

**Titre:** Étude de l'effet des gaz dissous sur la croissance de cellules végétales en bioréacteur  
Title: Effect of dissolved gases on the growth of plant cells in a bioreactor

**Auteur:** Steve Fiset  
Author:

**Date:** 2000

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

**Référence:** Fiset, S. (2000). Étude de l'effet des gaz dissous sur la croissance de cellules végétales en bioréacteur [Mémoire de maîtrise, École Polytechnique de Montréal].  
Citation: PolyPublie. <https://publications.polymtl.ca/8612/>

## Document en libre accès dans PolyPublie

Open Access document in PolyPublie

**URL de PolyPublie:** <https://publications.polymtl.ca/8612/>  
PolyPublie URL:

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

**Programme:** Non spécifié  
Program:

**UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL**

**ÉTUDE DE L'EFFET DES GAZ DISSOUS SUR LA CROISSANCE  
DE CELLULES VÉGÉTALES EN BIORÉACTEUR**

**STEVE FISET**

**DÉPARTEMENT DE GÉNIE CHIMIQUE  
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL**

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

**DÉCEMBRE 2000**

**©Steve Fiset, 2000.**



National Library  
of Canada

Acquisitions and  
Bibliographic Services

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

Bibliothèque nationale  
du Canada

Acquisitions et  
services bibliographiques

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.

0-612-60894-8

Canada

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL  
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé :

**ÉTUDE DE L'EFFET DES GAZ DISSOUS SUR LA CROISSANCE  
DE CELLULES VÉGÉTALES EN BIORÉACTEUR**

présenté par : Eiset Steve

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. PERRIER Michel, Ph.D., membre et directeur de recherche

M. ARCHAMBAULT Jean, Ph.D., membre et codirecteur de recherche

M. JOLICOEUR Mario, Ph.D., membre

## **REMERCIEMENTS**

**Je souhaite remercier mes collègues du groupe de recherche pour m'avoir aidé, conseillé et supporté : Dany Aubry pour sa confiance, ses encouragements sans défection et ses conseils à plusieurs niveaux, Martin Gaudette pour la motivation à bien faire qu'il communique, sa critique constructive et son humour acerbe, Luc Lavoie pour sa rigueur et ses encouragements, Joël Sirois pour son professionnalisme, sa rigueur et sa passion du travail et Robert Williams pour avoir soulevé de bonnes questions et avoir répondu à beaucoup d'autres.**

**Je désire aussi remercier mes co-locataires, Bruno Poulin ainsi que David Fortier et Alain Veilleux qui m'ont supporté, moi et mes chats, dans les bons comme les moins bons moments.**

**J'aimerais remercier mon directeur de recherche, M. Michel Perrier pour son aide et pour m'avoir permis de réaliser mes travaux à l'École Polytechnique de Montréal.**

**Je souhaite particulièrement remercier mon codirecteur de recherche, M. Jean Archambault, à qui je dois beaucoup. Sa confiance et sa ténacité m'ont apporté énormément. Son expertise dans le domaine des cellules végétales fut d'une aide précieuse.**

## RÉSUMÉ

L'objectif de cette étude est de déterminer l'effet de la concentration d'oxygène dissous (DO) et de la concentration du dioxyde de carbone dissous ( $\text{DCO}_2$ ) sur la croissance de cultures de cellules végétales en suspension. Les cultures sont effectuées en bioréacteurs de 3L (nominal) équipés d'agitateurs à rubans hélicoïdaux. Les cellules végétales utilisées sont de l'espèce *Eschscholtzia californica*.

Les cultures sont effectuées à l'aide de quatre bioréacteurs identiques. Afin de minimiser les variations autres que celles des paramètres étudiés, des méthodes de cultures, incluant l'homogénéisation de l'inoculum, un repiquage systématique et le suivi de l'inoculum, sont mises au point. Les cultures sont opérées en mode cuvée alimentée. Le suivi des nutriments permet d'alimenter les cultures en nutriments consommés à l'exception d'un seul nutriment soit le phosphate. La croissance des cultures est suivie par la mesure des concentrations en biomasse humide, sèche et en nombre de cellules.

Un système de commande et d'acquisition de données permet le suivi et le contrôle de la DO. La stratégie de contrôle consiste à faire varier la concentration en oxygène du gaz alimenté en opérant le bioréacteur à une vitesse d'agitation constante de 60 rpm sans manipuler le débit de bullage..

Comme les sondes mesurant le DCO<sub>2</sub> ne peuvent pas être utilisées pour la culture de cellules végétales, un modèle d'estimation du DCO<sub>2</sub> est développé et validé grâce à une sonde externe. Un contrôleur adaptatif est alors développé pour contrôler le DCO<sub>2</sub> estimé grâce à ce modèle en manipulant le débit total de gaz alimenté.

Des cultures en bioréacteur sont réalisées à différentes DO maintenues constantes. La plage explorée s'étend de 10% à 240% de la saturation avec l'air. Les conditions d'opération à 240% de DO sont à la limite de la capacité de transfert du système de culture. Les résultats des cultures effectuées en bioréacteurs suggèrent une cinétique de type Monod entre le taux de croissance spécifique et la concentration en oxygène dissous. Pour les trois mesures de croissance utilisées, les paramètres  $\mu_{MAX}$  et K<sub>S</sub> sont de 0.0077 h<sup>-1</sup> et 19% de DO pour le taux de croissance en biomasse sèche, de 0.0073 h<sup>-1</sup>, 18% de DO pour le taux de croissance en biomasse humide et de 0.011 h<sup>-1</sup> et 33% de DO pour le taux de croissance en concentration cellulaire.

Des cultures en bioréacteurs sont ensuite effectuées à une DO constante et différents niveaux de DCO<sub>2</sub> (de 1% à 19% de la saturation avec du CO<sub>2</sub> pur). Les résultats démontrent que le niveau de DCO<sub>2</sub> n'a pas d'effet apparent sur la croissance. Par contre, le fait de contrôler le DCO<sub>2</sub> à un niveau constant semble augmenter les taux de croissance spécifiques d'environ 40%. Cette effet positif

**du contrôle de DCO<sub>2</sub> est vérifié à des DO de 60%, 120% de même qu'à 180% de saturation avec l'air.**

## ABSTRACT

The objective of this study was to determine the effect of the concentration of dissolved oxygen (DO) and dissolved carbon dioxide (DCO<sub>2</sub>) on the growth of plant cell suspension cultures. Cultures were carried out in 3 L helicoidal ribbon impeller bioreactors. The plant cell species used in this study was *Eschscholtzia californica*.

Cultures were performed in four identical bioreactors. Homogeneous inoculum as well as systematic subculturing and monitoring were used to minimize external variations. Cultures were performed in fed-batch. Monitoring and addition of nutrients avoided their exhaustion with the exception of phosphate. Culture growth was monitored for wet and dry biomass and for cell concentration.

A data acquisition and control system was used to control the dissolved oxygen concentration. The control strategy involved manipulating the oxygen composition of the gas fed to the bioreactor while maintaining stirring speed at 60 rpm and without manipulating the gas flow rate. Since no DCO<sub>2</sub> probes are suitable for plant cell cultures, a model was developed to estimate the DCO<sub>2</sub> which was validated using an external probe. An adaptive controller was designed to control the estimated DCO<sub>2</sub> by manipulating the total gas flow rate.

Bioreactor cultures were performed at constant controlled DO, ranging from 10% to 240% with respect to air saturation. Operating conditions at 240% DO were at the upper limit of the oxygen transfer rate of the culture system used. The results suggest that the specific growth rate follows Monod type kinetics with respect to DO with  $\mu_{MAX}$  and  $K_s$  of  $0.0077 \text{ h}^{-1}$  and 19% DO for dry biomass growth,  $0.0073 \text{ h}^{-1}$  and 18% DO for wet biomass growth and  $0.011 \text{ h}^{-1}$  and 33% DO for cell growth.

Subsequently, cultures were performed at constant DO concentrations and DCO<sub>2</sub> levels ranging from 1% to 19% with respect to pure CO<sub>2</sub> saturation. DCO<sub>2</sub> did not seem to have any effect on growth. However, controlling DCO<sub>2</sub> to constant level in the range tested increased growth rate by 40%. This positive effect of DCO<sub>2</sub> control was observed at DO 60%, 120% and 180%.

## TABLE DES MATIÈRES

<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>IV</b>
<b>RÉSUMÉ .....</b>	<b>V</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>VIII</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES.....</b>	<b>X</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX .....</b>	<b>XIV</b>
<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>XV</b>
<b>LISTE DES SYMBOLES.....</b>	<b>XIX</b>
<b>LISTES DES ANNEXES .....</b>	<b>XXIV</b>
<b>1.0 INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 LA CULTURE DE CELLULES DE PLANTES .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 PROBLÉMATIQUE .....</b>	<b>2</b>
<b>2.0 REVUE DE LA LITTÉRATURE.....</b>	<b>6</b>
<b>2.1 CULTURE DE CELLULES DE PLANTES.....</b>	<b>6</b>
<b>2.1.1 Cultures en suspensions .....</b>	<b>6</b>
<b>2.1.2 Nutrition des cultures de cellules végétales.....</b>	<b>7</b>
<b>2.2 ÉTUDE DE LA CULTURE DE CELLULES DE PLANTE EN SUSPENSION .....</b>	<b>13</b>

2.2.1 Mesures de croissance des cultures en suspension .....	14
2.2.2 Étude de l'effet des gaz sur les cultures en suspension .....	15
2.2.3 Étude de l'effet des gaz en flacons agités .....	17
2.2.4 Études de l'effet des gaz en bioréacteurs.....	21
2.3 EFFET DES GAZ SUR LES CULTURES DE CELLULES VÉGÉTALES .....	30
2.3.1 Effet de l'oxygène dissous sur les cultures de cellules .....	31
2.3.2 Effet du dioxyde de carbone sur les plantes.....	35
2.3.3 Effet de l'éthylène sur les cellules végétales .....	37
<b>3.0 OBJECTIFS DU PROJET DE RECHERCHE .....</b>	<b>40</b>
<b>4.0 MATÉRIEL ET MÉTHODES .....</b>	<b>42</b>
4.1 LIGNÉE CELLULAIRE ET MAINTIEN .....	42
4.2 DESCRIPTION DU BIORÉACTEUR.....	43
4.3 CONDITIONS D'OPÉRATIONS .....	50
4.4 CULTURES TÉMOINS EN FLACONS.....	53
4.5 ÉCHANTILLONNAGE ET SUIVI .....	54
4.6 ANALYTIQUE .....	55
4.7 FACTEURS DE CORRECTIONS.....	56
<b>5.0 COMMANDE ET ESTIMATION DE PARAMÈTRES .....</b>	<b>60</b>
5.1 COMMANDE DE L'OXYGÈNE DISSOUS .....	61
5.1.1 Transfert d'oxygène.....	61
5.1.2 Contrôle d'oxygène dissous .....	65

<i>5.1.3 Estimations du taux d'assimilation et du coefficient de transfert d'O<sub>2</sub></i>	69
<b>5.2 DIOXYDE DE CARBONE .....</b>	<b>71</b>
<i>5.2.1 Mesure du taux de production du dioxyde de carbone.....</i>	<i>72</i>
<i>5.2.2 Évaluation de la rétention gazeuse du bioréacteur.....</i>	<i>77</i>
<i>5.2.3 Modèle d'estimation de la concentration de CO<sub>2</sub> dissous.....</i>	<i>81</i>
<i>5.2.4 Validation du modèle de DCO<sub>2</sub>.....</i>	<i>88</i>
<i>5.2.5 Contrôle du dioxyde de carbone dissous .....</i>	<i>95</i>
<b>5.3 PERFORMANCE DES CONTRÔLEURS ET DÉCOUPLAGE .....</b>	<b>100</b>
<i>5.3.1 Contrôle d'oxygène dissous .....</i>	<i>100</i>
<i>5.3.2 Contrôle du dioxyde de carbone dissous .....</i>	<i>103</i>
<i>5.3.3 Découplage des boucles de commandes.....</i>	<i>109</i>
<b>6.0 RÉSULTATS ET DISCUSSION .....</b>	<b>111</b>
<b>6.1 STABILITÉ DE LA LIGNÉE CELLULAIRE .....</b>	<b>111</b>
<b>6.2 EFFET DES GAZ DISSOUS, CULTURES EN FLACONS AGITÉS .....</b>	<b>114</b>
<b>6.3 SOMMAIRE DES CULTURES EN BIORÉACTEUR .....</b>	<b>120</b>
<b>6.4 EFFET DE L'OXYGÈNE DISSOUS .....</b>	<b>123</b>
<i>6.4.1 Résultats .....</i>	<i>123</i>
<i>6.4.2 Cinétique .....</i>	<i>126</i>
<b>6.5 EFFET DU DIOXYDE DE CARBONE DISSOUS .....</b>	<b>127</b>
<b>6.6 EFFET DE LA DO ET DU DCO<sub>2</sub> SUR LA NUTRITION.....</b>	<b>135</b>
<i>6.6.1 Assimilation spécifique des nutriments.....</i>	<i>136</i>
<i>6.6.2 Rendements .....</i>	<i>162</i>

**7.0 CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS .....171**

**BIBLIOGRAPHIE .....175**

## **LISTE DES TABLEAUX**

Tableau 5.1 : Valeurs des paramètre du contrôleur de DO en fonction de DO <sub>PC</sub>	101
.....	.....
Tableau 6.1 : Environnement gazeux des flacons en fonction du type de bouchon .....	119
Tableau 6.2 : Sommaire des conditions d'opération et du suivi des cultures en bioréacteur .....	121
Tableau 6.3 : Paramètres du modèle de Monod .....	127

## LISTE DES FIGURES

Figure 2.1 : Taux de croissance en fonction du phosphate inorganique pour deux espèces : <i>Panax genseg</i> et <i>Panax quinquefolium</i> .....	12
Figure 4.1 : Système de gaz d'un bioréacteur .....	45
Figure 4.2 : Montage pour étalonner la sonde et mesurer le DCO <sub>2</sub> .....	48
Figure 4.3 : Exemple de droite d'étaffonnage de la sonde à DCO <sub>2</sub> .....	49
Figure 4.4 : Variation des concentrations en nitrate et en biomasse lors d'une culture typique. ....	58
Figure 5.1 : Taux de transfert du CO <sub>2</sub> et mesure de pH lors de la culture FH08 .....	74
Figure 5.2 : Montage développé pour mesurer la rétention gazeuse en fonction du débit de bullage .....	79
Figure 5.3 : Volume mesuré des bulles en fonction du débit alimenté .....	80
Figure 5.4 : Procédé de transfert du CO <sub>2</sub> .....	82
Figure 5.5 : Variation de CO <sub>2</sub> * en fonction de la hauteur parcourue par les bulles .....	85
Figure 5.6 : Illustration graphique du calcul du KDCO <sub>2</sub> .....	87
Figure 5.7 : Estimation et mesure du DCO <sub>2</sub> pour la culture FH13 .....	89
Figure 5.8 : Estimation et mesure du DCO <sub>2</sub> pour la culture FH14 .....	90
Figure 5.9 : Estimation et mesure du DCO <sub>2</sub> pour la culture FH15 .....	90
Figure 5.10 : Estimation versus mesure du DCO <sub>2</sub> pour la culture FH16.....	91

Figure 5.11 : Estimation et mesure du DCO <sub>2</sub> pour la culture FH21 .....	93
Figure 5.12 : Estimation et mesure du DCO <sub>2</sub> pour la culture FH23 .....	93
Figure 5.13 : Estimation et mesure du DCO <sub>2</sub> pour la culture FH24 .....	94
Figure 5.14 : Cycle d'action du contrôleur de DCO <sub>2</sub> .....	99
Figure 5.15 : Contrôle de l'oxygène dissous à différents niveaux.....	102
Figure 5.16 : Profil des concentrations des gaz dissous et des débits alimentés pour la culture FH32 .....	105
Figure 5.17 : Profil des concentrations des gaz dissous et des débits alimentés pour la culture FH33.....	106
Figure 5.18 : Profil des concentrations des gaz dissous et des débits alimentés pour la culture FH34 .....	107
Figure 5.19 : Diagramme bloc des boucles de commande de DO et de DCO <sub>2</sub> .....	110
Figure 6.1 : Taux de croissance en biomasse sèche, humide et en nombre de cellules des cultures témoins.....	113
Figure 6.2 : Indices de croissance et DCO <sub>2</sub> en flacon agités selon le type de bouchon utilisé .....	115
Figure 6.3 : Estimé de la DO dans les flacons avec bouchons d'aluminium....	118
Figure 6.4 : Taux de croissance spécifiques en fonction de la DO .....	124
Figure 6.5 : Temps de division en fonction de la DO .....	125
Figure 6.6 : Taux de croissance spécifique en fonction du DCO <sub>2</sub> .....	129
Figure 6.7 : Temps de division en fonction du DCO <sub>2</sub> .....	130

<b>Figure 6.8 : Taux de croissance en fonction de la DO pour toutes les cultures</b>	131
.....	.....
<b>Figure 6.9 : Temps de division en fonction de la DO pour toutes les cultures</b>	132
<b>Figure 6.10 : Assimilation spécifique du nitrate en NdC, DO &lt; 100%</b>	137
<b>Figure 6.11 : Assimilation spécifique du nitrate en NdC, DO &gt; 100%</b>	138
<b>Figure 6.12 : Assimilation spécifique du nitrate en <math>X_{MS}</math>, DO &lt; 100%</b>	139
<b>Figure 6.13 : Assimilation spécifique du nitrate en <math>X_{MS}</math>, DO &gt; 100%</b>	140
<b>Figure 6.14 : Assimilation spécifique de l'ammonium en NdC, DO &lt; 100%</b>	142
<b>Figure 6.15 : Assimilation spécifique de l'ammonium en NdC, DO &gt; 100%</b>	143
<b>Figure 6.16 : Assimilation spécifique de l'ammonium en <math>X_{MS}</math>, DO &lt; 100%</b>	144
<b>Figure 6.17 : Assimilation spécifique de l'ammonium en <math>X_{MS}</math>, DO &gt; 100%</b>	145
<b>Figure 6.18 : Assimilation spécifique du glucose en NdC, DO &lt; 100%</b>	147
<b>Figure 6.19 : Assimilation spécifique du glucose en NdC, DO &gt; 100%</b>	148
<b>Figure 6.20 : Assimilation spécifique du glucose en <math>X_{MS}</math>, DO &lt; 100%</b>	149
<b>Figure 6.21 : Assimilation spécifique du glucose en <math>X_{MS}</math>, DO &gt; 100%</b>	150
<b>Figure 6.22 : Assimilation spécifique de l'oxygène en NdC, DO &lt; 100%</b>	152
<b>Figure 6.23 : Assimilation spécifique de l'oxygène en NdC, DO &gt; 100%</b>	153
<b>Figure 6.24 : Assimilation spécifique de l'oxygène en <math>X_{MS}</math>, DO &lt; 100%</b>	155
<b>Figure 6.25 : Assimilation spécifique de l'oxygène en <math>X_{MS}</math>, DO &gt; 100%</b>	156
<b>Figure 6.26 : Production spécifique de CO<sub>2</sub> en NdC, DO &lt; 100%</b>	158
<b>Figure 6.27 : Production spécifique de CO<sub>2</sub> en NdC, DO &gt; 100%</b>	159
<b>Figure 6.28 : Production spécifique de CO<sub>2</sub> en <math>X_{MS}</math>, DO &lt; 100%</b>	160

Figure 6.29 : Production spécifique de CO <sub>2</sub> en X <sub>MS</sub> , DO > 100% .....	161
Figure 6.30 : Rendement apparent de la croissance en biomasse sèche et en nombre de cellules sur le nitrate en fonction de la DO .....	163
Figure 6.31 : Rendement apparent de la croissance en biomasse sèche et en nombre de cellules sur l'ammonium en fonction de la DO .....	165
Figure 6.32 : Rendement apparent de la croissance en biomasse sèche et en nombre de cellules sur le glucose en fonction de la DO.....	167
Figure 6.33 : Rendement apparent de la croissance en biomasse sèche et en nombre de cellules sur l'oxygène en fonction de la DO.....	168
Figure 6.34 : Rendement apparent de la croissance en biomasse sèche et en nombre de cellules sur la production de dioxyde de carbone en fonction de la DO .....	169

## LISTE DES SYMBOLES

A	Aire d'une section transversale du bioréacteur	$\text{m}^2$
$[\text{A}_{(\text{aq})}]$	Concentration de l'espèce A dans l'eau	$\text{mM}$
$C^*$	Concentration de saturation en oxygène de l'eau en équilibre avec un gaz	$\text{mM}$
$\text{CO}_2^*$	Concentration de saturation en dioxyde de carbone de l'eau en équilibre avec un gaz	$\text{mM}$
$\text{CO}_2^*\text{out}$	Concentration de saturation en dioxyde de carbone de l'eau en équilibre avec le gaz de sortie	$\text{mM}$
$\text{CO}_2^*\text{réduit}$	$\text{CO}_2^*\text{out}$ réduit	$\text{mM}$
$\text{CO}_2_{\text{G}}$	Concentration de $\text{CO}_2$ dans la phase gazeuse	%
$\text{CO}_2\text{in}$	Concentration de $\text{CO}_2$ du gaz d'entrée	%
$\text{CO}_2_{\text{L}}$	Concentration de $\text{CO}_2$ dans la phase liquide	$\text{mM}$
$\text{CO}_2\text{out}$	Concentration de $\text{CO}_2$ du gaz de sortie	%
CPR	Taux de production de dioxyde de carbone	$\text{mM h}^{-1}$
CTR	Taux de transfert de dioxyde de carbone	$\text{mM h}^{-1}$
$\text{DCO}_2$	Concentration de dioxyde de carbone dissous	$\text{mM}$
$\text{DCO}_{2\text{PC}}$	Point de consigne du dioxyde de carbone	$\text{mM}$
DO	Concentration d'oxygène dissous	$\text{mM}$
$\text{DO}'$	Concentration d'oxygène dissous corrigée	%
$\text{DO}_{\text{f}}$	Concentration d'oxygène dissous finale	%
$\text{DO}_{\text{PC}}$	Point de consigne de l'oxygène dissous	$\text{mM}$
Facteur <sub>OIL</sub>	Facteur de correction pour tenir compte des ajouts de nutriments	

$X_{MH}$	Facteur de correction pour tenir compte du volume de biomasse	
H	Rétention gazeuse	
h	Hauteur de la colonne de liquide	m
$H_A$	Constante d'Henry de l'espèce A	
$H_C$	Constante d'Henry du dioxyde de carbone	
$H_O$	Constante d'Henry de l'oxygène	
$H_R$	Hauteur réduite	
$K^{*ac}$	Pseudo constante de dissociation du dioxyde de carbone	M
$k_1, k_2$	Constantes de vitesses de réactions	s <sup>-1</sup>
$K_{acid}$	Constante de dissociation de l'acide carbonique	M
$KDCO_2$	Variable reliant la concentration de dioxyde de carbone du gaz sortie du bioréacteur à la concentration représentative du transfert de dioxyde de carbone	
$K_H$	Constante de dissociation du dioxyde de carbone dans l'eau	M atm <sup>-1</sup>
$K_{HA}$	Constante de dissociation de l'espèce A dans l'eau	M atm <sup>-1</sup>
$K_{HO}$	Constante de dissociation de l'oxygène dans l'eau	M atm <sup>-1</sup>
$KLab$	Coefficient de transfert de masse par les bulles	h <sup>-1</sup>
$KLac$	Coefficient de transfert de masse du dioxyde de carbone	h <sup>-1</sup>
$KLao$	Coefficient de transfert de masse d'oxygène	h <sup>-1</sup>
$Klas$	Coefficient de transfert de masse par la	h <sup>-1</sup>

	surface	
K <sub>ls30</sub>	Coefficient de transfert de masse par la surface à 30 rpm	h <sup>-1</sup>
K <sub>s</sub>	Concentration du nutriment limitant pour laquelle $\mu=1/2\mu_{MAX}$	%
k <sub>x</sub>	Expression dans l'exponentielle	
m <sub>xi</sub>	Taux d'accroissement instantané de la biomasse i	g <sub>MS</sub> L <sup>-1</sup>
N <sub>2in</sub>	Concentration d'azote du gaz d'entrée	%
N <sub>2out</sub>	Concentration d'azote du gaz de sortie	%
O <sub>2f</sub>	Quantité d'oxygène final	moles
O <sub>2i</sub>	Quantité d'oxygène initial	moles
O <sub>2in</sub>	Concentration d'oxygène du gaz d'entrée	%
O <sub>2out</sub>	Concentration d'oxygène du gaz de sortie	%
OTR	Taux de transfert d'oxygène	mM h <sup>-1</sup>
OUR	Taux d'assimilation d'oxygène	mM h <sup>-1</sup>
OUR <sub>p</sub>	Taux d'assimilation d'oxygène estimé selon la pente	mM h <sup>-1</sup>
P	Pression	atm
P <sub>0</sub>	Pression standard	atm
P <sub>A</sub>	Pression partielle de l'espèce A	atm
P <sub>B</sub>	Pression partielle de dioxyde de carbone des bulles	atm
P <sub>CO2</sub>	Pression partielle de dioxyde de carbone	atm
P <sub>CO2,L</sub>	Pression partielle de dioxyde de carbone dissous	atm
P <sub>O</sub>	Pression partielle d'oxygène	atm
P <sub>Q</sub>	Coefficient d'aération	h <sup>-1</sup>
P <sub>w</sub>	Pression partielle de vapeur d'eau	atm

$Q_B$	Débit de bullage	$\text{cc min}^{-1}$
$q_{\text{CO}_2}$	Taux spécifique de production de dioxyde de carbone	$\text{mM h}^{-1} \text{g}_{\text{MS}}^{-1}$
$Q_H$	Débit alimenté en tête de bioréacteur	$\text{cc min}^{-1}$
$Q_Ni$	Taux d'assimilation du nutriment i	$\text{mM j}^{-1}$
$q_{Ni}$	Taux d'assimilation spécifique du nutriment i	$\text{mM j}^{-1} \text{g}_{\text{MS}}^{-1}$
$q_O_2$	Taux d'assimilation spécifique d'oxygène	$\text{mM h}^{-1} \text{g}_{\text{MS}}^{-1}$
$q_P$	Taux de production spécifique de métabolites secondaires	$\text{g j}^{-1} \text{g}_{\text{MS}}^{-1}$
$Q_T$	Débit total	$\text{cc min}^{-1}$
R	Constante des gaz parfaits	$\text{L atm mol}^{-1} \text{K}^{-1}$
RQ	Quotient respiratoire	
S	Nutriment limitant	%
SCV	Rapport du volume de cellules sédimentées au volume total de culture	
T	Température	K
$T_0$	Température standard	K
$t_{D\text{ MH}}$	Temps de division de la biomasse humide	h
$t_{D\text{ MS}}$	Temps de division de la biomasse sèche	h
$t_{D\#}$	Temps de division du nombre de cellules	h
$t_{\text{RES}}$	Temps de résidence	s
$u_B$	Vitesse des bulles	$\text{m s}^{-1}$
$V_A$	Volume de solution ajouté	L
$V_B$	Volume des bulles	L
$V_H$	Volume de la phase gazeuse dans la tête du flacon	L
$V_L$	Volume de liquide	L
$V_{\text{TOT}}$	Volume total	L
$V_x$	Volume occupé par la biomasse	L

$X$	Concentration en biomasse (de façon générale)	
$X_i$	Concentration de biomasse i	
$X_{MH}$	Concentration de biomasse humide	$g_{MH} L^{-1}$
$X_{MS}$	Concentration de biomasse sèche	$g_{MS} L^{-1}$
$Y_{X/N}$	Rendement de croissance sur les nutriments	$g_{MS} mol^{-1}$
$Y_{X/Ni}$	Rendement de croissance de la biomasse i sur le nutriment i	$g_{MS} mol^{-1}$
$\alpha$	Coefficient de transfert de masse d'oxygène réduit	
$\beta$	Coefficient de transfert de masse de dioxyde de carbone réduit	
$\gamma_1, \gamma_2$	Gains des estimateurs des contrôleurs	
$\lambda_1, \lambda_2, \lambda_3, \lambda_4$	Gains des contrôleurs	
$\mu$	Taux de croissance spécifique	$h^{-1}$
$\mu_c$	Taux de croissance spécifique en nombre de cellules	$h^{-1}$
$\mu_{MAX}$	Taux de croissance maximum	$h^{-1}$
$\mu_{MH}$	Taux de croissance spécifique en biomasse humide	$h^{-1}$
$\mu_{MS}$	Taux de croissance spécifique en biomasse sèche	$h^{-1}$
$\rho H_2O$	Masse volumique de l'eau	$kg m^{-3}$

## **LISTE DES ANNEXES**

<b>ANNEXE A : COMPOSITION DU MILIEU DE CULTURE.....</b>	<b>203</b>
<b>ANNEXE B : COMPTE CELLULAIRE.....</b>	<b>205</b>
<b>ANNEXE C : RÉSULTATS DES CULTURES EN BIORÉACTEURS.....</b>	<b>207</b>
<b>ANNEXE D : ASSIMILATION SPÉCIFIQUE DES NUTRIMENTS.....</b>	<b>229</b>
<b>ANNEXE E : RENDEMENTS APPARENTS.....</b>	<b>254</b>

## 1.0 INTRODUCTION

Depuis des temps forts anciens déjà, les plantes sont utilisées pour leurs vertus thérapeutiques. Au fil des siècles, l'art du guérisseur s'est affiné jusqu'à s'élever au niveau de science. Maintenant que l'alchimie a fait place à la chimie, il est possible d'identifier et d'isoler les ingrédients actifs des concoctions des shamans. Ainsi, les plantes sont reconnues comme une importante source de substances d'intérêts économiques, notamment dans le domaine pharmaceutique (Verpoorte, 1998).

### 1.1 La culture de cellules de plantes

On peut noter deux exemples de phyto-molécules d'intérêt économique, soit la sanguinarine et le Taxol® (Bristol-Myers Sqibb). La première est efficace contre la périodontite et la plaque dentaire alors que la seconde est un médicament contre le cancer. Ce sont des métabolites secondaires de plantes. Traditionnellement, les plantes entières sont cultivées et les phyto-molécules d'intérêts en sont extraites. Ainsi, la sanguinarine est produite à partir de *Macleaya cordata* alors que le Taxol® est isolé de l'if *Taxus brevifolia* (Kieran et coll., 1997). Les faibles quantités que contiennent les plantes à l'état naturel, 0.03% P/P pour le Taxol® (Rho et coll. 1992), requièrent des quantités phénoménales de biomasse végétale naturelle pour soutenir un rythme de

production industriel. Par exemple, il faut l'écorce de 1000 arbres de *Taxus brevifolia* âgés de 100 ans pour produire un kilogramme de Taxol®. Ce mode de production, n'est évidemment pas adéquat. De plus, ces phyto-molécules sont trop complexes pour être économiquement produites par synthèse chimique (17 étapes enzymatiques dans le cas de la sanguinarine) (Cline et coll., 1990). De même, l'utilisation de micro-organismes modifiés génétiquement ne peut parvenir à reproduire la biosynthèse de la sanguinarine. Le nombre important de gènes à cloner rend l'expression synchronisée de ceux-ci impossible à réaliser. La seule voie de production industrielle de telles molécules est la culture de cellules végétales *in vitro* (Verpoorte et coll., 1993).

## 1.2 Problématique

Le potentiel énorme que représente le règne végétal pour l'industrie pharmaceutique est à peine développé. Seulement une poignée de procédés de culture de cellules en suspensions ont été développés au niveau industriel, notamment la production de shikonine par *Lithospermum erythrorhizon* (Fujita, 1988), de berberine par *Coptis japonica* (Fujita et coll., 1987) et de ginsenoside par *Panax ginseng* (Ushiyama, 1991). Ces procédés ont d'ailleurs tous été abandonnés. La commercialisation des technologies développées à l'échelle de laboratoire est limitée par la rentabilité économique, qui elle-même origine d'une combinaison de facteurs biologiques et d'ingénierie (Kieran et coll., 1997). La

productivité est le facteur limitant qui est généralement en cause (Drapeau et coll., 1987).

La production de métabolites secondaires n'est généralement pas associée à la croissance cellulaire (Bailey et Ollis, 1986). Le procédé comporte donc deux étapes, soit la croissance suivie de la production qui peut-être induite par élicitation. L'élicitation est une réaction de défense des cellules de plantes à une attaque microbienne et résulte en la production et le relargage de substances anti-microbiennes dans leur environnement (Aubry, 1995). La productivité (en masse de produit formé par litre de culture par jour) du système de production est proportionnelle au rendement de production, soit la masse de phytomolécules produites par unité de cellules élicitées et à la concentration en cellules lors de l'élicitation. Enfin, la productivité globale du procédé est la production totale divisée par le temps total (pour la croissance et pour la production). C'est ainsi qu'est lié la productivité au taux de croissance.

Les phases de croissance et de production d'alkaloïdes par la lignée EC6 (*Eschscholtzia californica*) ont été étudiées intensivement ces cinq dernières années. Aubry (1995) développe un système de production de sanguinarine avec EC6 dans un réacteur de 5 L. Il établit que le meilleur moment pour induire la production de métabolites secondaires coïncide avec le taux maximum de respiration des cultures. Or, Pépin (1996) qui travaille avec *Vitis vinifera*,

constate que le profil des comptes cellulaires correspond au profil respiratoire. Par ailleurs, Sirois (1997) élabore un modèle de croissance ce qui permet d'ajouter les nutriments requis au prolongement de la phase de croissance permettant d'atteindre une concentration cellulaire de  $20 \times 10^6$  cellules  $\text{ml}^{-1}$ .

D'autre part, la croissance des cellules de plantes dépend fortement de la concentration en oxygène dissous (DO) dans le milieu de culture (Archambault et coll. 1994, Gao et coll., 1992, Payne et coll., 1990, Pépin, 1996, Snape et coll., 1989). Les travaux sur l'oxygène dissous effectués par Archambault et coll. (1994), avec des cellules immobilisées de *Catharanthus roseus* présentent la meilleure croissance en biomasse sèche pour une DO dans la phase liquide de 90% de la saturation avec l'air. De plus, il est conclu que pour les cultures à DO supérieure à 90%, la disponibilité nutritionnelle des glucides et du nitrate serait responsable de la diminution de la croissance par rapport à 90%. Par contre, selon Pépin (1996), la DO optimale pour la prolifération cellulaire de *Vitis vinifera* en suspension se situe entre 50% et 70% de la saturation avec l'air. Selon ces derniers résultats, le taux de croissance augmente jusqu'à 50% pour redescendre à partir de 70% jusqu'à 90%, limite de l'étude. C'est pourquoi les travaux de Sirois, comme d'Aubry, ont été effectués à une DO de 60% avec *Eschscholtzia californica*.

Enfin, un autre gaz dissous en quantité non négligeable dans les cultures de cellules en suspensions joue un rôle important : le dioxyde de carbone ( $\text{CO}_2$ ). Archambault (1991) rapporte que l'ajout de 2% (V/V) de  $\text{CO}_2$  au gaz d'alimentation d'un bioréacteur de cellules immobilisées de *Catharanthus roseus* augmente la production de biomasse par rapport à une alimentation en air (0.03%  $\text{CO}_2$ ) ou une alimentation à 5% de  $\text{CO}_2$ . Le dioxyde de carbone dissous ( $\text{DCO}_2$ ) est difficilement mesurable de manière stérile. Les sondes disponibles sont fiables sur 24 à 48h alors que les cultures de cellules de plantes durent rarement moins de 7 à 10 jours. Aubry (1995), développe un modèle pour l'estimation du  $\text{DCO}_2$  (concentration en dioxyde de carbone dissous) dans les cultures en suspensions d'*Eschscholtzia californica*. Le modèle n'est cependant pas validé et a été développé pour des conditions spécifiques d'aération. De plus, le modèle est utilisé à titre indicatif seulement et l'effet du  $\text{DCO}_2$  n'est pas identifié.

Les travaux réalisés par l'équipe de recherche sur l'environnement gazeux des cultures de cellules ne conduisent pas à des conclusions claires. Dans ce contexte, l'objectif général de ce projet est de déterminer l'effet de l'environnement gazeux sur la croissance des cultures de cellules en suspensions d'EC6 (*Eschscholtzia californica*).

## **2.0 REVUE DE LA LITTÉRATURE**

**La culture de cellules de plante demeure parfois la seule avenue possible pour la production à grande échelle de molécules complexes telles la sanguinarine et le Taxol®.** Si les applications industrielles de la culture de cellules de plantes sont si peu nombreuses, c'est généralement à cause de la faible productivité de cette technologie d'avant garde.

### **2.1 Culture de cellules de plantes**

La génération de lignées cellulaires végétales est initiée à partir d'une partie d'une plante stérilisée chimiquement. Ces tissus stériles sont cultivés sur des milieux de culture gélifiés. La croissance forme des amas cellulaires non différentiés appelés cals. Transféré dans du milieu liquide agité, les cals friables deviennent des suspensions cellulaires dont les agrégats diminuent en tailles.

#### **2.1.1 Cultures en suspensions**

Les cultures de cellules de plantes en suspension sont souvent comparées aux cultures des micro-organismes. On tente d'ailleurs fréquemment d'appliquer les technologies de culture microbiennes aux cultures de cellules de plantes avec un succès très limité. Les cellules de plantes cultivées *in vitro* sont plus grosses

(diamètre jusqu'à 500 fois) et poussent plus lentement (temps de division 10 à 50 fois plus lent) que les bactéries. De plus, les cellules végétales ont tendance à croître en amas qui atteignent parfois quelques millimètres de diamètre. Elles sédimentent facilement et requièrent donc une agitation constante. La viscosité des cultures de cellules végétales est fortement dépendante de la concentration en biomasse et présente un comportement pseudo-plastique dans la majorité des cas à plus de 150 à 200 g de biomasse humide par litre de culture (Kieran et coll., 1997).

D'autre part, les cellules de plantes sont très sensibles au cisaillement. Ce phénomène est très important pour le design et l'opération des systèmes de cultures. Ainsi, la vitesse d'agitation des bioréacteurs agités mécaniquement est restreinte aux vitesses les plus lentes afin de minimiser la perte de viabilité des cellules (Takeda et coll. 1994) ainsi que la diminution du taux de croissance spécifique (Ho et coll. 1995). Enfin, le bullage des gaz dans la phase liquide donne lieu à des problèmes de mousse et de flottaison des cellules (Wongsamuth et coll., 1994).

### **2.1.2 Nutrition des cultures de cellules végétales**

Les premiers milieux de culture de cellules de plantes totalement définis datent de 1955. Ensuite, la publication des milieux de culture MS (Murashige et Skoog,

1962), et B5 (Gamborg et coll., 1968), qui contiennent les minéraux essentiels, les vitamines, les hormones ainsi qu'une source de carbone, ont lancé les bases à partir desquelles ont été formulés de nouveaux milieux. L'influence des nutriments sur la croissance des cellules de plante est indéniable. Cette section relate brièvement les effets des glucides, de l'azote et du phosphate.

Étant donné que les cellules de plantes cultivées *in vitro* ont généralement perdu leur capacité de photosynthèse elles doivent compter sur une source d'énergie et de carbone externe. Le saccharose est une source largement utilisée d'énergie et de carbone. Les cellules d'*Eschscholtzia californica* n'ont pas la capacité de stocker les glucides sous forme d'amidon (Taticek et coll., 1990) comme le font par exemple certaines lignées cellulaires de *Catharanthus roseus* (van Gulik et coll., 1989). Les glucides ne doivent donc jamais manquer dans le milieu de culture sans quoi la biomasse sèche de la culture cesse de croître et même diminue (Sirois, 1997). Cet auteur n'a pas observé de relation entre le taux de croissance de la biomasse (sèche ou de la prolifération cellulaire) et la concentration en glucides présents dans le milieu de culture d'EC6. Par contre, des concentrations élevées ( $80 \text{ g L}^{-1}$ ) de saccharose peuvent ralentir sévèrement la croissance de cette lignée, voire l'inhiber totalement à plus forte concentration ( $120 \text{ g L}^{-1}$ ) (résultats non publiés).

Comme les cultures de cellules de plantes sont pour la plupart conduites en mode cuvée, il est normal que la quantité initiale de glucides ait une influence sur la concentration maximale de biomasse qui sera atteinte. Dans leur travaux, Zhong et coll. (1995) indiquent que la biomasse maximale atteinte est clairement proportionnelle à la concentration initiale de saccharose et l'arrêt de croissance coïncide exactement avec la disparition complète des glucides du milieu de culture. On retient que dans la plage de 1 à 30 g L<sup>-1</sup>, la concentration en glucides dans les cultures en cuvée alimentés n'a pas d'effet sur les taux de croissance des cellules.

On retrouve l'azote dans toutes les protéines et dans les acides nucléiques. C'est pourquoi les cellules de plantes ont besoin d'une source d'azote pour leur survie et leur croissance. Celle-ci est généralement fournie sous forme de sels d'ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) et de nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ). L'assimilation de ces ions fait appel à divers mécanismes.

L'ammonium est assimilé et transformé en glutamine par différents systèmes enzymatiques. Aubry (1995), Pépin, (1996) et Sirois (1997) notent une assimilation rapide du  $\text{NH}_4^+$  présent dans le milieu de culture, qu'il y ait croissance dès le début ou latence. La disparition complète de cet ion du milieu de culture n'affecte pas la croissance de façon immédiate. En fait, selon Sirois (1997), l'ammonium serait accumulé à l'intérieur de la cellule sous forme de

glutamine et utilisé par la suite pour la croissance cellulaire. Selon ce même auteur, la croissance de la biomasse serait ralentie par la présence de l'ammonium extracellulaire, mais l'arrêt de la prolifération cellulaire coïnciderait avec l'épuisement des réserves intracellulaires (Sirois, 1997).

