient donc être considérées dans une étape ultérieure afin d'assurer une meilleure compréhension des dynamiques biocinétiques et nutritionnelles et permettre l'optimisation des conditions du milieu de culture pour les cellules.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Ce mémoire visait à approfondir les comportements nutritionnels et biocinétiques de racines transformées de carotte en culture *in vitro*. La croissance et les dynamiques d'absorption du phosphate et de l'azote, deux nutriments très importants pour les cellules, ont tout d'abord été observées au niveau des racines cultivées dans des milieux dont les concentrations initiales en phosphate et en nitrate sont limitantes dans un cas, et non limitantes dans l'autre. Trois séries d'expériences ont donc été réalisées avec des racines transformées de carotte cultivées 1) en mode cuvée dans un milieu limitant en phosphate et en azote, 2) en mode cuvée dans un milieu enrichi en phosphate et en azote et 3) dans le même milieu enrichi alimenté en semi-continu.

La compartimentation ainsi que les dynamiques d'absorption et de consommation des nutriments importants ont ensuite été étudiées grâce à des analyses élémentaires et intracellulaires effectuées sur les racines. Plusieurs hypothèses ont alors été proposées, lesquelles ont été validées par un modèle biocinétique structuré dont la structure de base a été élaborée par les membres du centre de recherche et développement Biopro de l'École Polytechnique.

La compartimentation du phosphate et de l'azote a tout d'abord été considérée grâce aux résultats des cultures réalisées en milieu limitant et non limitant. Le phosphate et l'azote cellulaires ont été partagés en quatre bassins distincts dans les cellules. Le premier bassin regroupe le phosphore ou l'azote nécessaire aux racines pour exister, en excluant toutes les autres formes libres ou stockées. Ce bassin ne subit aucune variation durant la culture. Le deuxième bassin regroupe les nutriments contenus dans le métabolites cellulaires peu importe la forme sous laquelle ils se présentent. Enfin, le troisième et le quatrième bassins regroupent les nutriments sous formes libres dans le

cytoplasme et la vacuole respectivement. Les contenus respectifs de ces deux bassins n'ont pu être distingués étant donné les techniques d'analyse disponibles.

Les cinétiques d'absorption et de consommation ont été étudiées pour chacun de ces bassins. Plusieurs hypothèses ont alors été émises afin de décrire les comportements des racines avant et après l'initiation de la phase de croissance exponentielle qui apparaît comme une étape importante pour les cellules. En effet, durant cette période, les cellules doivent regarnir les bassins de phosphate et d'azote libres et métaboliques étant donné que les inocula provenaient de milieux appauvris en nutriments. Les bassins de phosphate et d'azote étaient alors à leur limite inférieure.

Lorsque les racines ont été transférées dans un milieu plus riche, il semble que le phosphate ou l'azote absorbé a tout d'abord été utilisé pour regarnir les bassins de nutriments libres et sous forme de métabolites jusqu'à ce que ce dernier soit à saturation. D'après les résultats expérimentaux, le flux de phosphate ou d'azote était environ trois fois plus élevé en direction des métabolites que du bassin de nutriments libres. Lorsque les bassins de phosphate et d'azote métaboliques ont atteint leur limite de saturation, la totalité de ces deux nutriments a été orientée vers les bassins respectifs de nutriments libres. Une fois que les racines ont atteint des conditions nutritionnelles favorables, la croissance exponentielle a été initiée. Les contenus des bassins de phosphate et d'azote libre étaient alors de 0.021 mmol Pi $\bullet g^{-1}$DW et 0.15 mmol N $\bullet g^{-1}$DW respectivement. Les bassins de phosphate et d'azote métabolique, quant à eux, contenaient 0.021 mmol P $\bullet g^{-1}$DW et 0.67 mmol N$\bullet g^{-1}$DW respectivement alors que les limites de saturation étaient de 0.021 mmol P $\bullet g^{-1}$DW et 1.75 mmol N $\bullet g^{-1}$DW respectivement.

Les capacités maximales d'absorption du phosphate et de l'azote dans les bassins de nutriments libres ont été de 0.23 ± 0.015 mmol Pi $\bullet g^{-1}$DW et 1.20 ± 0.03

mmol N • g^{-1}DW. Les concentrations maximales totales en phosphate et en azote contenues dans les cellules étaient alors 0.286 ± 0.008 mmol Pi •g^{-1}DW et 3.71 ± 0.04 mmol N • g^{-1}DW.

Enfin, lorsque le phosphate et l'azote ont été complètement épuisés, les nutriments présents sous formes libres ont tout d'abord été consommés jusqu'à épuisement afin de maintenir la croissance. Ensuite, les bassins de nutriments métaboliques ont été libérés pour obtenir du Pi et de l'azote disponibles pour les besoins de croissance. L'arrêt de la croissance a coïncidé avec l'épuisement total du phosphate métabolique.

Les concentrations en phosphate et azote contenues dans le milieu de culture semblent avoir un effet important sur la croissance des racines de carotte. En effet, un taux de croissance spécifique de 0.0705 ± 0.004 d^{-1} a été obtenu pour la culture en milieu limitant comparativement à un taux de croissance spécifique de 0.174 ± 0.006 d^{-1} obtenu pour la culture réalisée en milieu enrichi alimenté en semi-continu. La croissance a été considérée homogène pour toutes les cellules des racines, bien que seules les racines situées dans la partie apicales des racines se divisent. De plus, les concentrations en nutriments ont aussi été assumées homogènes sur l'ensemble des cellules même si les cellules nouvellement formées sont généralement très peu vacuolisées contrairement aux cellules matures. La croissance des racines a été représentée par une cinétique exponentielle selon une forme de Teissier en tenant compte des concentrations intracellulaires en phosphate, en azote et en glucides. Ceci permet de représenter la croissance des racines qui se poursuit après l'épuisement des nutriments du milieu de culture grâce aux réserves constituées à l'intérieur des cellules. L'absorption du phosphate et de l'azote a été représentée par une cinétique de Michaelis-Menten à deux niveaux d'affinité pour les transporteurs. L'absorption des glucides a été représentée par une cinétique de Michaelis-Menten à un seul niveau d'affinité pour les transporteurs.

Les hypothèses proposées pour la compartimentation et les cinétiques d'absorption du phosphate et de l'azote ainsi que pour les cinétiques de croissance ont été validées par le développement du modèle biocinétique structuré. D'après les résultats obtenus par la modélisation, les hypothèses posées semblent validées. En effet, la prédiction du modèle quant à la croissance des racines en milieu limitant est fidèle aux résultats expérimentaux. La phase de latence observée a été simulée de même que la quantité totale de biomasse formée. Toutefois, le taux de croissance simulé a été plus faible que celui obtenu expérimentalement avec 0.058 ± 0.0005 d^{-1} comparativement à 0.0705 ± 0.004 d^{-1} respectivement. De plus, les dynamiques d'absorption et de consommation du phosphate et de l'azote ont été simulées par le modèle : les taux d'absorption et d'utilisation ont été similaires et les concentrations maximales ont été prédites par le modèle. Les résultats expérimentaux suggéraient que les paramètres d'absorption relatifs au phosphate (V_{max} et K_m) étaient plus faible avant le début de la phase de croissance exponentielle ; cette hypothèse a permis de simuler adéquatement les dynamiques d'absorption du phosphate dans les cellules durant la phase de latence.

Finalement, le modèle a été confronté aux résultats des cultures effectuées en milieu enrichi. Il a ainsi été possible de relever certaines limitations reliées au modèle ou aux cultures réalisés. Tout d'abord, le taux de croissance spécifique simulé pour la culture réalisée en milieu riche alimentée en semi-continu a été de 0.11 d^{-1} comparativement à un taux de 0.17 d^{-1} obtenu expérimentalement. Ces résultats laissent croire que les concentrations extracellulaires devraient être considérées dans le taux de croissance spécifique, afin de restreindre la croissance lorsque les concentrations extracellulaires sont nulles et permettre une croissance plus importante en milieu non limitant. De plus, le modèle prévoit une croissance plus importante de la biomasse racinaire avec une valeur de 4.02 gDW comparativement à 1.84 gDW obtenue expérimentalement. Ceci pourrait être dû à une limitation par l'espace ou l'oxygène dans les cultures en milieu

enrichi, étant donné que les nutriments sont abondants et par conséquent l'activité métabolique est importante. Ces limitations devraient donc être corrigées lors de travaux ultérieurs afin de représenter fidèlement les dynamiques de nutrition et de croissance des racines de carotte.

Ces travaux de maîtrise ont donc permis d'approfondir les connaissances au niveau de la nutrition des racines de carotte et de leur physiologie. En effet, le phosphate et l'azote ont pu être compartimentés dans les cellules en distinguant les formes libres et les autres formes combinées présentes dans les cellules. Trois bassins de phosphate et d'azote respectivement ont alors été identifiés, ce qui a permis d'élaborer les étapes d'absorption du phosphate et de l'azote. Enfin, le modèle biocinétique structuré développé est original et constitue un outil précieux pour tester la validité de différentes hypothèses quant à la nutrition et l'assimilation des nutriments dans les cellules.

RECOMMANDATIONS

Les expériences réalisées dans le cadre de cette maîtrise ont permis d'approfondir les connaissances reliées aux dynamiques de croissances et d'absorption du phosphate et de l'azote. Toutefois, certains travaux supplémentaires pourraient bonifier davantage les connaissances au niveau des cinétiques d'absorption et de croissance, ainsi qu'au niveau du modèle.

Tout d'abord, la croissance des racines cultivées dans un milieu enrichi semble avoir été limitée par le manque d'oxygène ou d'espace, tel que démontré par les prédictions du modèle. Ce problème pourrait être évité en effectuant une culture en bioréacteur où les conditions environnementales en oxygène dissout serait contrôlées grâce à un mélange efficace.

De plus, l'hypothèse simplificatrice selon laquelle la croissance est homogène pour toutes les cellules des racines devrait être reconsidérée. En effet, la croissance des cellules varient en fonction de leur âge et de leur fonction dans les racines. De plus, les concentrations en phosphate et en azote ont également été considérées homogènes pour toutes les cellules, sans tenir compte du fait que les nouvelles cellules sont généralement peu vacuolisées contrairement aux cellules matures. En tenant compte d'une telle hétérogénéité au niveau de la croissance et des concentrations cellulaires, il serait probablement possible de modéliser plus fidèlement les phénomènes observés expérimentalement.

Par ailleurs, il serait intéressant de considérer un plus grand nombre de nutriments dans le modèle afin d'expliquer certaines divergences entre les prédictions du modèle et les résultats expérimentaux obtenus pour les cultures en milieu enrichi. De plus, bien que

le modèle tienne compte de la contribution des glucides pour la croissance, très peu de résultats ont été disponibles pour valider les hypothèses posées. Il serait donc souhaitable de valider le modèle avec un plus grand nombre de résultats expérimentaux et d'approfondir la compartimentation des glucides dans les cellules. Enfin, les résultats expérimentaux montrent que la quantité de biomasse totale tend à diminuer quelques jours après la fin de la croissance exponentielle à cause de la lyse cellulaire. Il serait donc intéressant d'intégrer une description de ce phénomène au modèle biocinétique développé afin d'obtenir une meilleure représentation des dynamiques de croissance.

Finalement, il serait avantageux de bonifier le modèle grâce à une compartimentation plus détaillée du phosphate et de l'azote dans les cellules. Ceci pourrait être accompli grâce à des analyses cellulaires faisant appel à des technologies de pointes telles que la résonance magnétique nucléaire (RMN) ou autres. Il serait ainsi possible de distinguer les formes de phosphate ou d'azote libres des autres formes non libres dans les cellules telles que les P-esters, les phospholipides et autres, ainsi que les acides aminés, les protéines et autres, dans le cas de l'azote. Enfin, une distinction entre les formes libres de phosphate ou d'azote localisées dans le cytoplasme ou la vacuole permettrait d'approfondir les connaissances au niveau de la séquence d'absorption et de la compartimentation.

BIBLIOGRAPHIE

BARBER, S.A. et SILBERBUSH, M. (1984). Plant root morphology and nutrient uptake. Dans : Roots, nutrient and water influx, and plant growth. ASA Spec. Publ. 49 Ed. D M Kral. Am. Soc. Agron., Madison, WI, 65-87.

BARBER, S.A., WALKER, J.M. et WASEY, E.H. (1963). Mechanisms for the movement of plant nutrients from the soil and fertilizer to the plant root. J. Agric. Food. chem., **11** : 204-207.

BÉCARD, G. et FORTIN, J.A. (1988). Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. New Phytol., **108** : 211-218.

BEEVER, R.E. et BURNS, D.J.W. (1980a). Phosphorus uptake, storage and utilization by fungi. Dans : Advances in botanical research, H.W. Woolhouse Eds, Academic Press, London England, **8** : 127-219.

BEEVER, R.E. et BURNS, D.J.W. (1980b). Adaptative changes in phosphate uptake by the fungus *Neurospora crassa* in response to phosphate supply. J. Bacteriol., **132** : 520-525.