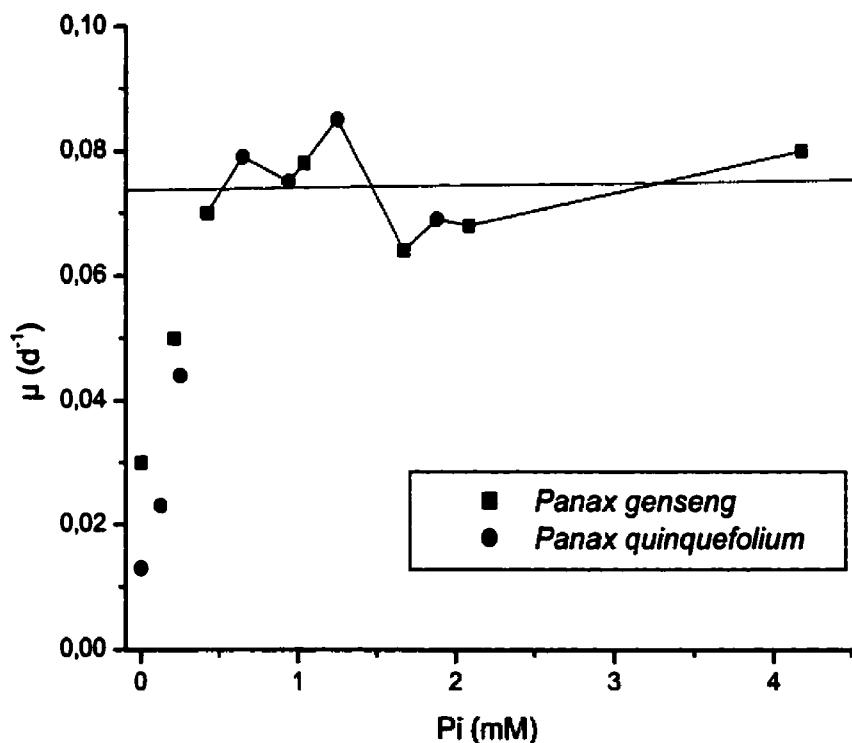
Une foule d'études rapportent un rapport  $\text{NH}_4^+ : \text{NO}_3^-$  optimal pour la croissance des cellules ou la production de métabolites secondaires (Sargent et coll., 1973, Do et coll., 1991, Mori et coll., 1994). En fait, déjà en 1973, l'étude de Veliky établi que l'assimilation d'ammonium a un impact majeur sur le pH extracellulaire et que ce peut être un facteur important dans le métabolisme de l'azote (Veliky et coll., 1973). On sait maintenant que le transport d'une molécule de  $\text{NH}_4^+$  à l'intérieur de la cellule fait intervenir un ion  $\text{H}^+$  qui est libéré dans la culture, ce qui provoque une chute du pH (Skirvin et coll., 1986). D'ailleurs, lors de travaux sur la production de métabolites secondaires par EC6, Fiset (1998) a démontré que l'ammonium comme seule source d'azote ajoutée à l'élicitation abaisse dangereusement le pH de la culture (de 5.5 à 3.3) ce qui inhibe la production d'alcaloïdes et provoque une perte importante de la viabilité des cellules. On retiendra donc, que l'assimilation du  $\text{NH}_4^+$  abaisse le pH ce qui peut nuire aux cellules mais qu'il est requis pour la division cellulaire.

Quant au nitrate il est introduit dans la cellule contre un gradient électrique ayant un potentiel de l'ordre de -100 à -250 mV (chargé négativement à

l'intérieur de la cellule). De l'énergie est donc requise pour le transport du nitrate dans la cellule. L'azote ainsi obtenu n'est pas utilisé sous sa forme oxydée ( $\text{NO}_3^-$ ). Une fois dans la cellule, le nitrate est soit stocké, soit transformé en  $\text{NH}_4^+$  grâce à une série d'étapes de réduction (Alberts et coll., 1994, Crawford, 1995). D'autre part, l'effet du manque de nitrate dans le milieu de culture provoque un arrêt de la croissance en biomasse selon Sirois (1997). Par contre, de hautes concentrations en nitrate sont défavorables au taux de croissance en biomasse et en nombre de cellules (Sirois, 1997).

Le phosphate qui est présent dans l'ATP et l'acide nucléique est fourni sous forme de sels tels le  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  ou le  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Il n'est jamais réduit et demeure sous forme d'orthophosphate ( $\text{HPO}_4^{2-}$  ou  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  (Clarkson et coll., 1980). Sa disparition rapide du milieu de culture (24 à 36h) soutient fortement la thèse selon laquelle il est accumulé à l'intérieur des cellules d'*Eschscholtzia californica* (Sirois, 1997). L'épuisement des réserves intracellulaires de  $\text{PO}_4^{2-}$  correspondrait à l'arrêt de la croissance en biomasse (van Gulik et coll., 1993) de même qu'à l'arrêt de la division cellulaire (Sirois, 1997). L'effet de la concentration de phosphate sur les taux de croissance en biomasse et en prolifération cellulaire serait négatif selon cet auteur. Par contre, van Gulik et coll. (1993), montrent que la croissance de *Catharanthus roseus* est linéaire avec un phosphate inorganique de 0.25 mM alors qu'elle est exponentielle jusqu'à l'épuisement du phosphate intracellulaire ou des glucides pour des

concentrations de 1.25 et 6.25 mM. Enfin, la Figure 2.1 résume les données présentées dans deux tableaux différents d'une publication de Liu et coll., (1997).



**Figure 2.1 : Taux de croissance en fonction du phosphate inorganique pour deux espèces : *Panax ginseng* et *Panax quinquefolium***

Comme on peut le voir, le taux de croissance de la biomasse est sensiblement constant en fonction du phosphate inorganique à partir d'une concentration de

0.5 mM. On retient que la concentration en phosphate initial a un effet sur la biomasse maximale atteinte mais que son effet sur le taux de croissance est négligeable.

## 2.2 Étude de la culture de cellules de plante en suspension

*« Cells are small and complex. It is hard to see their structure, hard to discover their molecular composition, and harder still to find out how their various components function. What we can learn about cells depends on the tools at our disposal [...] »* (Alberts et coll. 1994).

Le taux de croissance des cellules de plantes en suspension est faible et de l'ordre de 0.1 à 0.3 j<sup>-1</sup> comme le rapporte Aubry (1995). Le rapport d'inoculation, le volume d'innoculum sur le volume de la culture, est donc élevé, soit de l'ordre de 20 à 33%. C'est pourquoi l'inoculation de bioréacteurs requiert l'utilisation de plusieurs sous unités de culture de cellules. Par exemple, il faut les cellules de trois ou quatre flacons agités pour inoculer un réacteur de 2.5 L de culture. L'état physiologique de cette grande quantité de cellules a une influence importante sur le comportement de la culture inoculée. Hors, l'état

---

<sup>a</sup> Les cellules sont petites et complexes. Il est difficile de voir leur structure, difficile de découvrir leur composition moléculaire et encore plus difficile de trouver comment leur divers composants fonctionnent. Ce que nous pouvons apprendre à propos des cellules dépend des outils dont nous disposons [...].

physiologique des cellules est fonction du passé plus ou moins immédiat des cellules en question. Les conditions de culture des flacons servant à l'inoculation ont une grande influence sur la qualité de l'inoculum. En effet, les cellules de plantes accumulent certains nutriments (notamment l'azote et le phosphate) en vue d'une utilisation ultérieure. La quantité importante de cellules utilisée à l'inoculation (et les nutriments intracellulaires qu'elles contiennent) est une source de variation à ne pas négliger. Enfin, des expositions courtes, aussi peu que 3h, à l'anoxie (0% d'oxygène) peuvent avoir des effets dévastateurs sur la survie des racines de maïs à des conditions d'anoxie subséquentes (Zeng et coll., 1999).

### 2.2.1 Mesures de croissance des cultures en suspension

Une mesure très simple de la croissance d'une culture de cellules de plantes en suspension est la concentration de la biomasse humide ( $X_{MH}$ ) ou sèche ( $X_{MS}$ ). Par contre, l'un des inconvénients de cette mesure de la croissance est qu'elle mesure toute matière qui est dans la cellule (van Gulik et coll., 1989). Pour les cellules qui stockent les glucides sous forme d'amidon par exemple, la mesure de la biomasse sèche ne fait pas de différence entre un accroissement de la biomasse et un accroissement du stockage. Si l'objet de la biomasse est de produire des métabolites secondaires, il n'est pas intéressant de convertir du

glucose en amidon car il est très improbable que des grains d'amidons synthétisent des métabolites secondaires (van Gulik et coll., 1989).

D'ailleurs, Pépin (1996) observe que les concentrations en biomasse humide et sèche continuent de croître 7 jours après l'arrêt de la prolifération cellulaire. Le maximum dans la courbe de concentration en nombre de cellules coïncide avec le taux maximum d'assimilation de l'oxygène (OUR). Ainsi, le plafonnement des mesures d'OUR serait relié à une diminution importante du taux de division cellulaire et à une inflexion du taux de croissance de la biomasse (Pépin, 1996). C'est pourquoi, les travaux sur les cultures de cellules de plantes visant à améliorer la productivité doivent être décrites par les comptes cellulaires plutôt que par la biomasse (Pépin, 1996). Par contre, comme la mesure de la biomasse sèche est très précise comparée au compte cellulaire, la biomasse n'est pas près de disparaître des publications et des travaux de recherche sur les cellules de plantes. De plus, l'utilisation de cette mesure conjointement à la prolifération cellulaire est un outil supplémentaire qui permet de caractériser l'état de la culture.

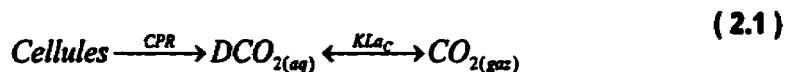
### **2.2.2 Étude de l'effet des gaz sur les cultures en suspension**

L'étude de la culture de cellules végétales n'est pas simple. Plusieurs facteurs sont impliqués et la dissociation de leurs effets n'est pas expérimentalement

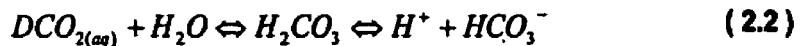
facile à réaliser. L'effet des gaz dissous sur les cultures en suspension ajoute à la difficulté. L'oxygène ( $O_2$ ) est sans doute le gaz dont l'effet est le plus étudié en biotechnologie. Son utilisation par les cellules produit du dioxyde de carbone ( $CO_2$ ). L'étude de l'effet des gaz sur la culture de cellules végétales hétérotrophes en suspensions présente un lot de difficultés.

La première difficulté est liée à la faible solubilité des gaz dissous dans les milieux aqueux. Le taux spécifique d'assimilation de l'oxygène (0.2 mmol g cellules $^{-1}$  h $^{-1}$ ) est du même ordre de grandeur que sa concentration de saturation dans l'eau en équilibre avec l'air (0.25 mM). En comparant avec le glucose qui présente un taux d'assimilation spécifique semblable (0.17 mmol g cellules $^{-1}$  h $^{-1}$ ) mais une concentration typique de 167 mM (30 g L $^{-1}$ ) on voit immédiatement la difficulté. Alors qu'il est possible de fournir aux cellules une quantité de glucose suffisante pour plusieurs jours, l'oxygène doit être transféré à la culture de façon continue (Payne et coll., 1990). C'est l'une des raisons pourquoi les flacons utilisés pour la culture de cellules de plantes requièrent une agitation constante.

La seconde difficulté concerne le  $CO_2$  dissous. Les cellules hétérotrophes produisent du  $CO_2$  qu'elles larguent dans le milieu de culture où il est présent sous forme aqueuse à une concentration notée  $DCO_2$  qui participe au transfert liquide - gaz.



Le DCO<sub>2</sub> est au centre d'une série de réactions réversibles en milieu aqueux, dont le schème réactionnel, pour des pH inférieurs à 10, peut être simplifié à :



Ces réactions atteignent l'équilibre en quelques minutes (Stumm et Morgan, 1996). Par contre, même si l'équilibre peut être considéré, cet équilibre n'est pas statique et peut être déplacé de la droite vers la gauche quand le pH est modifié.

### 2.2.3 Étude de l'effet des gaz en flacons agités

Le flacon agité est un système de choix pour l'étude de plusieurs composants des milieux de culture. Il permet d'effectuer des expériences en utilisant le même inoculum, éliminant ainsi la variabilité associée à ce facteur (Payne et coll., 1990). Il est possible de modifier l'apport d'oxygène en changeant la vitesse d'agitation (Snape et coll. 1989) ou en variant le niveau de liquide dans le flacon (Gao et coll., 1992, Aubry, 1995, Pépin, 1996) ce qui a pour effet de diminuer à la fois la surface de transfert, et l'agitation. Par contre, ces

techniques jouent sur le taux de transfert d'oxygène (OTR), équation ( 2.3 ) en modifiant le coefficient de transfert de l'oxygène ( $KLa_o^a$ ) du système.

$$OTR = KLa_o(C^* - DO) \quad (2.3)$$

On considère que la concentration du gaz à l'interface gazeux ne change pas (le taux de transfert est trop faible pour affecter la concentration dans la tête du flacon), ce qui fait que la concentration de saturation ( $C^*$ ) ne change donc pas avec le changement d'OTR. Ainsi, pour un taux d'assimilation d'oxygène (OUR) de la culture, un changement d'OTR a un impact direct sur l'oxygène dissous (DO).

On peut calculer la DO en appliquant l'équation ( 2.4 ) si on en connaît tous les termes.

$$DO = C^* - \frac{OUR}{KLa_o} \quad (2.4)$$

Kozma et coll. (1996) présentent une méthode pour l'estimation de la DO dans un flacon agité à partir de mesures hors ligne d'OUR. Couplé à un estimé du

<sup>a</sup> Plusieurs notations sont utilisées dans la littérature pour désigner les coefficients de transfert de masse. Selon McCabe et coll., (1993)  $KLa$  désigne le coefficient de transfert de masse du côté liquide du film et la force motrice qui doit y être associée est une différence de concentration volumétrique basée sur les concentrations globale (et non à l'interface comme pour  $kLa$ ).

$KLa_O$  mesuré dans l'eau et à un estimé du C\* en fonction du milieu utilisé (Kapelli 1981) ils appliquent l'équation ( 2.4 ). D'une manière analogue, Snape et coll. estiment que pour des vitesses d'agitation inférieures à 120 rpm, la demande en oxygène des cellules est légèrement supérieure au taux de transfert maximal (avec DO nulle) de la culture. On peut en déduire que pour des vitesse d'agitation inférieures à 120 rpm, la DO décroît au cours de la culture jusqu'à une valeur voisine de 0. Avec une agitation de 120 rpm et plus, le transfert est suffisant pour rencontrer la demande en oxygène de la culture affirment-ils. Ils ne peuvent par contre pas rapporter la DO finale (Snape et coll., 1989)

On le comprendra, maintenir des conditions de cultures stériles alors qu'une sonde à DO passe au travers d'un bouchon de coton et que le tout est agité à 120 rpm est quelque peu fastidieux. Néanmoins, de preux chevaliers de la culture de cellules de plantes y sont parvenus. Aubry (1995) rapporte que la DO en flacons agités à 120 rpm et contenant 240 ml de culture passe de 60% de la saturation avec l'air en début de culture à 40% en fin de culture. Pépin (1996) enregistre une DO de 80% aux premières heures de culture et un minimum un peu sous 20%.

Le suivi de l'oxygène dissous en flacon est possible. Son contrôle n'est pas impossible. Par contre, on doit être conscient que les techniques qui jouent sur

l'OTR en modifiant le  $KLa_O$  pour obtenir un effet de DO modifient aussi le coefficient de transfert des autres gaz, notamment le  $CO_2$  et l'éthylène. En effet, dans d'importants travaux sur le contrôle des gaz dissous, Smith et coll. (1990) observent que le rapport  $KLa_c / KLa_O$  (coefficient de transfert du  $CO_2$  / coefficient de transfert de l' $O_2$ ) est autour de 0,8.

$$KLa_c = 0.8KLa_O \quad (2.5)$$

Donc, il n'est pas possible d'isolé l'effet de la DO de l'effet du dioxyde de carbone dissous ( $DCO_2$ ) ou de l'éthylène dissous en modifiant seulement les conditions qui influencent les coefficients de transfert des cultures.

Payne et coll., (1990) décrivent un système permettant de faire varier les concentrations des gaz dans les flacons agités sans modifier le  $KLa$ . L'ajustement de la pression partielle des gaz en tête du flacon permet de maintenir des conditions d'oxygénation où, selon leur estimation, la DO ne descend pas au-dessous de 70%. Par contre, cette concentration ne peut pas être maintenue constante au cours de la culture. De plus, ils concluent que des variations importantes dans le  $DCO_2$  sont à prévoir car les taux de transfert par la surface du liquide dans le flacon agité est, selon eux, de beaucoup trop faible. Ce qui rend le contrôle du  $DCO_2$  dissous en flacon, selon eux, impossible.

Comme on peut le voir, les cultures en flacons permettent d'ouvrir des pistes et d'orienter les recherches mais pour l'étude systématique et simultanée des gaz à des concentrations constantes et connues, il faut avoir recours à un outil plus performant : le bioréacteur.

#### **2.2.4 Études de l'effet des gaz en bioréacteurs**

L'un des bioréacteurs les plus souvent cités en culture de cellules végétales est probablement le bioréacteur de type gazosiphon (*Airlift*). Ce réacteur sans agitateur mécanique provoque l'agitation par entraînement vers le haut du liquide par les bulles qui sont conduites à l'intérieur d'un tube central à l'extérieur duquel le liquide circule vers le bas. Ce bioréacteur offre plusieurs avantages et inconvénients pour la culture de cellules de plantes. Les inconvénients reliés à l'étude des gaz proviennent principalement du fait que l'agitation est produite par l'aération. Une modification du débit d'aération a un effet sur le transfert d'oxygène, mais aussi sur le temps de circulation (Thomas, 1987), le temps de mélange (Ade Bello, 1984), la rétention gazeuse, la turbulence, la taille et la vitesse des bulles (Onken, 1983), le régime d'écoulement (Snape, 1989) et le cisaillement. Tous ces paramètres ont des effets sur les cellules qui ne sont pas clairement définis et qu'on voudrait minimiser mais surtout découpler de l'effet des gaz. Le réacteur gazosiphon n'est donc pas adapté à l'étude des gaz.

Les taux de transfert gaz - liquides des différentes espèces gazeuses présentes dans le milieu de culture sont liés par des coefficients de transfert de masse associés les uns aux autres. On ne peut donc pas dissocier les effets des gaz dissous en variant seulement les conditions dont dépendent les coefficients de transfert. Par ailleurs, comme la DO a un effet sur la croissance des cellules de plantes en suspensions, la production de CO<sub>2</sub> globale est inévitablement altérée, et le DCO<sub>2</sub> le sera certainement lui aussi. Le contrôle indépendant des gaz dissous est donc essentiel à l'étude de leur effet.

Pour le contrôle de l'oxygène dissous, les sondes polarographiques stérilisables pour mesurer la concentration d'oxygène dissous (DO) sont disponibles sur le marché et utilisées par notre équipe depuis au moins une dizaine d'années. Un contrôleur linéaire (PI) ne permet pas d'obtenir des résultats satisfaisants à cause de la dynamique fortement non-linéaire des cultures (Aubry, 1995). En effet, le coefficient de transfert de masse reste sensiblement constant tout au cours de la culture lorsque les débits d'alimentation en gaz par bullage demeurent constants (Aubry, 1995). Par contre, lorsque le débit de bullage est ajusté au cours de la culture, l'effet sur le KL<sub>aO</sub> dans la culture est présumé être aussi important que celui observé dans l'eau et se reflète sur l'OTR défini à l'équation ( 2.3 ). D'autre part, lors de cultures opérées en cuvée ou en cuvée alimentée la concentration en biomasse varie dans le temps. De plus, le taux

spécifique d'assimilation de l'oxygène ( $q_{O_2}$ ) n'est pas lui non plus une constante (Aubry, 1995, Pépin, 1997). Ainsi, le taux d'assimilation de l'O<sub>2</sub> (OUR), équation ( 2.6 ) varie d'une façon importante dans le temps.

$$OUR = q_{O_2} X \quad ( 2.6 )$$

C'est pourquoi des contrôleurs adaptatifs sont conçus et améliorés depuis les travaux d'Aubry (1995) et Sirois (1997). Les lois de commande sont revues plus en détails au chapitre 5.

Pour le contrôle du DCO<sub>2</sub>, il est primordial de pouvoir mesurer le DCO<sub>2</sub> dans la culture. Or les sondes à DCO<sub>2</sub> disponibles commercialement présentement ne présentent pas des caractéristiques intéressantes pour l'utilisation en culture de cellules de plantes car soit elles ne sont pas stérilisables, soit elles ne sont pas assez précise (Royce et coll., 1991). La compagnie Ingold a déjà commercialisé une sonde stérilisable et étalonnable en ligne. Cette sonde potentiométrique était constituée d'une électrode à pH immergée dans un électrolyte séparé du milieu de culture par une membrane perméable au CO<sub>2</sub>. Le CO<sub>2</sub> réagi dans l'eau et provoque un changement de pH (Payne et coll., 1990). Une seconde génération de sonde possédait en plus des compartiments pour l'injection de tampons de calibration en cours de culture de façon stérile. Les problèmes engendrés étaient tels qu'elle n'est désormais plus disponible. D'autres outils permettent d'évaluer le DCO<sub>2</sub>. Des sondes de type cathéter sont utilisées pour

mesurer les signes vitaux (notamment DO, DCO<sub>2</sub>, pH) des patients lors d'interventions chirurgicales (Meruva et coll., 1997). Ces instruments sophistiqués requièrent l'utilisation d'instruments de mesure d'impédance (un appareil extrêmement coûteux). Ils reposent sur le même principe du changement de pH et subissent donc une dérive importante dans le temps ce qui requiert un étalonnage à chaque mesure. D'autre part, l'utilisation d'un tube de silicone reposant dans le milieu de culture permet de recueillir par diffusion le CO<sub>2</sub> dissous de la culture (Dahod, 1993). La composition en CO<sub>2</sub> du gaz de sortie du tube (transportée par un gaz porteur) est proportionnelle au DCO<sub>2</sub> de la culture. Par contre, l'auteur a du utiliser plus de 15 mètres de tubulure pour parvenir à transférer assez de gaz et avoir une lecture fiable. Cette méthode ne peut être utilisée sur des bioréacteurs de petite échelle.

Comme les instruments de mesure en ligne sont déficients, l'option envisagée est le développement d'un modèle pour estimer en ligne le DCO<sub>2</sub>. Le dioxyde de carbone dissous participe à un procédé de transfert similaire à celui de l'oxygène à l'équation ( 2.3 ) avec le CO<sub>2</sub> gazeux dont la concentration à l'équilibre est définie CO<sub>2</sub>\*. Le taux de transfert du CO<sub>2</sub> (CTR) est défini à l'équation ( 2.7 ).

$$\text{CTR} = KLa_c(DCO_2 - CO_2^*) \quad (2.7)$$

La convention utilisée pour la DO concernant l'expression des concentrations est aussi utilisée pour le DCO<sub>2</sub>, à la différence que le 100% de DCO<sub>2</sub> fait référence à la concentration de CO<sub>2</sub> dissous en équilibre avec du CO<sub>2</sub> pur, soit 33.9 mM et non le CO<sub>2</sub> présent dans l'air (0.035%).

Le taux de production du CO<sub>2</sub> (CPR) par la culture est généralement estimé directement à l'aide du CTR. L'équilibre des réactions dans lesquelles est impliqué le DCO<sub>2</sub> est influencé par les changements brusques de pH. Comme l'ajout de nutriments, notamment l'ammonium, provoque une chute de pH appréciable, l'estimation du taux de production du CO<sub>2</sub> basée sur le taux de transfert de CO<sub>2</sub> est momentanément faussée comme le démontre Royce (1992). Ce biais momentané est généralement négligé dans l'estimation du DCO<sub>2</sub>.

Aubry (1995) développe un modèle pour l'estimation du DCO<sub>2</sub> lorsque l'aération du bioréacteur est assurée par la surface seulement. Le bilan de masse sur le CO<sub>2</sub> dans la phase liquide parfaitement agitée est décrit par l'équation (2.8).

$$\frac{dDCO_2}{dt} = KLa_c \left[ \frac{p_{CO_2}}{H_c} - DCO_2 \right] + \text{CTR} \quad (2.8)$$

Le modèle utilise le CTR pour estimer le CPR. Le KLa<sub>c</sub> est déterminé à partir de l'équation (2.5). Le terme p<sub>0</sub> représente la pression partielle du CO<sub>2</sub> dans le

gaz en tête du bioréacteur et  $H_c$  la constante d'Henry du CO<sub>2</sub> dans l'eau à 26°C. Si on suppose que la biomasse est en pseudo-équilibre, la dérivée par rapport au temps est négligeable et il est possible d'estimer le DCO<sub>2</sub> grâce à l'équation ( 2.9 ) (Aubry, 1995).

$$DCO_2 = \frac{p_{CO_2}}{H_c} + \frac{CTR}{KL_a c} \quad (2.9)$$

Garnier et coll., (1996) présentent un modèle pour estimer le DCO<sub>2</sub> dans des cultures de cellules d'insectes où le débit de bullage est maintenu au minimum pour éviter la formation de mousse. Le modèle néglige d'ailleurs le transfert de ce débit de bullage. L'équation ( 2.10 ), peut être obtenue de l'équation ( 2.9 ).

$$p_{CO_2,L} = q_{CO_2} X \left( \frac{V_L RT}{Q_H} + \frac{1}{KL_a c H_c} \right) \quad (2.10)$$

Dans la nomenclature utilisée par Garnier,  $p_{CO_2,L}$  représente le DCO<sub>2</sub>, le taux spécifique de production de CO<sub>2</sub> ( $q_{CO_2}$ ) multiplié par la biomasse (X) égale le CTR déjà défini,  $V_L$  est le volume de culture, R est la constante des gaz parfaits, T la température et enfin  $Q_H$  le débit gazeux en tête du bioréacteur.

L'estimation du DCO<sub>2</sub> quand l'aération par bullage ne peut pas être négligée est une tâche plus ardue. En reliant les bilans sur les phases liquides et gazeuses dans le bioréacteur, Aubry (1995) développe un modèle complexe pour estimer le DCO<sub>2</sub> dans les conditions précises qu'il utilise lors de ses travaux. Une fraction du gaz d'alimentation est alimenté à la tête du bioréacteur diluant le gaz

plus concentré en CO<sub>2</sub> qui provient des bulles. Les deux concentrations en CO<sub>2</sub> requièrent chacune leur coefficient de transfert (KLas pour le transfert par la surface et KLab pour le transfert des bulles). L'équation ( 2.11 ) représente le bilan de masse de ce procédé de transfert.

$$\frac{dDCO_2}{dt} = KLAs \left[ \frac{p_{CO_2}}{H_c} - DCO_2 \right] + KLab \left[ \frac{p_B}{H_c} - DCO_2 \right] + CTR \quad (2.11)$$

Comme les bulles sont en écoulement de type piston, leur concentration moyenne, i.e. représentative du transfert, se situe quelque part entre la concentration à l'entrée et leur concentration à l'éclatement à la surface du bioréacteur tout en étant au maximum à l'équilibre avec le DCO<sub>2</sub>. En faisant converger les bilans sur la phase liquide et sur la phase gazeuse sous forme de bulles, Aubry estime que la concentration moyenne des bulles est de 85% de la concentration des bulles à l'éclatement. Ce pourcentage est spécifique aux conditions pour lesquelles il a été évalué. Ce modèle, tel qu'utilisé avec une concentration en CO<sub>2</sub> dans l'alimentation négligeable (0.035% ce qui simplifie un terme) est présenté à l'équation ( 2.12 ).

$$DCO_2 = \frac{\left[ KLAs \frac{p_{CO_2}}{H_c} + CTR + 0.85 \frac{KLab}{Q_B H_c} Q_T p_{CO_2} + 0.85 KLab \frac{RT}{Q_B (H_c)^2} KLAs V_L p_{CO_2} \right]}{\left[ KLAs + 0.85 KLab \frac{RT}{Q_B H_c} KLAs V_L + KLab \right]} \quad (2.12)$$

Les termes Q<sub>B</sub> et Q<sub>T</sub> représentent respectivement les débits de gaz par bullage et totaux. L'équipement disponible lors des travaux de l'auteur (Aubry, 1995) n'a

pas permis de valider le modèle qui n'a pu être utilisé qu'à titre indicatif sur le procédé (Sirois, 1997). D'autres modèles pour l'estimation du DCO<sub>2</sub> en cultures de cellules ont été publiés.

Dahod (1993) suppose une rétention gazeuse, (H) définie à l'équation ( 2.13 ), de 20% pour ses applications (deux cultures industrielles de *Streptomyces* à des viscosités de 2000-3000 cps pour l'une et de 100 cps pour l'autre) dans un réacteur de 600L opéré à 0.5 – 1.0 VVM.

$$H = \frac{\text{volume des bulles}}{\text{volume de culture}} = \frac{V_b}{V_t} \quad (2.13)$$

Puis, il utilise une moyenne logarithmique pour calculer la force motrice moyenne du transfert entre les bulles et la phase liquide. Ayant mesuré le DCO<sub>2</sub> avec un tube de silicone, il calcule le KL<sub>aC</sub> à rebours. Connaissant le KL<sub>aO</sub> il obtient des rapports KL<sub>aC</sub> / KL<sub>aO</sub> de 0.6 pour la fermentation à haute viscosité et de 0.33 pour la fermentation à faible viscosité. Il conclue que, pour une même fermentation, le rapport KL<sub>aC</sub> / KL<sub>aO</sub> est une constante mais qu'elle doit être calculée pour chaque fermentation. D'un autre côté, l'utilisation d'une rétention gazeuse constante de 20% pour une plage d'aération de 0.5 à 1.0 VVM (ce qui représente dans son cas de 300 à 600 L min<sup>-1</sup>) n'est pas valable. Il est probable que les disparités entre les rapports KL<sub>aC</sub> / KL<sub>aO</sub> proviennent de l'évaluation arbitraire de la rétention gazeuse et de l'effet de la viscosité sur celle-ci.

Royce et coll., (1991) utilisent les bilans globaux sur l'O<sub>2</sub> et sur le CO<sub>2</sub> afin d'estimer le DCO<sub>2</sub>. Ils mesurent les taux de transfert d'O<sub>2</sub> et de CO<sub>2</sub> par bilans globaux autour du bioréacteur tels que définis aux équations ( 2.14 ) et ( 2.15 ).

$$\text{OTR} = \frac{\left[ \frac{(O_2\text{in} - O_2\text{out}) Q_T}{100 RT} \right]}{V_L} \quad (2.14)$$

$$\text{CTR} = \frac{\left[ \frac{(CO_2\text{out} - CO_2\text{in}) Q_T}{100 RT} \right]}{V_L} \quad (2.15)$$

Ils supposent que les taux d'assimilation d'O<sub>2</sub> (OUR) et de production de CO<sub>2</sub> (CPR) sont égaux à leur taux de transfert respectifs et que le quotient respiratoire (RQ), tel que défini à l'équation ( 2.16 ) est égal à un.

$$RQ = \frac{CPR}{OUR} \quad (2.16)$$

Ils obtiennent ainsi le modèle exprimé à l'équation ( 2.17 ).

$$DCO_2 = \frac{p_{CO_2}}{H_c} + \frac{p_{CO_2} Q_T (1-H)}{60 V_L R T_0 K L_a c} \left( \frac{P_0}{P - p_w} \right) \left( \frac{CO_2\text{out} \frac{N_2\text{in}}{N_2\text{out}} - CO_2\text{in}}{CO_2\text{out}} \right) \quad (2.17)$$

Les termes T<sub>0</sub> et P<sub>0</sub> sont la température et la pression standard, alors que P et p<sub>w</sub> sont la pression d'opération du bioréacteur et la pression partielle de l'eau dans le gaz de sortie. Enfin, CO<sub>2</sub>out, CO<sub>2</sub>in sont les pourcentages de CO<sub>2</sub> dans le gaz de sortie et d'entrée. De la même façon, N<sub>2</sub>in et N<sub>2</sub>out sont les

pourcentages d'azote. En supposant que la rétention gazeuse ( $H$ ) est généralement inférieure à 10% et que la pression partielle de l'eau dans le gaz de sortie ( $p_w$ ) est normalement autour de 5%, ils annulent ces deux termes. Le dernier terme peut lui aussi être laissé de côté car sa valeur est très près de l'unité. Le modèle simplifié est présenté à l'équation ( 2.18 ).

$$DCO_2 = \frac{P_{CO_2}}{H_c} + \frac{P_{CO_2} Q_r}{V_t 60 R T_0 K L a_c} \frac{P_0}{P} \quad (2.18)$$

L'hypothèse selon laquelle la rétention gazeuse peut être simplifiée avec la pression partielle de la vapeur d'eau dans le gaz de sortie n'est pas vérifiée. Une rétention gazeuse de l'ordre de 10% est d'ailleurs de beaucoup supérieure à ce qui est observable dans un bioréacteur opéré avec une alimentation gazeuse de 0.05 VVM.

Il apparaît donc que les modèles d'estimation du DCO<sub>2</sub> publiés sont généralement développés pour des applications et des conditions de culture précises. Dans le cadre du présent projet de recherche, c'est ce qui devra être fait si nous voulons évaluer et contrôler le DCO<sub>2</sub> indépendamment de la DO.

### 2.3 Effet des gaz sur les cultures de cellules végétales

Les études systématiques portant sur les effets des gaz sur les cultures de cellules sont difficiles à réaliser. Ainsi, les résultats présentés dans la littérature

sur les effets des gaz sur la culture de cellules végétales en suspension sont parfois contradictoires.

### 2.3.1 Effet de l'oxygène dissous sur les cultures de cellules

Étant l'accepteur final d'électrons dans la phosphorylation oxidative, on s'attend à ce que l'oxygène joue un rôle important dans le cycle énergétique des cellules de plantes (Smith et coll., 1990). En effet, plusieurs études relatent l'effet de l'oxygène dissous sur la production de métabolites secondaires. En culture de bactéries, Flores et coll., (1994) rapportent que la proportion de polymère de haut poids moléculaire de la gomme de xanthane produite par *Xanthomonas campestris* augmente avec la DO jusqu'à l'atteinte d'un plateau à 40% de DO. Pour leur part, Suphantharika et coll., (1995) observent une baisse des rendements de croissance et de production de l'antibiotique difficidine par *Bacillus subtilis* quand la DO n'est pas maintenue constante mais oscille autour du point de consigne de 15% de DO.

En culture de cellules de plantes, Leckie et coll., (1991) rapportent qu'un haut  $KLa_O$  (jusqu'à  $20\text{ h}^{-1}$ ), ce qui entraîne une DO élevée et un  $DCO_2$  faible par rapport à un  $KLa_O$  moins élevé, favorise l'agrégation des cellules, diminue les rendements en biomasse et modifie le patron d'accumulation des alkaloïdes chez *Catharanthus roseus*. D'autre part, dans une série d'articles sur la

production de métabolites secondaires par *Catharanthus roseus* Schlatmann et coll., (1993, 1994, 1995) observent que l'ajmalicine produite est à 100% excrétée dans le milieu de culture lorsque l'aération est élevée à un KLaO de plus de  $12 \text{ h}^{-1}$ . Ils ne peuvent déterminer quel gaz est responsable de cet effet qui n'est pas observé en flacons agités ou quand les gaz sont recirculés dans le bioréacteur (Schlatmann et coll., 1993). Leur second papier explore l'effet de deux concentrations de DO, 15% et 85% sur la production d'ajmalicine. La production est cinq fois plus élevée dans la culture à haute DO mais les profils d'activités enzymatiques ne permettent pas d'expliquer la différence de production entre ces deux cultures. Ils supposent alors que l'oxygène limite la production d'ajmalicine en tant que substrat dans la voie métabolique menant à ce métabolite secondaire (Schlatmann et coll., 1994). Enfin, dans un troisième article, les auteurs démontrent qu'il existe une forte relation entre le taux de production spécifique ( $q_P$ ) d'ajmalicine et la DO. Ils émettent l'hypothèse que la relation entre  $q_P$  et la DO serait une régulation allostérique d'enzymes. Ce type de régulation enzymatique prédit une courbe sigmoïde entre le substrat et l'activité enzymatique. Cette hypothèse n'a cependant pas été prouvée (Schlatmann et coll., 1995).

Kessel et coll., (1977) observent une augmentation de 100 à 200% du niveau d'ATP intracellulaire de tissus de carottes quand la DO est sous le seuil critique de 16%. L'anoxie (DO 0%) provoque par ailleurs une réponse rapide (3h) de

l'activité enzymatique des racines de maïs (Zeng et coll., 1999). Cette réponse aurait pour but la conservation du carbone et de l'ATP. De courtes expositions à l'anoxie (3h) auraient des effets dévastateurs sur la survie des cellules sous des conditions d'anoxie subséquentes (Zeng et coll., 1999). D'autre part, Botrel et coll., (1996) observent une augmentation de 300% de l'activité de la nitrate réductase ainsi qu'une diminution de 300% de l'activité de la nitrite réductase en réponse à l'anoxie chez les racines d'*Hordeum vulgare* (orge). En conséquence, le surplus de nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ) produit est largué dans le milieu de culture de même que 30 à 40% de l'ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) nouvellement formé. Enfin, l'anoxie inhibe partiellement l'assimilation de cet ion, ce qui est expliqué par la diminution du niveau d'ATP des cellules. Celles-ci auraient des problèmes à conserver un gradient de pH et de potentiel au travers de leur membrane.

L'effet de l'approvisionnement en oxygène sur les cellules de tabac modifiées génétiquement a été réalisée par Gao et coll., (1992) en faisant varier le volume de culture de flacons agités ou le taux d'aération de bioréacteurs. Bien qu'ils ne rapportent pas la DO, ils obtiennent de meilleurs taux de croissance ( $\mu$ ) en biomasse ( $0.66 \text{ j}^{-1}$ ), de plus hautes concentrations en biomasse maximum ( $18 \text{ g L}^{-1}$ ), des taux spécifiques supérieurs d'assimilation d'oxygène ( $q_{\text{O}_2}$  de  $0.359 \text{ mmol O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ ), et de glucides ( $2.8 \text{ g j}^{-1}$ ) quand l'apport d'oxygène est augmenté. Ils ne notent pas l'obtention d'un plateau à l'augmentation de ces variables alors que l'apport d'oxygène est augmenté. Comme ils utilisent de

l'air, leur étude se limite à la plage de DO inférieure à 100% (en flacons agités contenant des niveaux de liquide variés ou à des taux d'aération différents en bioréacteurs). De plus, la variation du niveau de liquide dans un flacon agité modifie aussi le mélange. Cet effet n'est pas dissocié de l'effet de l'apport d'oxygène.

En augmentant la vitesse d'agitation de flacons agités, Snape et coll., (1989) arrivent à observer trois zones d'effets de l'approvisionnement en O<sub>2</sub> sur *Catharanthus roseus*. D'abord, il est un apport d'oxygène critique au-dessous duquel la croissance n'est pas possible. À partir de 50 rpm, le taux de transfert est suffisant pour que la culture survive sans pouvoir croître. Au-dessus de ce point, le taux de croissance augmente avec l'apport d'O<sub>2</sub> jusqu'au taux de croissance (non spécifique) maximum atteint (15 g de biomasse humide par jour). L'étude ne rapporte pas de mesure de DO mais se limite à la plage inférieure à 100%.

Archambault et coll. (1994), obtiennent un taux de croissance maximal à une DO de 90% avec des cellules de *Catharanthus roseus* immobilisées. Ils suggèrent qu'une limitation nutritionnelle réduirait le taux de croissance à des DO supérieure à 90%. Pépin (1996), observe un maximum à 60% de DO avec des cellules en suspensions de *Vitis vinifera* cultivés dans un milieu standard. Par contre, afin d'atteindre des DO supérieures à 60%, cet auteure a du

modifier la vitesse d'agitation dans le bioréacteur de 60 rpm à 90 rpm ce qui modifie sensiblement le cisaillement et pourrait expliquer la diminution du taux de croissance à des DO supérieures à 60%. D'ailleurs, le brunissement des cellules à des DO supérieures à 60%, associé par l'auteure à une oxydation des composés phénoliques présents dans le milieu de culture, pourrait être associé à une perte de viabilité des cellules due au cisaillement.

### 2.3.2 Effet du dioxyde de carbone sur les plantes

Le niveau de dioxyde de carbone a des effets sur la croissance des plantes entières comme le coton (Rufty et coll., 1994) et sur les produits de fixation des cellules autotrophes qui l'utilisent comme substrat (Horn et coll., 1994). De plus, le niveau de CO<sub>2</sub> dissous dans le milieu de culture influence le taux de fixation du CO<sub>2</sub> des cellules non autotrophes (Maurel et coll., 1986). La culture de cellules de *Catharanthus roseus* en flacon agités dans une atmosphère enrichie de 2% de CO<sub>2</sub> augmente le taux de croissance spécifique de 0.016 h<sup>-1</sup> dans l'air à 0.026 h<sup>-1</sup> (Maurel et coll., 1986).

D'autre part, l'ajout de 2% de CO<sub>2</sub> au gaz d'alimentation d'un bioréacteur de 20 L de cellules de *Catharanthus roseus* immobilisées permet d'augmenter le taux de croissance spécifique à 0.24 j<sup>-1</sup> par rapport à 0.2 j<sup>-1</sup> avec l'air (Archambault, 1991). Par contre, avec l'ajout de 5% de CO<sub>2</sub> au gaz d'alimentation le taux de

croissance spécifique chute à  $0.11 \text{ j}^{-1}$  et une perte de la viabilité des cellules est observée.

L'évaluation du niveau de  $\text{CO}_2$  dissous dans le milieu de culture n'est pas facile. Les modèles d'estimation du  $\text{DCO}_2$  présentés à la section 2.2.4 supposent que le pH et la biomasse sont en pseudo-équilibre, i.e. que le taux de changement du pH et du CPR sont très faibles et peuvent être négligés. Or, même si cela est vrai, la plupart du temps du moins, les réactions impliquant le  $\text{DCO}_2$  maintiennent une concentration non négligeable de  $\text{HCO}_3^-$  dans le milieu de culture. Celle-ci peut être calculée grâce à l'équation ( 2.19 ) (Royce et coll., 1991).

$$[\text{HCO}_3^-] = \frac{K_{\text{ac}}^*}{10^{-\text{pH}}} \text{DCO}_2 \quad (2.19)$$

La pseuso constante de dissociation du dioxyde de carbone  $K_{\text{ac}}^*$  a une valeur de  $4.7 \times 10^{-4} \text{ mol m}^{-3}$  (Arnua et coll., 1990). Le dioxyde de carbone dissous peut réagir et former du  $\text{H}_2\text{CO}_3$  dans l'eau. La concentration de  $\text{H}_2\text{CO}_3$  est négligeable à des pH supérieurs à 4 (Stumm et Morgan, 1996). Ainsi, les effets du  $\text{DCO}_2$  sont liés aux effets du  $\text{HCO}_3^-$  et peuvent difficilement en être dissociés.

Quoiqu'il en soit, des études attribuent la diminution de la croissance observée dans les cultures en suspensions de *Catharanthus roseus* à haut taux

d'aération au dégazage du CO<sub>2</sub> (Hegarty et coll., 1986, Ducos et coll., 1986). Cette observation semble supportée par l'étude d'Archambault (1991) sur des cellules immobilisées de *Catharanthus roseus* qui obtient une production de biomasse supérieure en ajoutant 2% de CO<sub>2</sub> dans le gaz d'alimentation du bioréacteur par rapport à l'alimentation en gaz de 0% ou de 5% de CO<sub>2</sub>. Par contre, Kim et coll., (1991) n'observent aucun effet du CO<sub>2</sub> sur la croissance de *Thalictrum rugosum*. Ils observent cependant une production de berberine (un métabolite secondaire) améliorée du double quand ils ajoutent 2% de CO<sub>2</sub> à l'alimentation gazeuse du bioréacteur.

### 2.3.3 Effet de l'éthylène sur les cellules végétales

L'éthylène est une hormone végétale unique car elle est gazeuse. C'est un hydrocarbone simple (CH<sub>2</sub>=CH<sub>2</sub>) qui affecte la croissance, la différentiation et le vieillissement naturel des cellules de plantes (Kumar et coll., 1998). Sa production est d'ailleurs dix fois plus élevée durant la différentiation des tissus de la plante *Heliconia psittacorum* que durant la prolifération des calis non différenciés (Kumar et coll., 1996). Une limitation en glucose provoquerait aussi une augmentation subite de la production d'éthylène dans les cultures en suspension de cellules de carottes. De plus, ajoutée de façon exogène, l'hormone provoquerait la même réponse, i.e. l'activation d'enzymes participant au catabolisme de phospholipides (PLD) que le manque de glucose. Ce qui

laisse croire que l'éthylène est impliquée dans la transduction du signal entre le manque de glucose et l'activation des PLD (Lee et coll., 1998).