BETHLENFALVAY, G.J. (1992). Mycorrhizae and crop productivity. Dans : Mycorrhizae in sustainable agriculture. A.S.A. Special Publication, **54** : 1-27.

BETHLENFALVAY, G.J., REYES-SOLIS, M.G., CAMEL, S.B. et FERRERA-CERRATO, R. (1991). Nutrient transfer between the root zones of soybean and maize plants connected by a common mycorrhizal mycelium. Plysiol. Plant., **82** : 423-432.

BIELESKI, R.L. (1973). Phosphate pools, phosphate transport, and phosphate availability. Plant Physiol., **24** : 225-252.

BIELESKI, R.L. et FERGUSON, I.B. (1983). Physiology and metabolism of phosphate and its compounds. Dans : Inorganic Plant Nutrition : Encyclopedia of plant physiology (New series). A. Lauchi and R.L. Bieleski Eds. Springer-Verlag, Wien, New York, É.U., 442-449.

BLEVINS, D.G. et REINBOTT, T.M. (1998). Impact of phosphorus nutrition on magnesium, calcium, and water status of plants. Dans : Phosphorus in plant biology : Regulatory roles in molecular, cellular, organismic, and ecosystem processes, J.P. Lynch, J. Deigman, (eds), Am. society of Plant Physiol, 168-177.

BLOOM, A.J., SUKRAPANNA, S.S. et WARNER, R.L. (1992). Root respiration associated with ammonium and nitrate absorption by barley. Plant Physiol., **99** : 1294-1304.

BOUDREAU, M.-J. (1999). Développement d'un bioréacteur à garnissages pour la culture de racines transformées. Mémoire de maîtrise, École Polytechnique de Montréal, Canada.

BOULDIN D.R. (1961). Mathematical description of diffusion process in the soil. Soil Sci. Soc. Am Proc., **25** : 476-480.

BOUMA D. (1975). The uptake and translocation of sulphur in plant. Dans : Sulphur in Australasian Agriculture, K.D. McLachlan ed., Sydney, 79-86.

BRETELER, H. et NISSEN, P. (1982). Effect of exogenous and endogenous nitrate concentration on nitrate utilization by *Dwraf bean*. Plant physiol., **79** :754-759.

CEREZO, M., GARCIA-AGUSTIN, P., SERNA, D. et PRIMO-MILLO, E. (1997). Kinetics of nitrate uptake by *citrus* seedlings and inhibitory effects of salinity. Plant Science, **126** : 105-112.

CHAPIN, F.S. et BIELESKI, R.J. (1982). Mild phosphorus stress in barley and a related low-phosphorous-adapted barleygrass : phosphorus fractions and phosphate absorption in relation to growth. Physiol. Plant, **54** : 309-317.

CLARKSON, D.T. (1985). Factors affecting mineral nutrient acquisition by plants. Ann. Rev. Plant Physiol., **36** : 77-115.

CLARKSON, D.T. et HANSON, J.B. (1980). The mineral nutrition of higher plants. Ann. Rev. Plant physiol., **31** : 239-298.

COMERFORD, N.B. (1998). Soil phosphorus bioavailability. Dans : Phosphorus in plant biology : regulatory roles in molecular, cellular, organismic, and ecosystem processes. J.P. Lynch, J. Deikman Eds, Am. Society of Plant Physiol., 136-147.

CONSTABEL, F. et WETTER, L.R. (1982). Dans : Plants tissue culture methods, 2e revised edition, N.R.C.C., Plant Biochemistry Section. Saskatchewan, Canada.

COOKE, A.D., STEWART, G.R. et PHILLIPS, T. (1992). Dynamics of nitrogenous assimilate partitioning between cytoplasmic and vacuolar fractions in carrot cell suspension cultures. Plant Physiol., **100** : 1808-1813.

COX, W.J. et REISENAUER, H.M. (1973). Growth and ion uptake by wheat supplied nitrogen as nitrate, or ammonium, or both. Plant soil, **38** : 363-380.

CRAWFORD, N.M. et GLASS, A.D.M. (1998). Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. Trends in plant Science, **3** : 389-395.

CRESS, W.A., THRONEBERRY, G.O. et LINDSEY, D.L. (1979). Kinetics of phosphorus absorption by mycorrhizal and non-mycorhizal tomato roots. Plant Physiol., **64** : 484-487.

DAVIES, F.T., PORTER, J.R. et LINDERMAN, R.G. (1993). VAM fungus spore populations and colonization of roots of maize and soybean under conventional and low-input sustainable agriculture. Agric. Ecosys. Environ., **43** : 325-335.

DILORIO, A. A., CHEETHAM, R. D. et WEATHERS, P. J. (1992). Growth of transformed roots in a nutrient mist bioreactor: reactor performance and evaluation. Appl. Microbiol. Biotechnol., **37** : 457-462.

DORAN, P.M. (1999). Design of mixing systems for plant cell suspensions in stirred reactors. Biotechnol. Prog., **15** : 319-335.

DUFF, S.M.G., MOORHEAD, G.B.F., LEFEBVRE, D.D. et PLAXTON, W.C. (1989). Phosphate starvation inducible « bypasses » of adenylate and phosphate dependent glycolytic enzymes in *Brassica nigra* suspension cells. Plant physiol., **90** :1275-1278.

DUNLOP, D.S. et CURTIS, W.R. (1991). Synergistic response of plant hairy-root cultures to phosphate limitation and fungal elicitation. Biotechnol. Prog., **7** : 434-438.

DREW, M.C. et SAKER, L.R. (1984). Uptake and long-distance transport of phosphate, potassium, and chloride in relation to internal ion concentrations in barley: evidence of nonallosteric regulation. Planta, **160** : 500-507.

EMSLEY, J. et HALL, D. (1976). The chemistry of phosphorus. Wiley, New York.

EPSTEIN, E. (1972). Mineral nNutrition of plants : principles and perspectives. Wiley and Sons, New York.

EVANS, H.J. et SORGER, G.J. (1966). Role of mineral elements with emphasis on the univalent cations. Ann. Rev. Plant Plysiol., **17** : 47-76.

FILLEUR, S. et DANIEL-VEDELE, F. (1999). Expression analysis of a high-affinity nitrate transporter isolated from *Arabidopsis thaliana* by differential display. Planta, **207** : 461-469.

FLORES, H.E. (1986). Use of plant cell and organ culture in the production of biological chemicals. Dans : Applications of Biotechnology to Agriculture Chemistry. Lebaron, H., Mumma, R.O., Honeycutt, R.C., Duesing, J.H. (Eds.). Proc. 190th Amer. Chem. Soc. Symposium Series 190.

FORTIN, J.A., ST-ARNAUD, M., HAMEL, C., CHAVARIE, C. et JOLICOEUR, M. (1996). Aseptic in vitro endomycorrhizal spore mass production. U.S. Patent., **5** : 530-554.

FORTIN, A.(1996). Méthode de Runge Kutta d'ordre 4 pour les systèmes. Analyse numerique pour ingenieurs, Éditions de l'École Polytechnique de Montréal.

GAUDETTE, M. (1997). Mise au point et validation d'un procédé de production de champignons endomycorhiziens en bioréacteur. Mémoire de maîtrise, École Polytechnique de Montréal, Canada.

GEORGE, E., MARSHENER, H. et JAKOBSEN, I. (1995). Role of arbuscular mycorrhizal fungi in uptake of phosphorus and nitrogen from soil. Crit. Rev. Biotechnol., **15** : 257-270.

GLASS, A.D.M., SIDDIQI, M.Y., RUTH, T.H. et RUFTY, T.W. (1990). Studies of uptake of nitrate in barley. Plant physiol., **93** : 1585-1589.

GLUND, K., NÜRNBERGER, T., ABEL, S., JOST, W., PREISSER, J. et KOMOR, E. (1990). Intracellular Pi- compartimentation during phosphate starvation-triggered induction of an extracellular ribonuclease in tomato cell culture. Dans: Current plant science and biotechnology in agriculture: Progress in plant cellular and molecular biology. Nijkamp, H.J.J., Van Der Plas, L.H.W., Van Aartrijk, J., editors. Kluwer academic publishers, Dordrecht, Netherlands, **9** : 339-342.

GOLDSTEIN, A.H. (1992). Phosphate starvation inducible enzymes and proteins in higher plants. Dans : Inducible plant proteins. J.L. Wray, Eds Cambridge University Press, Cambridge, 25-44.

GRAHAM, J.H., LEONARD, R.T. et MENGE, J.A. (1981). Membrane-mediated decrease in root exudation responsible for phosphorus inhibition of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation. Plant Physiol., **68** : 548-552.

GRANT, R.F. et ROBERTSON, J.A. (1997). Phosphorus uptake by root systems : mathematical modelling in *ecosys*. Plant and Soil, **188** : 279-297.

GRM, B. MELE, M. et KREMSER, M. (1980). Model of growth and ergot alkaloid production by *Claviceps purpurea*. Biotechnol. Bioeng., **22** : 255-270.

GUNDLACH, H., MULLER, M.J., KUTCHAN, T.M. et ZENK, M.H. (1992). Jasmomic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **89** : 2389-2393.

HAMILL, J.D., PARR, A.J., RHODES, M.J.C., ROBINS, R.J. et WALTON, N.J. (1987). New routes to plant secondary products. Biotechnology, **5** : 800-804.

HEWITT, E.J., HUCKLESBY, D.P. et NOTTON, B.A. (1975). Nitrate metabolism. 633-681.

HILTON, M. G. et RHODES, M. J. C. (1990). Growth and hyoscyamine production of hairy roots cultures of *Datura stramonium* in a modified stirred tank reactor. Appl. Microbiol. Biotechnol., **33** : 132-138.

IVASHIKINA, N.V. et SOKOLOV, O.A. (1997). Regulation of nitrate uptake and distribution in maize seedlings by nitrate, nitrite, ammonium and glutamate. Plant Science, **123** : 29-37.

JOLICOEUR, M. (1998). Optimisation d'un procédé de production de champignons endomycorhiziens en bioréacteur. Thèse de doctorat, École Polytechnique de Montréal, Canada.

JOLICOEUR, M., CHAVARIE, C., CARREAU P.J. et ARCHAMBAULT, J. (1992). Development of a helical-ribbon impeller bioreactor for high-density plant cell suspension culture. Biotechnol. Bioeng., **39** : 511-521.

JOLICOEUR, M., WILLIAMS, R.D., CHAVARIE, C., FORTIN, J.A. et ARCHAMBAULT, J. (1999). Production of endomycorrhizae propagules in bioreactors. Biotechnol. Bioeng. **64** : 224-232.

JONES, C.A., COLE, C.V., SHARPLEY, A.N. et WILLIAMS, J.R. (1984). A simplified soil and plant phosphorus model : I. Documentation. Soil Sci. Soc. Am. J., **48** : 800-805.

KIERAN, P.M., MACLOUGHLIN, P.F. et MALONE, D.M. (1997). Minireview : Plant cell suspension cultures : some engineering considerations. J. Biotechnol., **59** : 39-52.

KING, P.J. (1977). Studies on the growth in culture of plant cells. J. Exp. Bot., **102** : 142-155.

KNOBLOCH, K.H. (1982). Uptake of phosphate and its effect on phenylalanine ammonia-lyase activity and cinnamol putrescine accumulation in cell suspension cultures of *Nicotiana tabacum*. Plant cell rep., **1** : 128-130.

KOIDE, R.T. et SCHREINER, R.P. (1992). Regulation of the vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., **43** : 557-581.

KOSEGARTEN, H., GROLIG, F., WIENEKE, J., WILSON, G. et HOFFMANN, B. (1997). Differential ammonia-elicited changes of cytosolic pH in root hair cells of rice and maize as monitored by 2',7'-bis-(2-Carboxyethyl)-5 (and –6)-carboxyfluorescein-fluorescence ratio. Plant Physiol., **113** : 451-461.

KURZ, W.G.W. (1989). Bottlenecks towards commercialization of product synthesis by plant cell cultures. Dans : Primary and secondary metabolism of plant cell cultures II, Kurz, W.G.W., Ed., Springer-Verlag, Berlin. 303-304.

LEACH, F. (1983). Thèse de doctorat, Université de Paris-Sud, Centre d'Orsay, France.

LE BOT, J., ADAMOWICZ, S. et ROBIN, P. (1998). Modelling plant nutrition of horticultural crops: a review. Scientia Horticulturae, **74** : 47-82.

LEE, C.W.T. et SHULER, M.L. (2000). The effect of inoculum density and conditioned medium on the production of amalicine and catharanthine from immobilized *Catharanthus roseus* cells. Biotechnol. Bioeng., **67** : 61-72.

LEE, R.B. (1982). Selectivity and kinetics of ion uptake by barley plants following nutrient deficiency, Ann. Bot., **50** : 429-449.

LEE, R.B. et RATCLIFFE R.G. (1983). Phosphorus nutrition and the intracellular distribution of inorganic phosphate in pea roots tips: A quantitative study using ^{31}P-NMR. J. Exp. Bot., **34** : 1222-1244.

LEE, R.B., RATCLIFFE R.G. et SOUTHON, T.E. (1990). ^{31}P NMR measurements of the cytoplasmic and vacuolar Pi content of mature maize roots : relationships with phosphorus status and phosphate fluxes. J. Exp. Bot., **41** : 1063-1078.

LEGGETT, J.E., GALLOWAY, R.A. et GAUCH, H.G. (1965). Calcium activation of orthophosphate absorption by barley roots. Plant physiol., **40** : 897-902.

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

LOWENDORF, H.S., SLAYMAN, C.L. et SLAYMAN, C.W. (1974). Biochim. Biophys. Acta, **389** : 541-549.

MAK, Y. et DORAN, P.M. (1993). Effect of cell-cycle inhibition on synthesis of steroidal alkaloids by *Solanum aviculare* plant cells. Biotechnol. Letters, **15** : 1031-1034.

MARSCHNER, H. et DELL, B. (1994). Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. Plant and soil, **159** : 89-102,

MARTY, F. (1999). Plant Vacuoles. The Plant Cell, **11** : 587-599.

MELAN, A.M., DONG, X., ENDARA, M.E., DAVIS, K.R., AUSUBEL, F.M. et PETERMAN, T.K. (1993). An *Arabidopsis thaliana* lipoxygenase gene can be induced by pathogens, abscisic acid and methyl jasmonate. Plant Physiol., **101** : 441-450.

MENGEL, K. et KIRKBY, E. A. (1978). Principles of plant nutrition. Bern. Int. Poash Inst., 593 p.

MILLER, A.J. et SMITH, S.J. (1996). Nitrate transport and compartmentation in cereal root cells. J. Exp. Bot., **47** : 843-854.

MIMURA, T. (1995). Homeostasis and transport of inorganic phosphate in plants. Plant Cell Physiol., **36** :1-7.

MITCHELL, P. (1968). Chemiosmotic coupling and energy transduction. Bodmin : Glynn., 111 p.

NEEDHAM, A.E. (1965). The Uniqueness of Biological Materials, Oxford : Pergamon. 593 p.

NELDER, J.A. et MEAD, R. (1985). A simplex method for function minimization. Computer J., **7** : 308-313.

NEWSHAM, K.K.,. FITTER A.H. et WATKINSON, A.R. (1995). Multi-functionality and biodiversity in arbuscular mycorrhizas. Tree, **10** : 407-411.

NYE, P.H. (1966). The effect of nutrient intensity and buffering power of soil and the absorbing power, size and root-hairs of a root on nutrient adsorption by diffusion. Plant soil, **25** : 81-105.

NYHOLM, N. (1976). Biotechnol. Bioeng., **19** : 1043.

OAKS, A. et BIDWELL, R.G.S. (1970). Ann. Rev. Plant Physiol., **21** : 43-66.

OKSMAN-CALDENTEY, K.M., SEVON, N., VANHALA, L. et HILTUNEN, R. (1994). Effect of nitrogen and sucrose on the primary and secondary metabolism of transformed root cultures of *Hyoscyamus muticus*. Plant Cell Tissue Organ Cult., **38** : 263-272.

PARSONS, H.L., IP, J.H. et VANLERBERGHE G.C. (1999). Increased respirator restriction during phosphate-limited growth in transgenic tobacco cells lacking alternative oxidase. Plant Physiol., **121** : 1309-1320.

PAZOUTOVA, S., VOTRUBA, J. et REHACEK, Z. (1981). A mathematical model of growth and alkaloid production in the submerged culture of *Claviceps purpurea*. Biotechnol. Bioeng., **23** : 2837-2849.

PFEFFER, P.E., SHACHAR-HILL, Y., BÉCARD, G., ROLIN, D. et DOUDS, D.D. JR. (1998). Nutrient transport and metabolism in the life cycle of arbuscular mycorrhizae as examined by NMR spectroscopy. Dans: Radical biology: advances and perpectives on the function of plant roots. Flores H.E., Lynch J.P., Eissenstat D., Eds. American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland, USA, **18** : 178-187.

PILBEAM, D.J. et KIRKBY, E.A. (1992). Some aspects of the utilization of nitrate and ammonium by plants. Dans : Nitrogen metabolism of plants, Clarendon Press – Oxford.

PLAXTON, W.C. (1998). Metabolic aspects of phosphate starvation in plants. Dans : Phosphorus in plant biology : regulatory roles in molecular, cellular, organism, and ecosystem processes, J.P. Lynch, J. Deikman, (eds) American society of plant physiologists, 229-241.

Quickchem method. Lachat Instruments, Millwakee, Wi. USA.

PRESCOTT, HARLEY et KLEIN. (1993). Microbiologie, 2nd édition (eds) De Boeck Université. W.C. Brown Communication, Inc.

RAGHOTHAMA, K.G., MUCHHAL, U.S., KIM, D.H. et BUCHER, M. (1998). Molecular regulation of plant phosphate transporters. Dans : Phosphorus in plant biology : regulatory roles in molecular, cellular, organism, and ecosystem processes, J.P. Lynch, J. Deikman, (eds) American society of plant physiologists, 271-280.

RAMAKRISHNAN, D., SALIM, J. et CURTIS, W. R. (1994). Inoculation and tissue distribution in pilot-scale plant root culture bioreactors. Biotechnol. Techniques, **8** : 639-644.

RAVEN, H. P., EVERT, F. R. et EICHHORN, E. S. (1971). Biology of Plants, 5th edition Worth Publishers, Inc. 238-242.

REINBOTT, T.M. et BLEVINS, D.G. (1997). Phosphorus and magnesium fertilization interaction with soil phosphorus level : tall fescue yield and mineral element content. J. Prod. Agric., **10** : 260-265.

RIJHWANI, S.K. et SHANKS, J.V. (1998). Effect of subculture cycle on growth and indole alkaloid accumulation by *Catharanthus roseus* hairy root cultures. Enzyme Microb. Tech., **22** : 606-611.

Rijhwani, S.K, Ho, C.H. et SHANKS, J.V. (1999). *In vivo* ^{31}P and Multilabel ^{13}C NMR Measurements for evaluation of plant metabolic pathways. Metabolic Engineering, **1** : 12-25.

ROKEM, J.S. et GOLDBERG, S.K. (1985). Secondary Metabolites From Plant Cell Suspension Cultures : Methods for Yield Improvement. Dans : Advances in Biotechnological Processes 4., Alen.R. Liss Inc., New York, 241-274.

SALISBURY, F.B. et ROSS, C.W. (1992). Plant Physiol., 4e édition. Wadsworth Publishers, Belmont, CA, É.-U., 682 p.

SANDERS, F.E. et SHEIKH, N. A. (1983). The development of vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in plant root systems, Plant and Soil, **71** : 223-246.

SCHACHTMAN, D.P., REID, R.J. et AULING, S.M. (1998). Phophorus uptake by plants : from soil to cell. Plant physiol., **116** : 447-453.

SIDDIQI, M.Y., GLASS, A.D.M., RUTH, T.J. et FERNANDO, M. (1990). Studies on the regulation of nitrate influx by barley seedlings using $^{13}NO_3^-$. Plant physiol., **90** : 806-813.

SINGH, G., GAVRIELI, J., OAKEY, J.S. et CURTIS, W.R. (1998). Interaction of methyl jasmonate, wounding and fungal elicitation during sesquiterpene induction in *Hyoscyamus muticus* in root cultures. Plant Cell Reports, **17** : 391-396.

SMITH, F.A. (1966). Active phosphate uptake by *Nitella translucens*. Biochim. Biophys. Acta, **126** : 94-99.

ST-ARNAUD, M., HAMEL, C., CARON, M. et FORTIN, J.A. (1994). Inhibition of *Pythium ultimum* in roots and growth substrate of mycorrhizal *Tagetas patula* colonized with *Glomus intraradices*. Can. J. Plant Pathol., **16** : 187-194.

ST-ARNAUD, M., HAMEL, C., CARON, M. et FORTIN, J.A. (1995). Endomycorhizes VA et sensibilité aux maladies : synthèse de la littérature et mécanismes d'interaction potentiels. Dans : La symbiose mycorhizienne – État des connaissances. Fortin J.A., Charest C., Piché Y. Frelighsburg, Québec, Éditions Orbis, 51-87.

TANAKA, H., NISHIJIMA, F., SUWA, M. et IWAMOTO, T. (1983). Rotating drum fermentor for plant cell suspension cultures. Biotechnol. Bioeng., **25** : 2359-2370.

TAYA, M., KINO-OKA, M., TONE, S. et KOBAYASHI, S. (1989a). A Kinetic Model of Branching growth of plant hairy root. J. Chem. Eng. Japan. **22** : 698-700.

TAYA, M., YOYOMA, A., KONDO, O., KOBAYASHI, T. et MATSUI, C. (1989b). Growth characteristics of plant hairy roots and their cultures in bioreactors. J.Chem. Eng. Japan. **22** : 84-88.

TEPFER, D. (1984). Transformation of several species of higher plants by *agrobacterium rhizogenes* : sexual transmission of the transformed genotype and phenotype. Cell, **37** : 959-967.

TEPFER, D. (1983). The biology of genetic transformation of higher plants by Agrobacterium rhizogenes. Dans : Molecular genetics of the bacteria plant interaction, A. Pühler Ed., New York : Springer-Verlag, 248-258.

THEODOROU, M.E. et PLAXTON, W.C. (1993). Metabolic adaptations of plant respiration to nutritional phosphate deprivation. Plant physiol., **101** : 339-344.

TISDALL, J.M. ET OADES, J.M. (1979). Stabilization of soil aggregates by root systems of rye-grass. Aust. J. Soil Res., **17** : 429-441.

TODA, K. et YABE, I. (1979). Mathematical model of cell growth and phosphatase biosynthesis in saccharomyces carlsbergensis under phosphate limitation. Biotechnol. Bioeng., **21**: 487-502.

TOIVONEN, L. (1993). Utilization of hairy root cultures for production of secondary metabolites. Biotechnol. Prog., **9** : 12-20.

TOUGH, A.J., PULHAM, J. et PROSSER, J.I. (1995). A mathematical model for the growth of mycelial pellet populations. Biotechnol. Bioeng. **46** : 561-572.

ULLRICH, W.R. (1992). Transport of nitrate and ammonium through plant membranes. Dans : Nitrogen metabolism of plants. Clarendon Press – Oxford

VERPOORTE, R., VAN DER HEIJDEN, R., SCHRIPSEMA, J., HOGE, J.H.C. et TEN HOOPEN, H.J.G. (1993). Plant biotechnology for the production of alkaloids: Present status and prospects. J. Nat. Prod., **56** : 186-207.

ANNEXE A :

MILIEU DE CULTURE

Tableau A.1 : Solutions pour le milieu minimum

Sels majeurs	$MgSO_4 \bullet 7H_2O$	14.6 g		
	KNO_3	1.6 g	dans 500 mL	utiliser 25 mL/L
	KCl	1.3 g		
Calcium	$Ca(NO_3)_2 \bullet 4H_2O$	28.8 g	dans 500 mL	utiliser 5 mL/L
Vitamines	glycine	1.5 g		
	thiamine	50 mg		
	pyridoxine	50 mg	dans 500 mL	utiliser 1 mL/L
	acide	250 mg		
	nicotinique	25 g		
	inositol			
Micronutriments	KI	375 mg		
	$MnCl_2 \bullet 4H_2O$	3.0 g		
	$ZnSO_4 \bullet 7H_2O$	1.325 g	dans 500 mL	utiliser 1 mL/L
	H_3BO_3	0.75 g		
	$CuSO_4 \bullet 5H_2O$	65 mg		
	$Na_2MoO_4 \bullet 2H_2O$	1.2 mg		
NaFe-EDTA	$FeSO_4$-EDTA	4.3 g	dans 1L	utiliser 1.86 mL/L
PO_4^{-2}	KH_2PO_4	0.48 g	dans 100 mL	utiliser 1 mL/L
Sucrose				utiliser 10 g/L

ANNEXE B :