Les études portant sur les effets de l'éthylène sont généralement réalisés en utilisant des modulateurs chimiques de ce gaz (Cho et coll., 1988, Shibli et coll., 1997). C'est pourquoi il faut prendre garde à l'interprétation des résultats (Kumar et coll., 1998). Dans leur étude sur la croissance de *Thalictrum rugosum* et sa production d'alkaloïdes, Kim et coll., (1991) utilisent un supplément gazeux dans un bioréacteur. Ayant mesuré des concentrations de 21 ppm en flacons agités, ils alimentent le bioréacteur avec un gaz à cette concentration d'éthylène. Ils n'observent aucun effet sur la croissance. Par contre, la production d'alkaloïdes est augmentée de près de 50%.

En résumé, l'étude de l'effet des gaz dissous sur les cultures de cellules de plantes en suspension souffre de plusieurs lacunes. D'abord, le contrôle indépendant des gaz dissous n'est pas possible en flacons agités. Malgré cela, le nombre d'articles sur l'étude des gaz dissous en bioréacteur reste peu élevé. De plus, les études publiées se consacrent généralement à déterminer l'effet d'un seul gaz dissous. Dans plusieurs cas, même si l'oxygène dissous est contrôlé, le dioxyde de carbone n'est pas évalué et varie fortement au cours des cultures. L'étude systématique de l'effet des gaz dissous requière le suivi et le contrôle indépendant des gaz dissous. Dans cet optique, le développement d'un

modèle pour l'estimation du DCO<sub>2</sub>, le développement d'une stratégie de contrôle indépendant des gaz dissous et l'application de techniques de commandes adaptatives permettent l'étude des gaz dissous d'une façon indépendante et novatrice.

### 3.0 OBJECTIFS DU PROJET DE RECHERCHE

Le dessein général du projet de recherche est de déterminer l'effet de l'oxygène dissous et du dioxyde de carbone dissous sur la croissance des cultures de cellules en suspensions d'*Eschscholtzia californica*.

En premier lieu, il est nécessaire d'établir des méthodes et un système de culture qui permette l'étude des gaz tout en comportant le moins d'effets variables autres que ceux étudiés. Notamment, les effets de la variation de la qualité de l'inoculum et des nutriments intracellulaires qui provienne de l'inoculum ainsi que l'effet de « l'évolution » de cet inoculum doivent être minimisés. De plus, les conditions de stress hydrodynamique doivent être maintenues constantes. Enfin, comme on s'attend à ce que les rendements de la croissance par rapport aux nutriments ( $Y_{XN}$ ) varient en fonction des concentrations gazeuses, ces nutriments doivent être fournis aux cultures de façon à ne pas limiter ou ralentir la croissance.

En second lieu, les travaux de cette étude doivent être réalisés dans un bioréacteur offrant un environnement uniforme et une instrumentation sophistiquée, incluant des instruments permettant le suivi et le contrôle indépendant de l'oxygène dissous et du dioxyde de carbone dissous. La DO est mesuré à l'aide d'une sonde polarographique fiable et un contrôleur adaptatif

permet de maintenir des DO stables et constantes tout au long des cultures. Comme un instrument équivalent n'est pas disponible pour mesurer le DCO<sub>2</sub>, un modèle d'estimation du DCO<sub>2</sub> est développé et validé. Enfin, un contrôleur adaptatif est appliqué au contrôle du DCO<sub>2</sub>. Malheureusement, comme des mesures d'éthylène ne sont pas possibles avec l'équipement du laboratoire, ce gaz n'est pas suivi. Comme Kim et coll. 1991, rapportent que son effet est négligeable sur la croissance des cellules en suspension, l'effet de ce gaz n'est pas considéré dans la présente étude.

Finalement, l'étude de l'effet des deux principaux gaz dissous sur les cultures de cellules végétales en suspension sera réalisée d'une façon systématique et indépendante l'un de l'autre en effectuant des cultures où la concentration d'un gaz dissous est maintenue constante alors que la concentration de l'autre est contrôlée à différents niveaux, découplant ainsi les effets.

## 4.0 MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 4.1 Lignée cellulaire et maintien

La lignée cellulaire EC6 de l'espèce *Eschscholtzia californica* utilisée lors de ce projet de recherche a été développée et stabilisée par le Dr. Robert Williams du Centre de recherche en ingénierie des bioprocédés BIOPRO de l'École Polytechnique de Montréal. Les suspensions sont cultivées dans du milieu B5 (Gamborg et coll., 1968) auquel sont ajoutés  $0.2 \text{ mg L}^{-1}$  d'acide 2,4-dichlorophenoxyacétique (2,4-D),  $0.1 \text{ mg L}^{-1}$  de kinétine,  $30 \text{ g L}^{-1}$  de glucose et  $5 \text{ mM}$  de citrate d'ammonium,  $(\text{NH}_4)_2\text{HC}_6\text{H}_5\text{O}_7$ . Ces concentrations sont relatives au volume de culture final. L'annexe A présente la composition du milieu utilisé. Le pH est ajusté à 5.5 à l'aide d'une solution aqueuse de KOH 1N avant d'être stérilisé (20 min à  $121^\circ\text{C}$ , 1 bar).

Les suspensions sont maintenues en flacons de 500 ml contenant 240 ml de culture agités à 120 rpm à l'aide d'un agitateur orbital en présence de lumière continue à température contrôlée à  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ . Ces flacons sont fermés d'un bouchon de coton qui obstrue le passage aux micro-organismes de l'air tout en permettant à l'oxygène de diffuser à environ 80% de sa diffusion dans l'air (Henzler et coll., 1991). Les repiquages sont réalisés à tous les 5 à 8 jours lorsque le volume de cellules sédimentées (SCV) est de 50 à 75%. La

proportion de l'inoculum par rapport au volume de culture total varie de 25 à 40%. Ces variations sont nécessaires afin d'ajuster la concentration de l'inoculum servant aux cultures en bioréacteurs au moment voulu pour démarrer une expérience.

#### 4.2 Description du bioréacteur

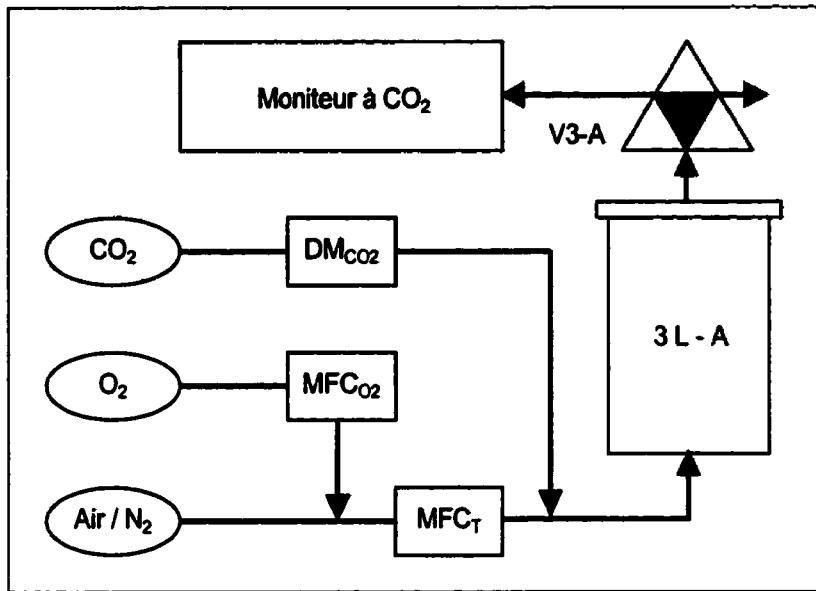
Le bioréacteur utilisé lors des travaux de ce projet a été conçu par les ingénieurs de Phytobiotech Inc. La technologie est inspirée de la conception d'un bioréacteur de 11 L agité à l'aide d'une hélice à double rubans hélicoïdaux (Jolicoeur et coll., en 1992).

Il est constitué d'un réservoir en verre d'un volume nominal de 3 L et d'un joint de caoutchouc sur lequel se fixe un couvercle d'acier inoxydable (SS-316) usiné de façon à recevoir les raccords servant à la sonde à DO ainsi que les tubes d'entrée et sortie de fluides. L'aération est faite par bullage au travers d'un filtre d'acier poreux placé au fond au centre du bioréacteur. L'hélice double a été remplacée par une hélice simple qui offre sensiblement la même efficacité de mélange (Sifi, 1999) pour un taux de cisaillement vraisemblablement inférieur. Le rapport hauteur/diamètre (H/D) a été augmenté de 1 à 2, dans le but d'obtenir un meilleur échange gazeux.

L'agitation, ajustée à 60 rpm pour toute la durée de toutes les cultures, est assurée par un moteur équipé d'un rhéostat. La température est maintenue à 26  $\pm 1^{\circ}\text{C}$  pour l'ensemble des cultures effectuées.

La concentration en oxygène dissous (DO) est mesurée à l'aide d'une sonde polarographique stérilisable de marque Ingold. L'étalonnage est effectué dans l'eau saturée d'azote (0% d'oxygène dissous) et à l'air (100% d'oxygène dissous) avant la stérilisation. La sonde permet ainsi de mesurer, par extrapolation, jusqu'à 476% d'oxygène dissous, soit la concentration maximale avec de l'oxygène pur à pression atmosphérique. La relation entre la DO et le signal est linéaire sur toute la plage (Aubry, 1995).

L'alimentation des gaz est suivie et contrôlée grâce à des débitmètres massiques contrôleurs (MFC) de marque Tylan General. Un rotamètre manuel (DM) est aussi utilisé pour ajouter du CO<sub>2</sub> lors de certaines cultures. Le système d'alimentation des gaz est illustré à la figure ci-dessous.



**Figure 4.1 : Système de gaz d'un bioréacteur**

Le rotamètre du  $\text{CO}_2$  est branché à l'alimentation gazeuse du bioréacteur sans passé dans le débitmètre massique contrôleur du débit total ( $MFC_T$ ) car la pression en amont de celui-ci est celle de l'air comprimé (1.3 kPa) ce qui fausse son étalonnage. Les gaz utilisés ( $\text{O}_2$ ,  $\text{N}_2$ , air fourni par le système d'air comprimé de l'École Polytechnique et  $\text{CO}_2$  pur) sont stérilisés par passage dans un filtre de 0.45  $\mu\text{m}$  (Gelman). De même, la sortie des gaz du bioréacteur est équipée du même type de filtre afin d'éviter la contamination par retour des gaz.

Le moniteur à  $\text{CO}_2$  (Rosemount Analytical, modèle 870) analyse les gaz de sortie pour leur composition en gaz carbonique. Un seul moniteur est disponible pour analyser les gaz de sortie de six bioréacteurs. Ainsi, une vanne trois voies (V3-A) est installée pour chacun des bioréacteurs et leurs gaz de sortie sont

analysés à tour de rôle, durant 45 minutes. À chaque changement de bioréacteur, les 15 premières minutes sont utilisées pour purger la ligne et l'appareil de mesure. Comme le taux de transfert de CO<sub>2</sub> (CTR) ne change pas rapidement, une série de 10 lectures espacées chacune de 3 minutes et répétées aux 4.5 h permettent de suivre avec amplement de précision le profil du CTR.

Le bioréacteur est équipé d'un port d'ajout constitué de trois bouteilles contenant des solutions concentrées des nutriments requis.

Deux ports d'échantillonnage permettent de prélever de petits volumes de culture de façon homogène. Le premier est un port standard aménagé dans le verre du récipient de 3 L. Il est muni d'un raccord en verre sur lequel les bouteilles d'échantillonnages de 250 ml peuvent être branchées de façon stérile lors des prélèvements pour analyse.

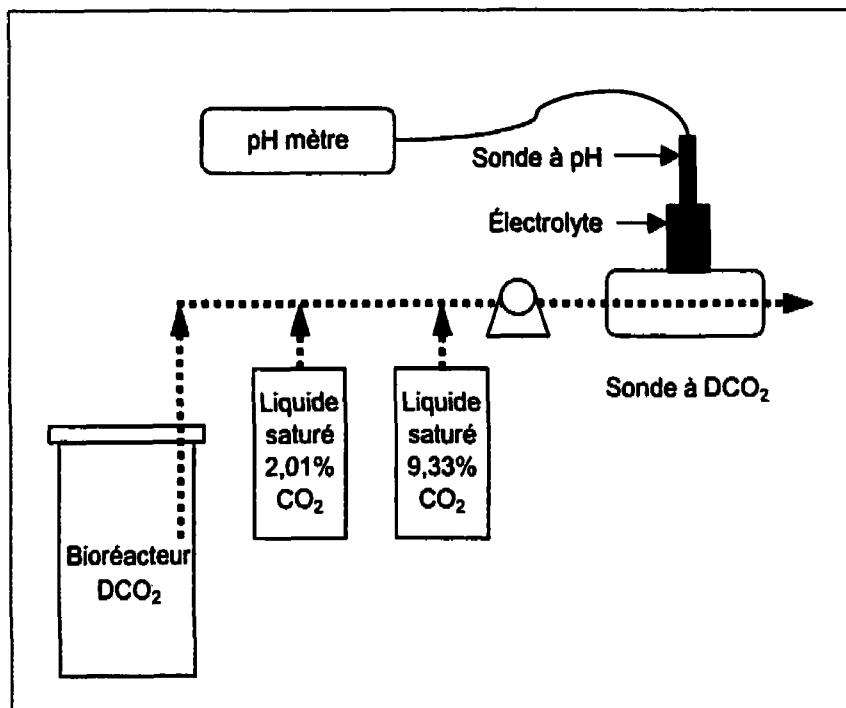
Le second port d'échantillonnage est développé lors de cette étude. Il sert à analyser le dioxyde de carbone dissous (DCO<sub>2</sub>) des cultures en bioréacteur sans exposer l'échantillon à l'air. Ce port est fabriqué d'une tige d'acier inoxydable dont une extrémité entre dans le bioréacteur jusqu'à 15 cm du fond, juste au dessus de l'hélice. La seconde extrémité est fixée à un tube de silicium

stérilisable suffisamment long pour acheminer, grâce à une pompe péristaltique, une partie homogène de la culture au travers d'une sonde à DCO<sub>2</sub>.

Cette sonde (Microelectrodes, Inc.) sert à mesurer la composition en CO<sub>2</sub> et consiste en une micro électrode à pH qui baigne dans un électrolyte (Carbon dioxyde electrolyte, Microelectrodes) séparé de l'échantillon à analyser par une membrane de teflon perméable au CO<sub>2(aq)</sub>. Elle est raccordée à un pH mètre standard (Accumet pH meter model 805-MP, Fisher). Cette sonde est non stérilisable. Le tube qui achemine l'échantillon vers la sonde est stérile et sa longueur ainsi que la pression continue vers l'extérieur du bioréacteur permettent une utilisation dans une plage de risque de contamination acceptable. Le tube utilisé est légèrement perméable aux gaz, c'est pourquoi la longueur des tubes, autant pour pomper l'eau saturée pour la calibration que pour pomper les échantillons de culture, sont tous de la même longueur et le plus court possible. De plus, le débit de pompage a été fixé constant à 30 ml min<sup>-1</sup>. La Figure 4.2 présente le montage réalisé afin de mesurer le DCO<sub>2</sub> des cultures.

Lors de cultures effectuées en flacons agités, le même montage est utilisé pour mesurer le DCO<sub>2</sub> dans ces flacons. Un tube d'acier inoxydable est placé dans le flacon et l'embouchure sellée à l'aide de Parafilm®. Cette opération est effectuée en moins de 3s afin de minimiser l'échange des gaz en tête de flacon.

Un tube flexible fixé à la tige d'acier inoxydable permet de pomper la culture, continuellement agitée lors de l'opération, au travers de la sonde de la même façon que pour une culture en bioréacteur.



**Figure 4.2 : Montage pour étalonner la sonde et mesurer le  $\text{DCO}_2$**

Lors de l'opération de la sonde à  $\text{DCO}_2$ , l'électrolyte est consommé et quoique la différence entre les deux points de calibration (2.01% et 9.33% de  $\text{DCO}_2$ ) demeure sensiblement constante, la mesure est sujette à une lente dérive. Ainsi, le fabricant recommande d'étalonner avec chacun des standards (liquide saturé d'un gaz dont la concentration en  $\text{CO}_2$  est connue) jusqu'à l'obtention de

lectures fiables. Le protocole développé fait appel à un standard de chacune des concentrations avant et après chaque série de mesures effectuées. Ainsi, l'étalonnage repose sur au moins deux mesures à chacun des points. Un exemple de droite d'étalonnage et de mesures effectuées est présenté à la Figure 4.3.

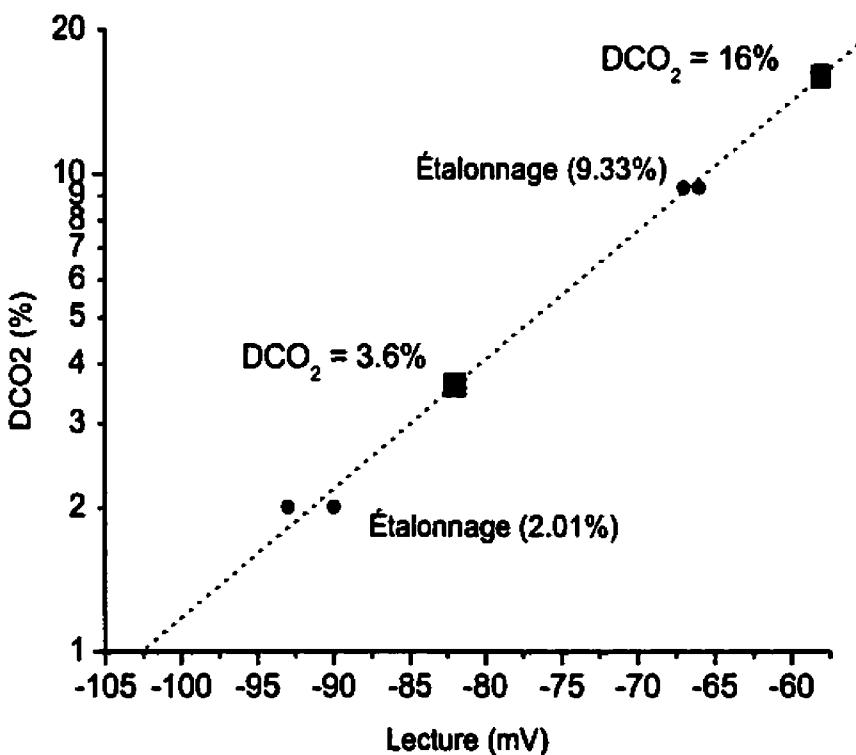


Figure 4.3 : Exemple de droite d'étalonnage de la sonde à DCO<sub>2</sub>

La mesure du DCO<sub>2</sub> des cultures en bioréacteurs permet d'ajuster et de valider le modèle d'estimation du DCO<sub>2</sub>.

### 4.3 Conditions d'opérations

Les cultures ont été faites dans quatre bioréacteurs identiques. La sonde à DO, les MFC et le moniteur à CO<sub>2</sub> sont reliés à un système de commande et d'acquisition de données numérique (Bioexpert) d'une période d'échantillonnage de 10 secondes. Les données provenant d'une culture sont la DO, la concentration en CO<sub>2</sub> des gaz de sortie ainsi que les débits de chacun des MFC qui l'alimentent. Les actions que prennent les contrôleurs se situent au niveau des débits gazeux alimentant le bioréacteur (0 à 225 cc min<sup>-1</sup>). Les autres actions sont exécutés de façon manuelle.

L'inoculum des cultures en bioréacteurs est produit en flacons agités. Chacune des cultures en bioréacteurs est inoculé avec 700 ± 10 cc de suspension cellulaire transférée dans du milieu frais tel que décrit à la section 4.1 quatre jours auparavant. Durant ces quatre jours de croissance en flacons, des échantillons de milieu sont prélevés pour analyse et des ajouts effectués afin qu'en aucun cas la concentration en ions ammonium du milieu ne soit sous 1 mM.

De plus, afin de minimiser les erreurs liées au facteur inoculum, une méthode d'harmonisation des inocula est développée. Trois flacons permettent de

produire 700 cc de suspension cellulaire nécessaire à l'inoculation d'un bioréacteur. Comme il est laborieux de manipuler 4 x 700 cc de suspension cellulaire et d'en prélever des quantités précises de façon homogène, la technique utilisée évite cela. Elle consiste plutôt en l'homogénéisation du double de la quantité requise pour inoculer un bioréacteur. Ainsi 2 x 3 flacons sont mélangés dans un grand flacon. Puis on prélève 700 cc du grand flacon pour inoculer le premier bioréacteur. Ensuite, trois nouveaux flacons sont ajoutés pour obtenir à nouveau le double de la quantité requise dans le grand flacon. Un volume de 700 cc est prélevé pour inoculer un second bioréacteur, et ainsi de suite jusqu'à ce que les quatre bioréacteurs soient inoculés. Le reste de l'inoculum sert à inoculer les flacons témoins (section 4.4). Ainsi, aucun des bioréacteurs ne reçoit des cellules provenant de moins de six flacons, ce qui permet un certain lissage des variations liées à l'inoculum.

Une fois la suspension cellulaire dans le bioréacteur, du milieu de culture est ajouté jusqu'à un volume total de culture de 2.4 L. La composition de ce milieu est la même que celle énoncée à la section 4.1, à l'exception de la concentration initiale de glucose qui est réduite à 20 g L<sup>-1</sup> de culture pour diminuer la formation de mousse observée en début de culture. Ce milieu est stérilisé durant 20 minutes à une température de 121°C et à une pression de 1 bar dans des flacons d'un litre contenant 900 ml de liquide. Les solutions

d'ajouts (ammonium citrate, potassium nitrate et glucose) sont stérilisées de la même façon dans des flacons de 250 ml contenant 200 ml de liquide.

Les cultures en bioréacteur sont toutes réalisées en cuvées alimentées. Chaque jour, un échantillon de la culture est prélevé afin d'exécuter une série d'analyses dont le détail est présenté à la section 4.5. Suite aux résultats de ces analyses un ajout de nutriments est effectué de sorte que les concentrations des constituants suivants soient constamment supérieures à 1 mM : chlore, nitrate, sulfate, sodium, ammonium, potassium, magnésium, calcium et glucose ( $1 \text{ g L}^{-1}$ ). Les ajouts de  $\text{NH}_4^+$  sont effectués à l'aide de solutions d'ammonium citrate. Le citrate ayant un effet tampon sur le pH de la culture lors de l'assimilation du  $\text{NH}_4^+$  il permet d'ajouter de grandes quantités de  $\text{NH}_4^+$  en limitant la baisse du pH.

Les cultures sont ainsi suivies et alimentées de chacun des nutriments de sorte qu'un seul manque nutritionnel survienne, le phosphate. Le phosphate ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) est assimilé et disparaît complètement du milieu de culture d'*Eschscholtzia californica* en 24-36 h. Le suivi en est donc impossible par les méthodes usuelles. C'est pourquoi ce nutriment ne sera pas ajouté. Les cultures sont effectuées avec le  $\text{PO}_4^{3-}$  présent dans le milieu B5 au départ, soit 1.1 mM par litre de culture à l'inoculation. Comme les cellules ont emmagasiné une quantité de phosphate difficile à quantifier au cours du dernier repiquage, il est probable que la croissance maximale varie d'une culture à l'autre. Par contre, les

résultats de Liu et coll., (1997) montrent que le taux de croissance ne varie pas en fonction du phosphate initial. Cette limitation nutritionnelle est la seule qui est appliquée car elle ne conduit pas à une décroissance immédiate de la biomasse. Dans le cas des autres nutriments, excluant l'ammonium, leur disparition du milieu de culture conduit à une décroissance rapide de la biomasse. Comme la viabilité de la culture est maintenue quelques jours après la disparition du phosphate, il est possible de valider le dernier point de croissance. Afin de prouver que le choix de cette limitation nutritionnelle est expérimentalement valable, des flacons témoins sont inoculés avec le même inoculum.

#### 4.4 Cultures témoins en flacons

Afin de s'assurer que la lignée cellulaire utilisée ne change pas de façon significative durant les travaux de ce projet, des cultures en flacon agités sont inoculés avec les mêmes cellules que les bioréacteurs. La température et la vitesse d'agitation sont identiques à celles des flacons destinés au maintien de la lignée, mais le taux d'inoculation est identique à celui des bioréacteurs soit 70 ml de suspension cellulaire homogène pour 240 ml de culture totale complétée avec le même milieu de culture que les bioréacteurs. Les témoins sont échantillonnés et suivis au même moment et selon le même traitement que les bioréacteurs, incluant les ajouts de nutriments et la limitation en phosphate.

## 4.5 Échantillonnage et suivi

Les échantillons des cultures en bioréacteurs et en flacons sont transvidés (~10 ml) d'une façon homogène dans une fiole à scintillation de 20 ml. Un volume de 1.5 ml de culture est filtré (seringue millipore swinnex-25 équipée d'un filtre de 0.45 µM (White Hamp) dans une fiole munie d'un septum en PTFE pour être analysé par chromatographie en phase liquide selon les méthodes décrites à la section 4.6.

Pour effectuer le compte cellulaire, 2 ml de l'échantillon de culture sont prélevés de façon homogène à l'aide d'une micropipette. La procédure pour le compte cellulaire est décrite à l'annexe B.

Le pH de l'échantillon déposé dans la fiole à scintillation de 20 ml est mesuré à l'aide d'un pHmètre (Accumet pHmeter model 805-MP, Fisher). Un volume connu de l'échantillon de culture est filtré (Fiber Glass filter, Gelman) sous vide afin de mesurer les concentrations en biomasse humide et sèche (séchée au four 24 h 80°C) par unité de volume de culture.

## 4.6 Analytique

Les analyses effectuées par chromatographie en phase liquide permettent de mesurer la concentration des ions et du glucose du milieu de culture et d'effectuer les ajouts requis le jour même.

Les cations sont analysés par chromatographie en phase liquide avec un détecteur électrochimique (Dionex) opéré en mode conductivité. La phase mobile est une solution aqueuse d'acide méthanosulfonique (20 mM) alimentée à 0.9 cc min<sup>-1</sup> par une pompe (Dionex). La séparation est effectuée à l'aide d'une colonne 4 x 250 mm (Ionpac CS-12A, Dionex) et d'un suppresseur cationique (CSRS-ultra, Dionex). La commande de la pompe et de l'injecteur automatique (AS3500, Spectra System) ainsi que l'acquisition de données est accomplie par le logiciel Dionex A1-450.

Un détecteur électrochimique opéré en mode conductivité sert à l'analyse des anions par chromatographie en phase liquide. La phase mobile est une solution aqueuse de bicarbonate (35 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> et 1.0 mM NaHCO<sub>3</sub>) alimentée à 1.0 ml min<sup>-1</sup> par une pompe. La séparation a lieu grâce à une colonne 4 x 250 mm (Ionpac AS14, Dionex) et un suppression anionique (ASRS-ultra, Dionex). La commande de la pompe et de l'injecteur automatique ainsi que l'acquisition de données est accomplie par le logiciel PeakNet 5.1 (Dionex).

Les glucides sont analysés par chromatographie en phase liquide par un détecteur à indice de réfraction (7515-A, ERC Inc). La phase mobile est de l'eau déionisée alimentée à  $1.0 \text{ ml min}^{-1}$  par une pompe (modèle 501, Waters). La séparation (saccharose, glucose, fructose) est effectuée à l'aide d'une colonne analytique (HPX87C, Biorad) maintenue à  $80 \pm 3^\circ\text{C}$  par un élément chauffant (7980, ManTech). L'acquisition de données est accomplie par le logiciel PeakNet 5.1 (Dionex).

#### 4.7 Facteurs de corrections

Ces analyses fournissent des concentrations de nutriments qui correspondent à la phase liquide de la culture. Le volume de cellules peut atteindre une proportion non négligeable du volume de culture total. La concentration mesurée par l'appareil ne correspond pas au volume de la culture entière mais au volume de la phase liquide seulement de la culture. Quand vient le temps de calculer des taux d'assimilation ou des rendements, la différence de concentration seule ne suffit plus à décrire la quantité assimilée si le volume de référence (le volume de la phase liquide) est variable. Un facteur de correction doit être appliqué à la concentration des nutriments lors de ces calculs. Si on fait l'hypothèse que la biomasse humide a la même masse volumique que l'eau

( $\rho_{H_2O}$ ) le volume occupé par la biomasse dans la culture ( $V_x$ ) peut être estimé grâce à l'équation ( 4.1 ) où  $X_{MH}$  est la concentration en biomasse humide.

$$V_x = \frac{X_{MH}}{V_L \cdot \rho_{H_2O}} \quad (4.1)$$

Le facteur de correction pour le volume de cellules est calculé en utilisant l'équation ( 4.2 ) (Pépin, 1996).

$$Facteur X_{MH} = 1 - V_x \quad (4.2)$$

Un autre facteur doit être appliqué lors du calcul des taux d'assimilations et des rendements ainsi qu'aux calculs des taux de croissance spécifiques ( $\mu$ ). Ce facteur représente la dilution due aux ajouts de nutriments au cours de la culture. On le calcule grâce à l'équation ( 4.3 ) où  $V_A$  représente le volume de l'ajout.

$$Facteur_{DIL} = 1 + \frac{V_A}{V_L} \quad (4.3)$$

Le taux d'évaporation est négligé car la vapeur d'eau est récupérée par un condenseur qui la renvoie dans la trappe à mousse. Or, le volume de liquide recueilli après 350 h de culture est de l'ordre de la dizaine de ml ce qui est négligeable.

En mode cuvée, le taux d'assimilation d'un nutriment ( $Q_{Ni}$ ) est calculé d'après la variation de la concentration du nutriment  $N_i$  en fonction du temps. Par exemple, le cas du nitrate ( $Q_{NO_3}$ ) pour une culture typique est présenté à la Figure 4.4.

Cette variation peut être exprimée par un polynôme. Dans cet exemple, le taux d'assimilation global de la culture ( $Q_{NO_3}$ ) est la pente de la droite ( $-m_N$ ). De la même façon, la variation de la concentration cellulaire dans le temps est lissée (voir la Figure 4.4). Le taux d'assimilation spécifique d'un nutriment ( $qN_i$ ) par la biomasse est défini à l'équation (4.4) et calculé à l'aide des courbes lissées.

$$qN_i = \frac{Q_{NO_3}}{X_i} \quad (4.4)$$

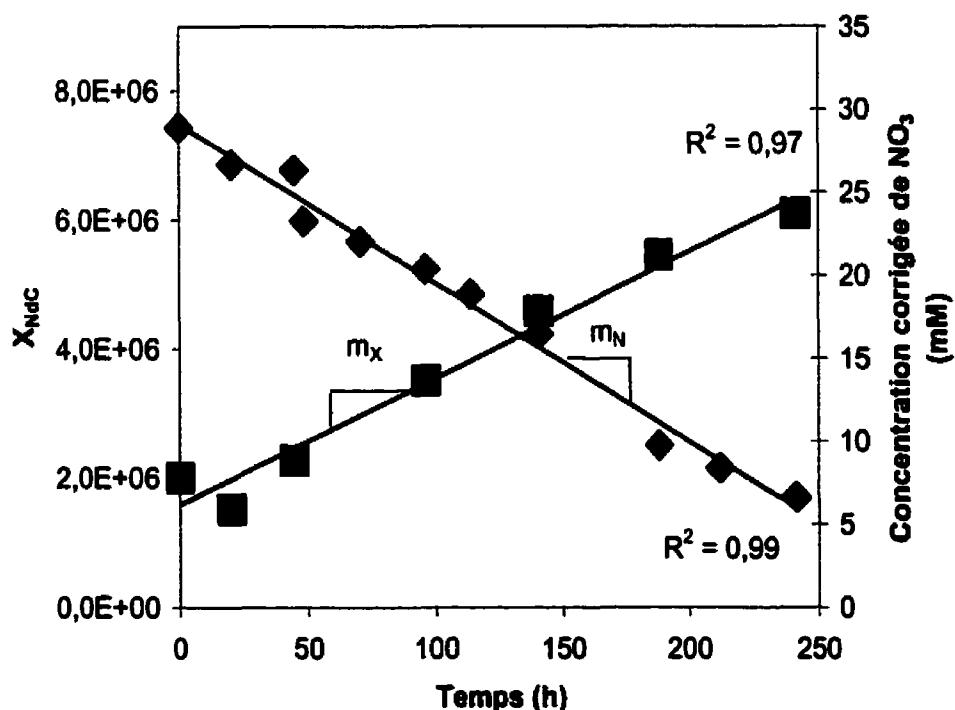


Figure 4.4 : Variation des concentrations en nitrate et en biomasse lors d'une culture typique.

On définit le rendement apparent de la production de biomasse par rapport à un nutriment ( $Y_{xi/Ni}$ ) par la variation de la concentration du nutriment en question par rapport à la production de biomasse, tel que défini par la relation ( 4.5 ).

$$Y_{xi/Ni} = \frac{\text{biomasse produite}}{\text{nutriment assimilé}} \quad ( 4.5 )$$

Le polynôme représentant la concentration en biomasse dans le temps peut être dérivé une fois par rapport au temps pour obtenir le taux d'accroissement instantané de la biomasse ( $m_{xi}$ ). En divisant le taux de production instantané de biomasse par le taux d'assimilation d'un nutriment, on obtient directement le rendement de production de biomasse par rapport à ce nutriment, tel que décrit à l'équation ( 4.6 ).

$$Y_{xi/Ni} = \frac{m_{xi}}{Q_{Ni}} \quad [=] \frac{g_{MS} L^{-1} j^{-1}}{mmol L^{-1} j^{-1}} [=] g_{MS} \text{ mmol}^{-1} \quad ( 4.6 )$$

## 5.0 COMMANDE ET ESTIMATION DE PARAMÈTRES

La revue de la littérature démontre que la concentration en oxygène dissous (DO) a un effet important sur les cultures de cellules de plantes (Archambault et coll., 1994, Pépin, 1996). Le contrôle de la DO permet d'éviter la condition extrême d'anoxie et ses conséquences sur la viabilité des cellules (Zeng et coll., 1999, Botrel et coll., 1996). De plus, comme les variations de DO semblent avoir un effet positif sur la production de métabolites secondaires par des bactéries (Suphantharika et coll., 1995) un bon contrôle de l'oxygène dissous est souhaitable pour la croissance.

Le métabolisme des cellules de plantes est lent ce qui permet de supposer un pseudo-équilibre biologique, i.e. que les taux d'assimilation des nutriments, les taux de production de CO<sub>2</sub> et de biomasse peuvent être considérés constants sur de courtes périodes de temps. Cela permet, si les autres variables du procédé (DO, DCO<sub>2</sub> et pH par exemple) sont constantes, de simplifier les bilans dynamiques car les dérivés par rapport au temps sont nulles.

D'un autre côté, afin d'étudier l'effet de l'environnement gazeux sur les cultures de cellules, le contrôle serré des variables dont l'effet est étudié est primordial. Comme l'oxygène est alimenté en continu au bioréacteur et que le CO<sub>2</sub> en est retiré lui aussi de façon continue, le recours à des techniques de commande

sophistiquées est requis. Dans cet optique, la mesure de variables et l'estimation de paramètres occupent un rôle de premier plan. Ce chapitre présente les techniques de contrôle et d'estimation de paramètres utilisées dans le cadre de ce projet de recherche. La première section est consacrée au contrôle de l'oxygène dissous (DO) et à l'estimation du coefficient de transfert de l'oxygène (KL<sub>O</sub>). La seconde section expose le développement du modèle d'estimation du dioxyde de carbone dissous (DCO<sub>2</sub>). La dernière section présente les performances des contrôleurs de DO et de DCO<sub>2</sub> développés et utilisés et du découplage des boucles de commande.

## 5.1 Commande de l'oxygène dissous

### 5.1.1 Transfert d'oxygène

Le transfert d'oxygène est un procédé de transfert interphase comportant plusieurs résistances en série. La diffusion du côté du film liquide est généralement considérée comme l'étape limitante du transfert entre la phase gazeuse et la phase liquide. Lorsque la phase liquide est parfaitement mélangée, l'équation ( 5.1 ) présente le bilan de l'oxygène sur cette phase.

$$\frac{dDO}{dt} = KL_a_o(C^* - DO) - q_{o_2}X \quad (5.1)$$

Le terme  $KL_a_o(C^* - DO)$  est le taux de transfert d'oxygène (OTR) basé sur la phase liquide tel que présenté à l'équation ( 2.3 ) alors que le second terme est le taux d'assimilation de l'oxygène (OUR) présenté à l'équation ( 2.6 ).

Par un bilan global autour du bioréacteur, il est possible d'établir l'OTR tel que présenté à l'équation ( 2.14 ).

$$OTR = \frac{\left[ \frac{(O_2in - O_2out) Q_T}{100} \right]}{V_L} \quad (2.14)$$

Le bilan sur la phase gazeuse, si elle peut être considérée comme parfaitement mélangée (comme dans le cas d'aération par la tête du bioréacteur seulement), est exprimé à l'équation ( 5.2 ).

$$\frac{dC^*}{dt} = \frac{\left[ \left( O_2in - \left[ \frac{C^*}{10K_{HO}} \right] \right) Q_T \right]}{V_L} - KL_a_o(C^* - DO) \quad (5.2)$$

Le premier terme de droite représente exactement l'OTR de l'équation ( 2.14 ) où la concentration du gaz de sortie du bioréacteur a été remplacée par la concentration à la saturation de ce même gaz dissous ( $C^*$ ) avec les facteurs de conversion requis. Le terme  $K_{HO}$  est analogue à la constante d'Henry pour l'oxygène ( $H_O$ ), mais avec les unités  $M \text{ atm}^{-1}$  ce qui facilite grandement son

utilisation. La définition de Stumm et Morgan (1996) est présentée pour l'espèce A à l'équation ( 5.3 ) et la conversion pour obtenir la constante d'Henry à l'équation ( 5.4 ).

$$\frac{[A(aq)]}{P_A} = K_{HA} \quad (5.3)$$

$$K_{HA} = \frac{H_A}{RT} \quad (5.4)$$

Le second terme à droite de l'équation ( 5.2 ) est le taux de transfert de l'oxygène à la phase liquide évalué par le coefficient de transfert (par opposition au taux de transfert établi par bilan tel qu'à l'équation ( 2.14 )).

Lorsqu'une partie ou toute l'aération est effectuée par bullage, l'hypothèse de mélange parfait ne tient plus que pour le volume de gaz compris entre la surface du liquide et le couvercle du bioréacteur. La fraction de la phase gazeuse qui est sous forme de bulles peut être considérée comme en écoulement piston. Le bilan d'oxygène sur la phase liquide demeure inchangé, mais le bilan sur les bulles est décrit à l'équation ( 5.5 ) (Bailey et Ollis, 1986).

$$\left( \frac{\text{vol. bulles}}{\text{vol. culture}} \right) \left( \frac{\text{vol. culture}}{\text{différentiel}} \right) \left( \frac{\text{taux de perte}}{\text{d'O}_2 \text{ bulle}} \right) = HAdz \frac{dp_O}{dt} \frac{1}{RT} \quad (5.5)$$

Or, ce qui est perdu par la phase gazeuse est transféré à la phase liquide et par bilan sur la phase liquide, le taux de transfert est le terme de gauche de l'équation ( 5.6 ) où z est l'axe vertical et A la surface du réacteur perpendiculaire à cet axe.

$$-KLa_o(C^*-DO)Adz = HA \frac{dp_o}{dz} \frac{1}{RT} \quad (5.6)$$

Grâce à la loi d'Henry et à l'équation ( 5.4 ) on obtient l'équation ( 5.7 ) qui permet de convertir la pression partielle ( $p_o$ ) en concentration à saturation ( $C^*$ ).

$$p_o = H_o C^* = \frac{C^*}{K_{HO}} \quad (5.7)$$

De plus, si on suppose une vitesse ascensionnelle des bulles ( $u_B$ ) constante, la dérivée par rapport au temps peut être remplacée telle qu'à l'équation ( 5.8 ).

$$dt = \frac{dz}{u_B} \quad (5.8)$$

Ainsi, la variation de  $C^*$  en fonction de  $z$  est obtenue en remplaçant les équations ( 5.7 ) et ( 5.8 ) dans l'équation ( 5.6 ) que l'on intègre pour obtenir l'équation ( 5.9 ).

$$\ln\left(\frac{(C^*-DO)|_z}{(C^*-DO)|_{in}}\right) = \frac{-KLa_o K_{HO} RT}{H u_B} z \quad (5.9)$$

Le taux de transfert global pour le volume de culture  $Ah$  est l'intégrale par rapport à  $z$  allant de 0 à  $h$  (Bailey et Ollis, 1986).

$$\int_0^h KLa_o(C^*-DO)(z)Adz = \frac{Hu_B}{K_{HO}RT} (C^*-DO)|_{in} A \left[ 1 - \exp\left(-\frac{KLa_o K_{HO} RTh}{Hu_B}\right) \right] \quad (5.10)$$

Comme on peut le voir, les bilans sur les différentes phases peuvent rapidement devenir complexes. Plusieurs des paramètres de l'équation ( 5.10 ) sont inconnus en condition de culture. Ainsi, seul le bilan sur la phase liquide

est utilisé pour construire la loi de commande qui est présentée à la section suivante.

### 5.1.2 Contrôle d'oxygène dissous

La stratégie de commande utilisée par Aubry (1995) consiste à ajuster la concentration en O<sub>2</sub> du gaz d'alimentation en manipulant directement la concentration d'O<sub>2</sub> participant au transfert (C\*) plutôt que d'agir sur le coefficient de transfert de l'oxygène (K<sub>L</sub>a<sub>0</sub>) en modifiant le taux d'aération ou la vitesse d'agitation. Ainsi, on obtient un environnement plus uniforme. Comme l'a prouvé Aubry (1995), un contrôleur linéaire (PI) ne permet pas d'obtenir des performances de contrôle satisfaisantes. C'est pourquoi, un contrôleur adaptatif est développé (Aubry, 1995) selon la technique de commande adaptive de Bastin et Dochain (1990). Cette technique implique l'utilisation d'une loi de commande linéarisante dans laquelle les paramètres non linéaires sont évalués par des estimateurs adaptatifs s'ajustant de façon automatique au cours de la culture.