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

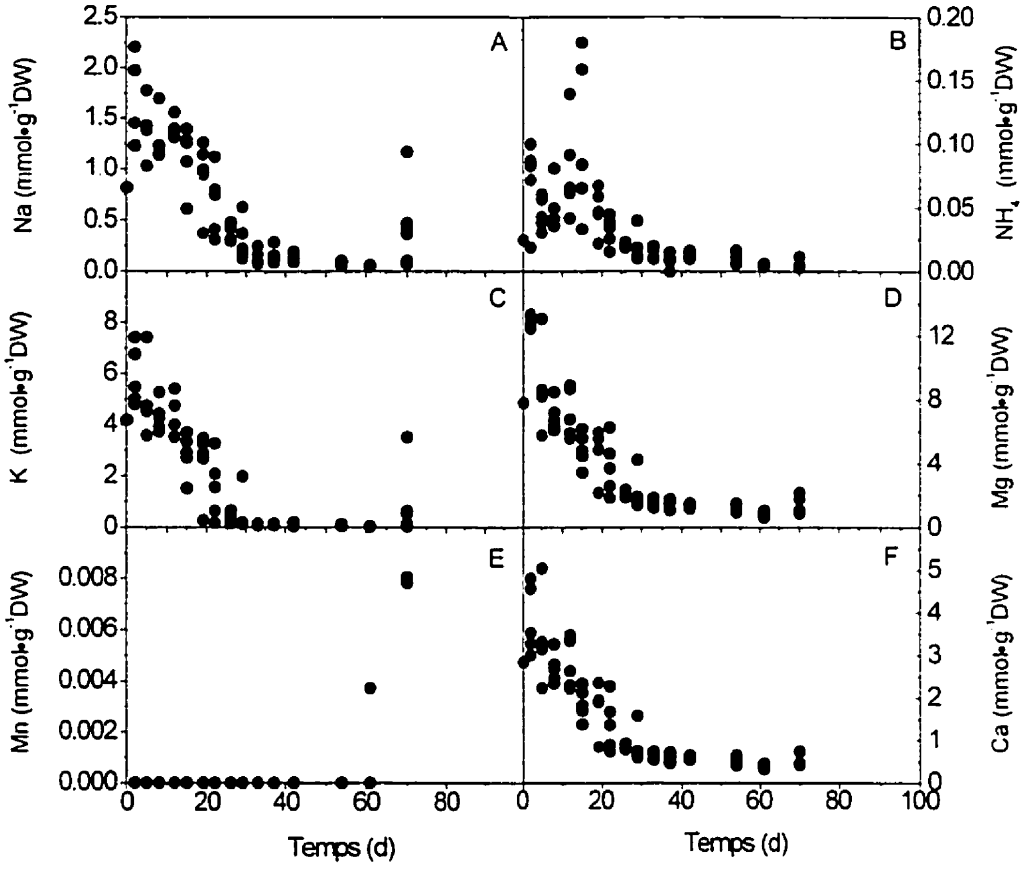

Figure B.1 : Concentrations des cations extracellulaires mesurés pour les racines cultivées en cuvée dans un milieu limitant M3P dans des boîtes de Pétri.

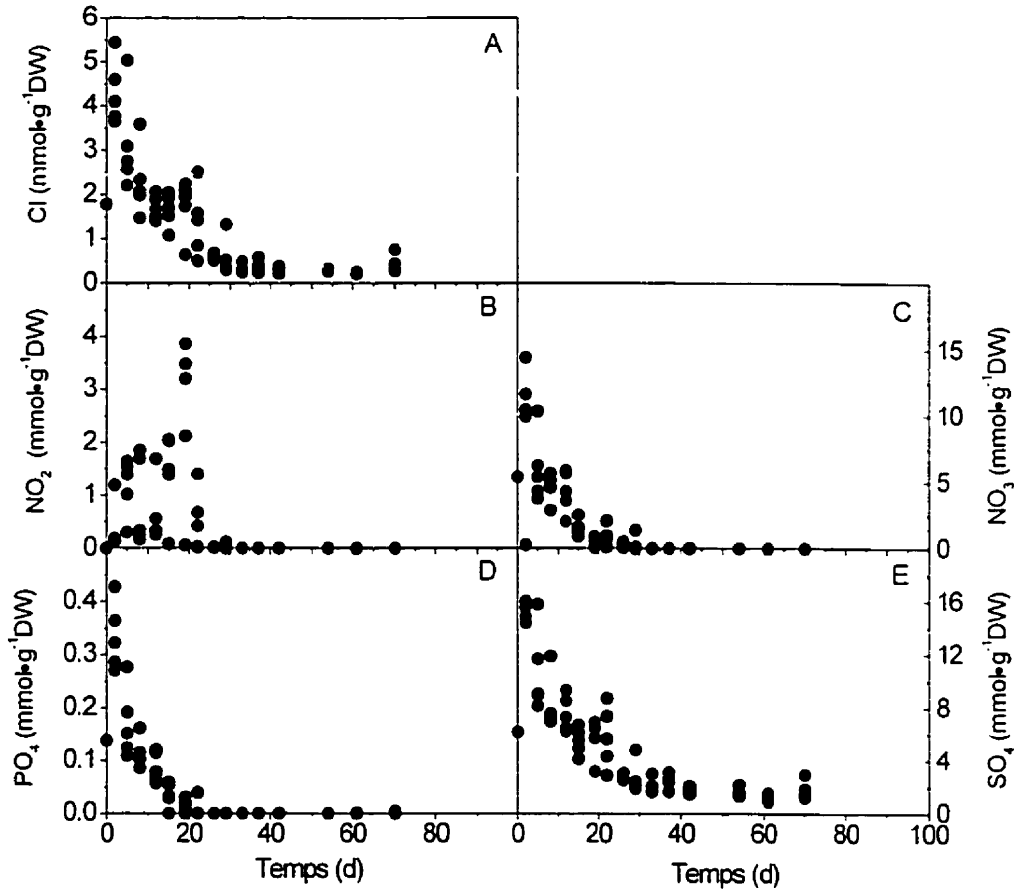

Figure B.2 : Concentrations des anions extracellulaires mesurés pour les racines cultivées en cuvée dans un milieu limitant M3P dans des boîtes de Pétri.

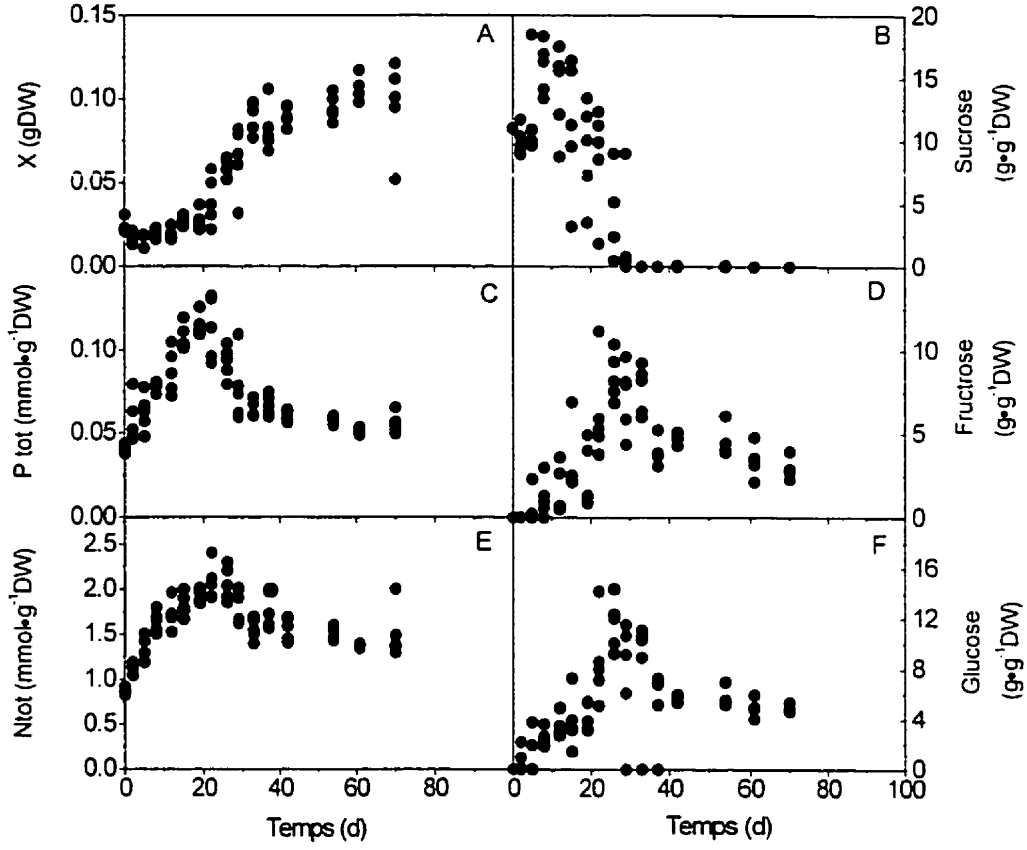

Figure B.3 : (A) Suivi de la biomasse, (C) de la concentrations cellulaire en phosphate et (E) azote et (B, D, F) des sucres extracellulaires mesurés pour les racines cultivées en cuvée dans un milieu limitant dans des boîtes de Pétri.

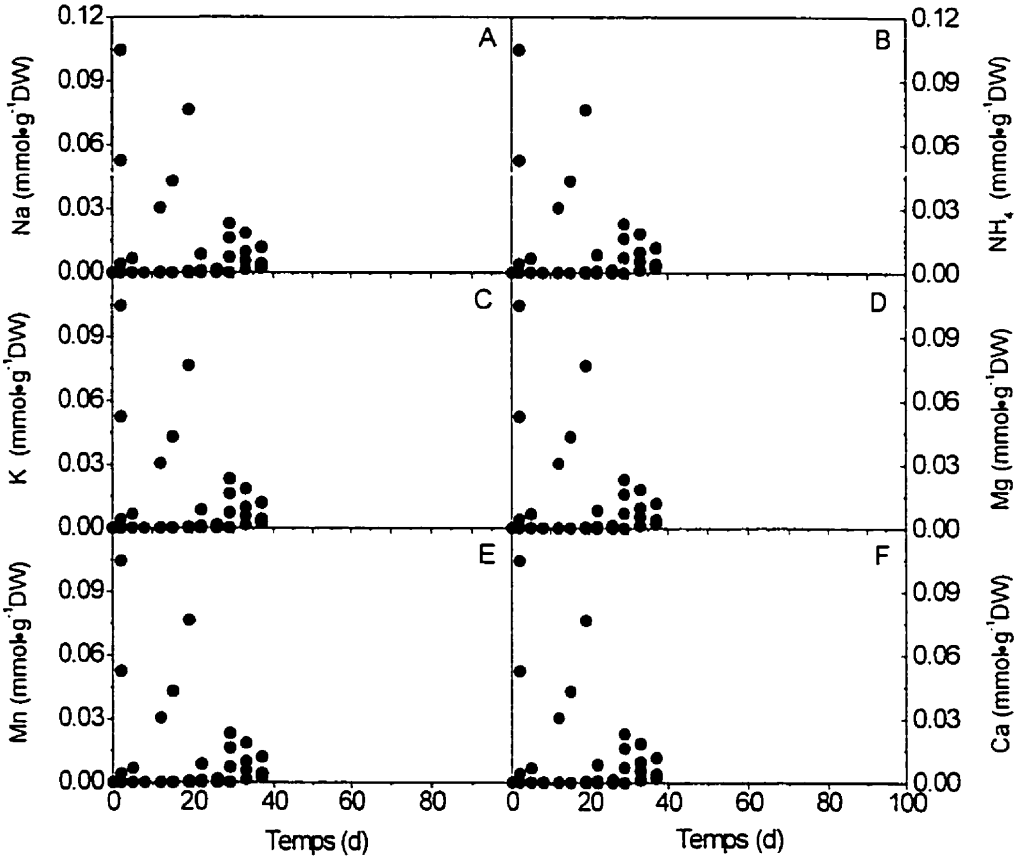

Figure B.4 : Concentrations des cations intracellulaires mesurés pour les racines cultivées en cuvée dans un milieu pauvre M3P dans des boîtes de Pétri.

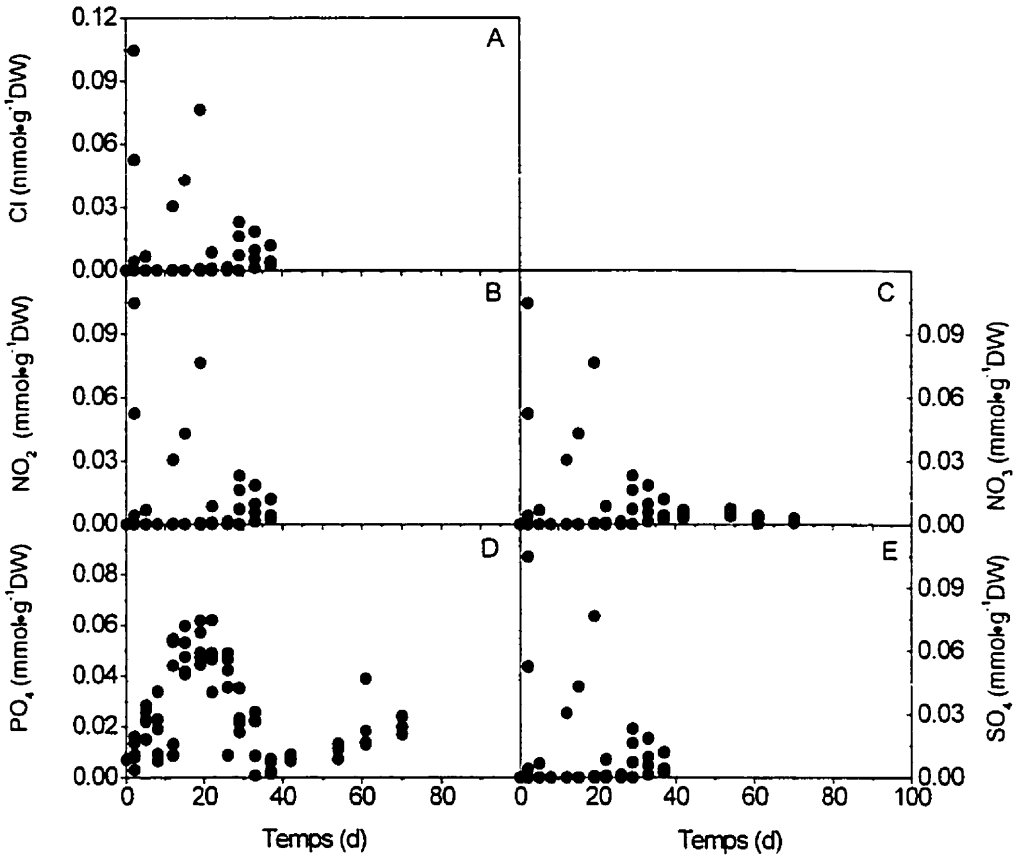

Figure B.5 : Concentrations des anions intracellulaires mesurés pour les racines cultivées en cuvée dans un milieu pauvre M3P dans des boîtes de Pétri.

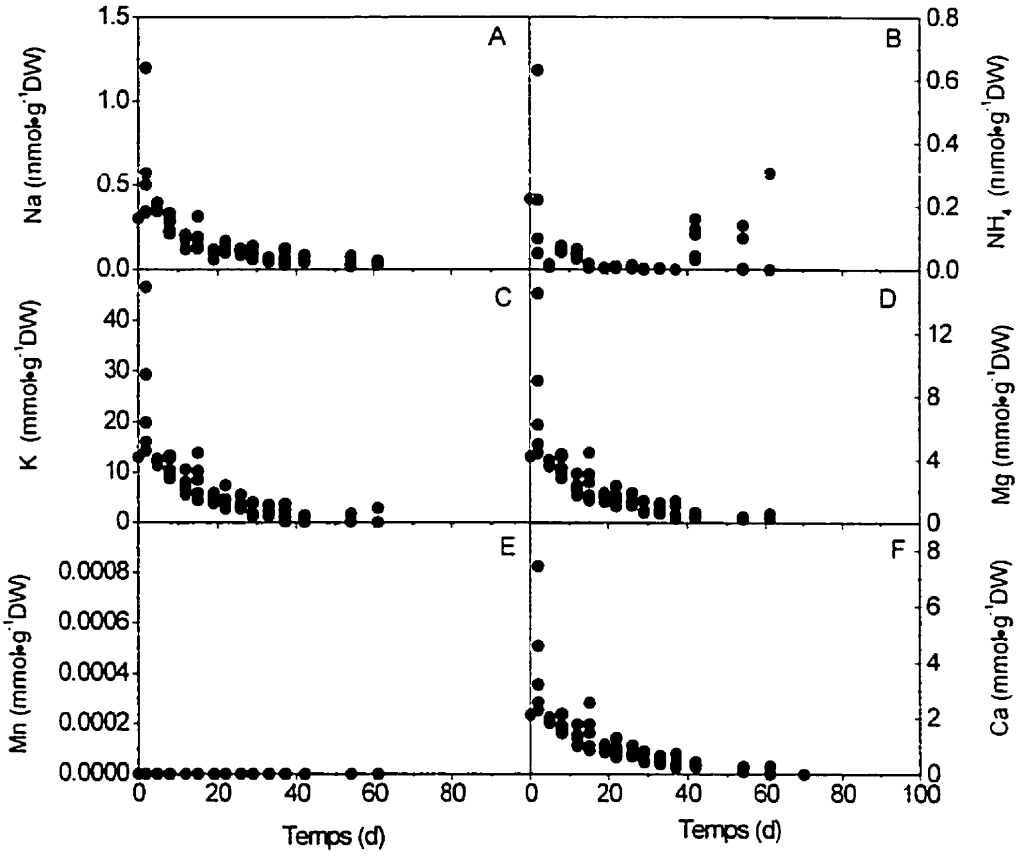

Figure B.6 : Concentrations des cations extracellulaires mesurées pour les racines cultivées en cuvée dans un milieu riche en phosphate et azote dans des boîtes de Pétri.

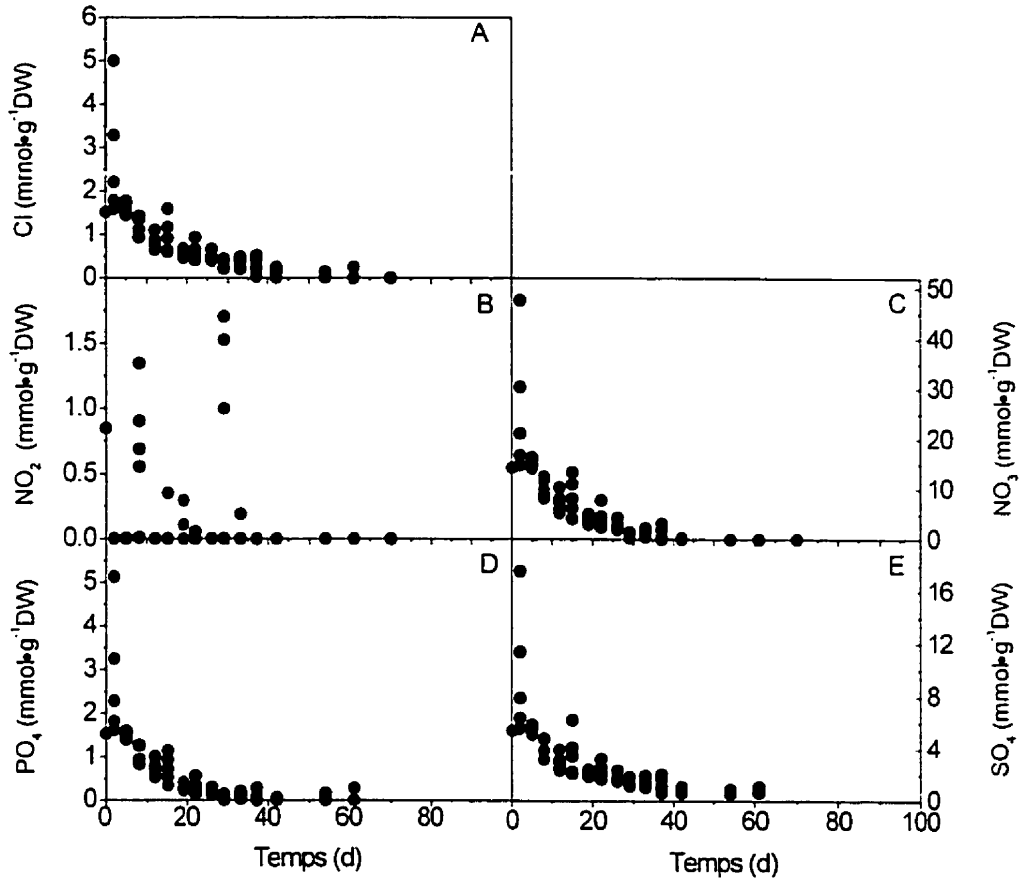

Figure B.7 : Concentrations des anions extracellulaires mesurées pour les racines cultivées en cuvée dans un milieu riche en phosphate et azote dans des boîtes de Pétri.

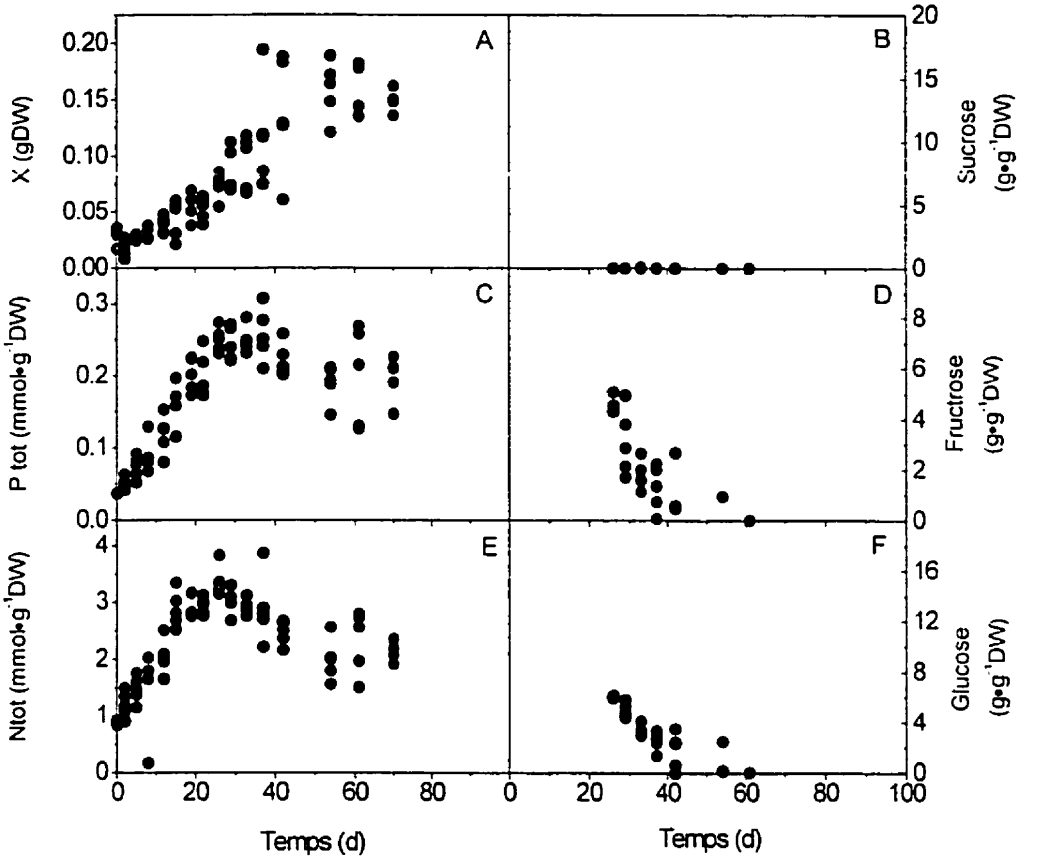

Figure B.8 : Suivi de la biomasse (A), de la concentrations cellulaire en phosphate (C) et azote (E) et des sucres extracellulaires (B, D, F) mesurées pour les racines cultivées en cuvée dans un milieu riche dans des boîtes de Pétri.

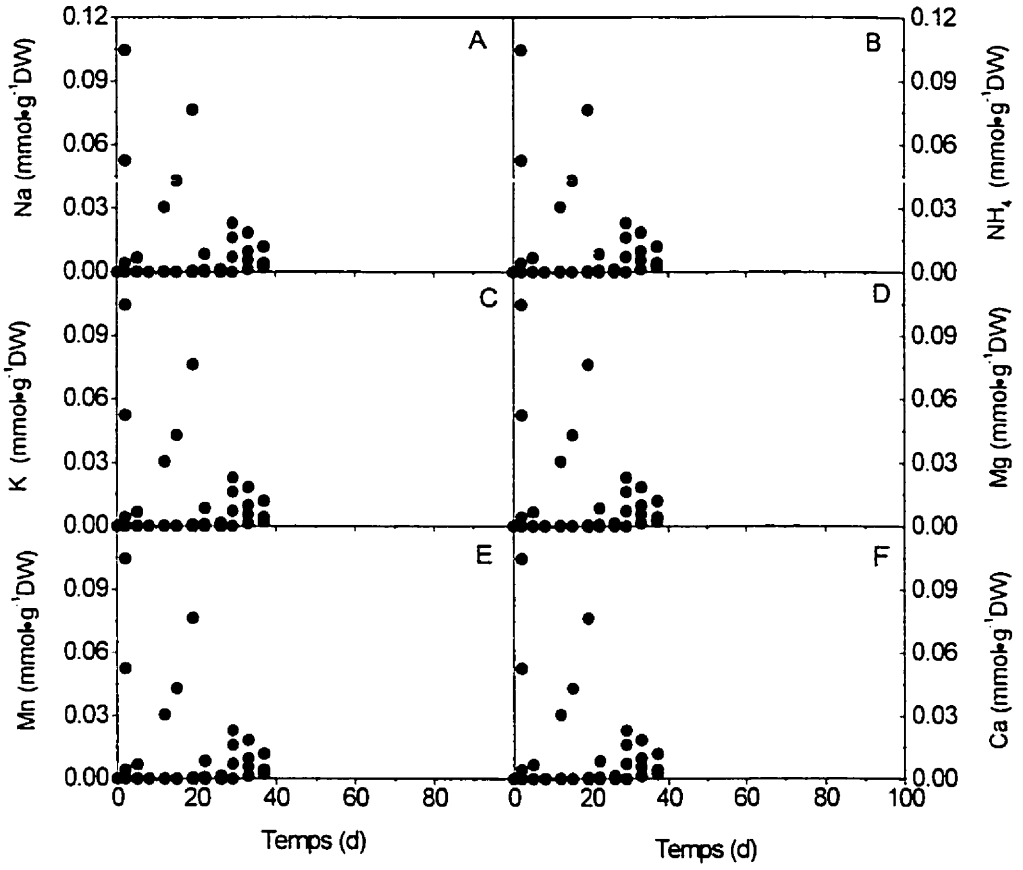

Figure B.9 : Concentrations des cations intracellulaires mesurés pour les racines cultivées en cuvée dans un milieu riche dans des boîtes de Pétri.