Le modèle entre la variable manipulée (C\*) et la variable contrôlée (DO) est le bilan sur l'oxygène dans la phase liquide présenté à l'équation ( 5.1 ). Le modèle linéaire de référence de l'erreur de contrôle figure à l'équation ( 5.11 ) où DO<sub>PC</sub> et λ<sub>1</sub> représentent respectivement le point de consigne de la concentration d'oxygène dissous et le gain du contrôleur.

$$\frac{d(DO_{PC} - DO)}{dt} + \lambda_1(DO_{PC} - DO) \quad (5.11)$$

Comme le point de consigne est constant au cours d'une même culture, on peut réécrire l'équation ( 5.11 ).

$$\frac{dDO}{dt} = \lambda_1(DO_{PC} - DO) \quad (5.12)$$

La loi de commande résultant de la combinaison des équations ( 5.1 ), ( 2.6 ) et ( 5.12 ) est présentée à l'équation ( 5.13 ) où la variable manipulée a été isolée.

$$C^* = \frac{\lambda_1(DO_{SP} - DO) + OUR}{KLao} + DO \quad (5.13)$$

Les estimateurs des paramètres évolutifs dans l'équation ( 5.13 ), OUR et KLao, vont rendre le contrôleur adaptatif si on applique la technique de Bastin et Dochain (1990). La version du contrôleur adaptatif d'oxygène dissous utilisée par Aubry (1995) a recours aux estimateurs présentés aux équations ( 5.14 ) et ( 5.15 ) où  $\gamma_1$  et  $\gamma_2$  sont les gains d'adaptation des estimateurs.

$$\frac{d\overline{OUR}}{dt} = \gamma_1(DO_{PC} - DO) \quad (5.14)$$

$$\frac{d\overline{KLao}}{dt} = -\gamma_2(C^* - DO)(DO_{PC} - DO) \quad (5.15)$$

Les paramètres estimés sont ajoutés à la loi de commande ( 5.13 ) pour former le contrôleur adaptatif. Même si les paramètres estimés au cours de la culture fournissent un contrôle robuste et performant, les valeurs que prennent les estimateurs divergent de la réalité et sont inutilisables pour suivre l'évolution

réelle du taux d'assimilation d'oxygène (OUR) de la culture ou du coefficient de transfert de l'oxygène (KL<sub>a</sub>). Pour contrer le problème, Sirois (1997) utilise le taux de respiration (OUR<sub>p</sub>) mesuré par la technique dynamique (Aubry, 1995) dans son contrôleur adaptatif basé sur le taux de respiration. Ainsi, seul le KL<sub>a</sub> est estimé dans ce contrôleur. Celui-ci n'est pas utilisé dans cette étude car même si le contrôle qui en résulte est plus performant, grâce à une meilleure estimation des paramètres de la loi de commande, le contrôleur est moins robuste. Le changement brusque du paramètre OUR<sub>p</sub>, qui survient en même temps qu'une perturbation importante de la DO suite à la pente effectuée pour obtenir l'OUR<sub>p</sub>, provoque parfois des instabilités prolongées que l'estimateur du KL<sub>a</sub> ne parvient pas à compenser assez rapidement.

D'un autre côté, afin de minimiser la formation de mousse dans les premières heures de culture, Sirois (1997) réduit le débit total (Q<sub>T</sub>) au minimum lors de l'opération des bioréacteurs. Cette action diminue le KL<sub>a</sub> et le contrôleur est alors sujet à saturer, c'est-à-dire que le contrôleur envoie de l'oxygène pur mais la DO demeure inférieure au point de consigne. Sirois contre alors le problème en programmant un algorithme qui ajuste le débit total de façon automatique, en le maintenant loin des limites de saturation du contrôleur. Or, cela crée un autre problème; quand le débit total est augmenté, l'augmentation soudaine du coefficient de transfert d'oxygène provoque une perte de contrôle momentanée. L'estimateur du KL<sub>a</sub> est donc remplacé pour tenir compte des augmentations

du débit total ( $Q_T$ ) par un coefficient d'aération ( $P_Q$ ) multiplié par un coefficient de transfert réduit ( $\alpha$ ) qui lui est estimé de la même manière que  $KLa_0$  avec toutefois un gain d'estimation ( $\gamma_3$ ) réduit. Le coefficient d'aération ( $P_Q$ ) est une estimation du  $KLa_0$  en culture en fonction du débit de bullage. Ainsi, lorsque le débit de bullage est augmenté, le  $P_Q$  augmente et le contrôleur compense immédiatement en ajustant en conséquence le  $C^*$ .

$$KLa_0 = \alpha P_Q \quad (5.16)$$

$$P_Q = 0.75(Q_r)^{0.45} \quad (5.17)$$

$$\frac{d\bar{\alpha}}{dt} = \gamma_3(C^* - DO)(DO_{PC} - DO) \quad (5.18)$$

Enfin, une dernière modification est effectuée pour donner plus de latitude à l'opérateur, l'OUR est laissé comme un paramètre d'ajustement manuel.

$$C^* = \frac{\lambda_1(DO_{PC} - DO) + OUR}{\alpha P_Q} + DO \quad (5.19)$$

Le contrôleur utilisé lors de la présente étude est construit à partir des progrès effectués par Aubry (1995) et Sirois (1997). La loi de commande est à l'équation (5.19) et l'estimateur ( $\alpha$ ) à l'équation (5.18).

### 5.1.3 Estimations du taux d'assimilation et du coefficient de transfert d'O<sub>2</sub>

En se basant sur le principe de la méthode dynamique de Bandyopadhyay et coll. (1967), Aubry (1995) met au point une technique d'estimation en ligne du taux de consommation d'oxygène par les cultures. Pour y parvenir, il coupe l'alimentation gazeuse et réduit l'agitation à 30 RPM réduisant au minimum le coefficient de transfert d'oxygène par la tête du bioréacteur (KL<sub>s</sub>). Quand l'OTR est zéro, les cellules continuent d'utiliser l'oxygène dissous au taux de consommation OUR. En suivant la DO pendant ce temps, il est possible de calculer le taux d'assimilation de l'oxygène, qui est supposé constant sur l'intervalle de temps que dure la perturbation. Ainsi, le bilan d'O<sub>2</sub> sur la phase liquide de l'équation ( 5.1 ) est réduit à l'équation ( 5.20 ).

$$\frac{dDO}{dt} = -q_{O_2} X = -OUR \quad ( 5.20 )$$

Comme le KL<sub>s</sub> à 30 RPM n'est pas complètement nul (0.43 h<sup>-1</sup>), Aubry apporte une correction sous la forme de l'équation ( 5.21 ) où DO' est la DO corrigée et KL<sub>s30</sub> est le coefficient de transfert par la surface à 30 RPM.

$$DO' = \left( DO(t) - \int_0^t KL_{s30} [C^*(t) - DO(t)] dt \right) \quad ( 5.21 )$$

Dans la présente étude, la vitesse d'agitation est maintenue à 60 RPM et le KL<sub>s</sub> utilisé est de 1 h<sup>-1</sup>. La correction apportée est de l'ordre de 10% (résultat non présenté). La pente obtenue de la régression de DO' correspond à l'OUR, le taux d'assimilation d'oxygène (Aubry, 1995). Une fois la DO redevenu stable

au point de consigne, il est possible d'évaluer le coefficient de transfert d'oxygène  $KLa_o$  grâce à l'équation ( 5.1 ). D'une part, la dérivée par rapport au temps est nulle car la DO est en contrôle, et d'autre part on connaît tous les autres termes : la DO est mesurée, le  $C^*$  est calculé à l'aide des débitmètres massiques contrôleurs (MFC) et l'OUR a été obtenu à l'aide de la pente. Si on isole le coefficient de transfert d'oxygène on obtient l'équation ( 5.22 ).

$$KLa_o = \frac{OUR}{(C^* - DO)} \quad (5.22)$$

La méthode utilisée présente l'inconvénient de modifier momentanément la concentration en oxygène dissous. De plus, lors de l'arrêt du bullage, le transfert du  $CO_2$  hors de la culture est arrêté ce qui provoque son accumulation sous forme de  $DCO_2$  suivie d'une désorption durant les minutes qui suivent. Ces variations n'ont pas d'effets positifs connus sur les cellules. De plus, comme il est difficile, voire impossible, de produire des pentes sur des cultures à faible DO (30%, 10%) comme certaines effectuées dans le cadre des présents travaux, d'autres moyens d'évaluer le taux d'assimilation et le coefficient de transfert d' $O_2$  ont été envisagés, sans succès. Sauf indications contraires, les résultats présentés ayant trait aux paramètres OUR et  $KLa_o$  ont donc été obtenus par la méthode de la pente précédemment décrite et adaptée d'Aubry (1995).

## 5.2 Dioxyde de carbone

Dans la littérature, les effets du CO<sub>2</sub> dissous sur la culture de cellules végétales en suspension ne concordent pas toujours. On accorde généralement un effet négatif autant au dégazage du CO<sub>2</sub> qu'à son accumulation à des niveaux trop élevés. Les études rapportées ne présentent cependant pas de données concernant les niveaux de DCO<sub>2</sub> mais décrivent plutôt des conditions de cultures provoquant différents niveaux de CO<sub>2</sub> dissous.

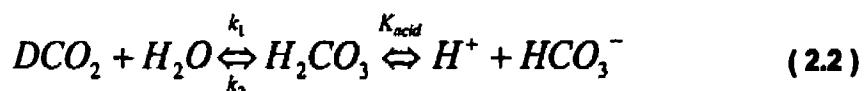
Les modèles publiés pour estimer le CO<sub>2</sub> dissous en culture s'appliquent généralement seulement aux conditions de cultures pour lesquelles ils furent développés. Le développement d'un modèle d'estimation du CO<sub>2</sub> dissous est l'objet de cette section. La section 5.2.1 expose les bases sur lesquelles le modèle s'appuie : la mesure du CO<sub>2</sub> dans les gaz de sortie du bioréacteur et son utilisation pour représenter le taux de production du CO<sub>2</sub>. La section 5.2.2 présente la méthode utilisée pour évaluer la rétention gazeuse du bioréacteur, un paramètre qui sera essentiel au développement du modèle qui est présenté à la section 5.2.3. La validation du modèle et l'élaboration d'une stratégie de contrôle font l'objet des sections 5.2.4 et 5.2.5.

### 5.2.1 Mesure du taux de production du dioxyde de carbone

Par un bilan global autour du bioréacteur, il est possible de calculer le taux de transfert du CO<sub>2</sub> hors du bioréacteur, dans la phase gazeuse tel qu'énoncé à l'équation ( 2.15 ).

$$CTR = \frac{\left[ \frac{(CO_2\text{out} - CO_2\text{in}) Q_T}{100} \right]}{RT} \quad (2.15)$$

Le CTR est généralement utilisé pour estimer le CPR, le taux de production du CO<sub>2</sub> de la culture. Lors de l'opération d'un bioréacteur de culture de cellules végétales en suspension en mode cuvée, les changements de pH sont lents. Il est donc possible de démontrer que l'estimation est valable (Pépin, 1996). Par contre, en mode cuvée alimentée, les ajouts important d'ammonium peuvent modifier rapidement le pH et l'équilibre établi entre les espèces du CO<sub>2</sub> dissous présentés à l'équation ( 2.2 ).



La concentration en acide carbonique H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> est de plus de deux ordre inférieure au DCO<sub>2</sub> (environ 0.3%) (Stumm et Morgan, 1996) et les changements de sa concentration sont négligés dans le bilan sur le dioxyde de carbone. La concentration en H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> peut varier au cours d'une culture et son effet est inconnu sur les cellules végétales. On peut calculer sa concentration grâce à l'équation ( 5.23 ) car les réactions qui l'impliquent sont rapides par

rapport à la dynamique des cultures de cellules et on les considèrent à l'équilibre.

$$[H_2CO_3] = \frac{10^{-pH} [HCO_3^-]}{K_{acid}} \quad (5.23)$$

Le terme  $K_{acid}$  est la constante de dissociation de l'acide carbonique. La concentration de l'ion carbonate augmente avec le pH et est égale à celle du DCO<sub>2</sub> à un pH de 6.3, dix fois plus grande à un pH de 7.3, en condition d'équilibre. Le bilan dynamique sur l'ion carbonate s'écrit à l'aide des constantes de vitesse des réactions déjà présentées.

$$\frac{d[HCO_3^-]}{dt} = k_1[DCO_2] - k_2[H_2CO_3] \quad (5.24)$$

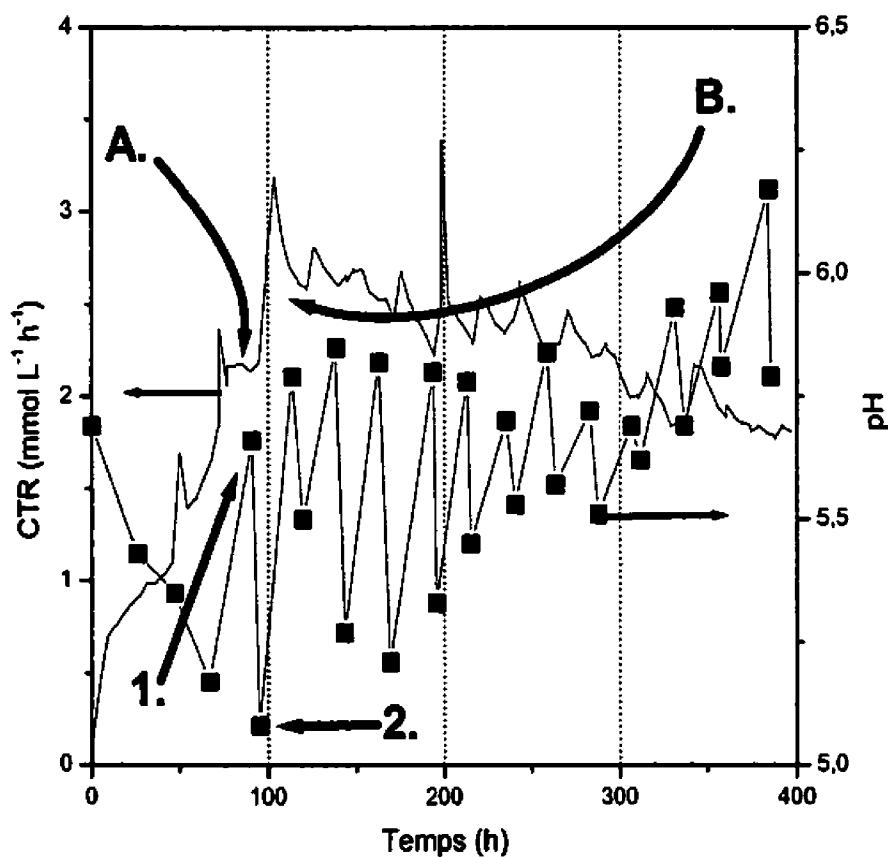
Ainsi, le CPR réel est exprimé à l'équation ( 5.25 ) adaptée de Royce (1992).

$$CPR = CTR + V_L \left( \frac{d[DCO_2]}{dt} + \frac{d[HCO_3^-]}{dt} \right) \quad (5.25)$$

Le terme entre parenthèse représente l'erreur par unité de volume causée par l'estimation directe du CPR par le CTR.

Afin d'évaluer l'amplitude de cette erreur dans les conditions de culture utilisées lors de la présente étude, des mesures de pH sont effectuées avant et après l'ajout de NH<sub>4</sub> à la culture FH08. Les ajouts effectués à cette culture représentent le cas extrême de perturbation du pH. D'abord en terme de volume ajouté, près de 800 ml, puis de quantité totale ajoutée, plus de 200 mmol dans un volume moyen de 2,2 L, sur 400h de culture, de sorte que les solutions

d'ajout ont une concentration de deux à cinq fois plus grande (400mM à 1M) pour les séries de cultures subséquentes. La Figure 5.1 présente l'évolution du CTR et du pH lors de la culture FH08.



**Figure 5.1 : Taux de transfert du CO<sub>2</sub> et mesure de pH lors de la culture FH08**

Pendant les trois premiers jours de culture, le pH diminue d'une façon linéaire de 5.7 jusqu'à 5.2. À 91h de culture, il est remonté à 5.7 (indiqué par le point 1 à

la Figure 5.1). Immédiatement après un ajout d'ammonium citrate augmentant la concentration de  $\text{NH}_4^+$  de la culture de 10 mM, le pH chute à 5.1 (indiqué par le point 2). Cette chute de pH représente une augmentation de la concentration en ions  $\text{H}^+$  de la culture et comme le montre l'équation ( 2.7 ), l'équilibre chimique est déplacé vers la gauche, transformant le carbonate ( $\text{HCO}_3^-$ ) en  $\text{DCO}_2$ . Le transfert du  $\text{CO}_2$  augmente donc car la force motrice au transfert liquide gaz augmente. C'est ce qui provoque le pic indiqué par le point B de la Figure 5.1. Après 114h de culture, le pH atteindra 5.8 et le pic de CTR semble terminé depuis quelques heures déjà. Comme on peut le voir, à chaque fois qu'un ajout est effectué, environ aux 24h, cet ajout est accompagné d'une variation du pH ce qui provoque un pic dans la courbe du CTR.

Par ailleurs le point A de la figure indique un plateau autour duquel le CTR augmente rapidement. Ce plateau coïncide avec l'augmentation soudaine du pH entre les 67<sup>e</sup> et 91<sup>e</sup> h de culture. Il est fort possible que ce plateau soit causé par l'accumulation dans le milieu de culture d'ion  $\text{HCO}_3^-$  alors que le pH augmente.

Donc, les ajouts d'ammonium citrate provoquent un déséquilibre momentané entre les espèces du  $\text{CO}_2$  dissous ce qui fausse l'estimation du CPR par le CTR. Immédiatement après l'ajout, les ions carbonates sont transformés en  $\text{DCO}_2$  qui est dégazé. La somme des concentrations de ces espèces diminue

donc et le terme entre parenthèses de l'équation ( 5.25 ) est négatif. Cela signifie que le CPR est surestimé par le CTR. Par contre, le pH de la culture semble revenir à un niveau stable (autour de 5.5) pour presque toute la durée de celle-ci. Ainsi, le niveau des ions carbonates est restauré lentement alors que le pic de CTR diminue. La somme des concentrations des espèces du CO<sub>2</sub> dissous doit inévitablement augmenter et le terme entre parenthèses de l'équation ( 5.25 ) est positif. C'est alors que le CPR est supérieur à ce qu'indique le calcul du CTR. La culture FH08 représente un cas extrême et les variations de pH observées sont exceptionnelles de même que la taille des pics de CTR. D'un point de vue global, les variations du CTR autour du CPR s'annulent et l'estimation directe du CPR par le CTR est donc valable.

Le modèle d'estimation du DCO<sub>2</sub> développé lors de cette étude suppose que les variations des autres espèces du CO<sub>2</sub> dissous sont instantanées et leur influence négligeable sur l'estimation du CPR par le CTR. La concentration de l'acide carbonique est évalué à l'aide de l'équation ( 5.23 ) et celle du HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> est calculée à l'aide de l'équation ( 5.26 ) où K<sup>\*</sup><sub>acid</sub> est une pseudo constante de dissociation formée des constantes de vitesse de réactions et de la constante de dissociation de l'acide carbonique (Arrua, 1990).

$$[HCO_3^-] = \frac{k_1 K_{acid}}{k_2 10^{-pH}} DCO_2 = \frac{K^*_{acid}}{10^{-pH}} DCO_2 \quad (5.26)$$

### **5.2.2 Évaluation de la rétention gazeuse du bioréacteur**

Afin de développer le modèle d'estimation du DCO<sub>2</sub> présenté à la section 5.2.3, la rétention gazeuse fut d'une aide précieuse. La rétention gazeuse est définie à l'équation ( 2.13 ).

$$H = \frac{\text{volume des bulles}}{\text{volume de culture}} = \frac{V_b}{V_t} \quad (2.13)$$

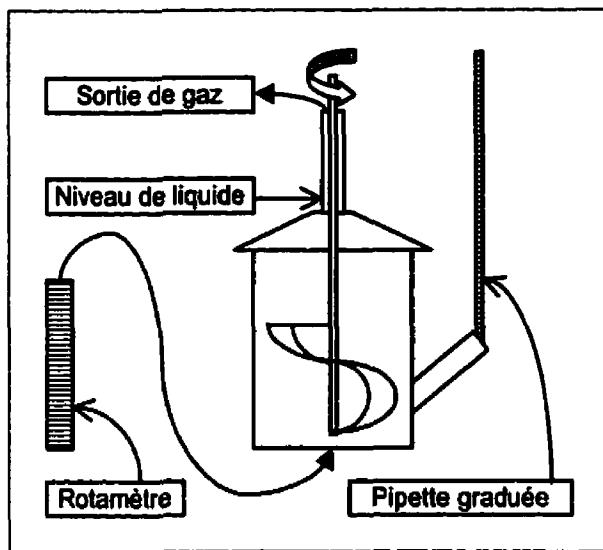
La difficulté dans la mesure de ce paramètre en conditions de culture fait que les modèles d'estimation du DCO<sub>2</sub> publiés soit supposent une valeur arbitraire (Dahod, 1993), soit ont recours à des artifices pour ne pas avoir à l'utiliser (Aubry, 1995).

Pour un fluide donné, le principal facteur qui influence la rétention gazeuse est le débit d'aération par bullage. Comme ce débit varie lors des cultures afin de soutenir le transfert d'oxygène, une relation entre la rétention gazeuse et le débit alimenté est requise. Le volume de culture influence aussi le volume des bulles mais comme la rétention gazeuse est ramenée à un volume de bulles par unité de volume de culture, ce facteur a une influence minime.

La mesure précise du volume des bulles dans un système liquide aéré présente certaines difficultés puisque ce volume ne provoque qu'un très faible changement sur la hauteur du liquide dans le bioréacteur. La surface de la section du système est trop importante par rapport au volume mesuré, ce qui

implique un faible déplacement de la surface du liquide entre les conditions de bullage zéro et un débit de bullage donné dans la plage d'opération (ici jusqu'à 0.1 VVM). De plus, l'agitation et le bullage provoquent des oscillations qui rendent la mesure impossible à effectuer.

Un système permettant l'évaluation à vide (i.e. avec de l'eau au lieu du milieu de culture et des cellules) de la rétention gazeuse dans un réacteur de 3L est conçu. Il permet d'effectuer des lectures précises et reproductibles. La Figure 5.2 présente le montage utilisé pour relier la rétention gazeuse au débit de bullage. Le bioréacteur utilisé a un volume de 2L et est rempli d'eau au delà du couvercle comme indiqué sur la figure. La surface du liquide est ainsi réduite à la section de la pipette graduée ( $0.3 \text{ cm}^2$ ) et à la section du tube central ( $\pi \text{ cm}^2$ ) au lieu de la section du bioréacteur ( $530 \text{ cm}^2$ ). Le tube central sert à évacuer le gaz alimenté et à laisser passer l'arbre de l'agitateur hélicoïdal (60 rpm). La forme du couvercle permet aux bulles de sortir sans entrave pour ne pas modifier la rétention gazeuse. L'appareil est étalonné à un débit zéro avant chaque lecture. L'augmentation du volume total de fluide dans le système causé par le bullage à un débit donné correspond au volume des bulles ( $V_B$ ). La mesure de ce volume sur la pipette est corrigée d'un facteur 10.75 pour tenir compte de la section du tube central. Le débit de gaz est ajusté à l'aide d'un rotamètre manuel.



**Figure 5.2 : Montage développé pour mesurer la rétention gazeuse en fonction du débit de bullage**

Les résultats à la Figure 5.3 présentent la rétention gazeuse, i.e. le volume moyen des bulles mesuré à cinq répétitions (entre 0 et 6.34 cc) divisé par le volume total du système ( $V_{TOT} \sim 2000$  cc). Les points sont modélisés avec un coefficient de corrélation très satisfaisant ( $R^2=0.99$ ) par la parabole de l'équation ( 5.27 ).

$$H = -2.48 \times 10^{-8} Q_T^2 + 1.82 \times 10^{-5} Q_T - 4.24 \times 10^{-5} \quad (5.27)$$

Grâce à cette corrélation empirique et aux équations suivantes, il est possible de calculer la vitesse ascensionnelle ( $u_B$ ) et le temps de résidence moyen des bulles ( $t_{RES}$ ), où  $h$  est la hauteur de la colonne d'eau à parcourir par les bulles.

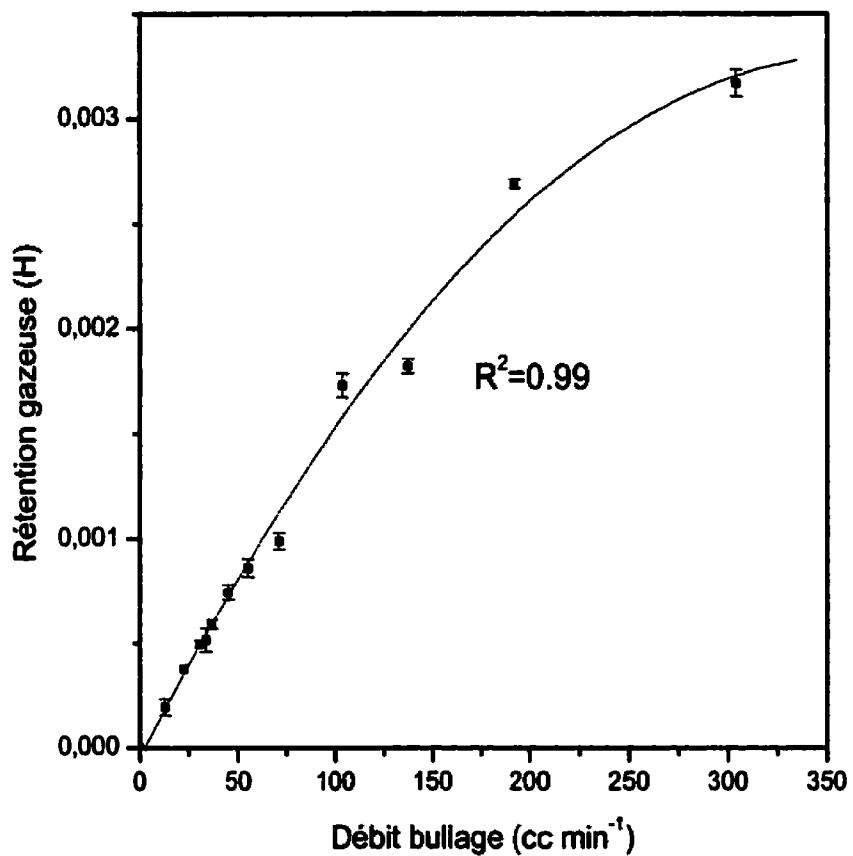


Figure 5.3 : Rétention gazeuse mesurée en fonction du débit alimenté

$$h = \frac{V_{TOT}}{A} = 0.075 V_{TOT} \quad (5.28)$$

$$t_{RÉS} = \frac{V_B}{Q_T} = \frac{H V_{TOT}}{Q_T} \quad (5.29)$$

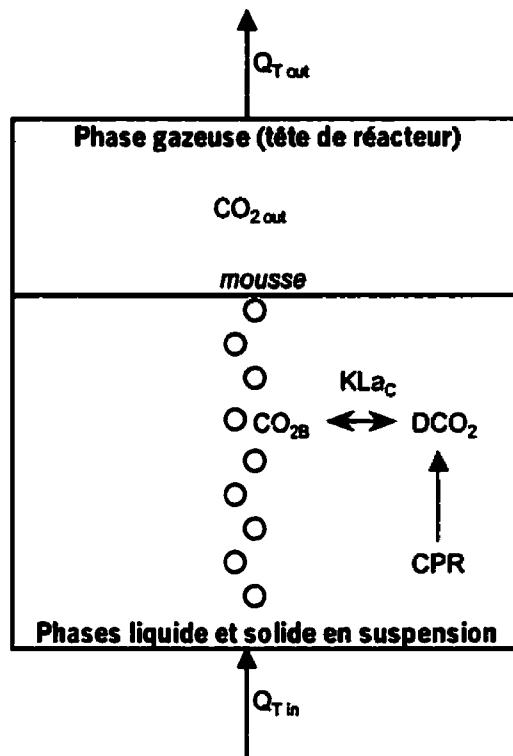
$$u_B = \frac{h}{t_{RÉS}} = \frac{\frac{V_{TOT}}{A}}{\frac{H V_{TOT}}{Q_T}} = \frac{Q_T}{H A} \quad (5.30)$$

### 5.2.3 Modèle d'estimation de la concentration de CO<sub>2</sub> dissous

Les outils développés depuis le début de ce chapitre sont tous mis à profit pour développer le modèle d'estimation du CO<sub>2</sub> dissous dont cette section fait l'objet.

Les hypothèses de départ sont le mélange parfait de la phase liquide et le comportement piston de la phase gazeuse sous forme de bulles. Selon la section 5.2.1, on fait l'hypothèse que les changements de concentration des espèces du CO<sub>2</sub> dissous (H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> et HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) sont négligeables et ne sont pas considérés dans le présent exercice de modélisation. Cela signifie que le CPR est considéré égal en tout temps au CTR. Le procédé de transfert est présenté à la Figure 5.4. Tel qu'illustré, le bilan du CO<sub>2</sub> sur la phase liquide, présenté à l'équation (5.31), est analogue au bilan sur l'oxygène, équation (5.1).

$$\frac{dDCO_2}{dt} = KLa_C [CO_2^* - DCO_2] + CPR \quad (5.31)$$



**Figure 5.4 : Procédé de transfert du CO<sub>2</sub>**

Comme on suppose un pseudo-équilibre, la dérivée par rapport au temps est considérée nulle et l'équation ( 5.31 ) devient l'équation ( 5.32 ) où CO<sub>2</sub>\* varie selon z, l'axe vertical, d'une façon encore inconnue.

$$DCO_2 = \frac{CTR}{KLa_c} + CO_2 * \quad (5.32)$$

Cette variation peut être obtenue par le bilan de matière sur les bulles de la phase gazeuse, pour tout DCO<sub>2</sub> donné. Ainsi, sur un élément de volume de hauteur dz, le gain en CO<sub>2</sub> de la bulle est exprimé à l'équation ( 5.33 ).

$$\left( \frac{\text{vol. bulles}}{\text{vol. culture}} \right) \left( \frac{\text{vol. culture}}{\text{différentiel}} \right) \left( \frac{\text{taux de changement}}{\text{concentration en CO}_2 \text{ bulle}} \right) = HAdz \frac{dp_{CO_2}}{dt} \frac{1}{RT} \quad (5.33)$$

Cette équation est analogue à l'équation ( 5.5 ) pour le transfert de l'oxygène. Un développement identique conduit donc à l'équation ( 5.34 ) analogue à l'équation ( 5.9 ).

$$\ln \left( \frac{(CO_2^* - DCO_2)_z}{(CO_2^* - DCO_2)_{in}} \right) = - \frac{KLa_c K_H RT}{H u_B} z \quad (5.34)$$

Ou alors :

$$(CO_2^* - DCO_2)_z = (CO_2^* - DCO_2)_{in} \exp(kx) \quad (5.35)$$

Avec,

$$kx \cdot z = - \frac{KLa_c K_H RT z}{H u_B} \quad (5.36)$$

L'expression ( 5.36 ) est laissée telle quelle dans Bailey & Ollis (1986). Elle peut cependant être simplifiée en remplaçant la vitesse des bulles ( $u_B$ ) par l'équation ( 5.30 ).

$$kx \cdot z = - \frac{KLa_c K_H RT z}{H \frac{Q_r}{AH}} = - \frac{KLa_c K_H RT z A}{Q_r} \quad (5.37)$$

Ainsi, l'équation ( 5.37 ) ne contient aucun terme qui ne soit fonction de la rétention gazeuse  $H$  tel la vitesse des bulles ( $u_B$ ) ou leur temps de résidence (trés). Même si les résultats présentées à la section 5.2.2 ne sont pas utilisées dans le modèle final, leur contribution au modèle est importante et c'est pourquoi ils sont présentés. L'équation ( 5.38 ) présente donc le bilan du  $DCO_2$

sur la phase gazeuse, qui est applicable sans avoir recours à une estimation de la rétention gazeuse. Ce bilan devient de ce fait un outil puissant et versatile s'appliquant à plusieurs types de cultures et de bioréacteurs sous un large éventail de condition d'opérations.

$$(CO_2^* - DCO_2)_z = (CO_2^* - DCO_2)_{in} \exp\left(-\frac{KLa_c K_H RT z A}{Q_r}\right) \quad (5.38)$$

Le raisonnement conduisant jusqu'au bilan sur la phase gazeuse avait pour but de découvrir la variation de la concentration en CO<sub>2</sub> des bulles en fonction de la hauteur dans le bioréacteur. Or, l'équation ( 5.38 ) exprime précisément la variation du CO<sub>2</sub><sup>\*</sup> selon z qui est requise au bilan sur la phase liquide. Un exemple illustre cette variation à la Figure 5.5.

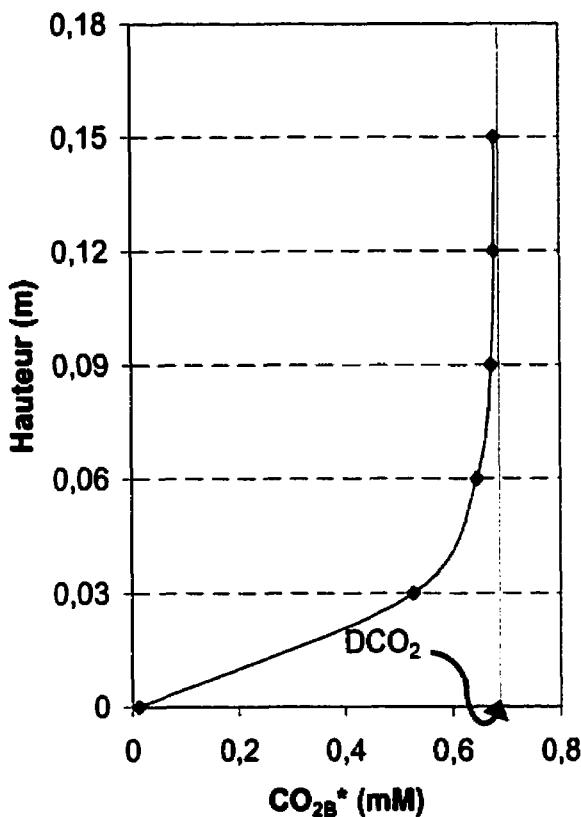


Figure 5.5 : Variation de  $\text{CO}_2^*$  en fonction de la hauteur parcourue par les bulles

De toute évidence,  $\text{CO}_2^*$  <sub>out</sub> ne peut être supérieur à DCO<sub>2</sub>.

Afin d'utiliser l'équation ( 5.32 ), une concentration représentative du transfert doit être établie. Aubry, (1995) utilise une constante ( $K_{DCO_2} = 0.85$ ) qui relie cette concentration représentative à la concentration des gaz de sortie du bioréacteur. Il y arrive en faisant converger les bilans sur les phases liquide et gazeuse dans des conditions de cultures fixes ( $Q_T = \text{cste}$ ). Inspirer de ce

concept, une variable ( $KDCO_2$ ) reliant une concentration  $CO_2^*$  représentative du transfert entre les phases liquides et gazeuses est calculée à l'aide du bilan sur la phase gazeuse (équation ( 5.38 )) selon l'équation ( 5.39 ).

$$KDCO_2 = \frac{\int_{z=0}^{z=h} [CO_2^*(z)] dz}{[CO_2^*(h)]} \quad ( 5.39 )$$

Le numérateur de l'intégrale représente la variation du  $CO_2^*$  en fonction de la hauteur dans le bioréacteur. Celle-ci est réduite par le dénominateur qui représente la concentration du gaz à la sortie du bioréacteur, rendant  $KDCO_2$  inférieur ou égal à l'unité. Si elle est évaluée à l'aide de la méthode du trapèze avec cinq points, la variable est calculée grâce à l'équation ( 5.40 ).

$$KDCO_2 = \frac{\left( CO_2^*_{in} + (CO_2^*_{in} - DCO_2) \exp(5k_x) + 9DCO_2 + 2((CO_2^*_{in} - DCO_2) \exp(k_x) + \exp(2k_x) + \exp(3k_x) + \exp(4k_x)) \right)}{10CO_2^*_{out}} \quad ( 5.40 )$$

Afin de calculer  $KDCO_2$ , le  $DCO_2$  est requis dans l'équation ( 5.40 ). On posera une valeur quelconque pour débuter. Ensuite, le  $DCO_2$  sera estimé grâce au bilan sur la phase liquide qui devient :

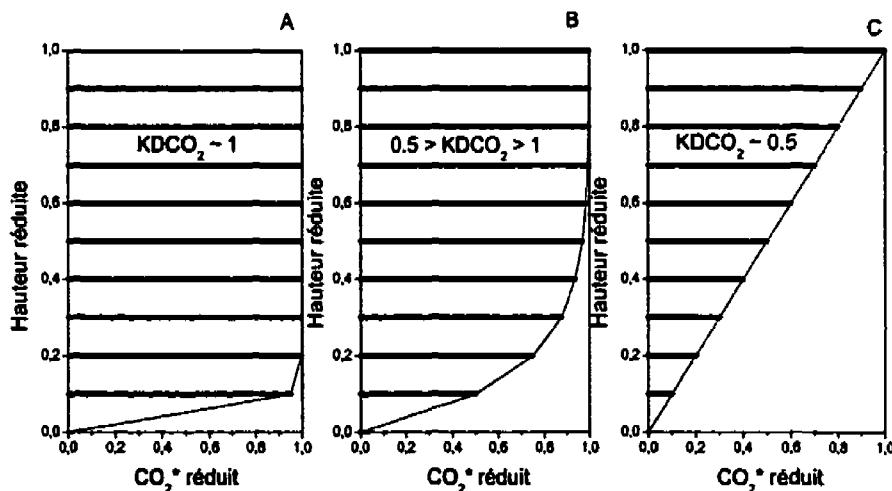
$$DCO_2 = \frac{CTR}{KL_a_c} + CO_2^*_{out} KDCO_2 \quad ( 5.41 )$$

Par itération entre les équation ( 5.40 ) et ( 5.41 ), la convergence est généralement atteinte en moins de cinq étapes.

La limite supérieure de  $KDCO_2$  est ~1 et ce cas correspond à une phase gazeuse dont la concentration en  $CO_2$  augmente très rapidement pour atteindre la concentration de sortie du bioréacteur,  $CO_2^*_{out}$ . Cette situation est illustrée sur le graphique A de la Figure 5.6. La hauteur réduite ( $h_R$ ) et le  $CO_2^*$  réduit sont définis aux équations suivantes. La zone hachurée est la fraction de la zone totale qui correspond à  $KDCO_2$ .

$$h_R = \frac{z}{h} \quad (5.42)$$

$$CO_2^* \text{ réduit} = \frac{CO_2^*(z)}{CO_2^*(h)} = \frac{CO_2^*(z)}{CO_2^*_{out}} \quad (5.43)$$



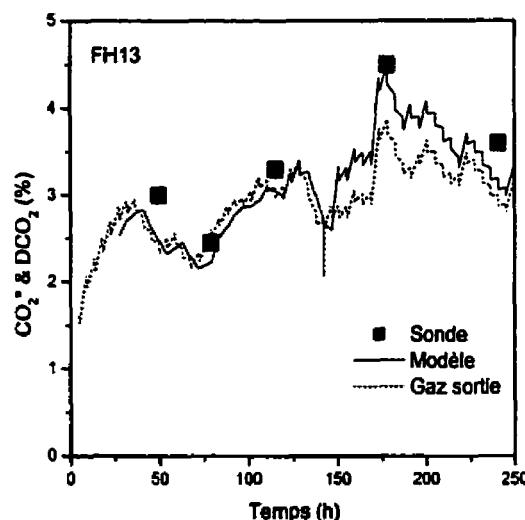
**Figure 5.6 : Illustration graphique du calcul du  $KDCO_2$**

La limite inférieure de  $KDCO_2$  est ~0.5 et le graphique C de la figure Figure 5.6 présente visuellement la situation. Elle correspond au cas où la concentration en  $CO_2$  de la phase gazeuse augmenterait de façon linéaire jusqu'à atteindre la concentration de sortie  $CO_2^{*out}$ . Comme l'augmentation linéaire de la concentration est le chemin le plus court entre la concentration à l'entrée ( $CO_2^{*in}$ ) et la concentration à la sortie ( $CO_2^{*out}$ ),  $KDCO_2$  ne peut en aucun cas être inférieur à 0.5, l'aire d'un triangle inscrit dans un rectangle de surface unitaire. De la même façon, une situation intermédiaire typique est illustrée au graphique B de la Figure 5.6. La concentration en  $CO_2$  de la bulle augmente d'abord rapidement (force motrice élevée :  $CO_2^{*B}(z) - DCO_2$ ) et diminue à mesure que la concentration de la bulle est importante (ce qui diminue la force motrice).

#### 5.2.4 Validation du modèle de $DCO_2$

Le modèle d'estimation du  $DCO_2$  est composé des équations ( 5.37 ) ( 5.40 ) et ( 5.41 ). Il est préférable et plus simple de l'appliquer en ligne sur les cultures mais il est possible, si les paramètres requis sont connus ( $KLac$  ,  $Q_T$ ,  $CO_2$  et CTR), de calculer à posteriori le niveau de  $DCO_2$ . Le modèle est donc implanté sur le système de commande des bioréacteurs dès les cultures FH13 à FH16. Lors de ces cultures le  $DCO_2$  est mesuré à l'aide de la sonde à  $DCO_2$  décrite à la section 4.2 et estimé selon le modèle. Le premier point mesuré avec la sonde

semble un peu trop élevé pour chacune des cultures. Il est possible que cela soit du à un problème d'étalonnage car ces mesures ont toutes été effectuées le même jour. Pour les autres points des cultures FH13, FH14 et FH15, le modèle suit les mesures effectuées par la sonde avec une erreur inférieure à 10%. Les figures 5.7, 5.8, 5.9 et 5.10 présentent la concentration en CO<sub>2</sub> dans les gaz de sortie, le DCO<sub>2</sub> estimé par le modèle ainsi que le DCO<sub>2</sub> mesuré par la sonde.



**Figure 5.7 : Estimation et mesure du DCO<sub>2</sub> pour la culture FH13**

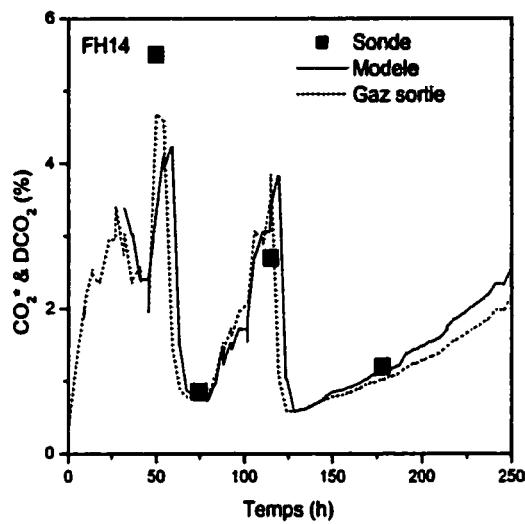


Figure 5.8 : Estimation et mesure du  $\text{DCO}_2$  pour la culture FH14

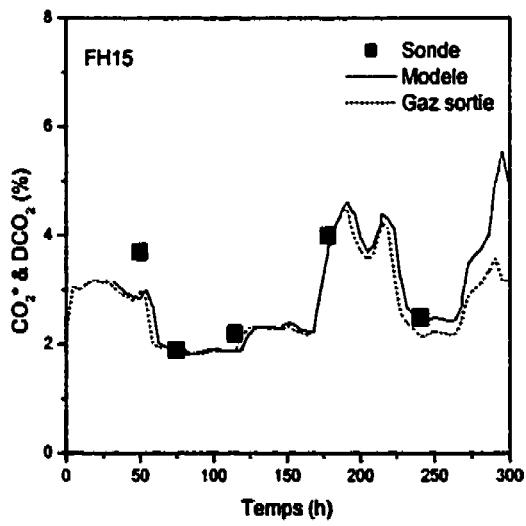
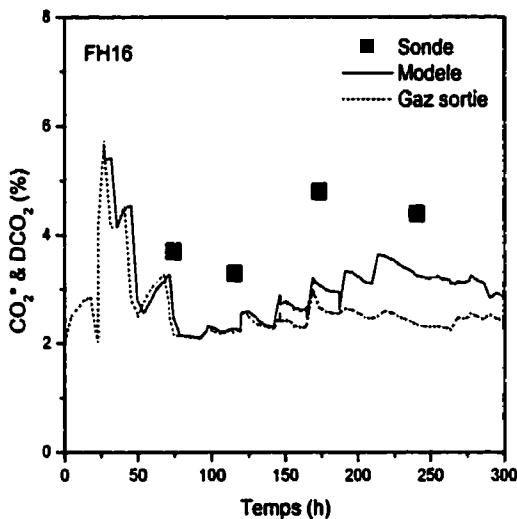


Figure 5.9 : Estimation et mesure du  $\text{DCO}_2$  pour la culture FH15

Par contre, le modèle sous estime largement la concentration de DCO<sub>2</sub> mesuré dans la culture FH16 tel que présenté à la figure 5.10 (une différence jusqu'à 1.7% sur une mesure de 4.8% de DCO<sub>2</sub>, ce qui représente une erreur relative de 35%).