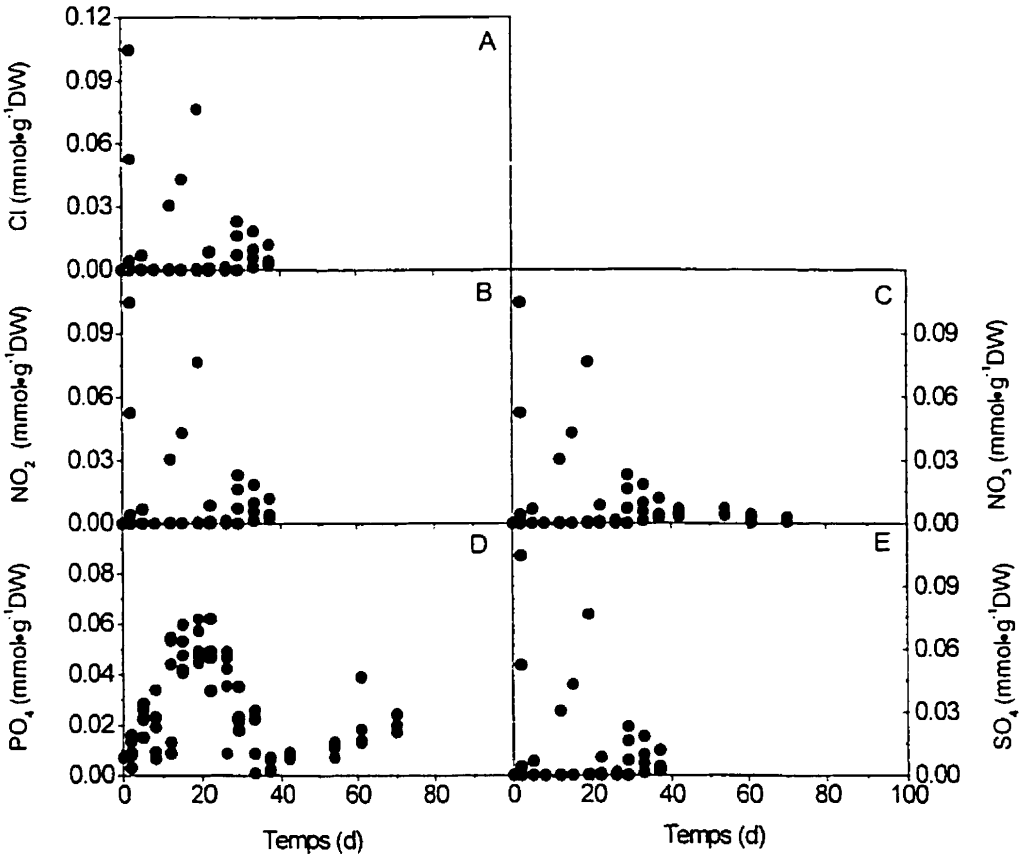

Figure B.10 : Concentrations des anions intracellulaires mesurées pour les racines cultivées en cuvée dans un milieu riche dans des boîtes de Pétri.

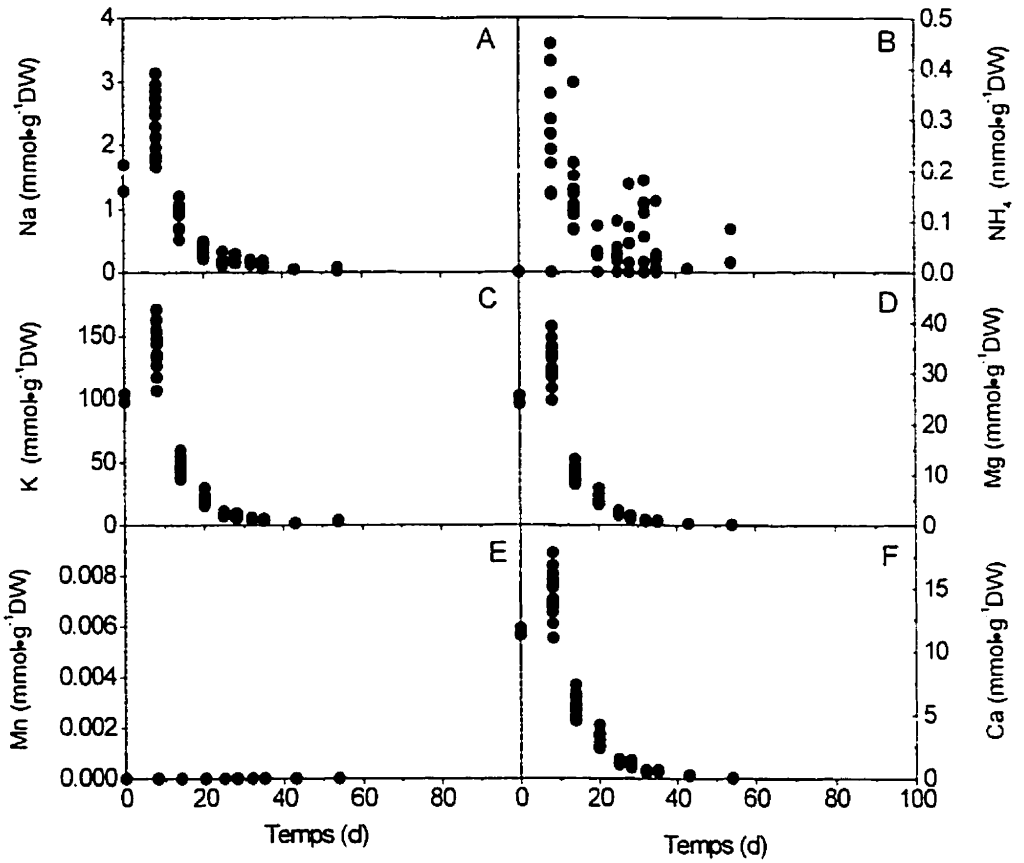

Figure B.11 : Concentrations des cations extracellulaires mesurées pour les racines cultivées en mode semi-continu dans un milieu riche en phosphate et azote dans des flacons.

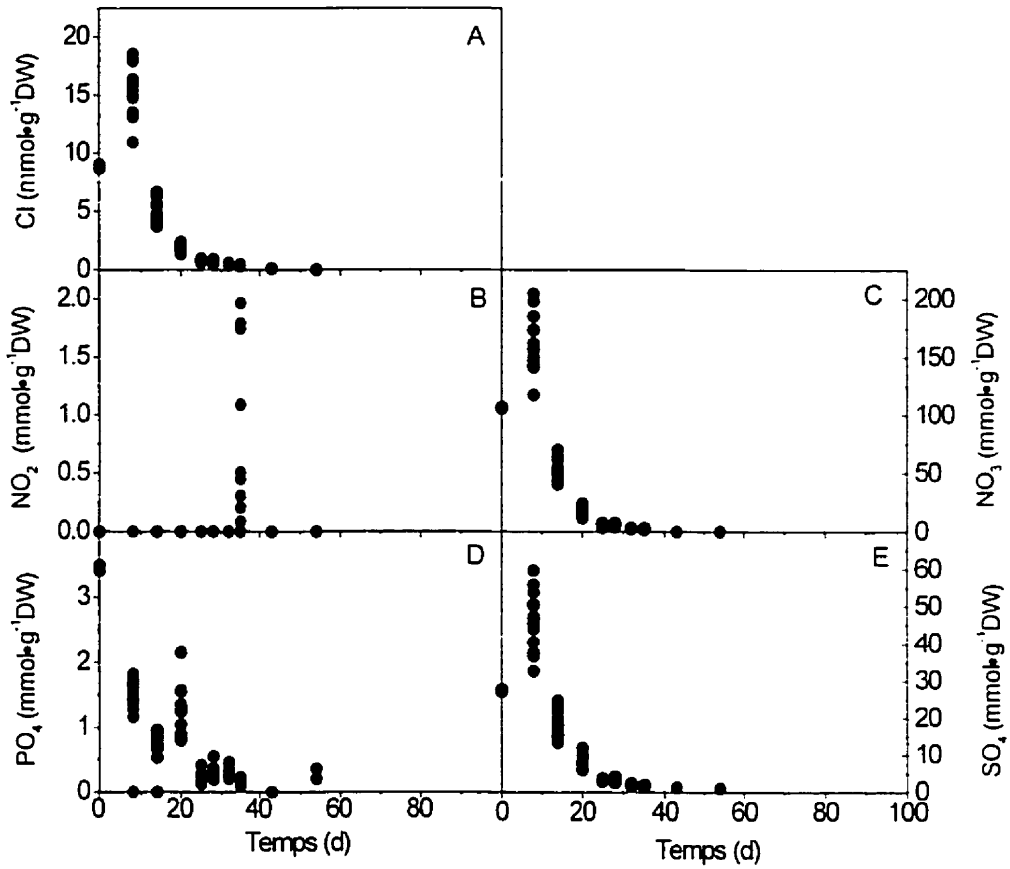

Figure B.12 : Concentrations des anions extracellulaires mesurées pour les racines cultivées en mode semi-continu dans un milieu riche en phosphate et azote dans des flacons.

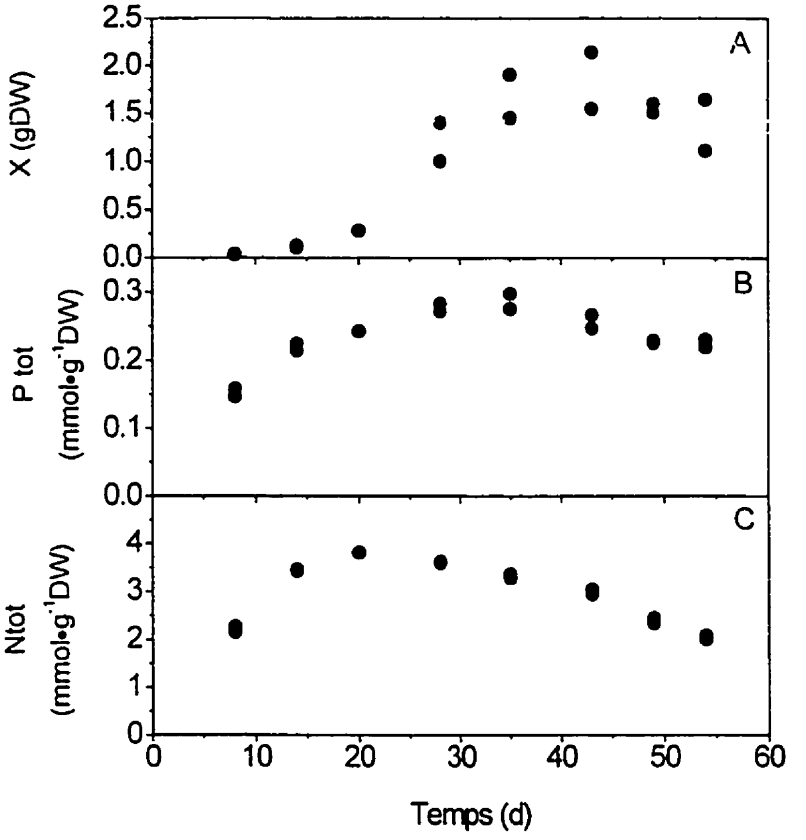

Figure B.13 : Suivi de la biomasse (A), de la concentrations cellulaire en phosphate (B) et azote (C) mesurés pour les racines cultivées en mode semi-continu dans un milieu riche dans des flacons.