**Figure 5.10 : Estimation versus mesure du DCO<sub>2</sub> pour la culture FH16**

Si on cherche à corriger le modèle pour que la courbe du DCO<sub>2</sub> passe par tous les points de mesure, l'exercice devient du lissage de courbe et cela réduit (parfois jusqu'à néant) la portée du modèle corrigé.

L'analyse des quatre dernières figures montre que le modèle suit bien les points mesurés quand le DCO<sub>2</sub> mesuré est près de l'équilibre avec la concentration

des gaz de sortie. Par contre, malgré que DCO<sub>2</sub> mesuré est supérieur à l'équilibre avec les gaz de sortie, le modèle sous estime largement le DCO<sub>2</sub>. En se référant à l'équation ( 5.41 ) du modèle d'estimation, on constate que si KLac est surestimé, l'importance du terme CTR / KLac sur la valeur du DCO<sub>2</sub> estimé diminue. À la limite, le terme devient négligeable et le modèle revoie la concentration représentative du transfert avec la phase liquide du bioréacteur comme DCO<sub>2</sub>.

$$DCO_2 = \frac{CTR}{KLac} + CO_2 *_{out} KDCO_2 \quad ( 5.41 )$$

Pour les cultures FH13, FH14 et FH15, l'estimation du KLac est soit meilleure, soit elle ne fausse que légèrement le modèle car ce terme est réellement faible. Quoiqu'il en soit, l'erreur d'estimation du modèle lors de la culture FH16 est attribuée à une surestimation du KLac.

Afin de valider d'une manière plus convainquante le modèle d'estimation de la concentration du dioxyde de carbone dissous, les cultures suivantes (FH21, FH23 et FH24) sont suivies avec la sonde à DCO<sub>2</sub>. Les figures 5.11, 5.12 et 5.13 présentent la concentration en CO<sub>2</sub> des gaz de sortie, les mesures de DCO<sub>2</sub> effectuées à l'aide de la sonde, la courbe de DCO<sub>2</sub> estimé par le modèle en plus de la variable KDCO<sub>2</sub> reliant la concentration de sortie du bioréacteur à la concentration représentative du transfert interphases pour les cultures FH21, FH23 et FH24.

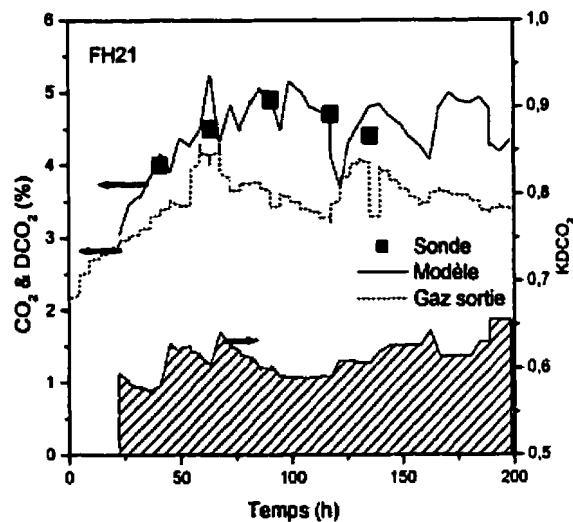


Figure 5.11 : Estimation et mesure du DCO<sub>2</sub> pour la culture FH21

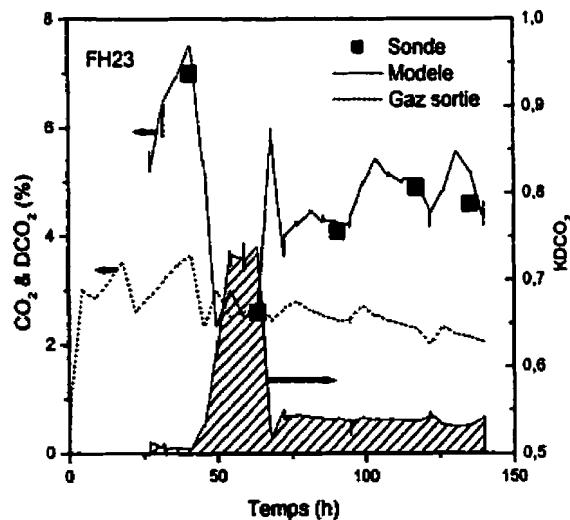
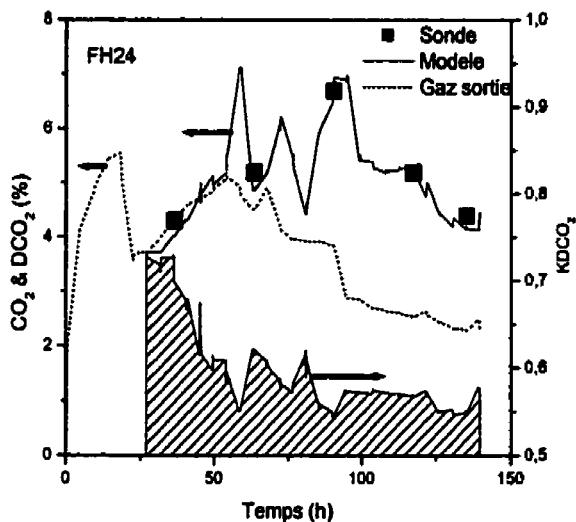


Figure 5.12 : Estimation et mesure du DCO<sub>2</sub> pour la culture FH23



**Figure 5.13 : Estimation et mesure du DCO<sub>2</sub> pour la culture FH24**

Ces résultats démontrent que le DCO<sub>2</sub> est correctement estimé par le modèle. Celui-ci colle très bien aux mesures de la sonde et cela que le DCO<sub>2</sub> soit près de l'équilibre avec la phase gazeuse ou qu'il s'en éloigne. De plus, la valeur que prend la variable KDCO<sub>2</sub> illustre l'efficacité du transfert. Quand sa valeur est élevée (~0.75) le gaz de sortie est près d'être en équilibre avec le DCO<sub>2</sub>. Alors que quand elle est plus faible, ces deux courbes s'éloignent ce qui signifie que le gaz sort du bioréacteur avant d'être saturé de CO<sub>2</sub>.

Ces résultats permettent de démontrer que l'hypothèse d'équilibre avec la phase gazeuse n'est vrai qu'en début de culture, alors que le taux de production

du CO<sub>2</sub> est faible ce qui rend, à la limite, le premier terme du modèle négligeable.

### **5.2.5 Contrôle du dioxyde de carbone dissous**

Au moyen du modèle validé pour estimer le DCO<sub>2</sub>, une stratégie de commande est développée pour contrôler la concentration en dioxyde de carbone dissous des cultures. L'équation ( 5.44 ) présente le bilan sur la phase liquide (adapté de l'équation ( 5.31 ) et du modèle de DCO<sub>2</sub>) représentant le phénomène de transfert impliquant le CO<sub>2</sub> dans un bioréacteur.

$$\frac{dDCO_2}{dt} = KLa_c [CO_2 *_{out} KDCO_2 - DCO_2] + CTR \quad ( 5.44 )$$

Idéalement, la variable à manipuler est la concentration en CO<sub>2</sub> de la phase gazeuse alimentée au bioréacteur, comme dans le cas du contrôle de DO. Cependant, cette approche implique la mesure et le contrôle de faibles débits de CO<sub>2</sub> ce qui est difficile à réaliser en pratique.

De plus, à l'inverse de l'O<sub>2</sub>, le CO<sub>2</sub> est produit et non consommé par les cellules. Le taux de désorption du CO<sub>2</sub> du bioréacteur peut devenir insuffisant ce qui conduit à un nouvel équilibre avec un DCO<sub>2</sub> supérieur au point de consigne (DCO<sub>2PC</sub>). Un contrôleur basé sur la commande de la concentration en CO<sub>2</sub>

dans le gaz d'alimentation ne peut corriger cette situation. C'est pourquoi une autre stratégie est envisagée.

En supposant que les mesures de respiration : l'OUR et le CPR, suivent des profils similaires, sans toutefois supposer que le quotient respiratoire RQ, soit une constante, encore moins qu'il soit l'unité, l'augmentation de la demande en O<sub>2</sub> est accompagnée de l'augmentation de la production de CO<sub>2</sub>. Ainsi, avant que le contrôleur de DO ne sature à 100% d'oxygène dans le gaz alimenté au bioréacteur, une augmentation du débit total (Q<sub>T</sub>) est requise et appliquée manuellement par l'opérateur. Comme le montre l'équation ( 5.44 ), cette action contribue à extraire le CO<sub>2</sub> du bioréacteur de deux manières. D'abord, le coefficient de transfert du CO<sub>2</sub> (KLac) est augmenté d'une manière analogue à l'augmentation dans l'eau, ce qui augmente le taux de transfert. En second lieu, la concentration de la phase gazeuse est diminuée par un effet de dilution ce qui augmente la force motrice du transfert.

La stratégie de commande adoptée manipule donc la concentration en oxygène du gaz alimenté pour contrôler le niveau d'O<sub>2</sub>, ce qui permet d'utiliser le contrôleur décrit à la section 5.1.2. Le DCO<sub>2</sub> est contrôlé en manipulant le débit total alimenté d'un mélange d'air et d'oxygène pur. Comme dans le cas du contrôle de l'oxygène dissous, le caractère évolutif de la culture suggère l'utilisation d'un contrôleur adaptatif.

Le modèle linéaire pour le suivi de l'erreur est l'équation ( 5.45 ) et il devient l'équation ( 5.46 ) car le point de consigne est constant.

$$\frac{d(DCO_{2PC} - DCO_2)}{dt} + \lambda_2(DCO_{2PC} - DCO_2) = 0 \quad ( 5.45 )$$

$$\frac{dDCO_2}{dt} + \lambda_2(DCO_{2PC} - DCO_2) = 0 \quad ( 5.46 )$$

Le modèle théorique du procédé de transfert du CO<sub>2</sub> est le bilan sur la phase liquide de l'équation ( 5.44 ). Pour établir la loi de commande, le modèle théorique doit exprimer la variable manipulée en fonction de la variable contrôlée. En première approximation, considérons que l'effet d'un changement de Q<sub>T</sub> sur KLa<sub>C</sub> est négligeable par rapport au changement de la force motrice provoqué par la dilution due à l'augmentation de Q<sub>T</sub>. On peut alors exprimer CO<sub>2\*</sub><sub>out</sub> et CO<sub>2out</sub> à l'aide des équations suivantes :

$$CO_2 *_{out} = 10CO_{2out}K_H \quad ( 5.47 )$$

$$CO_{2out} = 100 \frac{CTR V_t RT}{Q_T} \quad ( 5.48 )$$

Ces deux équations sont introduites dans l'équation ( 5.44 ).

$$\frac{dDCO_2}{dt} = KLa_C \left[ 10K_H \left( 100 \frac{CTR V_t RT}{Q_T} \right) KDCO_2 - DCO_2 \right] + CTR \quad ( 5.49 )$$

Les équations ( 5.46 ) et ( 5.49 ) sont égalées par les dérivées.

$$\lambda_2(DCO_{2PC} - DCO_2) = KLa_c \left[ 10K_H \left( 100 \frac{CTR V_L RT}{Q_T} \right) KDCO_2 - DCO_2 \right] + CTR \quad (5.50)$$

La variable manipulée ( $Q_T$ ) est isolée de l'équation ( 5.50 ) pour obtenir la loi de commande.

$$Q_T = \frac{[10K_H(100CTR V_L RT)KDCO_2]}{\left[ \frac{\lambda_2(DCO_{2PC} - DCO_2) - CTR}{KLa_c} + DCO_2 \right]} \quad (5.51)$$

Initialement, l'effet de la variation de  $Q_T$  sur  $KLa_c$ , a été négligé. Or, tel que développé par Sirois (1997) pour le contrôle de l'oxygène dissous, le terme  $P_Q$  tient compte de l'effet des variations du débit total sur le coefficient de transfert. Ainsi, l'expression ( 5.52 ) est introduite dans la loi de commande où  $\beta$  est le coefficient de transfert réduit que l'on estime grâce à l'équation ( 5.53 ).

$$KLa_c = \beta P_Q \quad (5.52)$$

$$\frac{d\bar{\beta}}{dt} = \gamma_4 (CO_2 *_{out} KDCO_2 - DCO_2)(DCO_{2PC} - DCO_2) \quad (5.53)$$

L'estimateur  $\beta$  a pour gain  $\gamma_4$  et la loi de commande devient l'équation ( 5.54 ).

$$Q_T = \frac{[10K_H(100CTR V_L RT)KDCO_2]}{\left[ \frac{\lambda_2(DCO_{2PC} - DCO_2) - CTR}{\beta P_Q} + DCO_2 \right]} \quad (5.54)$$

Ce contrôleur a pour variable mesurée la sortie du modèle de  $DCO_2$ . La mesure du  $CO_2$  dans le gaz de sortie est partagée entre six réacteurs en tout, 45

minutes chacun (incluant 15 minutes de purge). Le contrôleur est implanté de sorte qu'il effectue une seule action à toute les 4.5 h, au moment où l'analyse des gaz de sortie passe au bioréacteur suivant. La figure suivante explique le cycle.

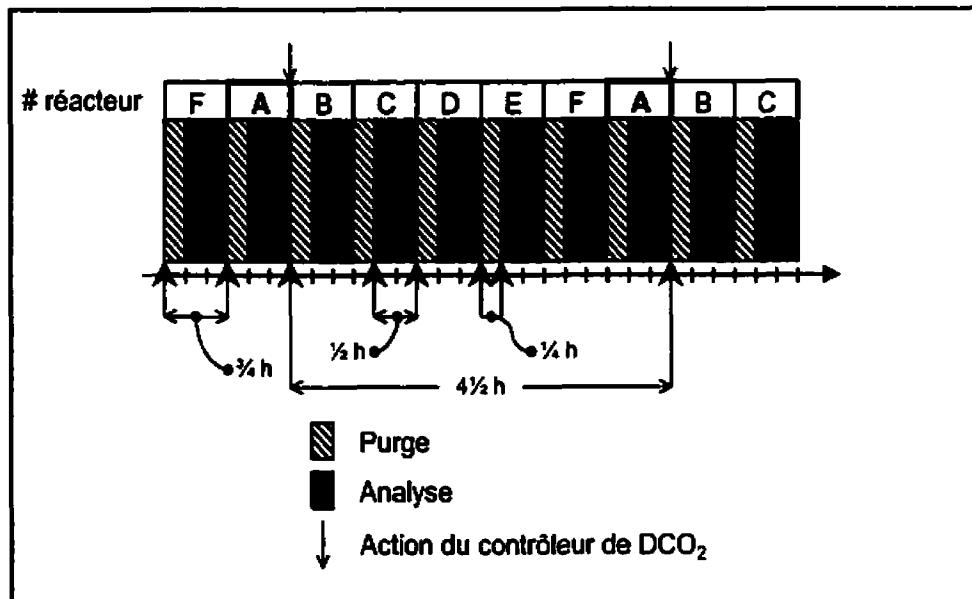


Figure 5.14 : Cycle d'action du contrôleur de DCO<sub>2</sub>

## 5.3 Performance des contrôleurs et découplage

### 5.3.1 Contrôle d'oxygène dissous

Le contrôleur d'oxygène dissous utilisé est conçu pour un point de consigne fixe au cours d'une culture. Les paramètres ( $\lambda_1$ , le gain du contrôleur et  $\gamma_3$  le gain d'estimation de  $\alpha$ ) optimisant le contrôle ont été choisis suivant les travaux d'Aubry (1995) et de Sirois (1997). Comme il n'existe pas de méthode pour déterminer rapidement la valeur des paramètres pour ce type de contrôleur (Aubry, 1995), les paramètres sont choisis par essais et erreurs. Les paramètres utilisés sont déterminés en optimisant la réponse suite à une perturbation (arrêt momentané de l'apport d'oxygène quand sont effectuées les pentes pour mesurer l'OUR par exemple) effectuée à une DO de 60%.

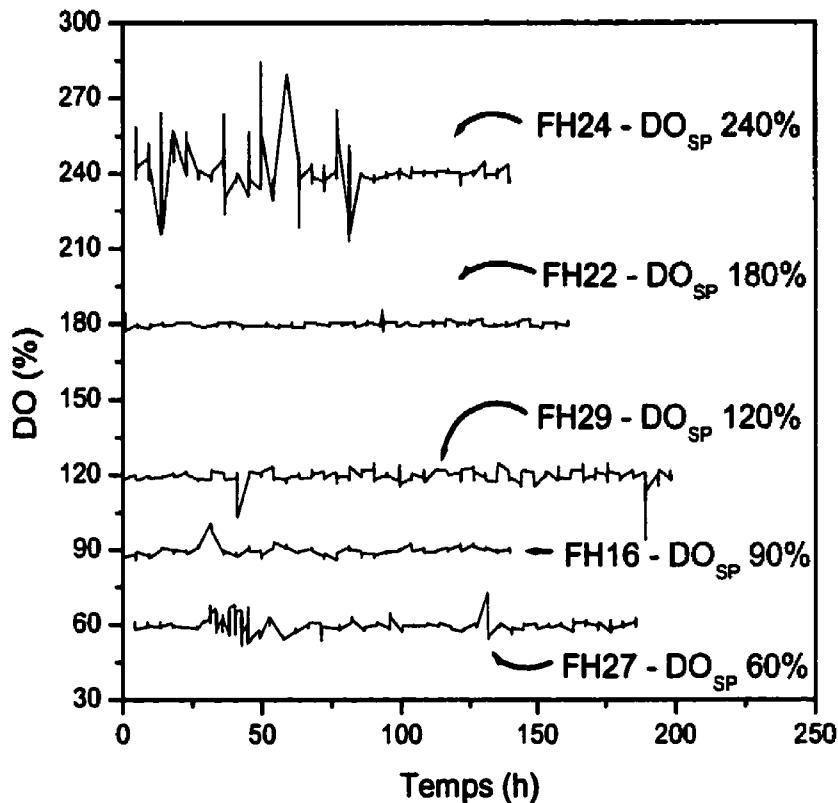
Quand le point de consigne est supérieur à 60%, la dynamique du procédé est modifiée. Les débits gazeux sont plus élevés car la diminution de la force motrice ( $C^* - DO$ ) exige un coefficient de transfert ( $KLa_O$ ) supérieur pour soutenir un taux de transfert (OTR) équivalent. Ceci implique que le temps de réponse à un changement de la concentration de la phase gazeuse diminue suite à une action du contrôleur. L'augmentation du  $KLa_O$  diminue aussi le temps de réponse de la phase liquide. De plus, comme on le verra au chapitre suivant, l'OUR ( $qO_2 X$ ) augmente en fonction de la DO, ce qui contribue aussi à

accélérer la réponse du procédé aux perturbations. Comme les paramètres du contrôleur sont trop lents pour des DO supérieures à 60%, ils sont augmentés en conservant le même rapport gain du contrôleur / gain de l'estimateur. De la même manière, les contrôleurs sont ralentis lors des cultures à 30% et 10% de DO. Ainsi, avec des paramètres ajustées (en début de culture) selon le point de consigne de DO, un contrôle stable et performant est maintenu pour l'ensemble des cultures. Le tableau 5.1 présente les paramètres utilisés.

**Tableau 5.1 : Valeurs des paramètre du contrôleur de DO en fonction de  $DO_{PC}$**

$DO_{PC}$	10	30	60	90	120	180	240
$\lambda_1$	2,5	2,5	5	6,25	7,5	10	10
$\gamma_3$	0,625	0,625	1,25	1,5625	1,875	2,5	2,5

La Figure 5.15 présente des exemples de la performance du contrôleur de DO pour des concentrations allant de 60% à 240% d'oxygène dissous. Comme on peut le voir sur la figure, la DO fluctue beaucoup quand on tente de la maintenir à 240%.



**Figure 5.15 : Contrôle de l'oxygène dissous à différents niveaux**

Dans ce dernier cas (240%), le problème n'en est pas un de contrôle de procédé, mais plutôt d'atteinte des limites de transfert gazeux du bioréacteur. En effet, le transfert de masse est poussé aux limites de la capacité du système ce qui rend l'opération difficile. Les débitmètres massiques contrôleur sont souvent ouverts au maximum de leur capacité ( $225 \text{ cc min}^{-1}$  pour un MFC de  $200 \text{ cc min}^{-1}$ ) ce qui fait que le contrôleur sature constamment. Quand la DO

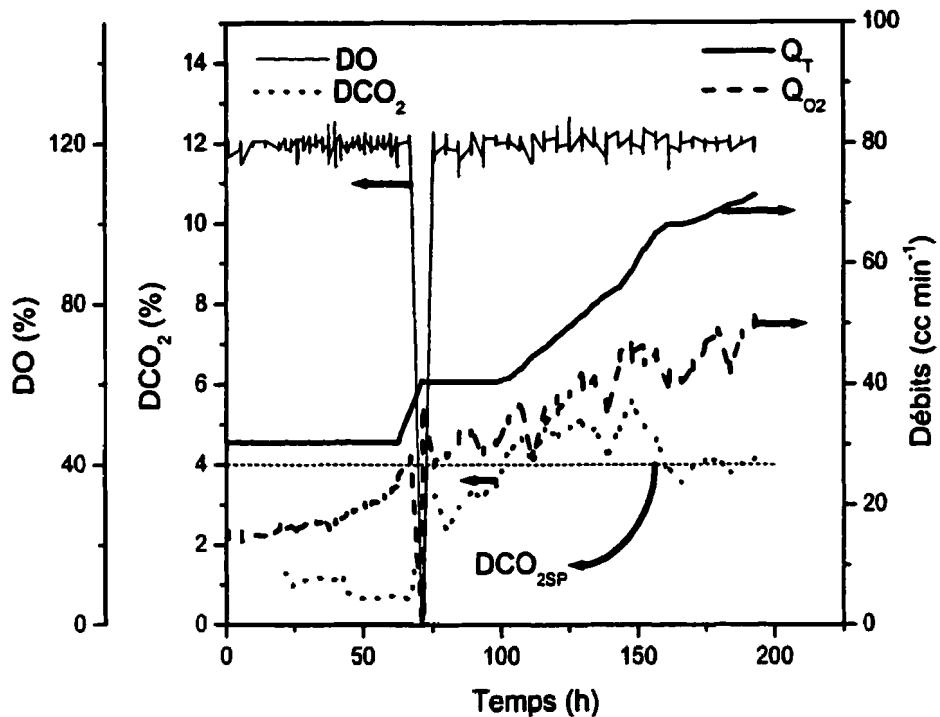
dépasse le point de consigne, le  $\alpha$  s'est adapté à la baisse à une valeur qui sous estime le coefficient de transfert ce qui fait que le contrôleur dépasse largement le point de consigne et le manège recommence en sens inverse. À la fin de cette culture (à partir d'un peu moins de 100h), comme l'OUR est devenu plus élevé, la dynamique du contrôleur et celle du procédé se sont accordées et le contrôle s'est amélioré. Les cultures effectuées à d'autres points de consigne présentent des profils de DO plus stables.

### 5.3.2 Contrôle du dioxyde de carbone dissous

Le contrôleur de dioxyde de carbone dissous est conçu et utilisé avec un point de consigne constant au cours d'une même culture. Une paire de paramètres ( $\lambda_2$  le gain du contrôleur et  $\gamma_4$  le gain d'estimation de  $\beta$ ) du contrôleur est choisie suite à la simulation du procédé grâce au modèle. Des valeurs de 1.5 pour  $\lambda_2$  et de 5 pour  $\gamma_4$  sont obtenus. Dans le design de ce type de contrôleur, Aubry (1995) observe qu'en simulation, les paramètres optimaux sont généralement trop élevés pour le procédé réel. Afin d'être conservateur, le même gain d'estimateur que pour le contrôleur de DO à 60% (estimateur  $\alpha$ ) est utilisé pour le contrôleur de DCO<sub>2</sub> (estimateur  $\beta$ ). Ainsi,  $\gamma_4 = \gamma_3 = 1.25$ . Le gain du contrôleur est quant à lui fixé à 0.25 (un sixième du gain de simulation). La Figure 5.16 présente le profil de DCO<sub>2</sub> obtenu lors de la culture FH32 grâce au contrôleur et

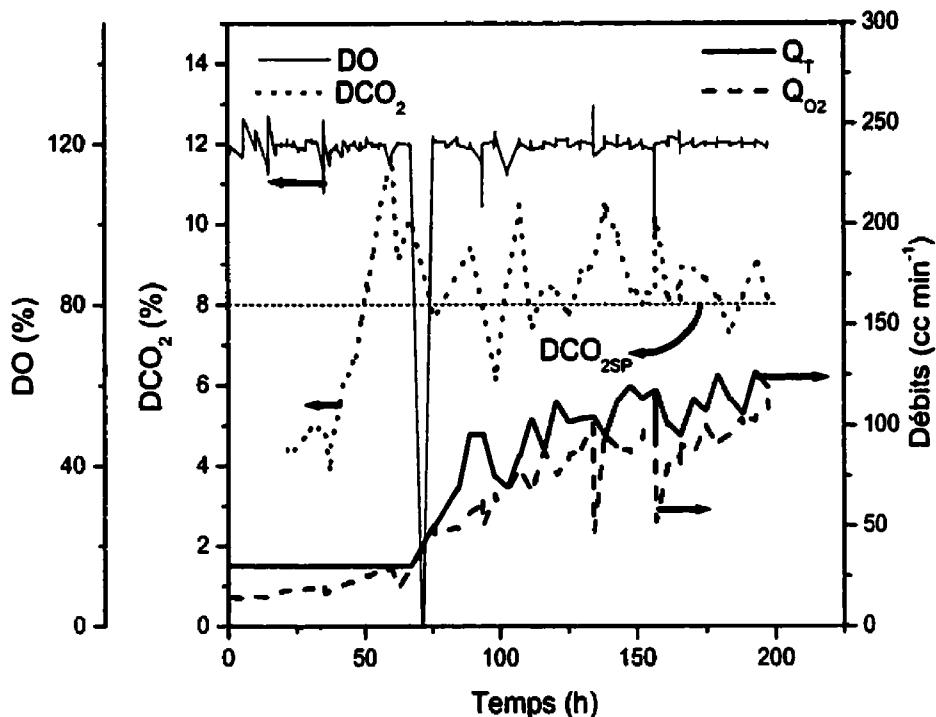
ces paramètres. L'action du contrôleur de DCO<sub>2</sub> augmente régulièrement le débit total alimenté (Q<sub>T</sub>) ce qui maintient le dioxyde de carbone dissous autour de la valeur du point de consigne (4%).

Lors de cette série de culture (FH32, FH33, FH34), un problème d'acquisition de données ne permet pas de présenter la composition du gaz de sortie du bioréacteur, pas plus que le CTR. La comparaison avec la concentration en CO<sub>2</sub> du gaz de sortie et le DCO<sub>2</sub> qui est disponible tel qu'estimé sur l'ordinateur de contrôle est donc impossible. Un autre événement indésirable est survenu lors de cette culture. L'alimentation en oxygène des trois bioréacteurs est interrompue durant environ deux heures un peu avant la 75<sup>e</sup> h de culture provoquant l'anoxie (DO = 0%) durant cette période. L'effet sur la culture est discuté au chapitre suivant.



**Figure 5.16 : Profil des concentrations des gaz dissous et des débits alimentés pour la culture FH32**

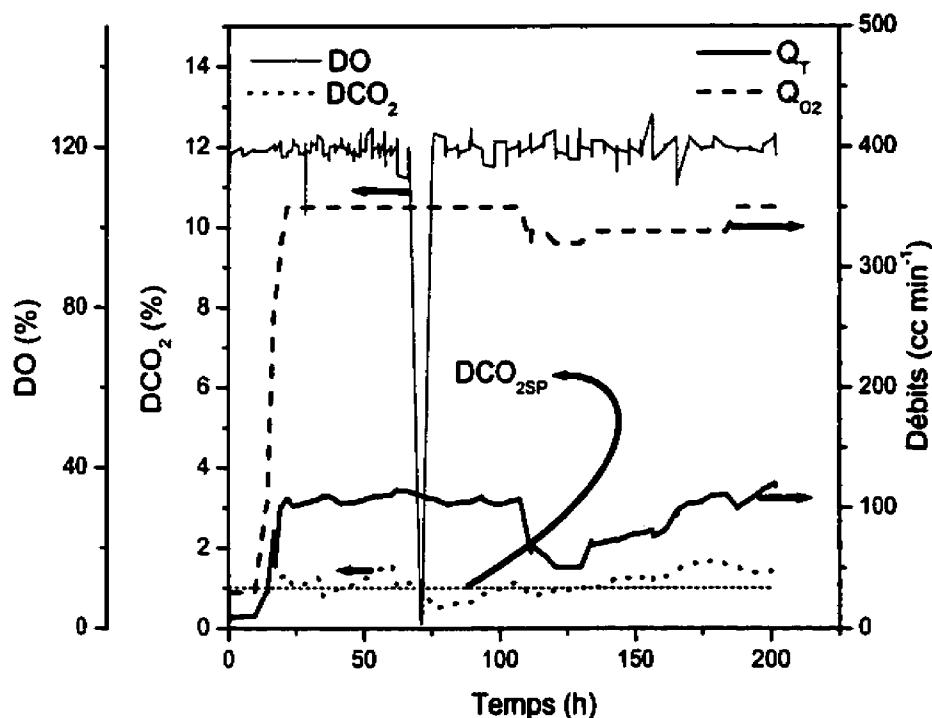
La Figure 5.17 montre le profil de DCO<sub>2</sub> lors de la culture FH33. Dans ce cas, le contrôleur oscille constamment et le DCO<sub>2</sub> varie autour de son point de consigne (8%). L'oscillation tend à diminuer au fil des cycles.



**Figure 5.17 : Profil des concentrations des gaz dissous et des débits alimentés pour la culture FH33**

La Figure 5.18 présente le profil du DCO<sub>2</sub> au cours de la culture FH34 dont le point de consigne est de 1% de DCO<sub>2</sub>. Le montage lors de cette culture est modifié de sorte à pouvoir alimenté un débit total maximal de 350 cc min<sup>-1</sup> au lieu de 200 cc min<sup>-1</sup>. Le contrôleur sature dès qu'il est mis en fonction. Pour maintenir le point de consigne de 1% de DCO<sub>2</sub>, un débit total supérieur à 350 cc

$\text{min}^{-1}$  est requis à la fin de la culture avec le système utilisé. Une valeur proche du point de consigne de  $\text{DCO}_2$  est tout de même atteinte.



**Figure 5.18 : Profil des concentrations des gaz dissous et des débits alimentés pour la culture FH34**

En comparant les oscillations du profil de  $\text{DCO}_2$  au débit total alimenté, on peut voir qu'il y a un lien. En effet, les oscillations du  $\text{DCO}_2$  sont les plus importantes (jusqu'à  $\pm 2\%$ ) lors de la culture FH33 (Figure 5.17) où le contrôleur est en état

cyclique tout au long de la culture. L'action du contrôleur fait varier le débit total parfois de plus de  $25 \text{ cc min}^{-1}$ , ce qui représente un ajustement de plus de 25% du débit total en une seule action. Ces oscillations sont moins importantes ( $\pm 1\%$ ) lorsque le débit total est augmenté de façon régulière comme lors de la culture FH32 (Figure 5.16). Enfin, les oscillations sont presque nulles lors de la culture FH34 où le contrôleur n'effectue aucune action et où le DCO<sub>2</sub> augmente lentement au cours de la culture. Les oscillations rapides du DCO<sub>2</sub> estimé par le modèle proviennent des variations dans le CO<sub>2</sub> de sortie qui faussent l'estimation faite du CPR par le CTR. En effet, quand le débit total alimenté augmente, le nouvel équilibre n'est pas instantané et le DCO<sub>2</sub> est lentement extrait hors du bioréacteur, faussant le CPR, estimé à partir CTR, d'une manière analogue à l'effet d'un changement de pH. Comme le modèle de DCO<sub>2</sub> utilise le CTR, son estimation est faussée ce qui explique une partie de l'oscillation observée. En fait, le DCO<sub>2</sub> réel est assurément plus stable et passe par une moyenne entre les oscillations.

Compte tenu des ressources matérielles utilisées et du temps disponible, les résultats obtenus sont satisfaisants. Le développement du contrôleur sans être une fin en soit est un progrès. Comme une seule action est effectuée à toutes les 4.5 h, l'ajustement des paramètres du contrôleur n'a pu être améliorée d'avantage.

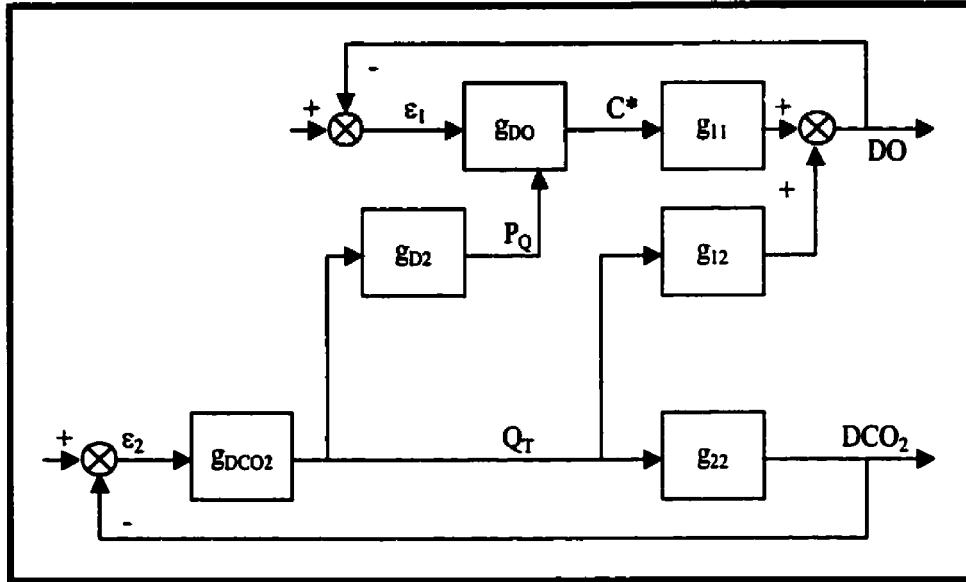
### 5.3.3 Découplage des boucles de commandes

Le paireage des variables manipulées ( $C^*$  et  $Q_T$ ) avec les variables contrôlées ( $DO$  et  $DCO_2$ ) a été fixé en fonction de l'équipement disponible et expliqué à la section 5.2.5. Une forte interaction existe entre le débit total alimenté et le procédé de transfert d'oxygène. La période d'échantillonnage de la boucle de commande d'oxygène dissous est plus rapide (10s) que la période d'échantillonnage de la boucle de commande de  $DCO_2$  ( $4\frac{1}{2}$  h i.e. 16200s). Par contre, bien que l'action du contrôleur de  $DCO_2$  soit peu fréquente, elle est importante. Le remplacement dans la loi de commande de l'estimateur du coefficient de transfert  $KLa_0$  par l'estimateur du coefficient de transfert réduit  $\alpha$  jumelé à une fonction reliant le  $KLa_0$  et le débit total ( $Q_T$ ) agit en quelque sorte comme un découleur des deux boucles de commande.

Le principe du découplage en contrôle de procédé multi-entrées multi-sorties (MIMO) est de compenser l'effet de l'action d'une boucle de commande sur une autre boucle. Le « découleur » modifie la sortie du contrôleur de la première boucle afin de compenser l'action de la seconde boucle sur la première.

Le principe utilisé est le même mais le mode d'action est un peu différent. L'effet du changement de débit total effectué par la boucle de  $DCO_2$  est compensé

directement dans le contrôleur de DO et non sur sa sortie. La Figure 5.19 illustre le diagramme bloc des deux boucles de commandes.



**Figure 5.19 : Diagramme bloc des boucles de commande de DO et de  $\text{DCO}_2$**

Les blocs  $g_{\text{DO}}$  et  $g_{\text{DCO}_2}$  représentent les fonctions de transfert des contrôleurs des gaz dissous. Les blocs  $g_{11}$  et  $g_{22}$  sont les fonctions de transfert du procédé entre  $C^*$  et DO et entre  $Q_T$  et  $\text{DCO}_2$  respectivement. Le bloc  $g_{12}$  représente la fonction de transfert du procédé entre  $Q_T$  et DO. Enfin, le bloc  $g_{\text{D}2}$  représente la fonction de transfert utilisée pour compenser l'effet de  $Q_T$  sur le transfert d'oxygène. La sortie de ce bloc ( $P_O$ ) est directement utilisée dans le contrôleur de DO. La Figure 5.16 de même que la Figure 5.17, déjà présentées, montrent que la boucle de DO est découplée de la boucle de  $\text{DCO}_2$ .

## 6.0 RÉSULTATS ET DISCUSSION

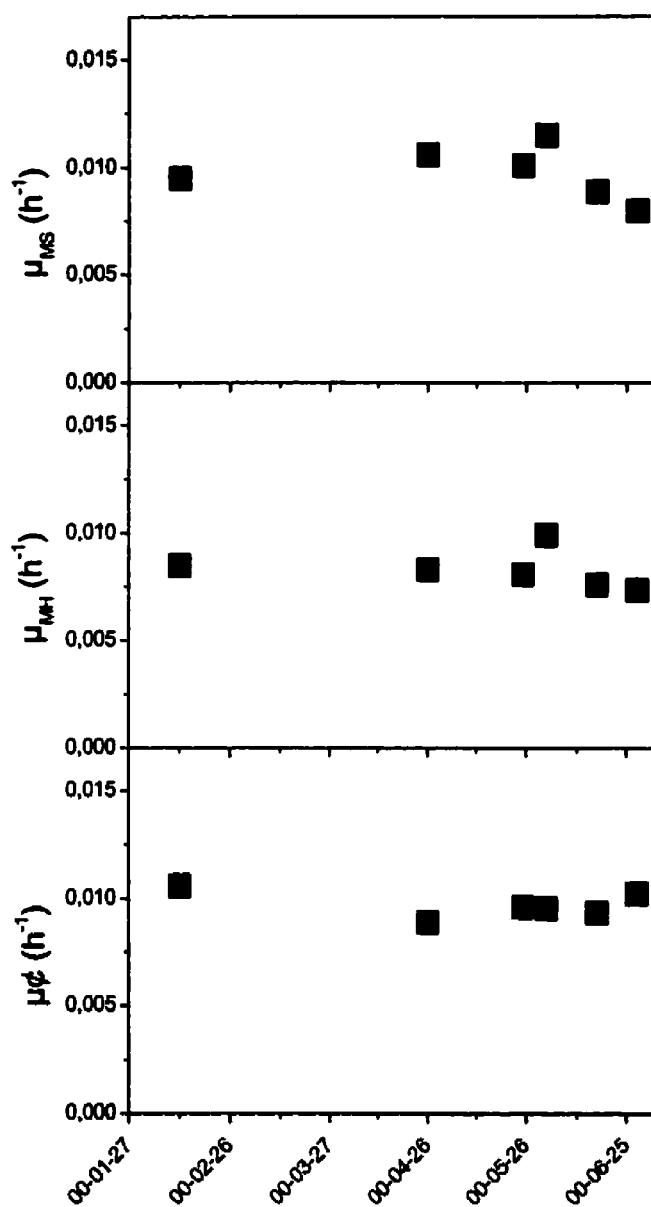
Ce chapitre présente les résultats des cultures effectuées lors de ce projet de recherche. La première section traite de la stabilité de la lignée cellulaire d'*Eschscholtzia californica* au cours des travaux. La seconde section présente les résultats de cultures effectuées en flacons agités avec différents types de bouchons. La troisième section est une synthèse des cultures effectuées en bioréacteur montrant les conditions particulières dans lesquelles chacune est réalisée. Les deux sections suivantes présentent respectivement l'effet de l'oxygène dissous et l'effet du dioxyde de carbone dissous sur la croissance des cellules d'*Eschscholtzia californica* en suspension. Enfin, la dernière section présente une synthèse de l'effet des gaz dissous sur la nutrition des cellules de cette espèce.

### 6.1 Stabilité de la lignée cellulaire

L'une des prémisses sur lesquelles s'appuient ce projet de recherche est que l'inoculum n'est pas un facteur de variation important. Ainsi, les cultures effectuées dans des séries d'expériences différentes sont comparables. Afin de vérifier que les caractéristiques de croissance de la lignée cellulaire ne changent pas au cours du projet de recherche, des cultures en flacons servent de témoins. Ces cultures témoins sont inoculées avec les même cellules que

les bioréacteurs et traités de façon identique tel que décrit à la section 4.4. La Figure 6.1 montre le taux de croissance des témoins en fonction de la date des cultures.

L'étude des cultures en bioréacteurs s'étend sur une période de cinq mois. Le taux de croissance est demeuré le même ( $0.01 \text{ h}^{-1}$  en biomasse sèche,  $0.0075 \text{ h}^{-1}$  en biomasse humide et  $0.01 \text{ h}^{-1}$  en nombre de cellules) tout au long de la durée de ces travaux et l'évolution de la lignée cellulaire n'est donc pas un facteur de variation. De plus, cette constance dans les taux de croissance des culture témoins confirme que la limitation en phosphate soit n'affecte pas le taux de croissance, soit le limite d'une manière identique tout au long de l'expérimentation.

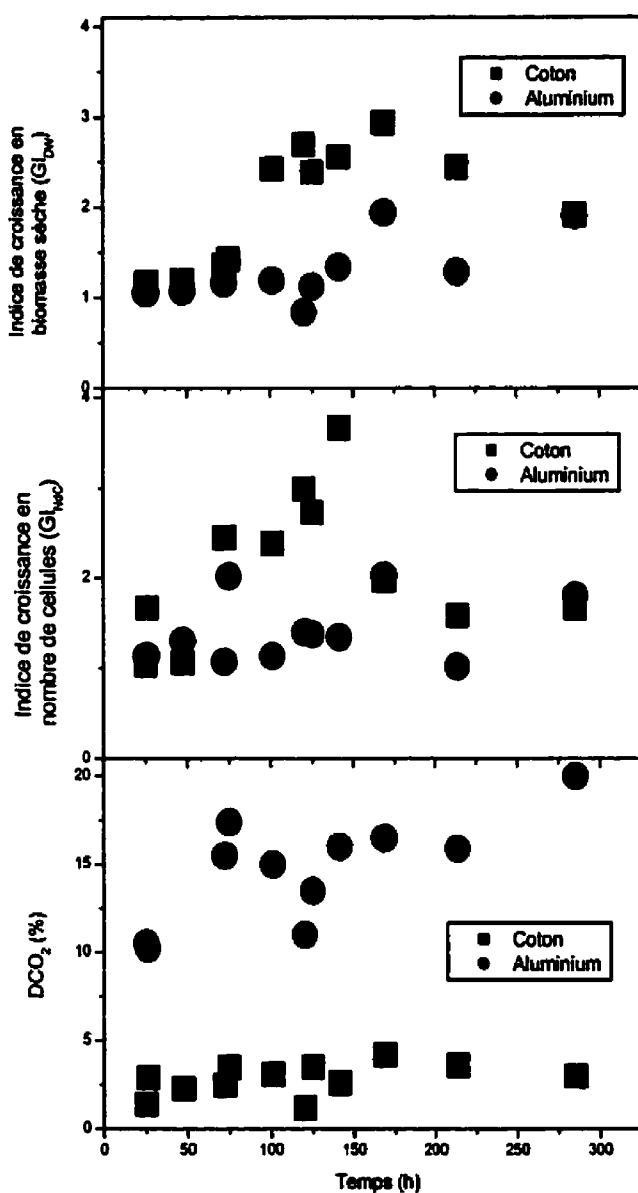


**Figure 6.1 : Taux de croissance en biomasse sèche, humide et en nombre de cellules des cultures témoins**

## 6.2 Effet des gaz dissous, cultures en flacons agités

Le type de bouchon utilisé pour fermer les flacons agités modifie l'environnement gazeux auquel les cellules sont exposées. Ainsi, des cultures sont effectuées en utilisant des bouchons de coton et d'aluminium (papier d'aluminium triple).

La sonde à DCO<sub>2</sub> est utilisée pour mesurer le niveau de dioxyde de carbone dissous dans les flacons. La procédure est décrite à la section 4.2. Comme les flacons utilisés ont un volume utile d'environ 240 ml, une fois la mesure de DCO<sub>2</sub> effectuée (ce qui requiert de pomper environ 100 ml), la culture est inutilisable pour la suite de l'expérience. Les résultats de ces expériences sont présentés à la Figure 6.2 dont chacun des points est un flacon différent. L'utilisation de l'indice de croissance pour présenter les résultats permet de ramener chacun des flacons sur la même base. L'étude compare deux types de bouchons, et chaque paire de flacons (l'un avec bouchon de coton, l'autre avec bouchon d'aluminium) est inoculée à partir d'un même flacon mère et récolté le même jour. Comme les flacons mères ne sont pas absolument identiques, la courbe d'indice de croissance n'est pas aussi nette que lorsque la même culture est suivie.



**Figure 6.2 : Indices de croissance et DCO<sub>2</sub> en flacon agités selon le type de bouchon utilisé**

Ces résultats indiquent une nette tendance. En effet, l'indice de croissance en biomasse sèche et en nombre de cellules des cultures avec un bouchon de coton est toujours largement supérieur à celui des cultures avec un bouchon d'aluminium. En fait, avec un bouchon d'aluminium, l'indice de croissance est généralement de 1 ce qui indique qu'il n'y a pas de croissance. Ces résultats s'expliquent par les mesures de DCO<sub>2</sub> effectuées. Les flacons fermés d'un bouchon d'aluminium accumulent de hauts niveaux de CO<sub>2</sub>. Les flacons avec bouchons d'aluminium présentent un niveau de DCO<sub>2</sub> supérieur à 10%, après seulement 24h, et qui peut atteindre 20% comparativement aux flacons avec bouchon de coton dont le DCO<sub>2</sub> varie entre 1.2 et 4.2%.

L'accumulation du CO<sub>2</sub> dans les flacons avec bouchon d'aluminium est causée par l'étanchéité de celui-ci. L'inhibition de la croissance ne doit donc pas être attribuée uniquement à l'effet du haut niveau de DCO<sub>2</sub>. Considérant le système complètement fermé, le niveau d'oxygène diminue au fil de la culture. Grâce aux mesures de DCO<sub>2</sub>, il est possible d'estimer l'oxygène dissous résiduel dans le flacon au moment de l'échantillonnage.

Les quantités d'O<sub>2</sub> et de CO<sub>2</sub> dans les deux phases du flacon sont initialement les mêmes que l'air soit 21% et 0.035%, le CO<sub>2</sub> initial est négligé. La mesure de DCO<sub>2</sub> permet de calculer le CO<sub>2</sub> total produit dans le flacon puisque le système est fermé, les phases liquides et gazeuses sont en équilibre. Les équations

suivantes permettent de calculer le CO<sub>2</sub> qui se trouve dans chacune des phases.

$$CO_{2L} = \frac{DCO_2}{100} V_L K_H \quad (6.1)$$

$$CO_{2G} = \frac{DCO_2}{100} \frac{V_H}{RT} \quad (6.2)$$

Comme le CO<sub>2</sub> présent dans la phase liquide représente environ 0.1% du CO<sub>2</sub> dans la phase gazeuse, cette quantité est négligée dans le bilan sur chacun des deux gaz. Le développement ci-après s'ensuit où les indices i et f réfèrent aux quantités initiales et finales.

$$O_{2i} = 0.21 \frac{V_H}{RT} \quad (6.3)$$

$$O_{2f} = O_{2i} - \frac{CO_{2G}}{RQ} \quad (6.4)$$

$$\frac{DO_f}{100} = \frac{O_{2f}}{\frac{V_H}{RT}} \left( \frac{1}{0.21} \right) \quad (6.5)$$

Le facteur 1/0.21 sert à convertir la DO sur la base que 100% est l'équilibre avec l'air. En remplaçant les équations (6.1) à (6.4) dans l'équation (6.5) et simplifiant l'expression on obtient :

$$DO_f = \left( 21 - \frac{DCO_2}{RQ} \right) \left( \frac{1}{0.21} \right) \quad (6.6)$$

Le quotient respiratoire (RQ) est inconnu. Cependant, il est généralement supérieur à un pour les cellules de plantes ce qui signifie qu'un peu plus d'une molécule de CO<sub>2</sub> est produite de l'utilisation d'une molécule d'O<sub>2</sub>. En utilisant tout de même un RQ de 1, la Figure 6.3 présente le résultat du calcul pour les cultures effectuées avec un bouchon d'aluminium.

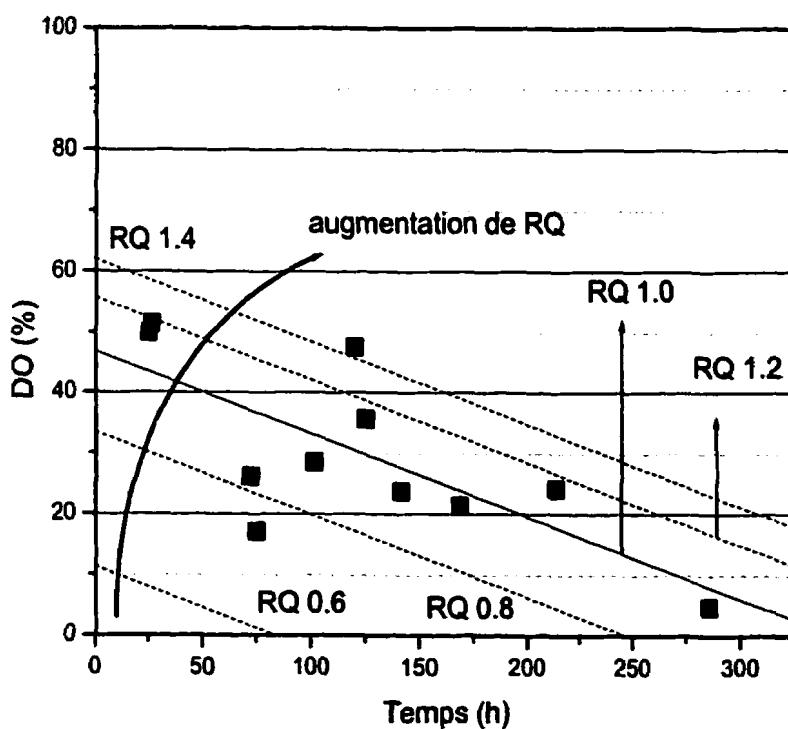


Figure 6.3 : Estimé de la DO dans les flacons avec bouchons d'aluminium

Apparemment, la DO estimée diminue d'une façon linéaire au cours des cultures en flacons couvertes de bouchons d'aluminium. Pour un RQ de 1, le niveau d'oxygène dissous après 24 h est de 50%. À 300h il approche les 5%. Si le RQ réel est supérieur à un, la DO estimée est supérieure comme l'illustre les droites pointillées représentant le profil de DO estimé pour des RQ de 0.6, 0.8, 1.2, et 1.4. Le Tableau 6.1 présente une synthèse des données produites par l'équipe de recherche sur les flacons agités.

**Tableau 6.1 : Environnement gazeux des flacons en fonction du type de bouchon**

Bouchon	Plage de DO mesurée	Plage de DCO <sub>2</sub> mesuré	Référence
Coton	60-40%	--	Aubry, 1995
	80-20%	--	Pépin, 1996
	--	1-4%	
Aluminium	50-5%	10-20%	

Ces résultats indiquent que pour les cultures d'*Eschscholtzia californica* en flacons agités, le bouchon de coton offre de meilleures conditions de culture que le bouchon d'aluminium. Quant à déterminer si l'accumulation de DCO<sub>2</sub> ou le manque de DO cause l'inhibition de la croissance avec un bouchon d'aluminium, cette étude en flacons ne peut y parvenir.

### **6.3 Sommaire des cultures en bioréacteur**

Afin de situer chacune des cultures effectuées en bioréacteur dans le cadre de ce projet, le Tableau 6.2 présente une vue d'ensemble des travaux réalisés et des conditions d'opération spécifiques à chacune des séries de culture.

**Tableau 6.2 : Sommaire des conditions d'opération et du suivi des cultures en biofertilisant**

Les cultures en bioréacteurs sont effectuées en séries de 2 à 4 cultures. Les cultures d'une même série sont inoculées au même moment, avec un inoculum homogène préparé tel que décrit à la section 4.3. Pour la série 2 et les suivantes, l'inoculum est suivi les deux jours précédent son utilisation afin que la concentration en ions ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) soit supérieure à 1 mM. La culture FH07 est effectuée sans véritable contrôle de DO.

Les séries 1 à 4 portent sur l'étude de l'effet de l'oxygène dissous sur la croissance. Chacune des cultures de ces séries est réalisées à une DO constante, à différents points de consigne. Les résultats de ces cultures sont présentés et analysés à la section 6.4. Les séries A, B, et C portent sur l'étude de l'effet du dioxyde de carbone dissous. Les cultures de ces séries sont opérées à différents niveaux de DCO<sub>2</sub>, avec une DO identique et constante. La section 6.5 présente et traite les résultats de ces cultures. L'annexe C contient le détail de chacune de ces cultures.

Les cultures sont effectuées en mode cuvée alimentée. Le Tableau 6.2 montre les nutriments ajoutés aux cultures. Le nitrate étant fourni en quantité suffisante avec le milieu B5 (25mM) il n'est ajouté qu'à la toute fin de la culture FH08 qui est suivie exceptionnellement plus longtemps. De même, aucun ajout supplémentaire de glucose n'est fait puisqu'il n'est jamais totalement consommé.

Le contrôleur d'oxygène dissous est utilisé pour toutes les cultures. Par contre, le contrôleur de DCO<sub>2</sub> étant entièrement conçu lors de cette étude, il n'est pas disponible au début des travaux. Son utilisation débute lors des premières cultures portant sur l'étude du DCO<sub>2</sub>. Le modèle de DCO<sub>2</sub> est validé au cours des cultures FH13 à FH21. Il est appliqué à toutes les cultures sans exceptions; en ligne à l'aide du système de commande ou à rebours à l'aide des données enregistrées selon le cas.

## 6.4 Effet de l'oxygène dissous

### 6.4.1 Résultats

Les taux de croissance spécifiques ( $\mu$ ) des cultures des séries 1 à 4 sont présentés à la Figure 6.4 pour la biomasse sèche  $X_{MS}$ , la biomasse humide  $X_{MH}$  et le nombre de cellules  $X_{Ndc}$ . De même, les temps de division sont présentés à la Figure 6.5. Les taux de croissance et les temps de division de chacune des séries sont identifiées d'un symbole particulier pour souligner que les résultats d'une même série présentent une tendance plus claire.

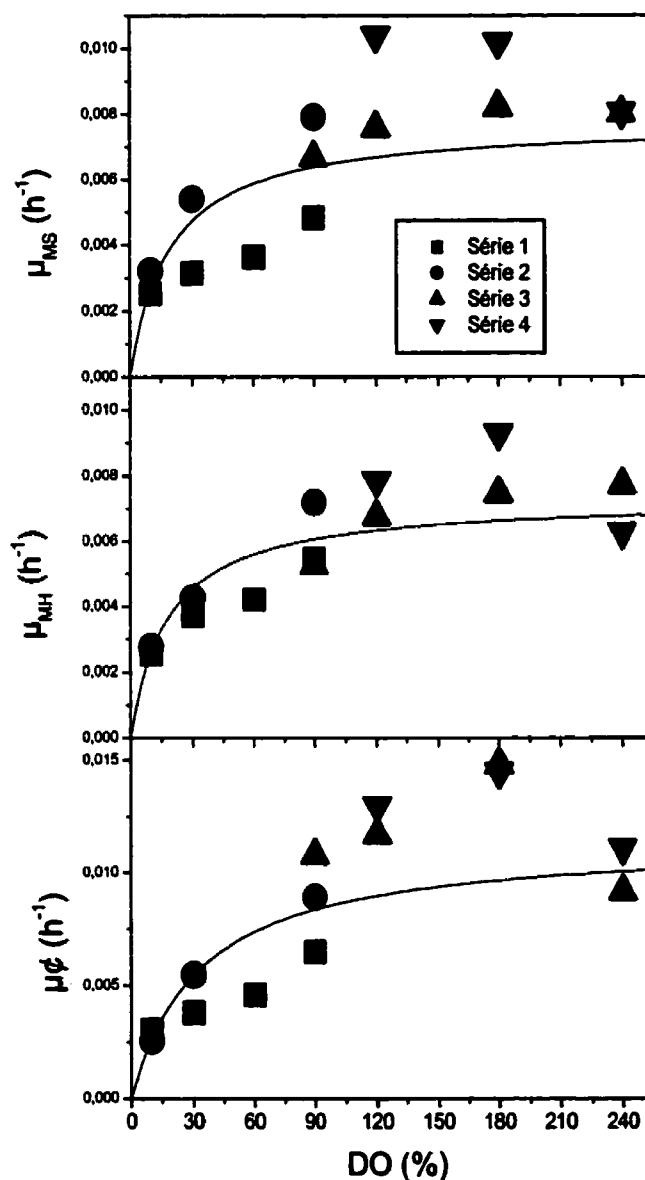


Figure 6.4 : Taux de croissance spécifiques en fonction de la DO

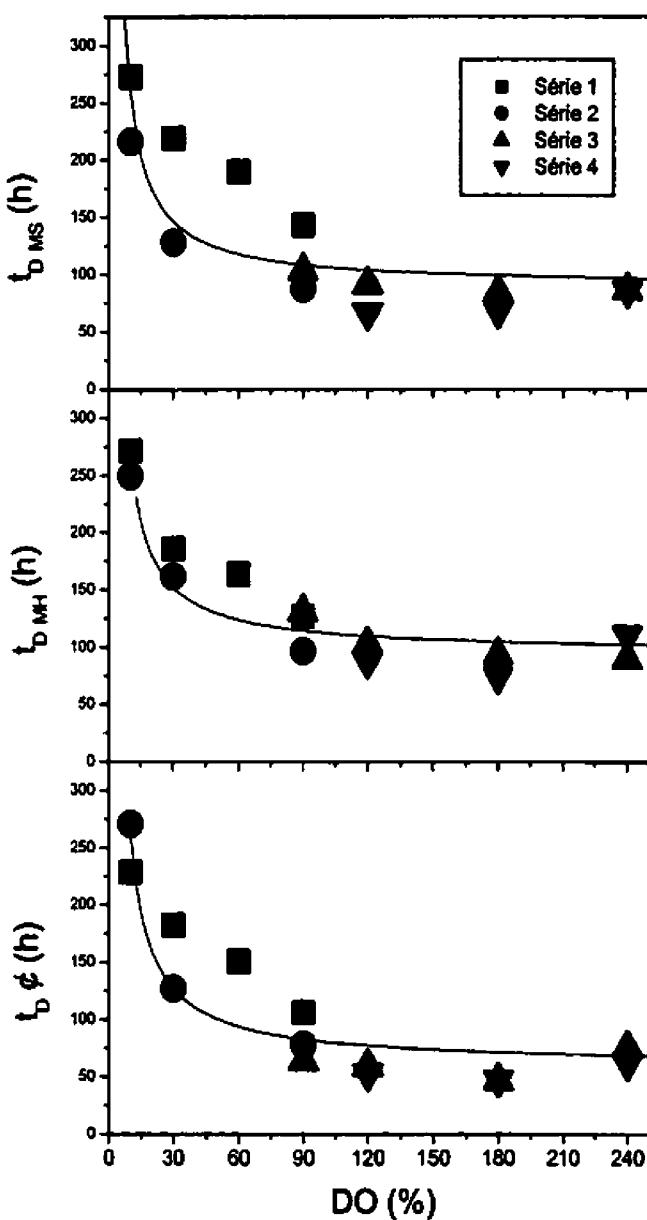


Figure 6.5 : Temps de division en fonction de la DO

Les taux de croissance de la première série sont légèrement inférieurs à ceux de la seconde, et ce pour les trois mesures de croissance effectuées. Ces résultats s'expliquent par la mise au point de la méthode de culture lors de la première série. Ainsi, le traitement de l'inoculum est différent pour cette série seulement. Le suivi du NH<sub>4</sub> de l'inoculum n'a pas été effectué comme pour les autres séries. L'inoculum utilisé n'est donc pas d'une aussi bonne qualité pour la croissance lors de son transfert en bioréacteurs. De plus, le contrôle de l'oxygène dissous n'est pas aussi efficace pour les cultures de la série 1 que pour les suivantes. Il est possible que la croissance soit affectée négativement par les variations de la concentration en oxygène dissous.

Les séries 3 et 4 explorent l'effet de la DO à des niveaux qui dépassent la saturation avec l'air (100%). Elles sont effectuées dans les mêmes conditions sauf qu'à la quatrième série est appliqué le contrôleur de DCO<sub>2</sub> développé.

#### 6.4.2 Cinétique

L'effet de la concentration en oxygène dissous sur le taux de croissance suggère une cinétique de Monod.

$$\mu = \frac{\mu_{max}S}{K_s + S} \quad (6.7)$$

Sur la Figure 6.4 sont tracées des courbes à l'aide de l'équation de Monod pour chacune des mesures de croissance effectués. Les paramètres utilisés apparaissent au Tableau 6.3. De même, le temps de division calculé avec le  $\mu$  de Monod est tracé sur la Figure 6.5. Apparemment, cette cinétique simple s'applique au taux de croissance des cellules par rapport à la concentration d'oxygène dissous.

**Tableau 6.3 : Paramètres du modèle de Monod**

<b>Mesure de croissance</b>	<b>Modèle de Monod</b>		
	$\mu_{MAX} (h^{-1})$	$K_s (\%DO)$	$r^2$
Biomasse sèche ( $X_{MS}$ )	0,0077	19	0,69
Biomasse humide ( $X_{MH}$ )	0,0073	18	0,88
Nombre de cellules ( $X_C$ )	0,0114	33	0,84

## 6.5 Effet du dioxyde de carbone dissous

Cette section présente les résultats des cultures des séries A, B et C portant sur l'étude de l'effet de la concentration en dioxyde de carbone dissous. Ces cultures sont effectuées en contrôlant la DO au même niveau pour les cultures d'une même série, mais différents niveaux de DCO<sub>2</sub>. La série A est effectuée à 60% de DO alors que les séries B et C le sont à 120%. La plage de DCO<sub>2</sub> explorée en bioréacteur s'étend de 1 à 19%.

Afin d'atteindre un niveau aussi élevé que 19% de DCO<sub>2</sub>, l'ajout de CO<sub>2</sub> dans le gaz d'alimentation est requise lors de la culture FH28. Malheureusement, le moniteur de CO<sub>2</sub> analysant les gaz de sortie ne permet pas de mesurer des concentrations supérieures à 10% ce qui fait que le modèle de DCO<sub>2</sub> ne peut estimer cette concentration. La sonde à DCO<sub>2</sub> est donc utilisée et la moyenne des lectures obtenues (quatre lectures sur 200h) est de 19% ±1.25% (écart moyen). De même, pour atteindre un niveau de 1%, un débit total supérieur à 200 cc min<sup>-1</sup> est requis ce qui est obtenu en modifiant le montage par l'ajout d'un débitmètre en parallèle.

Les Figure 6.6 et Figure 6.7 présentent respectivement les taux de croissance spécifiques et les temps de division en fonction de la concentration en DCO<sub>2</sub> contrôlée durant la culture. Il semble que la concentration en dioxyde de carbone dissous a peu d'effet apparent sur la croissance des cellules d'*Eschscholtzia californica*.

Les taux de croissance spécifiques de même que les temps de division de toutes les cultures effectuées en bioréacteurs sont réunis sur les Figure 6.8 et Figure 6.9.

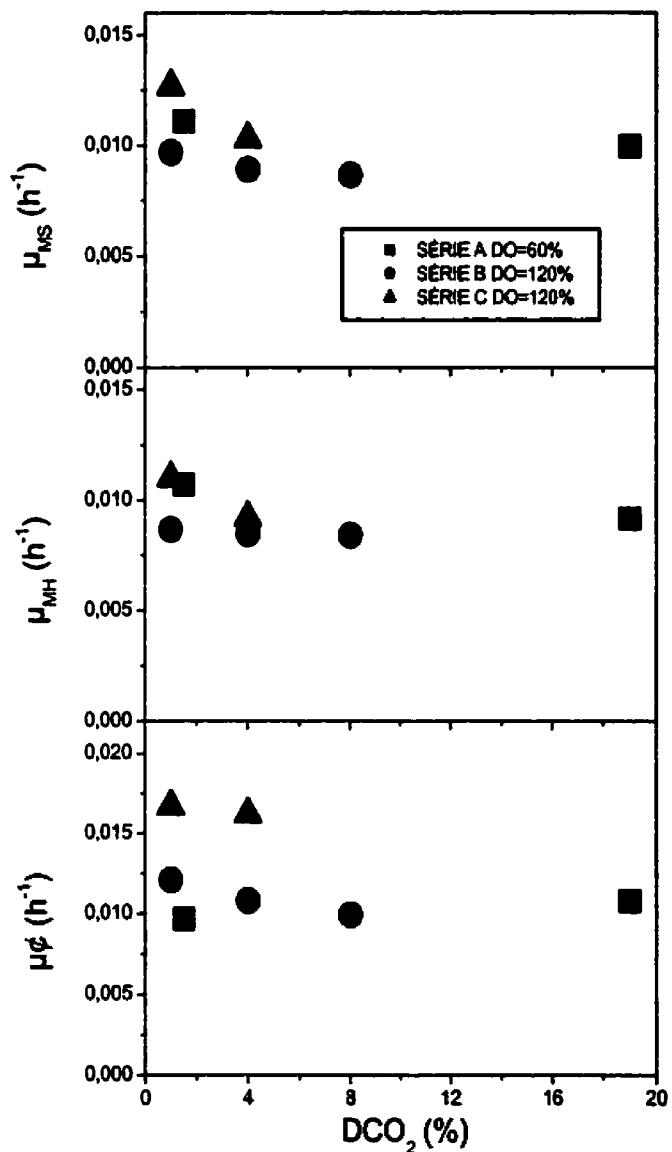


Figure 6.6 : Taux de croissance spécifique en fonction du  $\text{DCO}_2$

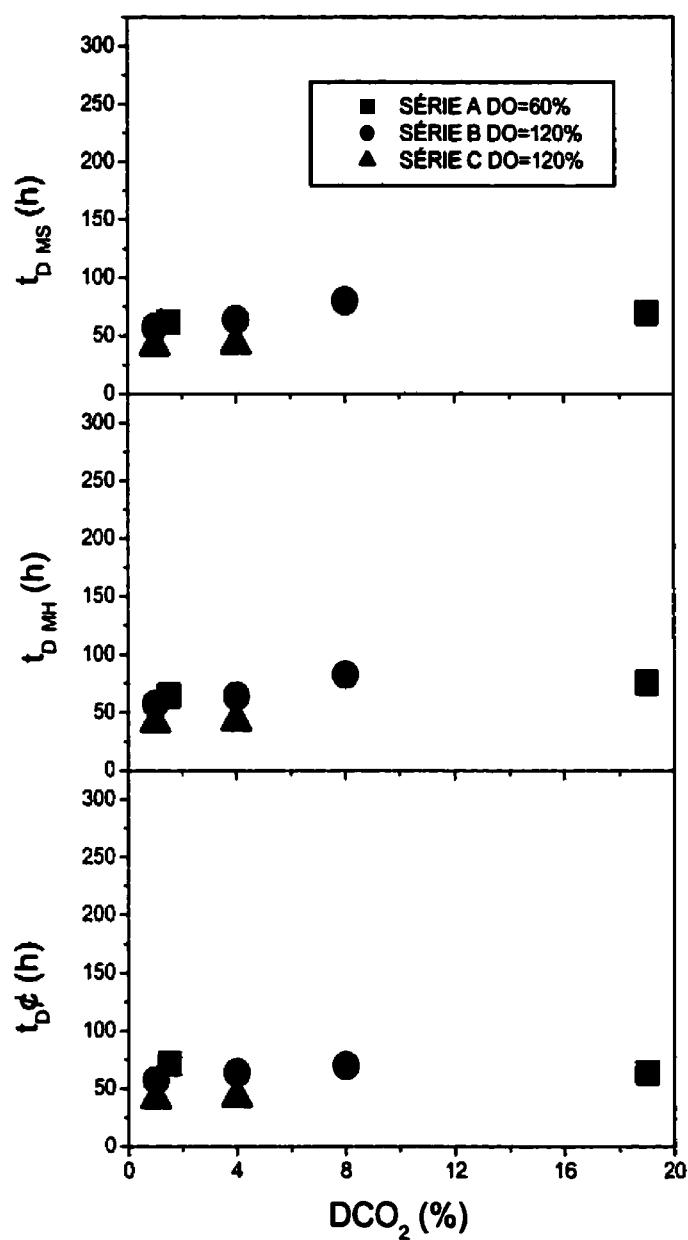


Figure 6.7 : Temps de division en fonction du  $\text{DCO}_2$

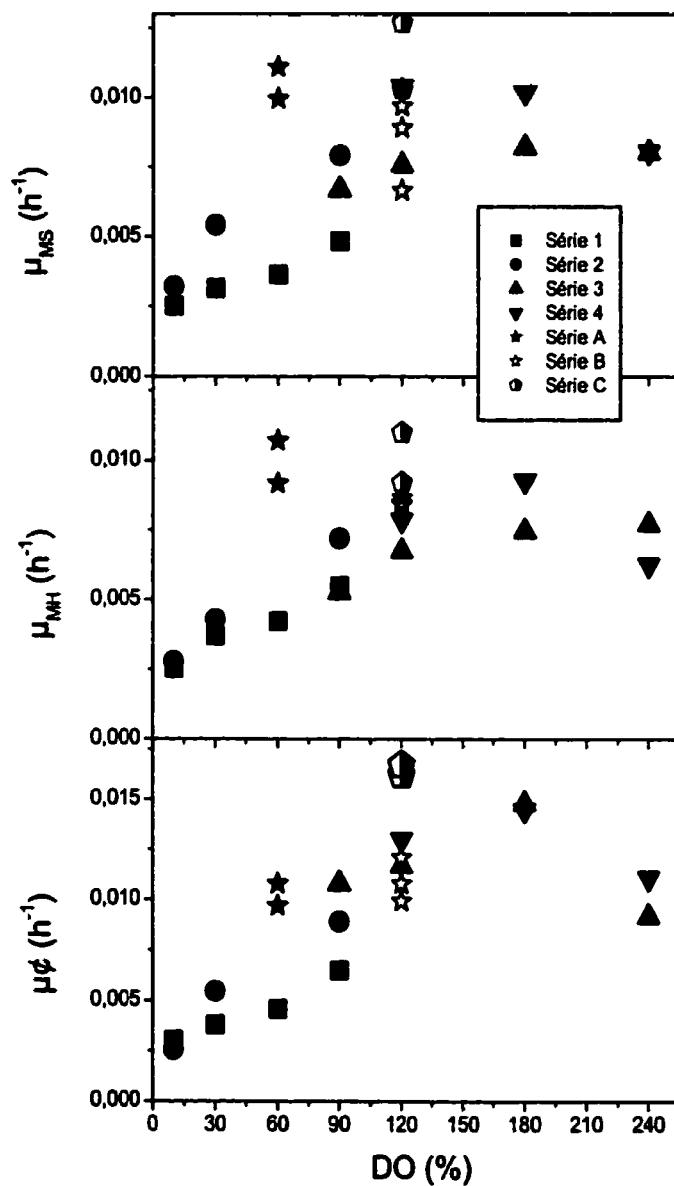


Figure 6.8 : Taux de croissance en fonction de la DO pour toutes les cultures

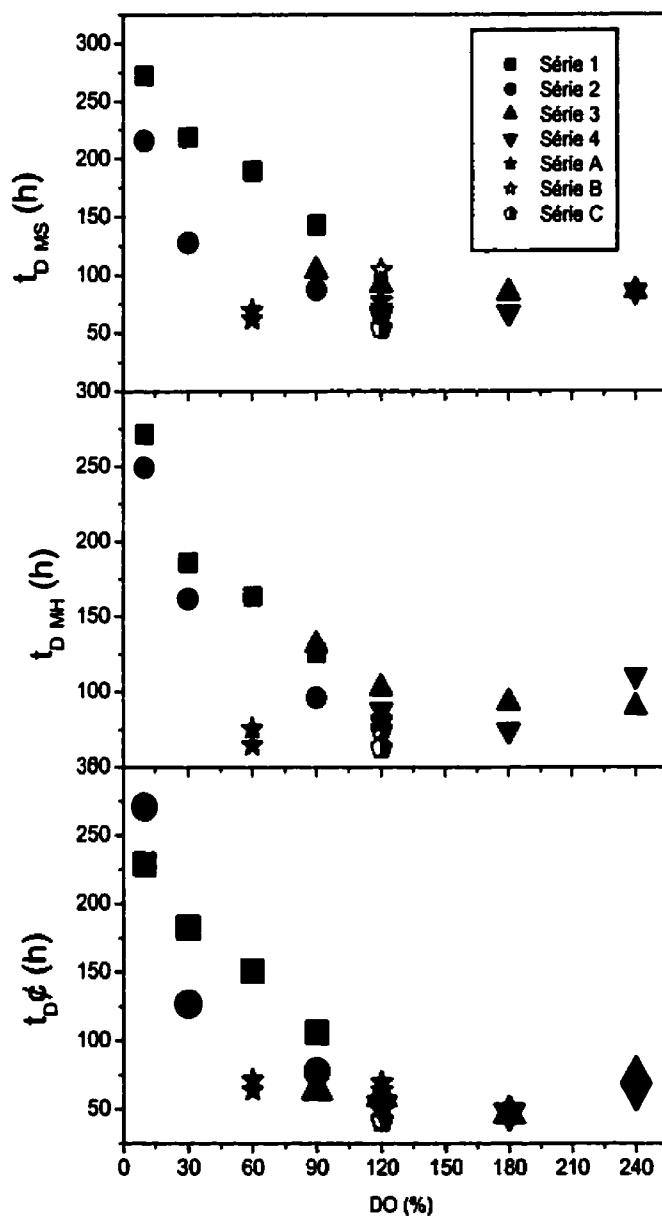


Figure 6.9 : Temps de division en fonction de la DO pour toutes les cultures

Il apparaît que le contrôle du DCO<sub>2</sub> à niveau constant a un effet positif sur la croissance. Les résultats de chacune des séries effectuées avec contrôle de DCO<sub>2</sub> (4, A, B et C) sont individuellement comparées ci-après aux cultures sans contrôle de DCO<sub>2</sub>.

Il est important de rappeler que la série de cultures 4 même si elle avait pour but l'étude de l'oxygène dissous a été effectuée avec le contrôleur de DCO<sub>2</sub>, puisqu'il était disponible. Le taux de croissance en biomasse sèche des cultures de la série 4 est supérieur à celui des cultures de la série 3, en omettant les cultures à 240% de DO puisque les limites physiques du système de culture sont atteintes. L'augmentation du taux de croissance, que provoque le contrôle du DCO<sub>2</sub>, pour les cultures à DO de 120% et de 180% est plus remarquable en biomasse sèche qu'en biomasse humide ou en nombre de cellules.

Par ailleurs, on observe que le taux de croissance des cultures de la série A effectuées à DO 60% (FH27, DCO<sub>2</sub> 1.5% et FH28 DCO<sub>2</sub> 19%) est nettement plus élevé que celui de la culture FH11 (DO 60%) effectuée sans contrôle de DCO<sub>2</sub>. De même, la tendance exhibée par les cultures de la série 2 (DO 10%, 30% et 90% sans contrôle de DCO<sub>2</sub>) suggère un taux de croissance en biomasse sèche d'environ  $0.007 \text{ h}^{-1}$  à 60% par interpolation linéaire, ce qui est nettement inférieur au taux de croissance moyen de  $0.01 \text{ h}^{-1}$  des cultures FH27 et FH28 effectuées avec contrôle de DCO<sub>2</sub>.

Les cultures de la série B (DO 120% et DCO<sub>2</sub> 1%, 4% et 8%) ne présentent pas d'augmentation apparente de leur taux de croissance par rapport à la culture effectuée sans contrôle de DCO<sub>2</sub>, au même niveau d'oxygène dissous. Cependant, ces cultures (FH32, FH33 et FH34) dont les profils de DO sont présentées aux figures 5.16, 5.17 et 5.18 ont souffert d'anoxie durant deux heures aux environs de la 75<sup>e</sup> heure de culture.

L'anoxie, même pour une période aussi courte que 120 minutes a un effet négatif remarquable sur la croissance des cellules en suspensions quand ces cultures sont comparées à celles de la série C dont les conditions sont identiques, hormis le manque d'oxygène dissous.

Enfin, les taux de croissance spécifiques des cultures de la série C (DO 120%, DCO<sub>2</sub> 1% et 4%) sont les meilleurs obtenus pour l'ensemble des cultures réalisées lors de cette étude. Le taux de croissance spécifique en biomasse sèche de la culture effectuée à 120% de DO sans contrôle de DCO<sub>2</sub> (série 3, culture FH21) est de 0.0076 h<sup>-1</sup>. Les autres cultures effectuées à 120% de DO utilisent le contrôleur de DCO<sub>2</sub> (culture FH31, série 4 et cultures FH35 et FH37, série C). Les taux de croissance en biomasse sèche de ces trois cultures sont respectivement 0.010 h<sup>-1</sup>, 0.010h<sup>-1</sup> et 0.013h<sup>-1</sup>. La moyenne présente une augmentation de plus de 45% du taux de croissance. L'augmentation est de

38% pour le taux de croissance en biomasse humide et de 31% pour le taux de croissance en nombre de cellules.

En résumé, ces résultats suggèrent une cinétique de Monod pour la dépendance du taux de croissance spécifique des cellules d'*Eschscholtzia californica* cultivées en suspension par rapport à la concentration d'oxygène dissous. D'autre part, la concentration en DCO<sub>2</sub> ne semble pas avoir d'effet sur le taux de croissance de ces cellules. Par contre, le contrôle du DCO<sub>2</sub> semble avoir un impact positif important (de l'ordre de 40%) sur les taux de croissance des cellules d'*Eschscholtzia californica*. Cet effet positif est observé pour des DO de 60%, 120% de même que 180%.

## 6.6 Effet de la DO et du DCO<sub>2</sub> sur la nutrition

Cette section présente les résultats de l'analyse nutritionnelle effectuée pour chacune des cultures. L'assimilation spécifique, qN<sub>i</sub>, en nombre de cellules et en biomasse sèche de chacun des nutriments mesurés est analysé individuellement dans la première section. À la seconde section sont présentés et analysés les rendements apparents en nombre de cellules et en biomasse sèche pour les nutriments ( $Y_{X_i/N_i}$ ).

### 6.6.1 Assimilation spécifique des nutriments

Les figures 6.10 à 6.29 présentent les taux d'assimilation spécifiques des principaux nutriments consommés par les cultures selon la DO, le nitrate, l'ammonium, le glucose, l'oxygène ainsi que les taux de production spécifique de CO<sub>2</sub>. L'annexe D réuni les figures représentant l'assimilation des nutriments qui ne sont pas présentés dans le chapitre (chlore, sulfate, sodium, potassium, magnésium et calcium).

Le premier nutriment abordé est le nitrate (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>). La Figure 6.10 présente son assimilation spécifique en nombre de cellules (NdC) pour les cultures dont la DO est inférieure à 100%. Pour les cultures dont la DO est supérieure à 100%, la Figure 6.11 présente le même calcul. L'assimilation spécifique du nitrate par rapport à la biomasse sèche (X<sub>MS</sub>) est présenté aux figures 6.12 et 6.13.

On observe que l'assimilation spécifique du nitrate en début de culture augmente légèrement avec la concentration d'oxygène dissous. Outre les cultures à DO 10%, l'assimilation spécifique du nitrate en début de culture se situe entre 1.25 et 2.5 mmol j<sup>-1</sup> 10<sup>-9</sup>%. Elle décroît ensuite jusqu'à 0.5 mmol j<sup>-1</sup> 10<sup>-9</sup>% entre 150 et 250 h de culture. La décroissance semble plus lente pour les cultures à faibles DO (10%, 30% et 60% sans contrôle de DCO<sub>2</sub>), ce qui reflète la croissance plus lente de ces cultures par rapport aux cultures à DO plus élevées ou avec contrôle de DCO<sub>2</sub> à DO de 60%.

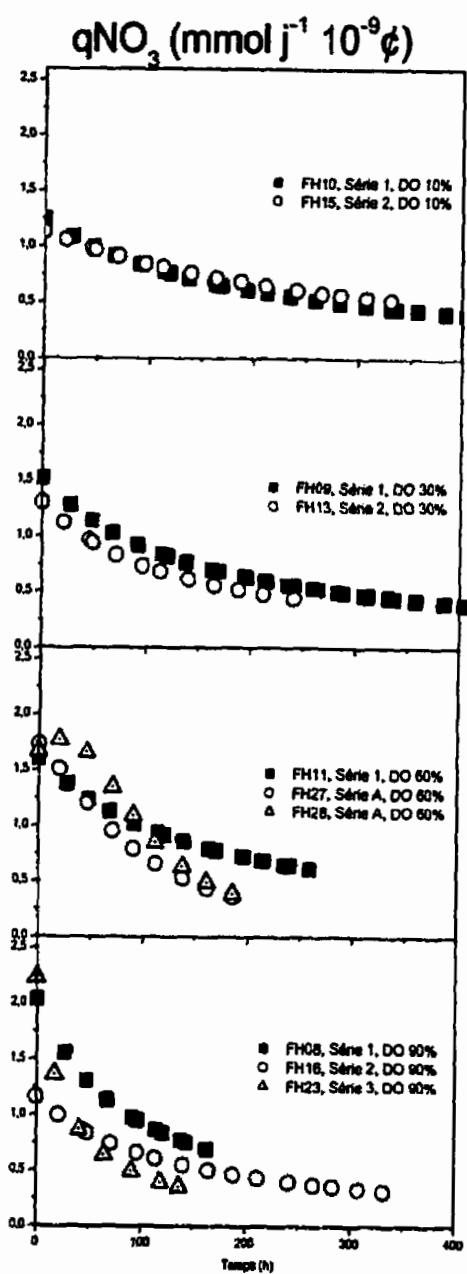
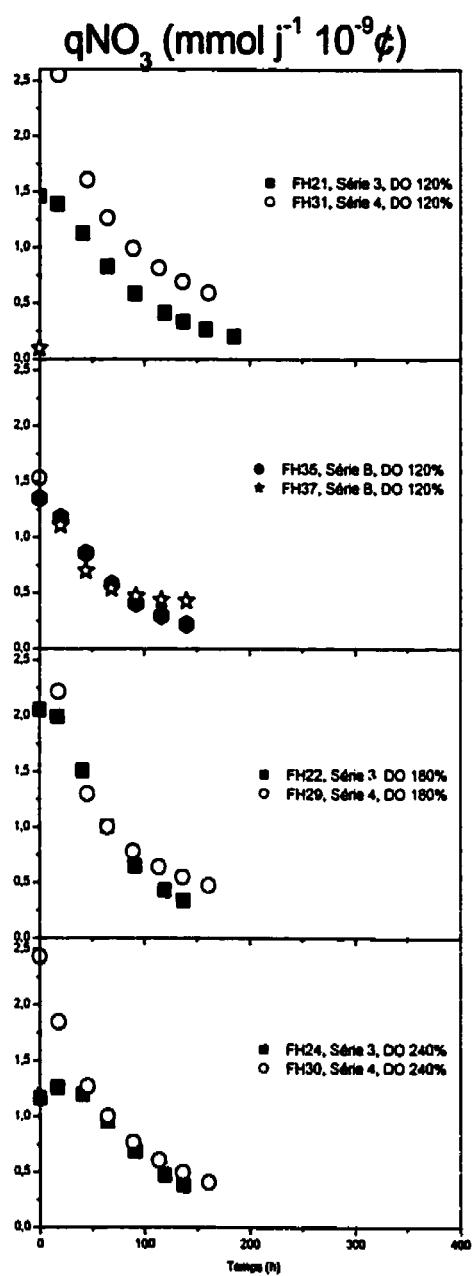
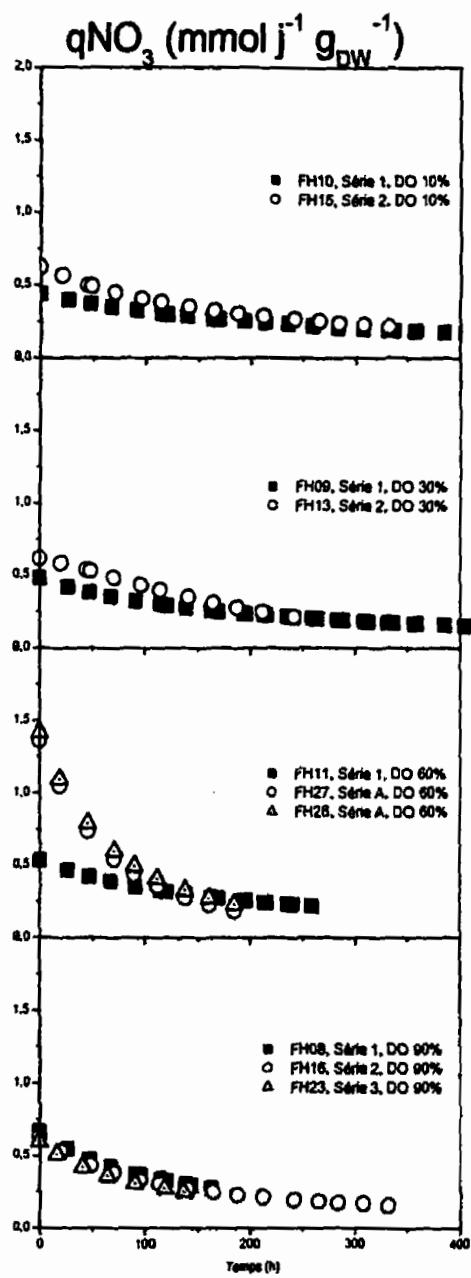


Figure 6.10 : Assimilation spécifique du nitrate en NdC, DO < 100%



**Figure 6.11 : Assimilation spécifique du nitrate en NdC, DO > 100%**



**Figure 6.12 : Assimilation spécifique du nitrate en  $X_{\text{MS}}$ , DO < 100%**

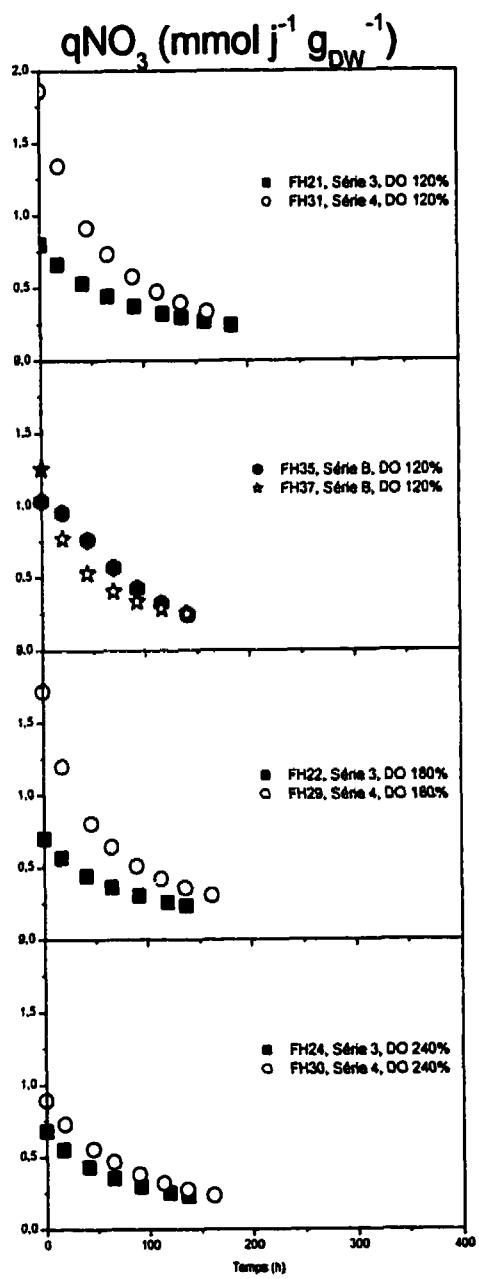


Figure 6.13 : Assimilation spécifique du nitrate en  $X_{\text{MS}}$ , DO > 100%

Ici encore on observe un profil d'assimilation similaire à celui présenté pour le nombre de cellules sur la plage de DO testée. En considérant d'abord seulement les cultures sans contrôle de DCO<sub>2</sub> (FH08 à FH24), ce taux d'assimilation spécifique pour les cultures à DO jusqu'à 60% (environ 0.5 mmol j<sup>-1</sup> g<sub>DW</sub><sup>-1</sup> en début de culture) est inférieur à celui observé pour les cultures à DO de 90% et plus (0.75 mmol j<sup>-1</sup> g<sub>OW</sub><sup>-1</sup>). En comparant les résultats des cultures effectuées avec contrôle de DCO<sub>2</sub> (à partir de FH27) par rapport à celles effectuées sans contrôle de DCO<sub>2</sub>, l'assimilation spécifique du nitrate en biomasse sèche augmente d'une façon remarquable (voir les cultures FH27 et FH28 par rapport à FH11 à la Figure 6.12 ou encore les cultures FH31, FH35 et FH37 par rapport à FH21 Figure 6.13).