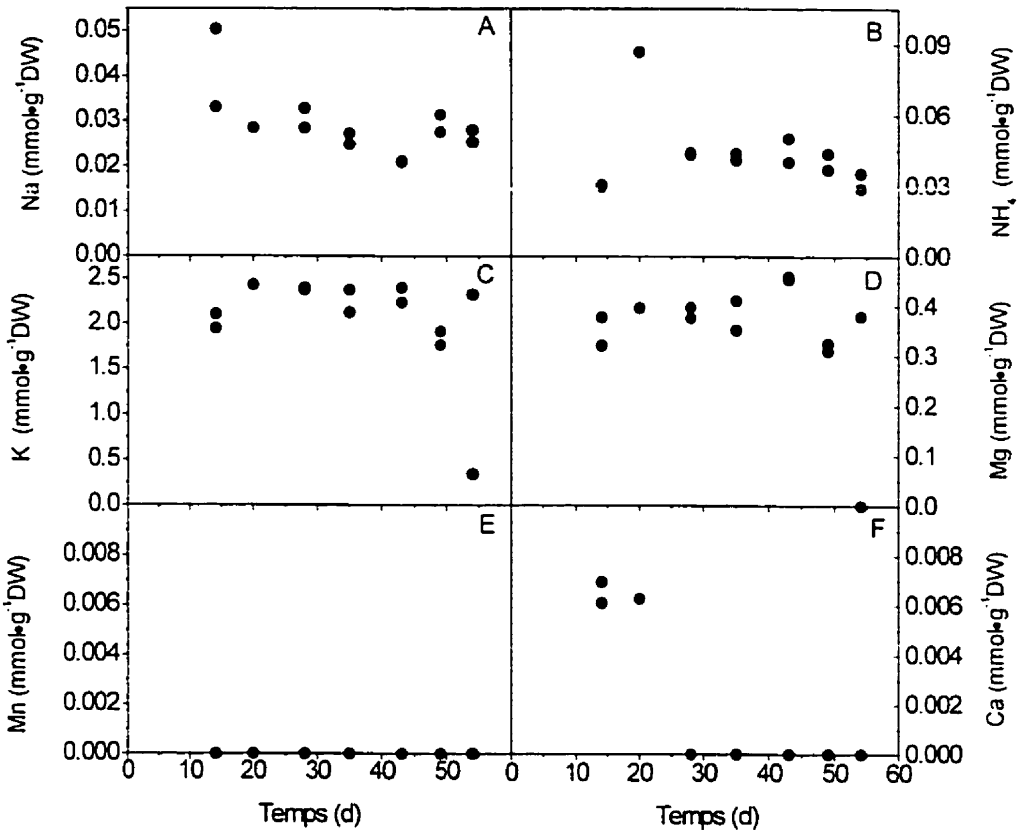

Figure B.14 : Concentrations des cations intracellulaires mesurées pour les racines cultivées en mode semi-continu dans un milieu riche en phosphate et azote dans des flacons.

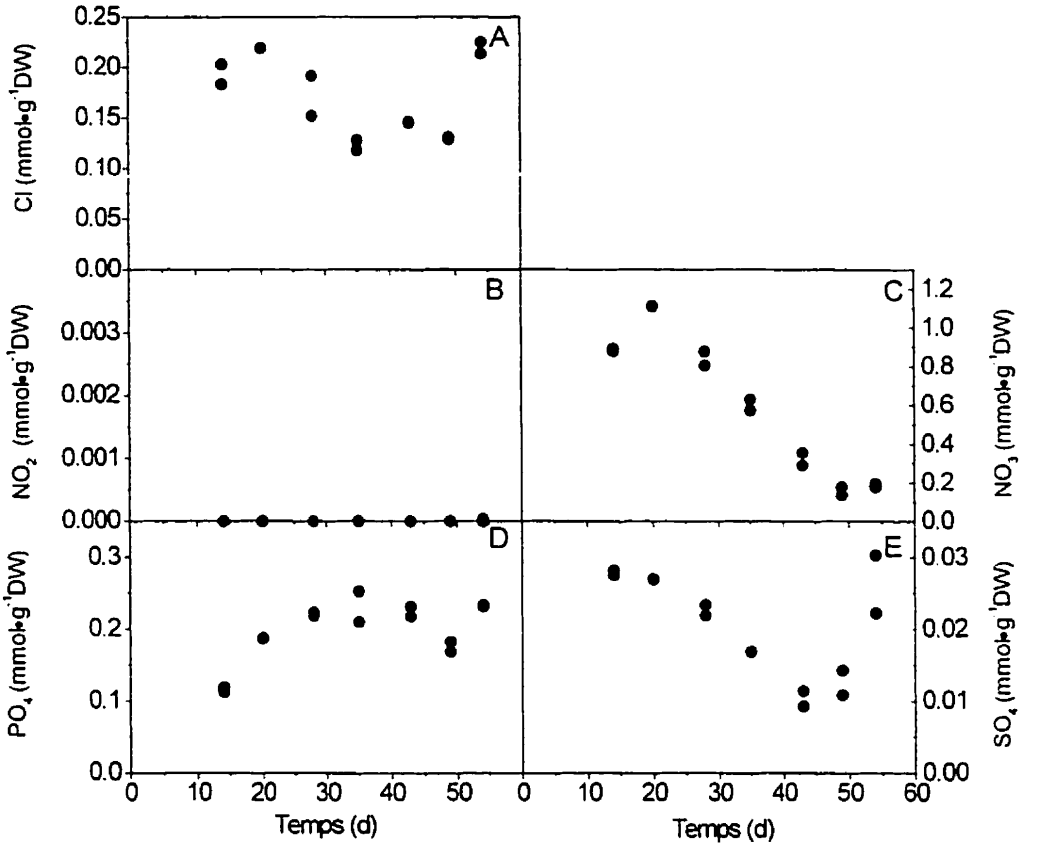

Figure B.15 : Concentrations des anions intracellulaires mesurées pour les racines cultivées en mode semi-continu dans un milieu riche en phosphate et azote dans des flacons.

ANNEXE C :

PROGRAMME POUR LE MODÈLE BIOCINÉTIQUE STRUCTURÉ UTILISÉ AU CHAPITRE QUATRE

Programme d'appel : minip.m

```
clear all
global ct v xi a i VmaxIIp VmaxIp KmIIp KmIp mini VmaxIn KmIn VmaxIIn...
KmIIn muhydro Srcrit Ysr K1 K2 K3 murmax X1 X2 X3 X4 X5 X6 X7 Kpp...
inhipr VmaxIs mmuN KmIs mrS parm mrP mrN mumur topN topP Pcsmax Pb...
 PLmin PLmax Nb NLmin NLmax Ncsmax mmu

xi=1;          v =1;
K1=4.27;       K2=7.16;          K3=12.55;

murmax = 0.174;
inhipr = 2.44;       %    facteur d'inhibition si [PO4] trop élevée
Kpp   = 16;          %    constante d'inhibition pour le PO4
muhydro= 0.61;

PLmax =0.23;         %    mmol/gDW
PLmin =0.0066;
Pcsmax=0.021;
Pb =0.0357;

NLmax=  1.197;
NLmin=  0.0666;
Ncsmax= 1.75;
Nb  =  0.865;        %
```

```
% ------------------------------- coefficients de maintenance ----------------------------
mrP = 0.00002;          %
mrN= 0.00695;           % mmol/gDW/d
mrS= 0.000875;          %

Ysr= 0.58/1.283;

% ---------------------------- paramètres d'absorption du phosphate ---------------------
VmaxIp = 0.0090542;
KmIp   = 0.04561;
VmaxIIp= 0.0390292;
KmIIp  = 7.95;
% ---------------------------- paramètres d'absorption de l'azote ----------------------
VmaxIn  = 0.11290;
KmIn    = 0.907568;
VmaxIIn = 0.4996;
KmIIn   = 9.06;

% ---------------------------- paramètres d'absorption des glucides ---------------------
VmaxIs=.094;            %           (S doit être en g/L)
KmIs=.0967;             %
Srcrit=0.32;

ct=0;
para0=[VmaxIn KmIn VmaxIIn KmIIn K2];
para=fmins('oksmin2', para0);
save c:\result.dat parm -ascii
```

Programme de minimisation : oksmin2.m

```
function mini=oksmin2(x);

global ct v xi a i VmaxIIp VmaxIp KmIIp KmIp mini VmaxIn KmIn VmaxIIn...
KmIIn muhydro Srcrit Ysr K1 K2 K3 murmax X1 X2 X3 X4 X5 X6 X7 Kpp...
inhipr VmaxIs mmuN KmIs mrS parm mrP mrN mumur topN topP Pcsmax Pb...
 PLmin PLmax Nb NLmin NLmax Ncsmax mmu

X1=0; X2=0; X3=0; X4=0; X5=0; X6=0; X7=0;

top= 0;        topN=0;
ct=ct+1        xi=1;
i=1;           a = 0;

VmaxIn =x(1); KmIn= x(2) ; VmaxIIn= x(3);  KmIIn =x(4); K2=x(5);

% ---------------------------------- conditions initiales ------------------------------------

% culture en cuvé en milieu limitant M3P :
%y0 = [0.016 0.087 PLmin 0 Pb+PLmin Pb 3.28 0.0066 0 Nb+NLmin Nb 0.0 0.005 0.04
10];

% culture en cuvée en milieu riche :
y0=[0.016 1.05 PLmin 0 Pb+PLmin Pb 10.5 NLmin 0 Nb+NLmin Nb 0.0 0.005 0.02 10];
```

```
% culture en semi-continu en milieu riche :
%y0=[0.016 0.829 PLmin 0 Pb+PLmin Pb 15.181 NLmin 0 Nb+NLmin  Nb 0.0  0.005
0.15 10];

% y0 = [X    P   PL   Pcs   Pt  Pb  N      NL   Ncs   Nt  Nb      S   Sir   V   S0]
%     (gDW mmol/L  mmol/gDW                                  g/L   g/L

% ---------- appel de la résolution du système d'équations différentielles ----------------

[t, y]=mji('quatre21', 0.0, y0, 0.5, 200);
mini = (X1+X2+X3+X4+X5+X6+X7)

% ---------------------------------- données estimées par le modèle ---------------------------
inhipr=2.44;
Kpp=0.91317769;
muhydro=0.6117833;

parm(ct,:)=[ct VmaxIn KmIn VmaxIIn KmIIn K2];
```

Programme contenant les équations différentielles : quatre21.m

```
function dydt=Quatre21(t,y);

global ct v xi a i VmaxIIp VmaxIp KmIIp KmIp mini VmaxIn KmIn VmaxIIn...
KmIIn muhydro Srcrit Ysr K1 K2 K3 murmax X1 X2 X3 X4 X5 X6 X7 Kpp...
inhipr VmaxIs mmuN KmIs mrS parm mrP mrN mumur topN topP Pcsmax Pb...
 PLmin PLmax Nb NLmin NLmax Ncsmax mmu
dydt = zeros(size(y),1);

X=y(1);P=y(2);PL=y(3);Pcs=y(4);Pt=y(5);Pb=y(6);N=y(7); NL=y(8); Ncs=y(9);
Nt=y(10); Nb=y(11);S=y(12);Sir=y(13);V=y(14);S0=y(15);

% -------------------- PARAMÈTRES DES RACINES ------------------------
  if mrP  <  0 ; mrP=  0; end
  if mrP  >  1 ; mrP=  1; end
  if mrN <  0 ; mrN= 0; end
  if mrN >  1 ; mrN= 1; end
  if S0  <= 0 ; S0 = 0; end
  if Sir <= 0 ; Sir= 0; end

  if P   <= 0;   P = 0; end
  if PL  <= 0;  PL = 0; end
  if Pcs <= 0; Pcs = 0; end
  if Pb  <= 0;  Pb = 0; end
  if Pt  <= 0;  Pt = 0; end
```

```
if N  <= 0;  N = 0; end
if NL  <= 0;  NL = 0; end
if Ncs <= 0; Ncs = 0; end
if Nb  <= 0;  Nb = 0; end
if Nt  <= 0;  Nt = 0; end

% ---------- SYSTÈME D'ÉQUATIONS DIFFÉRENTIELLES ----------------------

f0=2*exp(-500*(Pcs-0))./(1+exp(-500*(Pcs-0)));
mur = murmax*mmu*(1-exp(-K1*(Pt)))*(1-exp(-K2*(Nt)))*
        (1-exp(-K3*Sir))*Kpp/(Kpp+P^inhipr)*(1-f0);
dXdt=mur*X;

% ---------- consommation du phosphate extracellulaire -------------------------

dPdt= -((VmaxIp*P/(P+KmIr)+VmaxIIp*P/(P+KmIIp)))*X/V;          % mmol/L/d
dPtdt= (VmaxIp*P/(P+KmIr)+VmaxIIp*P/(P+KmIIp))-(Pt)*mur-mrP;    %
mmol/gDW/d

dPLdt = 0;
dPcsdt= 0;
dPbdt = 0;

% ---------------- consommation du nitrate extracellulaire -------------------------

dNdt=-((VmaxIn*N/(N+KmIn))+(VmaxIIn*N/(N+KmIIn)))*X/V;
dNtdt= (VmaxIn*N/(N+KmIn)+VmaxIIn*N/(N+KmIIn))-(Nt)*mur-mrN;
```

```
dNLdt = 0;
dNbdt = 0;
dNcsdt= 0;

% ------------------ consommation des glucides extracellulaires ----------------------------

if S0 <= 0            % S0 : sucrose
  muhydro=0; S0=0;
end
dS0dt=-muhydro*X/V;

% disparition du sucrose dans le milieu
if Sir < Srcrit
 dSdt = (-dS0dt-VmaxIs*S/(S+KmIs)*X/V);
 dSirdt=VmaxIs*S/(S+KmIs)-(Ysr+Sir)*mur-mrS;
 else
 dSdt=-dS0dt;
 dSirdt = -(Ysr+Sir)*mur-mrS;
end
if Sir < 0
  Sir=0; dSirdt=0; dSdt = 0;
end

dVdt=-mur*X*0.009-.007/120;

dydt=[dXdt;dPdt;dPLdt;dPcsdt;dPtdt;dPbdt;dNdt;dNLdt;dNcsdt;dNtdt;dNbdt;dSdt;dSir
dt;dVdt;dS0dt];
```