En résumé, l'assimilation spécifique du nitrate présente une faible augmentation pour les cultures effectuées à DO 90% et plus. Le contrôle de DCO<sub>2</sub> semble avoir comme effet d'augmenter l'assimilation spécifique du nitrate en biomasse sèche.

La Figure 6.14 et la Figure 6.15 présentent l'assimilation en nombre de cellules de l'ammonium (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>). La Figure 6.16 et la Figure 6.17 présentent l'assimilation spécifique de l'ammonium en biomasse sèche.

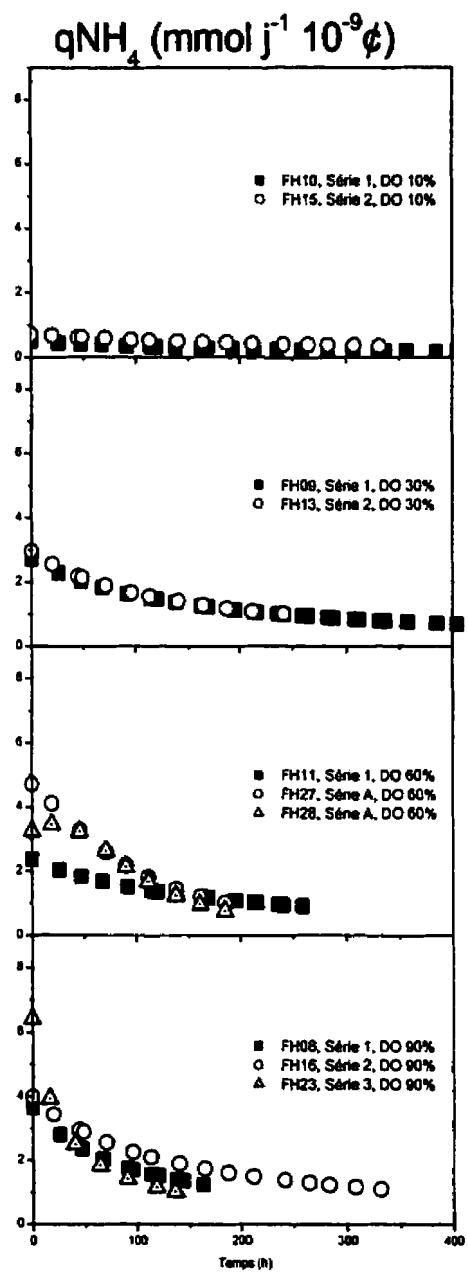


Figure 6.14 : Assimilation spécifique de l'ammonium en NdC, DO < 100%

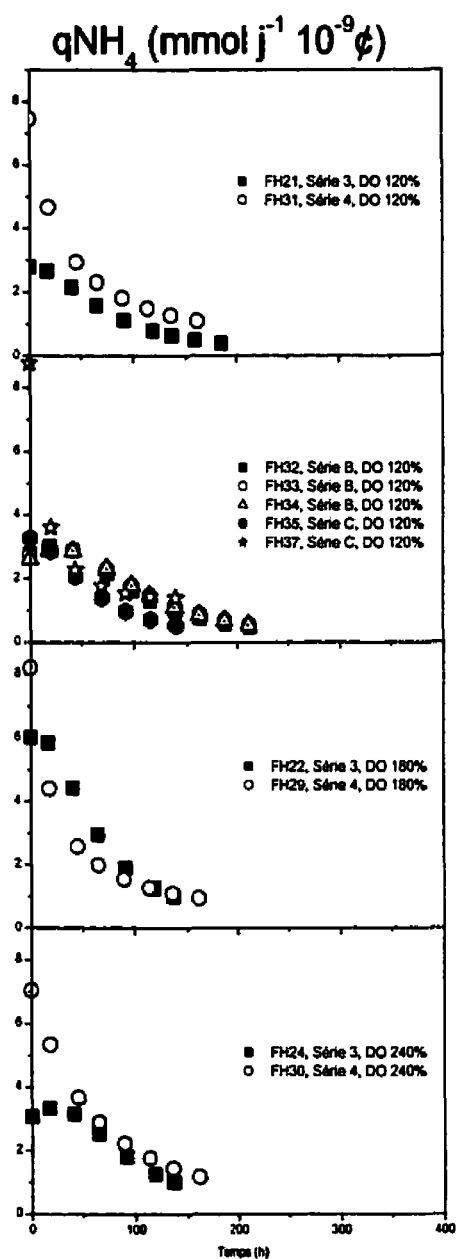


Figure 6.15 : Assimilation spécifique de l'ammonium en NdC, DO > 100%

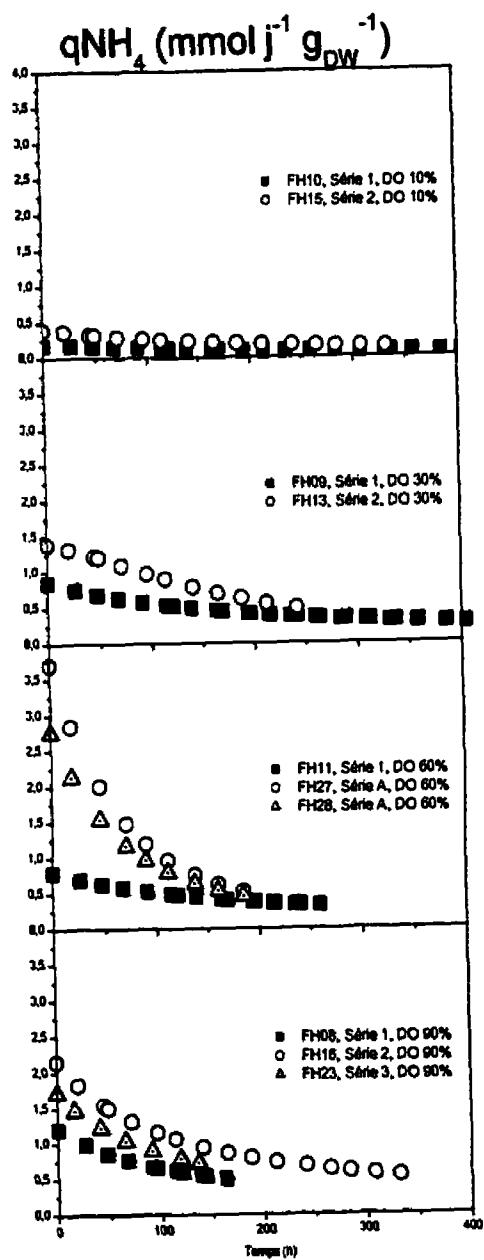


Figure 6.16 : Assimilation spécifique de l'ammonium en  $X_{\text{MS}}$ , DO < 100%

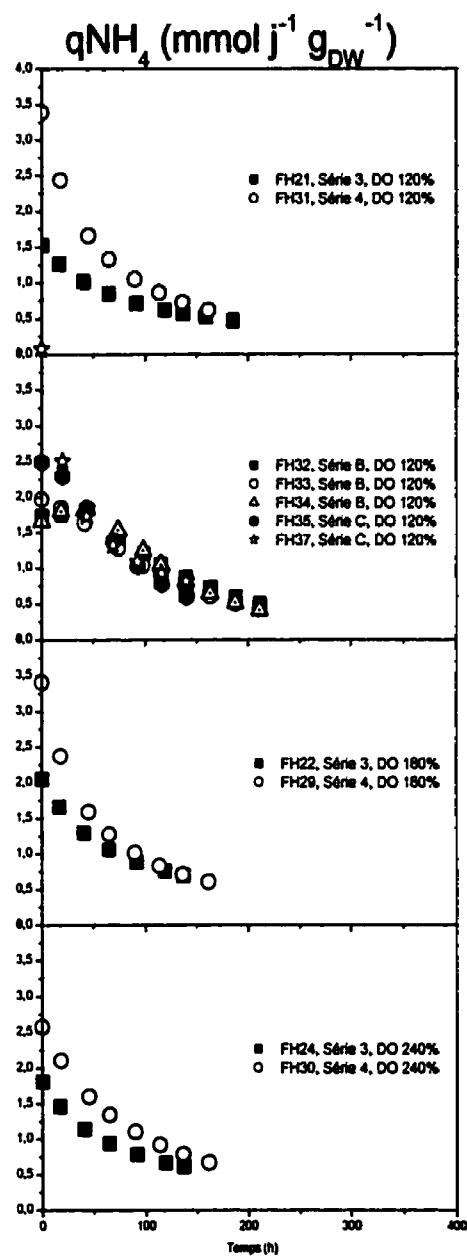


Figure 6.17 : Assimilation spécifique de l'ammonium en  $X_{\text{MS}}$ , DO > 100%

On observe que l'assimilation spécifique de l'ammonium en nombre de cellules augmente faiblement en fonction de la DO. L'assimilation maximum est observée à une DO de 180% où elle demeure supérieure à  $4 \text{ mmol j}^{-1} 10^{-9}\%$  jusqu'à près de 50h. Le contrôle de DCO<sub>2</sub> ne semble pas affecter l'assimilation spécifique du NH<sub>4</sub> en nombre de cellules.

On observe une augmentation de l'assimilation spécifique de l'ammonium en fonction de la DO jusqu'à 90%. À partir de cette concentration l'assimilation ne semble plus affecter par la DO. Le contrôle du DCO<sub>2</sub> semble augmenter légèrement l'assimilation spécifique en X<sub>MS</sub>.

En résumé, l'assimilation spécifique du NH<sub>4</sub> en nombre de cellules semble présenter un maximum à 180% alors qu'un plateau semble atteint vers 90% pour l'assimilation spécifique en biomasse sèche. Le contrôle de DCO<sub>2</sub> augmente l'assimilation spécifique du NH<sub>4</sub><sup>+</sup> en biomasse sèche, mais pas en nombre de cellules.

L'assimilation spécifique du glucose en nombre de cellules et en biomasse sèche est présentée aux figures 6.18 à 6.21 en  $\text{g j}^{-1} 10^{-9}\%$  et en  $\text{g j}^{-1} \text{gms}^{-1}$ .

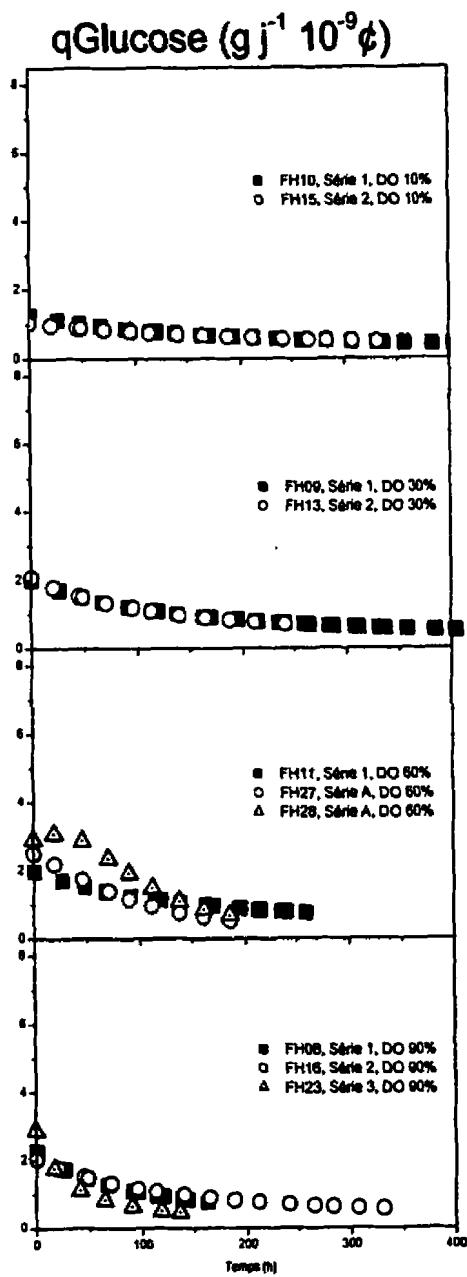


Figure 6.18 : Assimilation spécifique du glucose en NdC, DO < 100%

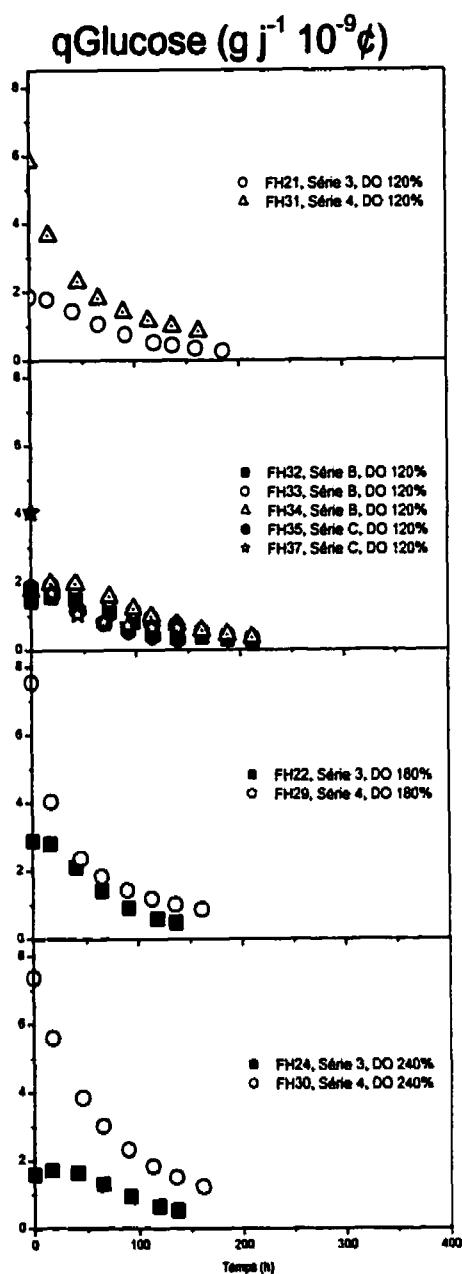


Figure 6.19 : Assimilation spécifique du glucose en NdC, DO > 100%

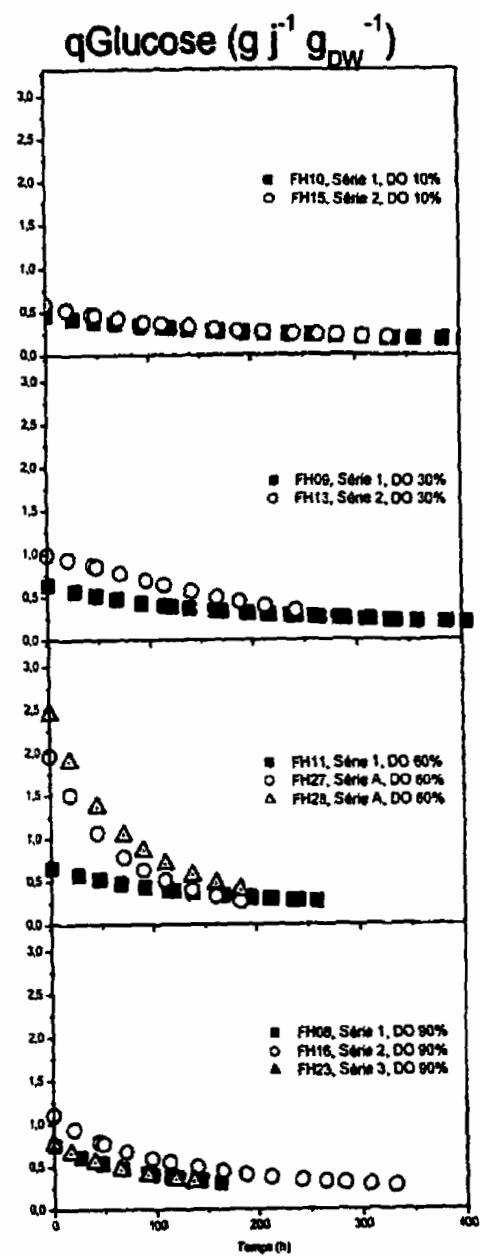


Figure 6.20 : Assimilation spécifique du glucose en  $X_{\text{MS}}$ , DO < 100%

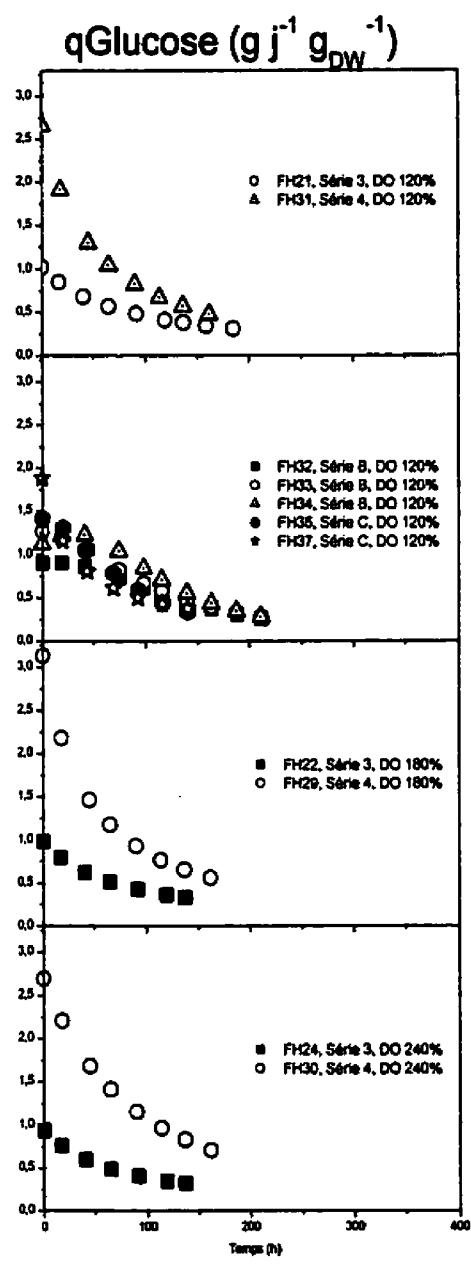


Figure 6.21 : Assimilation spécifique du glucose en  $X_{MS}$ , DO > 100%

Ces résultats ne montrent pas d'effet apparent de l'oxygène dissous sur l'assimilation spécifique du glucose en nombre de cellules. En effet, excepté pour les cultures à 10% de DO, l'assimilation spécifique initiale est d'environ  $2 \text{ g j}^{-1} 10^{-9}$  et décroît à un rythme semblable sur toute la plage de DO étudiée. À 180%, l'assimilation spécifique débute cependant à  $3 \text{ g j}^{-1} 10^{-9}$ , sans contrôle de DCO<sub>2</sub>. Le contrôle de ce gaz dissous semble augmenter légèrement l'assimilation spécifique du glucose en nombre de cellules.

Ces résultats suggèrent que l'assimilation spécifique du glucose par rapport à la biomasse sèche n'est pas fonction de la DO. En effet, l'assimilation initiale se situe entre  $0.5$  et  $1 \text{ g j}^{-1} \text{ gDW}^{-1}$  pour toutes les cultures sans contrôleur de DCO<sub>2</sub>. Par contre, l'assimilation spécifique apparaît augmenter quand le DCO<sub>2</sub> est contrôlé.

La Figure 6.22 présente l'assimilation spécifique de l'oxygène ( $qO_2$ ) pour les cultures dont la DO est inférieure à 100% alors que la Figure 6.23 présente le  $qO_2$  pour les cultures à DO supérieure à 100%. Pour certaines cultures, l'OUR ne peut pas être mesuré. C'est le cas des cultures effectuées à DO 10% et des cultures de la série 2.

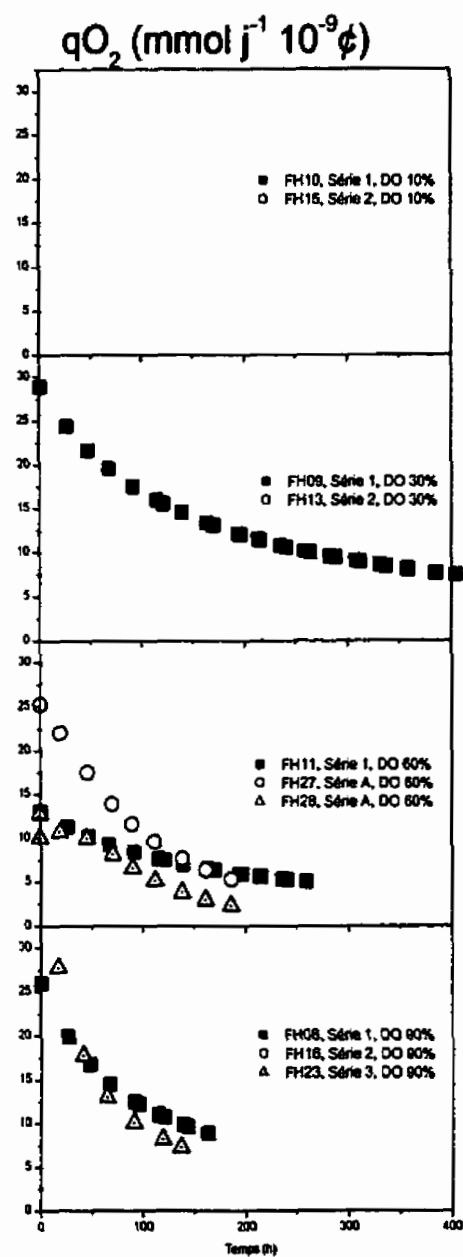
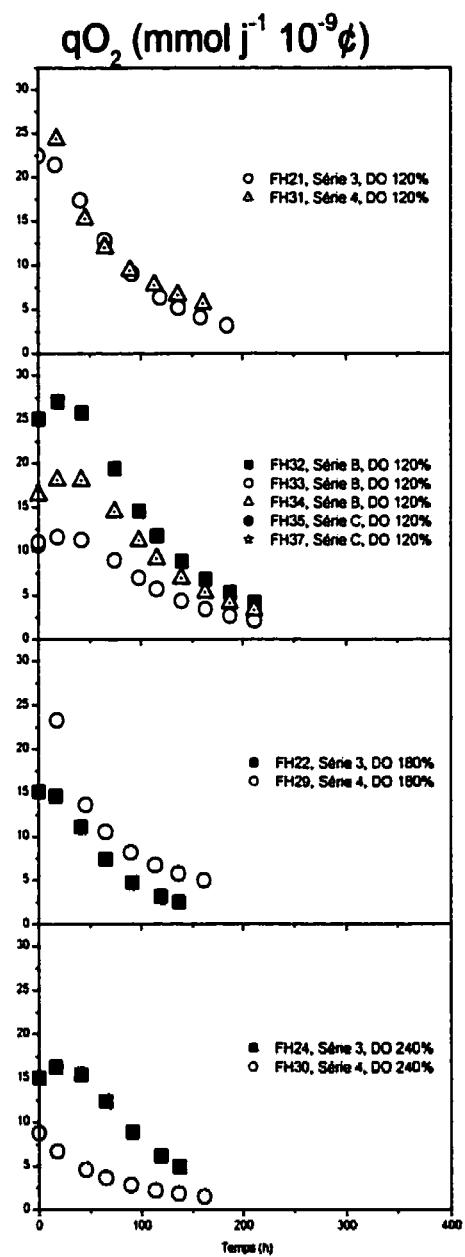


Figure 6.22 : Assimilation spécifique de l'oxygène en NdC, DO < 100%



**Figure 6.23 : Assimilation spécifique de l'oxygène en NdC, DO > 100%**

Ces résultats ne permettent pas d'établir de relation claire entre le taux d'assimilation spécifique de l'O<sub>2</sub> et la concentration en oxygène dissous. L'absence de certains résultats limite les comparaisons. Quoiqu'il en soit, le niveau de DCO<sub>2</sub> semble avoir un certain impact sur le qO<sub>2</sub>. En effet, le profil d'assimilation spécifique d'O<sub>2</sub> des cultures de la série A diffèrent entre elles. D'abord, la culture FH27 de la série A a un niveau de DCO<sub>2</sub> contrôlé à environ 1.5% alors que la culture FH28 de la même série est contrôlée à environ 19% de DCO<sub>2</sub>. Le qO<sub>2</sub> de la culture FH28 est inférieur d'environ 10 mmol j<sup>-1</sup> 10<sup>-9</sup> à en début de culture et l'écart diminue au fil du temps (voir Figure 6.22). De même, des différences sont observées entre les cultures de la série B (DO 120%). La culture FH32 est contrôlée à DCO<sub>2</sub> 4%, la culture FH33 à DCO<sub>2</sub> 8% et la culture FH34 à DCO<sub>2</sub> 1%. L'assimilation la plus élevée entre ces trois cultures est obtenue avec la culture à 4% de DCO<sub>2</sub>, suivi de la culture à 1% puis de celle à 8%. Les résultats des cultures de la série C ne peuvent être produits problème d'acquisition des données. Les hauts niveaux de DCO<sub>2</sub> (8% et 19%) de même que les faibles niveaux (1% et 1.5%) semblent affecter à la baisse l'assimilation spécifique de l'O<sub>2</sub> par rapport à 4% de DCO<sub>2</sub>.

Les figures 6.24 et 6.25 présentent l'assimilation spécifique de l'oxygène en biomasse sèche.

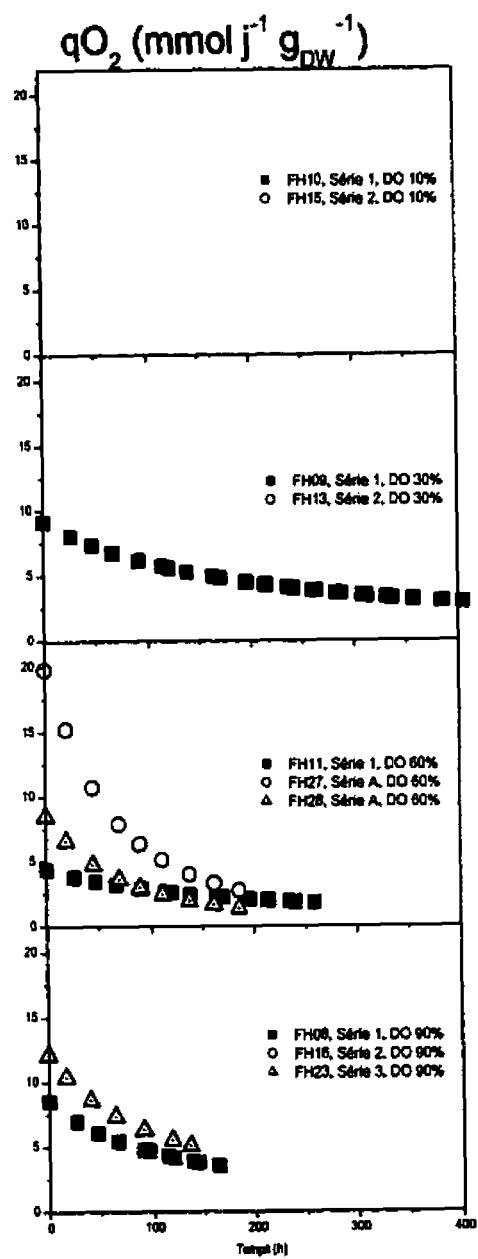


Figure 6.24 : Assimilation spécifique de l'oxygène en  $X_{MS}$ , DO < 100%

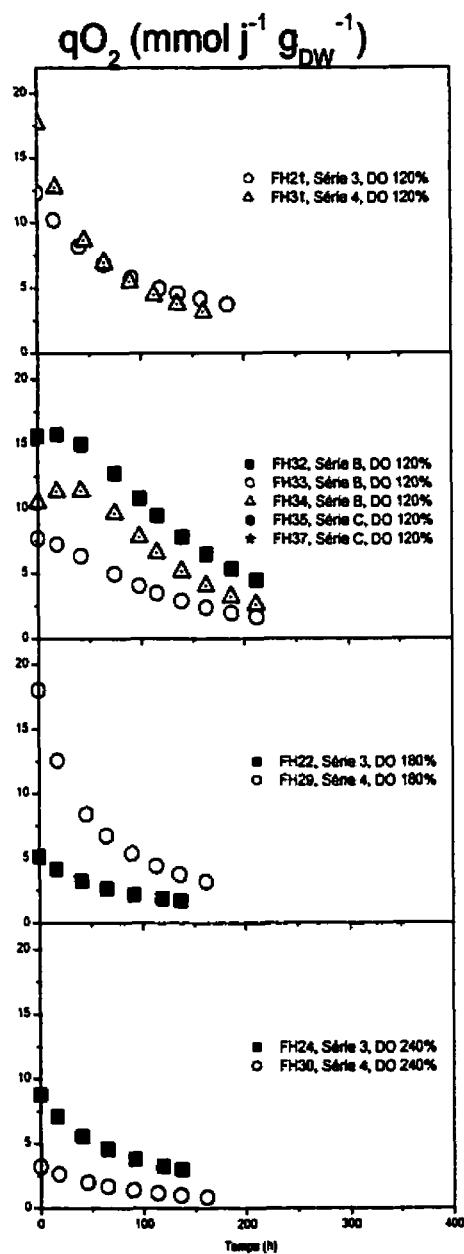


Figure 6.25 : Assimilation spécifique de l'oxygène en  $X_{\text{MS}}$ , DO > 100%

Les Figure 6.24 et Figure 6.25 présentant l'assimilation spécifique de l'oxygène en biomasse sèche n'apportent pas d'information qui permettent d'avantage de conclusions.

En résumé, les données disponibles sur les taux de respirations ne permettent pas d'attribuer à la DO un effet sur l'assimilation spécifique d' $O_2$ , que cela soit en NdC ou en  $X_{DW}$ . Par contre, le  $qO_2$  supérieur observé pour la culture FH32 à 4% de DCO<sub>2</sub> est peut-être attribuable au niveau de DCO<sub>2</sub>.

Finalement la production spécifique de dioxyde de carbone est présentée de la même façon que les nutriments. Les données de CO<sub>2</sub>, concentration dans le gaz de sortie et taux de production, sont non disponibles pour les cultures des séries B et C.

Ces résultats semblent indiquer que la DO n'a pas d'effet clairement identifiable sur la production spécifique de CO<sub>2</sub> en nombre de cellules. De même, les résultats de production spécifique de CO<sub>2</sub> en biomasse sèche présentés aux Figure 6.28 et Figure 6.29 ne permettent pas de dégager une tendance nette. En résumé, la production de CO<sub>2</sub> ne semble pas être une fonction de la concentration en oxygène dissous.

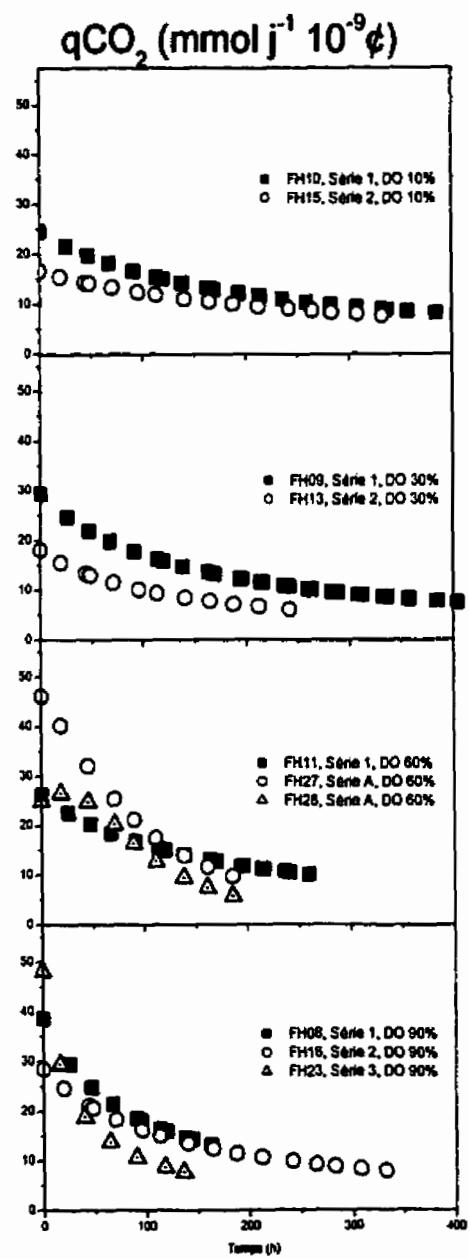


Figure 6.26 : Production spécifique de  $\text{CO}_2$  en NdC, DO < 100%

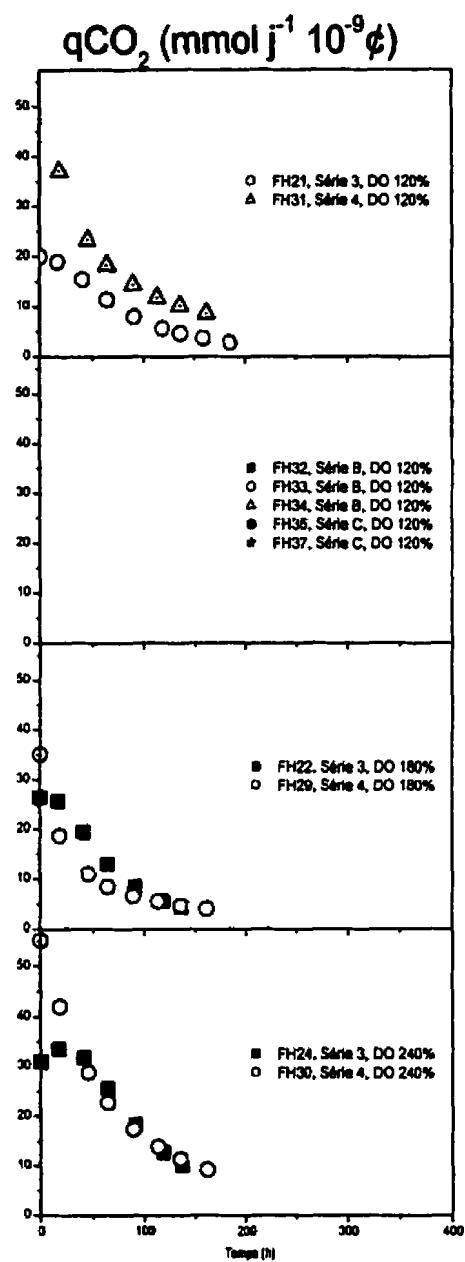


Figure 6.27 : Production spécifique de  $\text{CO}_2$  en NdC, DO > 100%

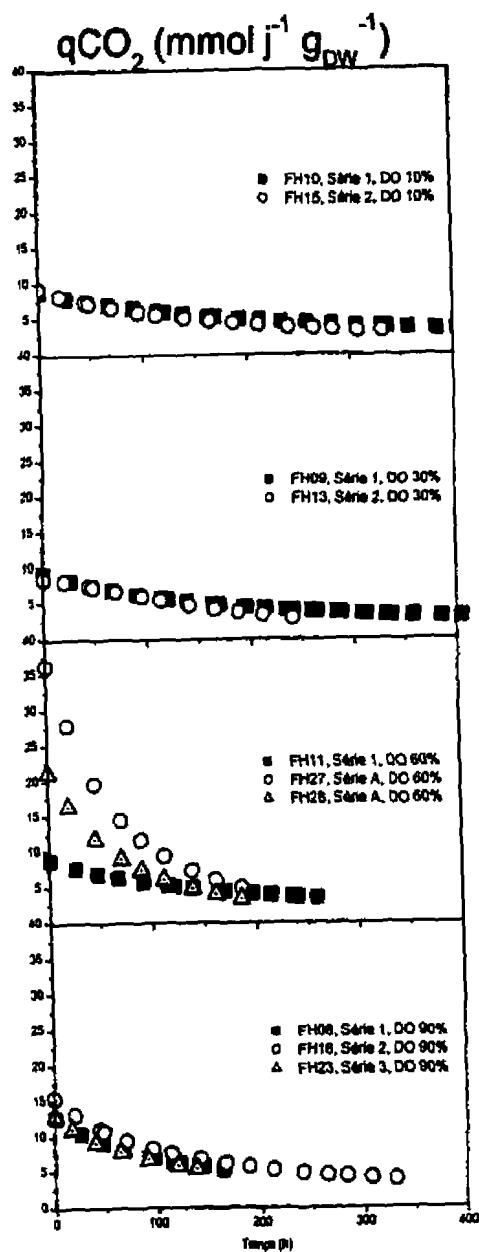


Figure 6.28 : Production spécifique de  $\text{CO}_2$  en  $X_{\text{MS}}$ , DO < 100%

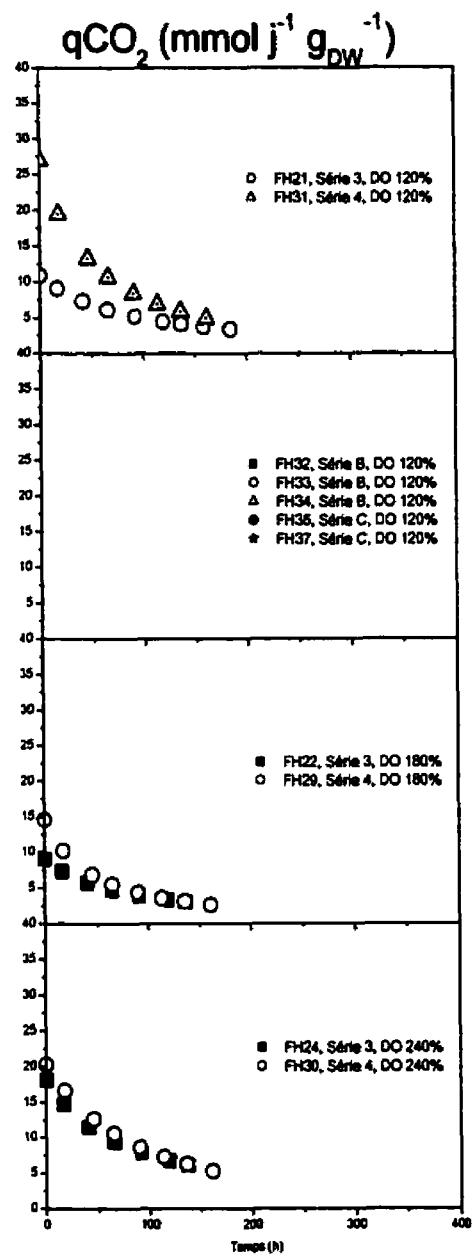


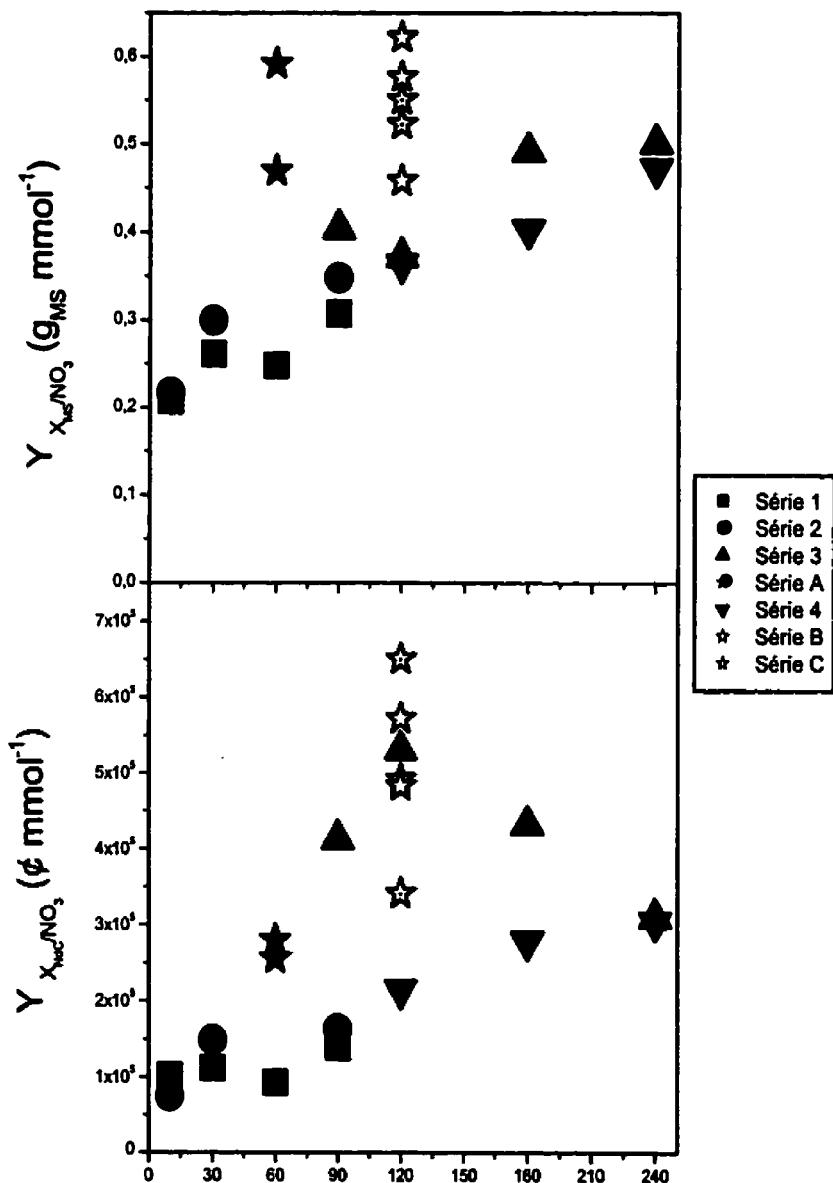
Figure 6.29 : Production spécifique de  $\text{CO}_2$  en  $X_{\text{MS}}$ , DO > 100%

Globalement, on observe une faible augmentation de l'assimilation spécifique en nombre de cellules avec la DO pour les ions azotés ( $\text{NO}_3$  et  $\text{NH}_4$ ). L'assimilation spécifique en biomasse sèche des sels d'azote semble être plus élevé à DO 90% et plus qu'à DO 60% et moins. D'autre part, le contrôle de  $\text{DCO}_2$  semble augmenter l'assimilation spécifique en biomasse sèche des sels azotés et du glucose. Enfin, l'assimilation spécifique d'oxygène en biomasse sèche semble présenter un maximum pour un niveau de  $\text{DCO}_2$  de 4%.