Programme de résolution du système d'équations différentielles : mji.m

```
function  [t,y] = mji(f, t0, y0, h, nmax, resul, mod)

global ct v xi a i VmaxIIp VmaxIp KmIIp KmIp mini VmaxIn KmIn VmaxIIn...
KmIIn muhydro Srcrit Ysr K1 K2 K3 murmax X1 X2 X3 X4 X5 X6 X7 Kpp...
inhipr VmaxIs mmuN KmIs mrS parm mrP mrN mumur topN topP Pcsmax Pb...
 PLmin PLmax Nb NLmin NLmax Ncsmax mmu

% Methode de Runge Kutta d'ordre 4 pour les systemes
% d'equations differentielles de la forme y' = f(t,y)
% Programmeur: A. Fortin (10 avril 1996)
% Reference: Analyse numerique pour ingenieurs, A. Fortin,
%          Editions de l'Ecole Polytechnique de Montreal,
%          Section 7.4.2
%
%
% Arguments
%
% Entree:
% 1) f: Le nom entre apostrophes (' ') du fichier .m contenant la foNLtion
%    f(t,y). Exemple: 'eqdif' (correspondant a un fichier eqdif.m).
% 2) t0: Vous devez fourNt le temps de depart.
% 3) y0: Vous devez fourNt la(les) condition(s) initiale(s). y0 doit
%    etre un vecteur ligne, par exemple [1 2]. La dimension de y0
%    donne automatiquement la dimension du systeme.
% 4) h: Vous devez fourNt le pas de temps.
```

```
% 5) nmax: Vous devez fourNt le nombre maximal de pas de temps.
% 6) resul: Si vous voulez les resultats dans un fichier, vous devez
%    fourNt le nom entre apostrophes (' ') de ce fichier.
%    Exemple: 'resul.dat' qui creera un fichier nomme resul.dat.
% 7) mod: Si vous avez fourni un fichier de resultats, vous pouvez
%    choisir le pas des iterations qui seront affichees dans ce fichier.
%    Exemple: si vous inscrivez 5, seulement les iterations qui
%             sont des multiples de 5 seront affichees dans le
%             fichier de resultats.
%    Si rien n'est ecrit, mod = 1.
% Retour:
% 1) t est un vecteur contenant les temps ti.
% 2) y est une matrice contenant la solution obtenue.
%    La colonne i de y correspond a la solution de l'equation i.
%
mmu=1;
if y0(4) < Pcsmax
  VmaxIp = 0.00942;
  KmIp   = 0.04561;
  VmaxIIp= 0.0390292;
  KmIIp  = 7.95;
else
  VmaxIp  = 0.02682 ;  % quand P faible
  KmIp    = 0.04961;
  VmaxIIp = 0.0752   ;  % quand P élevé
  KmIIp   = 7.95   ;
end;
```

```
nbeq = size(y0,2);
   y0 = y0';
   k1 = zeros(nbeq,1);
   k2 = zeros(nbeq,1);
   k3 = zeros(nbeq,1);
   k4 = zeros(nbeq,1);
   y = zeros(1,nbeq);
   n = 1;
   t(1) = t0;
   y(1,:) = y0';

while(n <= nmax),
     k1 = h * feval(f,t(n),y0);
     k2 = h * feval(f,t(n)+h/2,y0+k1/2);
     k3 = h * feval(f,t(n)+h/2,y0+k2/2);
     k4 = h * feval(f,t(n)+h,y0+k3);

if (any(~finite(k1)))|(any(~finite(k2)))|(any(~finite(k3)))|(any(~finite(k4))),
   disp('la fonction n''est pas definie en certains points');
   return;
end
y0 = y0 + (1/6) * (k1+2*(k2+k3) + k4);
for AK = 1:15,
   if y0(AK) < 1e-15
     y0(AK)=0;
   end
end
```

```
% ------------------------------ absorption de phosphate ------------------------------------
nn=0.5*n;

if y0(4) < Pcsmax
  VmaxIp = 0.00942;
  KmIp   = 0.04561;
  VmaxIIp= 0.0390292;
  KmIIp  = 7.95;

else
  VmaxIp  = 0.02682 ;  % quand P faible
  KmIp    = 0.04961;
  VmaxIIp = 0.0752   :  % quand P élevé
  KmIIp   = 7.95   ;
end;

if y0(2) < 0.0001
   topP = 1000;
else
if y0(5) > top
    topP = y0(5);
else
   topP = 1000;
end
end

if topP < 1000
```

```
 if y0(4) < Pcsmax                    % augmentation de Pt
    y0(6) = Pb;
    y0(4) = y0(4) + 0.70* (y0(5)- (Pb+y0(4)+y0(3)));
    y0(3)  = y0(5) - y0(6)-y0(4);
  else
 if y0(3) < PLmax
    y0(6) = Pb;
    y0(4)= Pcsmax;
    y0(3) = y0(5)-y0(6)-Pcsmax;
 else
   y0(6) = Pb;
   y0(3) = PLmax;
   y0(4) = Pcsmax;
   y0(5) = Pb + PLmax + Pcsmax;
 end
 end
end

if topP >= 1000                       %  quand le Pt commence a diminuer
   if a < 2
    y0(3) = y0(5) - y0(6)-y0(4);
    y0(5) = y0(3) + y0(4) + y0(6);
     if y0(3) < 0.000008
      a = 2;
    end
  else
```

```
    if y0(4) > 0
     y0(3) = y0(3) + 0.00015;
     y0(6) = Pb;
     y0(4) = y0(5) - y0(6) - y0(3);
     a = 2;
   else
    if y0(6) > 0
     y0(3) = y0(3) + 0.00015;
     y0(6) = y0(6) - 0.00015;
     y0(5) = y0(3) + y0(4) + y0(6);
     mmu=0;
   else
    y0(4) = 0;
     y0(6) = Pb;
     y0(3) = 0;
     y0(5)= y0(4)+y0(3)+y0(6);
     mmu=0;
   end
   end
  end
end

% ---------------------------- conditions initiales pour le nitrate ----------------------------
if y0(7) < 0.0001
  topN = 1000;
end
nn=0.5*n;
```

```
if topN < 1000
 if y0(9) < Ncsmax                    % augmentation de N
    y0(11) = Nb;
    y0(9) = y0(9) + 0.77* (y0(10)- (Nb+y0(9)+y0(8)));
    y0(8)  = y0(10) - y0(11)-y0(9);
    if y0(10) >= topN
      topN = y0(10);          % détermine si N max est atteint
     else
      topN = 1000;
    end
   else

 if y0(8) < NLmax
    y0(11) = Nb;
    y0(9)= Ncsmax;
    y0(8) = y0(10)-y0(11)-Ncsmax;
    if y0(10) >= topN
      topN = y0(10);          % détermine si N max est atteint
     else
      topN = 1000;
    end
  else
    y0(11) = Nb;
    y0(8) = NLmax;
    y0(9) = Ncsmax;
    y0(10) = Nb + NLmax + Ncsmax;
     if y0(10) >= topN
```

```
      topN = y0(10);          % détermine si N max est atteint
     else
      topN = 1000;
    end
  end
  end
else          % (if topN = 1000)    Ni commence a diminuer
  if y0(8) > NLmin
    %y0(9) = y0(9);
    y0(11) = Nb;
    y0(8) = y0(10) - y0(11)-y0(9);
     else
  if y0(9) > 0
    y0(8) = NLmin;
    y0(11) = Nb;
    y0(9) = y0(10) - y0(11)-y0(8);
  else
  if y0(8) > 0
    y0(9) = 0;
    y0(11) = Nb;
    y0(8) = y0(10) - y0(11)-y0(9);
else
    y0(9) = 0;
    y0(11) = Nb;
    y0(8) = 0;
    y0(10)= y0(9)+y0(8)+y0(11);
  end
```

```
  end
 end
end

% ------------ test de la conlentration en glucides intracellulaires ---------

if y0(13) >= Srcrit
  y0(13)=Srcrit;
end
  if y0(1) <= 0;  y0(1) = 0; end          %  X
  if y0(2) <= 0;  y0(2) = 0; end          %  P
  if y0(3) <= 0;  y0(3) = 0; end          %  PL
  if y0(4) <= 0;  y0(4) = 0; end          %  Pcs
  if y0(5) <= 0;  y0(5) = 0; end          %  Pt
  if y0(6) <= 0;  y0(6) = 0; end          %  Pb
  if y0(7)  <= 0;  y0(7)  = 0; end        %  N
  if y0(8)  <= 0;  y0(8)  = 0; end        %  NL
  if y0(9)  <= 0;  y0(9)  = 0; end        %  Ncs
  if y0(10) <= 0;  y0(10) = 0; end        %  Nt
  if y0(11) <= 0;  y0(11) = 0; end        %  Nb
  if y0(12) <= 0;  y0(12) = 0; end        %  S
  if y0(13) <= 0;  y0(13) = 0; end        %  Sir
  if y0(14) <= 0;  y0(14) = 0; end        %  V
  if y0(15) <= 0;  y0(15) = 0; end        %  S0

% ----- ajustements des concentrations lors des changements de milieu en semi-continu
j=n*0.5;
```

```
jour=[8 14 20 25 28 32 35];
Pm =[0.8294 0.67381 0.89708 0.82946 0.97293 0.92211 0.98208];
Nm = [15.1851 13.3402 11.4864 12.5536 11.0056 12.0431 10.8246];

%if i <= 7
% if j == jour(i)
%   y0(2)= Pm(i);
%   y0(7)= Nm(i);
%   y0(15) = 10;
%   y0(12) = 0;
%   y0(14)=0.15;
%    i = i+1;
% end
%end

% ------------------------------ minimisation ----------------------------------------------

ni=[2 4 7 9 11 15 18 21 25 29 32 36 39 45 53 59 70 86 99];

Ptot=[0.0597 0.06451 0.08077 0.08993 0.1110 0.11806 0.11658 0.0957 0.0791 0.066
0.0690 0.0619 0.06 0.0530 0.0574 0.0555  0.05167 0.05619 0.04367];
iPtot=0.118-0.04367;          % = (Xmax-Xmin)

Ntot=[1.1933 1.4516 1.680 1.8125 1.9940 2.0361 2.2597 2.1631 1.8586 1.575 1.7850
1.56805 1.523 1.3809 1.5104 1.334 1.157 1.235 1.0300];
iNtot=2.26-0.87;
```

```
Pmil=[0.1367958 0.07362998 0.05841034 0.04491946 0.02989404 0.00802834
0.0043539 0 0 0.00012445 0 0 0.000064 0.00083 0.001866 0.001146 0.0001912
0.002798 0.017468];

iPmil=0.1367958;


Nmil=[4.60028396 3.12257398 2.68492294 2.5269529 2.26011208 2.08448652
1.36701336 0.4481345 0.32058014 0.02962466 0.02117674 0.02962812 0.02985252
0.01538976 0.013487274 0.02310712 0.008570078 0.1361623 0.003558614];

iNmil=4.59645;


X=[0.0172 0.0156 0.0202 0.0198 0.0264 0.0276 0.0396 0.0582 0.0642 0.0896 0.0822
0.09 0.095 0.1058 0.0962 0.1072 0.1086 0.1000 0.125875];

iX=0.1258-0.0156;


SS=[0.64472 1.2036 3.41492 3.95954 5.8698 7.40344 11.7844 21.4686 16.6832
16.3004 8.5734 10.104 10.476 9.008 7.612 6.738 7.284 8.678 9];

iSS=21.4686-0;


SS0=[9.9804 10.7264 16.694 15.06 12.32 9.1728 9.1186 4.32682 2.60706 0 0 0.044
0.056 0 0 0 0.034 0.004 0];

iSS0=15.06-0;


if xi <=19

 if j == ni(xi)

    X1=X1+(((y0(5)-Ptot(xi))/iPtot)^2);

    X2=X2+(((y0(10)-Ntot(xi))/iNtot)^2);

    X3=X3+(((y0(2)-Pmil(xi))/iPmil)^2);

    X4=X4+(((y0(7)-Nmil(xi))/iNmil)^2);

    X5=X5+(((y0(1)-X(xi))/iX)^2);
```

```
    X6=X6+(((y0(12)-SS(xi))/iSS)^2);
    X7=X7+(((y0(15)-SS0(xi))/iSS0)^2);
    xi = xi + 1;
  end
end
parm(n,:)=[n*0.5 y0(1) y0(2) y0(3) y0(4) y0(5) y0(6) y0(7) y0(8) y0(9) y0(10) y0(11)
y0(12) y0(13) y0(14) y0(15)];

    y(n+1,:) = y0';
    t(n+1) = t(n) + h;
    n = n+1;
  end

if (nargin > 5),
  if (nargin < 7),
    mod = 1;
  end
  eqdout(f, resul, t, y, h, nmax, 'de Runge-Kutta d''ordre 4',mod);
end
```