En ce qui concerne les autres nutriments mesurés, les taux d'assimilation spécifique en nombre de cellules de même qu'en biomasse sèche sont présentés à l'annexe D. Leur assimilation est faible et les variations entre les cultures ne semblent pas expliquées par les facteurs à l'étude.

### **6.6.2 Rendements**

Cette section présente les rendements de croissance apparents en biomasse sèche et en nombre de cellules pour les mêmes nutriments que présentés à la section précédente. La Figure 6.30 présente les rendements pour le nitrate.

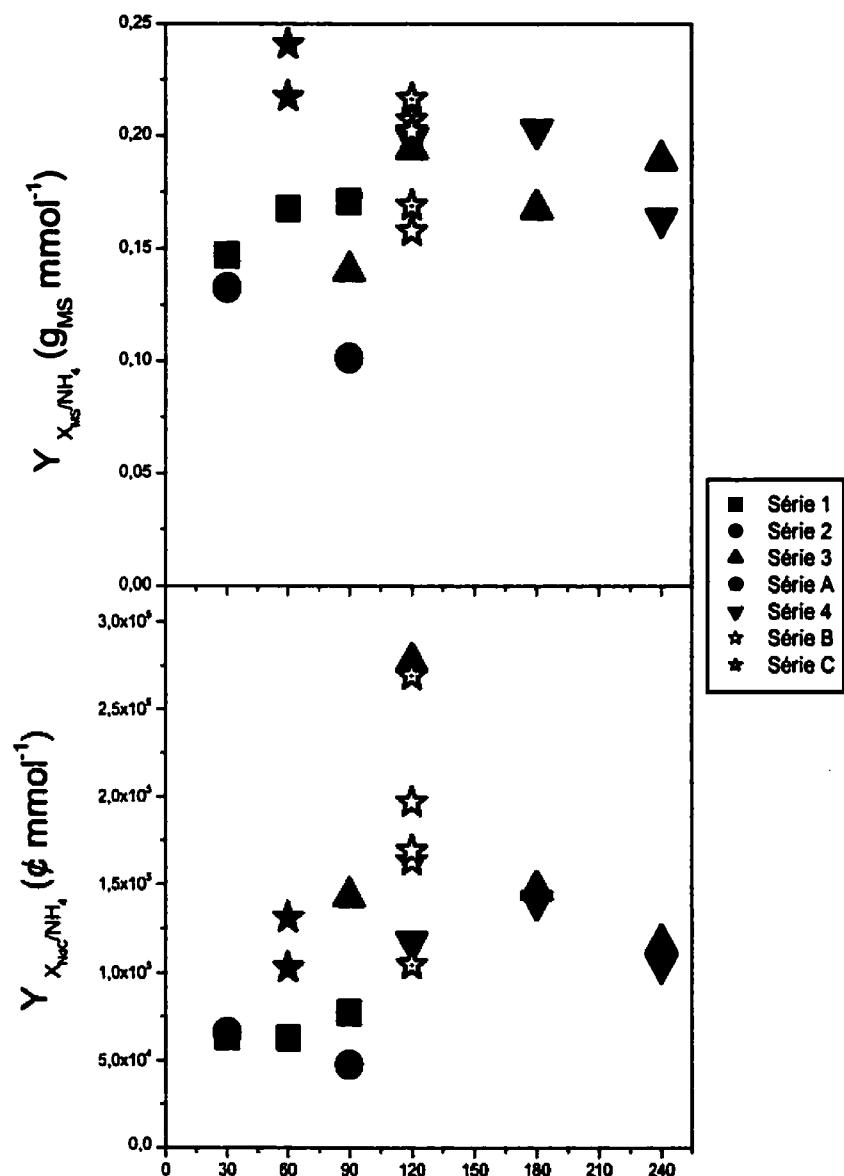


**Figure 6.30 : Rendement apparent de la croissance en biomasse sèche et en nombre de cellules sur le nitrate en fonction de la DO**

Le rendement apparent du nitrate sur la croissance en biomasse sèche semble augmenter de façon linéaire quand seules les cultures des séries 1 à 4 sont considérés. Les cultures des séries A à C (avec contrôle de DCO<sub>2</sub>) montrent des rendements supérieurs aux séries 1 à 4. Cependant les cultures effectuées avec contrôle de DCO<sub>2</sub> (séries A, 4, B et C) démontrent des rendements apparents se situant entre 0.35 et 0.65 et n'exhibent pas de tendance apparente.

Par ailleurs, on observe un rendement maximum du nitrate sur le nombre de cellules ( $6.5 \times 10^5 \text{ mmol}^{-1}$ ) à 120% de DO. Le contrôle de DCO<sub>2</sub> ne semble pas affecter le rendement en nombre de cellules puisque les cultures avec contrôle de DCO<sub>2</sub> semblent former un tout avec l'ensemble.

La Figure 6.31 présente les rendements apparents de l'ammonium pour la biomasse sèche et le nombre de cellules.



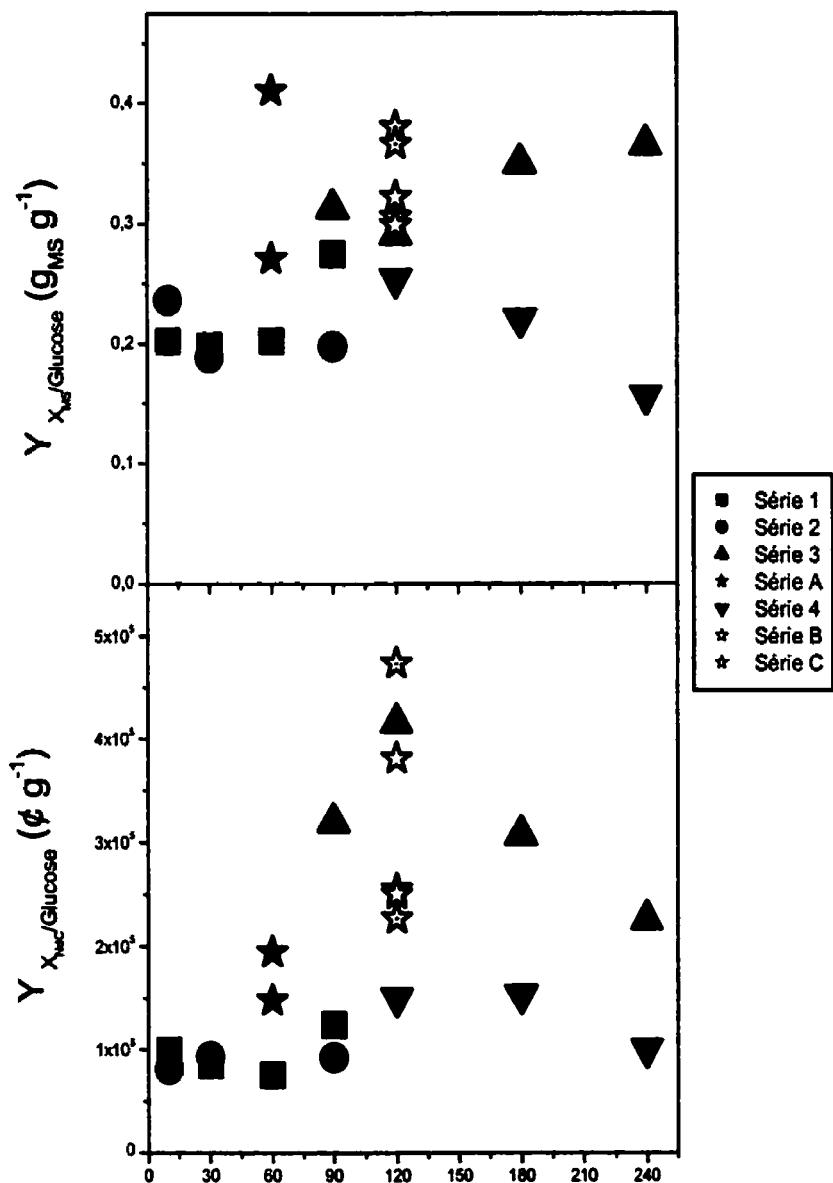
**Figure 6.31 : Rendement apparent de la croissance en biomasse sèche et en nombre de cellules sur l'ammonium en fonction de la DO**

Il ne semble pas y avoir de corrélation entre le rendement apparent en NH<sub>4</sub> sur la biomasse sèche et la DO. En effet, le rendement varie de 0.1 à 0.25 g<sub>MS</sub> mmol<sup>-1</sup> sans tendance.

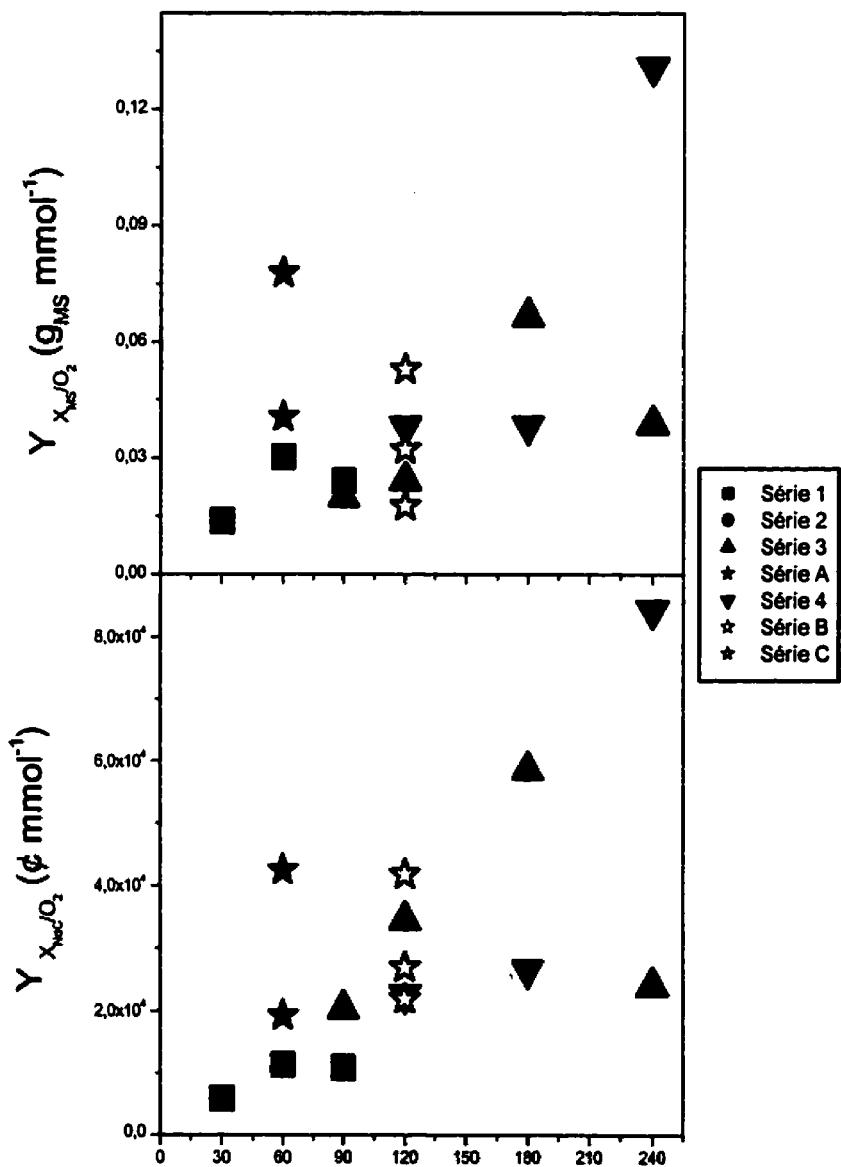
Par contre, le rendement en NH<sub>4</sub> de la production de cellules semble lié à la DO. Un maximum ( $2.8 \times 10^5 \text{ mmol}^{-1}$ ) est observé à 120% de DO. Ceci est similaire à ce qui est observé pour le rendement en nombre de cellules sur le nitrate à la Figure 6.30. Le rendement maximum de la croissance en nombre de cellules sur le NH<sub>4</sub> est par contre 50% du rendement maximum observé pour le NO<sub>3</sub>. Donc, les meilleurs rendements observés pour la croissance en nombre de cellules sur les sels azotés est à 120% de DO.

À la Figure 6.32, les rendements apparents du glucose montrent la même tendance que celles observées pour les ions azotés. Ainsi, il ne semble pas y avoir de lien entre le rendement apparent de la biomasse sèche et la DO alors qu'un maximum est observé à 120% pour le rendement apparent en nombre de cellules. Les rendements en biomasse sèche varient de 1.6 à 4.1 g<sub>MS</sub> g<sup>-1</sup>) alors que le rendement maximum en nombre de cellules est de  $4.7 \times 10^5 \text{ g}^{-1}$ .

Les figures 6.33 et 6.34 présentent respectivement le rendement sur la consommation d'oxygène et le rendement sur la production de dioxyde de carbone en fonction de la DO.



**Figure 6.32 : Rendement apparent de la croissance en biomasse sèche et en nombre de cellules sur le glucose en fonction de la DO**



**Figure 6.33 : Rendement apparent de la croissance en biomasse sèche et en nombre de cellules sur l'oxygène en fonction de la DO**

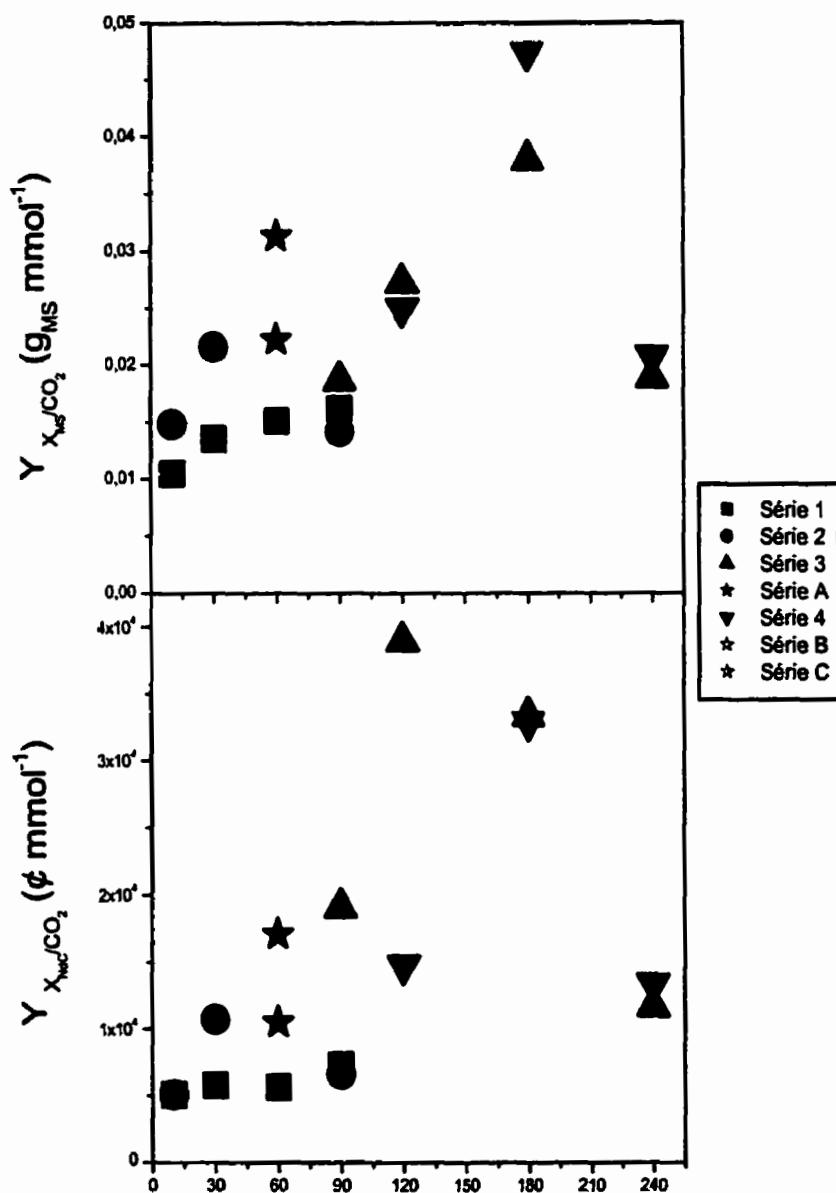


Figure 6.34 : Rendement apparent de la croissance en biomasse sèche et en nombre de cellules sur la production de dioxyde de carbone en fonction de la DO

Ces rendements sur les gaz dissous sont calculés à l'aide de l'intégrale des taux d'assimilation et de production par rapport au temps car ces espèces chimiques sont alimentées et retirées en continue des cultures. Ces résultats suggèrent une faible augmentation des rendements sur l'O<sub>2</sub> en fonction de la DO. Dans le cas de la production de CO<sub>2</sub>, les rendements de croissance semblent présenter une corrélation avec la DO avec un maximum entre 120% et 180% pour le rendement en nombre de cellules.

En résumé, les rendements en biomasse sèche n'apparaissent pas liés à la concentration en oxygène dissous alors que les rendements de la croissance mesurée en nombre de cellules paraissent exhiber un maximum autour de 120% de DO. De plus, les rendements ne semblent pas affectés par le contrôle du DCO<sub>2</sub> de manière significative.

## 7.0 CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

Le principal objectif de ce projet de recherche est de déterminer l'effet de l'environnement gazeux sur la croissance de cellules de plantes en suspensions. Les deux gaz qui sont présents, consommés et produits en plus grande quantité dans un système de culture de cellules en suspensions sont l'oxygène et le dioxyde de carbone. Ce projet de recherche se limite donc à l'effet de ces deux gaz dissous sur la croissance de cultures de cellules en suspensions. Afin de déterminer l'effet de ces deux gaz dissous, les conditions dans lesquelles les cultures sont réalisées sont adaptées de sorte que les effets d'autres facteurs que ceux étudiés sont éliminés ou minimisés.

En premier lieu, des techniques de cultures ont été développées (maintien de la lignée cellulaire, inocula homogène, flacons témoins, limitation en phosphate) pour obtenir des résultats reproductibles et dont les effets sont expliquées par les facteurs étudiés. L'échantillonnage et le suivi mis au point par l'équipe de recherche permet d'alimenté les cultures en fonction de leurs besoins nutritionnels. Dans le but de minimiser les changements brusques de pH, l'utilisation de pompes pour effectuer les ajouts de façon continue a été mise au point par l'équipe de recherche.

Certaines difficultés liées au contrôle de l'oxygène dissous proviennent du fait que les systèmes de gaz sont tous alimentés à partir du même détendeur d'air. Comme la pression de l'oxygène dans le système d'alimentation du bioréacteur est supérieur à celle de l'air, il arrive que l'oxygène destiné à un bioréacteur se retrouve dans un autre. Ainsi, lorsqu'un réacteur est mis hors contrôle, il arrive que l'action de son contrôleur affecte le contrôle des autres bioréacteurs. Une partie des problèmes de contrôle de la série 1 ont par la suite été réglés en isolant les quatre réacteurs utilisés lors de ce projet de recherche des autres bioréacteurs utilisés par le reste du groupe. Pour enrayer définitivement le problème, il est suggéré de mettre en place un système de gaz indépendant pour chacun des bioréacteurs. Quoiqu'il en soit, le niveau de contrôle de la DO obtenu lors de l'étude permet d'étudier son effet sur la croissance des cultures.

Le développement et la validation d'un modèle d'estimation du dioxyde de carbone dissous est un avancement important dans l'état des connaissances de ce domaine. La conception d'un contrôleur basé sur ce modèle permet d'étudier d'une façon adéquate l'effet du DCO<sub>2</sub> sur la croissance des cellules en suspension. Par contre, le contrôle du DCO<sub>2</sub> pourrait être amélioré en diminuant le nombre de bioréacteurs entre lesquels le moniteur de CO<sub>2</sub> est partagé. De plus, des oscillations perpétuelles du débit total faussent momentanément l'estimation du modèle de DCO<sub>2</sub> rendant son contrôle impossible dans cette situation. Par ailleurs, les paramètres du contrôleur ne sont sûrement pas

optimaux. Comme la période entre deux actions est de 4,5 h, le réglage de ces paramètres requiert d'effectuer des essais qui n'étaient pas envisageables dans le cadre de ce projet de recherche. Quoiqu'il en soit, le contrôle efficace du DCO<sub>2</sub> passe inévitablement par le réglage de ces paramètres afin de réduire les oscillations et de produire des conditions de culture plus uniformes.

L'étude de l'effet de l'oxygène dissous sur la croissance des cultures de cellules en suspension présente une cinétique de type Monod. Selon ces résultats, la concentration d'oxygène dissous à laquelle l'étape de croissance d'un éventuel procédé de production de sanguinarine devrait être conduite est de 120%. Au-delà de cette concentration, le gain du taux de croissance est marginal et les conditions d'opération plus coûteuses. De plus, les rendements des nutriments consommés en grande quantité (NO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub> et glucose) semblent présenter un maximum à 120%, ce qui peut signifier que le métabolisme est d'avantage orienté vers la croissance qu'il ne l'est à des rendements plus faibles.

Les résultats obtenus de l'étude de l'effet du DCO<sub>2</sub> révèlent que celui-ci semble d'avantage lié à son contrôle qu'à son niveau. En effet, les cultures effectuées à différents niveaux de DCO<sub>2</sub> montrent un taux de croissance semblables entre elles, mais supérieurs aux taux de croissance des cultures effectuées au même niveau de DO mais sans contrôle de DCO<sub>2</sub>. Le niveau auquel est contrôlé le DCO<sub>2</sub> ne semble pas avoir d'effet sur la croissance. Le point de consigne du

DCO<sub>2</sub> recommandé est de 4% puisque la taux d'assimilation spécifique de l'oxygène est maximum à ce niveau ce qui facilite le contrôle de l'oxygène dissous. Par contre, le temps requis pour accumuler la concentration de DCO<sub>2</sub> voulue dans le bioréacteur augmente avec celle-ci. Un niveau de DCO<sub>2</sub> inférieur à 4% pourrait être souhaitable si l'on veut diminuer le temps requis pour l'accumulation sans toutefois ajouter de CO<sub>2</sub> dans l'alimentation gazeuse du bioréacteur.

Enfin, les résultats obtenus de l'étude des cellules en suspension d'*Eschscholtzia californica* s'appliquent très probablement à plusieurs autres espèces végétales mais inévitablement, il y a des exceptions. Par exemple, l'espèce *Ginko biloba* cultivée par l'équipe de recherche ne semble pas être en mesure de croître sans un niveau de CO<sub>2</sub> dissous élevé. De même, l'effet des concentrations en oxygène dissous et en dioxyde de carbone dissous reste à déterminer sur la phase de production de métabolites secondaires. Les concentrations de ces gaz dissous incluent les taux de productions des métabolites secondaires mais aussi la distribution des alcaloïdes produits.

## BIBLIOGRAPHIE

ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WATSON, J. D. (1994). The cell. , Garland, 60-139.

AL-RUBEAI, M., SINGH, R. P., EMERY, A. N., ZHANG, Z. (1995). Cell cycle and cell size dependence of susceptibility to hydrodynamic forces. Biotechnology and Bioengineering, **46**, 88-92.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (1985). Standard methods for the examination of water and wastewater. Method 406: Carbon Dioxide, Sixteen Edition, 279-286.

ANANTA, I., AHKAM SUBROTO, M., DORAN, P. M. (1995). Oxygen transfert and culture characteristics of self-immobilized *Solanum aviculare* aggregates. Biotechnology and Bioengineering, **47**, 541-549.

ANDREWS, G. F., FONTA, J. P., MARROTTA, E., STROEVE, P. (1984). The effects of cells on oxygen transfert coefficients I: Cell accumulation around bubbles. Chem. Eng. J., **29**, B39-B46.

ANDREWS, G. F., FONTA, J. P., MARROTTA, E., STROEVE, P. (1984). The effects of cells on oxygen transfert coefficients II: Analysis of enhancement mechanisms. Chem. Eng. J., **30**, B47-B55.

ARCHAMBAULT, J. (1991). Large-scale (20L) culture of surface-immobilized *Catharanthus roseus* cells. Enzyme Microb. Technol., **13**, 882-892.

ARCHAMBAULT, J., POUYEZ, C. M., PÉPIN, M. F., PERRIER, M., CHAVARIE, C. (1994). Effect of dissolved oxygen concentration on the growth of surface-immobilized *Catharanthus Roseus* cells: A modelling and experimental study. Advances in Plant biotechnology, 159-207.

ARCHAMBAULT, J., WILLIAMS, R. D., BÉDARD, C., CHAVARIE, C. (1996). Production of sanguinarine by elicited plant cell cultures I. Shake flask suspension culture. J. of Biotechnology, **46**, 95-105.

ARCHAMBAULT, J., WILLIAMS, R. D., PERRIER M., CHAVARIE, C. (1996). Production of sanguinarine by elicited plant cell cultures III. Immobilized bioreactor cultures. J. of Biotechnology, **46**, 121-129.

AUBRY, D. (1995). Développement et commande d'un procédé de production de sanguinarine par la culture de cellules végétales. Mémoire de maîtrise, École polytechnique de Montréal, Canada.

BADINO, A. C. Jr, FACCIOTTI, M. C. R., SCHMIDELL, W. (2000). Improving *kla* determination in fungal fermentation, taking into account electrode response time. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, **75**, 469-474.

BAILEY, J. E., OLLIS, D. (1986). Biochemical engineering fundamentals. , McGraw-Hill, New York, 457-532.

BAKER, C.J, MOCK, N.M., DEAHL, K. et DOMEK, J. (1997). Monitoring the rate of oxygen consumption in plant cell suspensions. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, **51**, 111-117.

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

BALICA, R., RYU, D. D. Y., POWELL, L., OWEN, D. (1992). Rheological properties of plant cell suspensions. Biotechnol. Prog., **8**, 413-420.

BANDYOPADHYAY, B., HUMPREY, A. E. (1967). Dynamic measurement of the volumetric oxygen transfert coefficient in fermentation systems. Biotechnology and Bioengineering, **IX**, 533-544.

BOTREL, A., MAGNÉ, C., KAISER, W. M. (1996). Nitrate reduction, nitrite reduction and ammonium assimilation in barley roots in response to anoxia. Plant Physiol. Biochem., **34**, 645-652.

BOUMA, T. J., BROEKHUYSEN, G. M., VEEN, B. W. (1996). Analysis of root respiration of *Solanum tuberosum* as related to growth, ion uptake and maintenance of biomass. Plant Physiol. Biochem., **34**, 795-806.

CALDERBANK, P. H., MOO-YOUNG, M. B. (1961). The continuous phase heat and mass-transfert properties of dispersions. Chemical Engineering Science, **16**, 39-54.

CARREAU, P. J., PATTERSON, I., YAP, C. Y. (1976). Mixing of viscoelastic fluids with helical ribbon agitators. Can. J. Chem. Eng., **54**, 135-142.

CHANG, H.N., HALARD, B. et MOO-YOUNG, M. (1989). Measurement of  $K_{la}$  by a gassing-in method with oxygen-enriched air. Biotechnology and Bioengineering, **34**, 1147-1157.

CHANG, Q., RANDERS-EICHHORN, L., LAKOWICZ, J. R., RAO, G. (1998). Steam-sterilisable, fluorescence lifetime-based sensing film for dissolved carbon dioxide. Biotechnol. Prog., **14**, 326-331.

CHO, G. H., KIM, D. I., PEDERSEN, H. (1988). Ethephon enhancement of secondary metabolite synthesis in plant cell cultures. Biotechnology Progress, **4**, 184-188.

CIOFFI, F. et GALLERANO, F. (1998). Design and management of hypersensitive aquaculture tanks. Journal of Hydraulic Research, **36**, 723-745.

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

CLINE, S. D., PSENAK, M., McHALE, R. J., KRYUEGER, R. J., COSCIA, C. J. (1990). Preferential induction of biological oxydation systems in alkaloid metabolism of plant tissues cultures subjected to fungal elicitation. Biological oxidation systems, **1**, 99-113.

CRAWFORD, N. M. (1995). Nitrate: Nutrient and signal for plant growth. The plant cell, **7**, 859-868.

CROUGHAN, M. S., HAMEL, J. F., WANG, D. I. C. (1987). Hydrodynamic effects on animal cells grown in microcarrier cultures. Biotechnology and Bioengineering, XXIX, 130-141.

CROUGHAN, M. S., SAYRE, E. S., WANG, D. I. C. (1989). Viscous reduction of turbulent damage in animal cell culture. Biotechnology and Bioengineering, 33, 862-872.

DAHOD, S. K. (1993). Dissolved carbon dioxide measurement and its correlation with operating parameters in fermentation processes. Biotechnol. Prog., 9, 655-660.

DANG, N.D.P., KARRER, D.A. et DUNN, I.J. (1977). Oxygen transfert coefficients by dynamic model moment analysis. Biotechnology and Bioengineering, 19, 853-865.

de ORY, I., ROMERO, L. E., CANTERO, D. (1999). Laboratory scale equipment for the determination of  $k_{la}$  in bioreactors. Bioprocess Engineering, 20, 73-75.

DIAZ, C., DIEU, P., FEUILLERAT, C., LELONG, P., SALOMÉ, M. (1996). Simultaneous adaptative predictive control of the partial pressures of dissolved oxygen ( $pO_2$ ) and dissolved carbon dioxide ( $pCO_2$ ) in laboratory-scale bioreactor. Journal of Biotechnology, **52**, 135-150.

DO, C. B. et CORMIER, F. (1991). Effects of high ammonium concentrations on growth and anthocyanin formation in grape (*Vitis vinifera* L.) cell suspension cultured in a production medium. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, **27**, 169-174.

DRAPEAU, D., BLANCH, H. W., WILKE, C. R. (1985). Growth kinetics of *Dioscorea deltoidea* and *Catharanthus roseus* in batch culture. Biotechnology and Bioengineering, **28**, 1555-1563.

DRAPEAU, D., BLANCH, H. W., WILKE, C. R. (1987). Economic assessment of plant cell culture for the production of ajmalicine. Biotechnology and Bioengineering, **30**, 946-953.

DUCOS, J. P. et PAREILLEUX, A. (1986). Effect of aeration rate and influence of  $pCO_2$  in large-scale cultures of *Catharanthus roseus* cells. Appl. Microbiol. Biotechnol., **25**, 101-105.

DUNN, I.J. et EINSELE, A. (1975). Oxygen transfert coefficients by the dynamic method. J. Appl. Chem. Biotechnol., **25**, 707-720.

EYER, K., OEGGERLI, A., HEINZLE, E. (1995). On-line gaz analysis in animal cell cultivation: II. Methods for oxygen uptake rate estimation and its application to controlled feeding of glutamine. Biotechnology and Bioengineering, **45**, 54-62.

FISSET, S. (1998). Étude de l'effet des nutriments sur la production d'alkaloïdes par des cultures de cellules végétales. Projet de fin d'études, Université du Québec à Trois-Rivières, Canada.

FLORES, F., TORRES, L. G., GALINDO, E. (1994). Effect of the dissolved oxygen tension during cultivation of *X. campestris* on the production and quality of xanthan gum. J. of Biotechnology, **34**, 165-173.

FUJITA, Y. (1988). Shikonin: production by plant (*Lithospermum erythrorhizon*) cell cultures. Biotechnology in agriculture and forestry; medicinal and aromatic plants, **4**, 225-236.

FUJITA, Y., TABATA, M. (1987). Secondary metabolites from plant cells: Pharmaceutical applications and progress in commercial production. Plant Tissue and Organ Culture, 169-185.

GAMBORG, O.L., MILLER, R. A., OJIMA, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp. Cell Res., **50**, 151-158.

GAO, J., et LEE, J. M. (1992). Effect of oxygen supply on the suspension culture of genetically modified tobacco cells. Biotechnol. Prog., **8**, 285-290.

GARNIER, A., VOYER, R., TOM, R., PERRET, S., JARDIN, B., KAMEN, A. (1996). Dissolved carbon dioxide accumulation in large scale and high density production of TGF $\beta$  receptor with baculovirus infected Sf-9 cells. Cytotechnology, **22**, 53-63.

GAUTHIER, L., THIBAULT, J. et LEDUY, A. (1991). Measuring  $k_{la}$  with randomly pulsed dynamic method. Biotechnology and Bioengineering, **37**, 889-893.

GOUT, E., BLIGNY, R. et DOUCE, R. (1992). Regulation of intracellular pH values in higher plant cells. J. of Biological Chemistry, **267**, 13903-13909.

HEGARTY, P. K., SMART, N. J., SCRAGG, A. H., et FOWLER, M. W. (1986). The aeration of *Catharanthus roseus* L. G. Don suspension cultures in airlift bioreactors: The inhibitory effect at high aeration rates on culture growth. J. of Exp. Bot., 37, 1911-1920.

HENZLER, H.-J., SCHEDEL, M. (1991). Suitability of the oxygen shake flask for oxygen supply to microbiological cultures. Bioprocess Eng., 7, 123-131.

HO, C. S., SHANAHAN, J. F. (1987). Carbon dioxide transfert in bioreactors. CRC Critical Reviews in Biotechnology, 4, 185-251.

HO, C-H., HENDERSON, K. A. et RORRER, G. L. (1995). Cell damage and oxygen mass transfert during cultivation of *Nicotiana tabacum* in a stirred-tank bioreactor. Biotechnol. Prog., 11, 140-145.

HOHE, A., WINKELMANN, T., SCHWENKEL H.-G. (1999). CO<sub>2</sub> accumulation in bioreactor suspension cultures of *Cyclamen persicum* Mill. And its effect on cell growth and regeneration of somatic embryos. Plant Cell Reports, 18, 863-867.

HOOKER, B. S., LEE, J. M. et AN, G. (1990). Cultivation of plant cell in a stirred vessel: Effect of impeller design. Biotechnology and Bioengineering, **35**, 296-304.

HORN, M. E., WIDHOLM, J. M. (1994). Photoautotrophic growth of soybean cells in suspension culture III. Characterization of carbon fixation products under high and low CO<sub>2</sub> levels. Plant cell Tissue and Organ Culture, **39**, 239-244.

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

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

KAPELLI, O., FIECHTER, A. (1981). Determination of dissolved oxygen concentration equilibrium. Biotechnology and Bioengineering, **23**, 1897-1901.

KESSELL, R. H. J., GOODWIN, C. et PHILIP, J. (1977). The relationship between dissolved oxygen concentration, ATP and embryogenesis in carrot (*Daucus carota*) tissue cultures. Plant Science Letters, **10**, 265-274.

KESSELL, R. H. J. et CARR, A. H. (1972). The effect of dissolved oxygen concentration on growth and differentiation of carrot (*Daucus carota*) tissue. J. of Exp. Bot., **23**, 996-1007.

KHARE, A. S., NIRANJAN, K. (1995). Impeller-agitated aerobic reactor: the influence of tiny bubbles on gas hold-up and mass transprt in highly viscous liquids. Chemical Engineering Science, **50**, 1091-1105.

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

KIM, D.-I., PEDERSEN, H. et CHIN, C.-K. (1991). Cultivation of *Thalictrum rugosum* cell suspension in an improved airlift bioreactor: Stimulatory effect of carbon dioxide and ethylene on alkaloid production. Biotechnology and Bioengineering, **38**, 331-339.

KIM, D.-J. et CHANG, H.-N. (1989). Dynamic measurement of *k<sub>la</sub>* with oxygen-enriched air during fermentation. J. Chem. Technol. Biotechnol., **45**, 39-44.

KOZMA, J., KARAFFA, L. (1996). Estimation of dissolved oxygen in shake-flask. Hungarian Journal of Industrial Chemistry, **24**, 225-227.

KUMAR, D., KIESSIG, D. F. (2000). Differential induction of tobacco MAP kinases by the defense signal nitric oxide, salicylic acid, ethylene, and jasmonic acid. Molecular Plant-Microbe Interaction, **13**, 347-351.

KUMAR, P. P., LAKSHMANAN, P., THORPE, T. A. (1998). Regulation of morphogenesis in plant cell tissue culture by ethylene. In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant, **34**, 94-103.

KUMAR, P. P., NATHAN, M. J., GOH, C.-J. (1996). Involvement of ethylene on growth and plant regeneration in callus cultures of *Heliconia psittacorum* L. f.. Plant Growth Regulation, **19**, 145-151.

KUMAR, P. P., RAO, C. D., GOH, C.-J. (1996). Ethylene and CO<sub>2</sub> affect direct shoot regeneration from the petiolar ends of *Paulownia kawakamii* leaves cultured in vitro. Plant Growth Regulation, **20**, 237-243.

KURATA, K., FUKUDA, E. (1995). Effect of dissolved oxygen concentration on carrot somatic embryo production. Acta Horticulturae, **393**, 91-96.

LAI, F.-M. et MCKERSIE, B. D. (1994). Regulation of storage protein synthesis by nitrogen and sulfur nutrients in alfalfa (*Medicago sativa L.*) somatic embryos. Plant Science, **103**, 209-221.

LANG, J. A., YOON, K-H. et PRENOSIL, J. E. (1990). Effect of permeate flux rate on alkaloid production in a novel plant cell membrane reactor using *Coffea arabica* cells. Biotechnol. Prog., **6**, 447-451.

LECKIE, F., SCRAGG, A. H. et CLIFFE, K. C. (1991). An investigation into the role of initial *kla* on the growth and alkaloid accumulation by cultures of *Catharanthus roseus*. Biotechnology and Bioengineering, **37**, 364-370.

LEE, S. H., CHAE, H. S., LEE, T. K., KIM, S. H., SHIN, S. H., CHO, B. H., CHO, S. H., KANG, B. G., LEE, W. S. (1998). Ethylene-mediated phospholipid catabolic pathway in glucose-starved carrot suspension cells. Plant Physiol., **116**, 223-229.

LINDSEY, K. et YEOMAN, M. M. (1983). The relationship between growth rate, differentiation and alkaloid in cell cultures. J. of Exp. Bot., **34**, 1055-1065.

LINEK, V., SINKULE, J. et BENES, P. (1991). Critical assessment of gassing-in methods for measuring *k<sub>la</sub>* in fermentors. Biotechnology and Bioengineering, **38**, 323-330.

LINEK, V. et SINKULE, J. (1990). Comments on validity of dynamic methods of oxygen diffusion coefficients in fermentation media with polarographic oxygen electrodes. Biotechnology and Bioengineering, **35**, 1034-1041.

LINEK, V., BENES, P. et VACEK, V. (1989). Dynamic pressure method for *k<sub>la</sub>* measurement in large-scale bioreactors. Biotechnology and Bioengineering, **33**, 1406-1412.

LINEK, V., MOUCHA, T., DOUSOVA, M. et SINKULE, J. (1994). Measurement of *k<sub>la</sub>* by dynamic pressure method in pilot-plant fermentor. Biotechnology and Bioengineering, **43**, 477-482.

LIU, S. et ZHONG, J. J. (1998). Phosphate effect on production of ginseng saponin and polysaccharide by cell suspension cultures of *Panax ginseng* and *Panax quinquefolium*. Process Biochemistry, **33**, 69-74.

LÖWENADLER, J., RÖNNER, U. (1994). Determination of dissolved carbon dioxide by coulometric titration in modified atmosphere systems. Letters in applied microbiology, **18**, 285-288.

MARARD, P. et HENRY, M. (1998). Optimization of the mineral composition of in vitro culture media. Journal of Plant Nutrition, **21**, 1565-1576.

MARTIN, S. M. et ROSE, D. (1976). Growth of plant cell (*Ipomoea*) suspension cultures at controlled pH levels. Can. J. Bot., **54**, 1264-1270.

MAUREL, B., PAREILLEUX, A. (1986). Carbon dioxide fixation and growth of heterotrophic cell suspensions of *Catharanthus roseus*. J. Plant Physiol., **122**, 347-355.

McCABE, W. L., SMITH, J. C., HARIOTT, P. (1993). Unit Operation of Chemical Engineering. , McGraw-Hill, New York, 686-737.

MERCHUK, J. C. (1991). Shear effects on suspended cells. Advances in Biochemical Engineering, **44**, 65-95.

MERUVA, R. K., MEYERHOFF, M. E. (1998). Catheter-type sensor for potentiometric monitoring of oxygen, pH and carbon dioxide. Biosensors and bioelectronics, **13**, 201-212.

MITCHELL-LOGEAN, C., MURHAMMER, D. W. (1997). Bioreactor headspace purging reduces dissolved carbon dioxide accumulation in insect cell cultures and enhances cell growth. Biotechnol. Prog., **13**, 875-877.

MORI, T. et SAKURAI, M. (1994). Production of anthocyanin from strawberry cell suspension cultures; Effects of sugar and nitrogen. J. of Food Science, **59**, 588-593.

MURASHIGE, T., SKOOG, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant, **15**, 473-497.

OEGGERLI, A., EYER, K., HEINZLE, E. (1995). On-line gaz analysis in animal cell cultivation: I. Control of dissolved oxygen and pH. Biotechnology and Bioengineering, **45**, 42-53.

OSKMAN-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 and Organ Culture, **38**, 263-272.

PANDA, A. K., MISHRA, S., BISARIA, V. S. (1992). Alkaloid production by plant cell suspension cultures of *Holarrhena antidysenterica*: I Effect of major nutrients. Biotechnology and Bioengineering, **39**, 1043-1051.

PAREILLEUX, A. et VINAS, R. (1983). Influence of the aeration rate on the growth yields in suspension cultures of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. J. of Ferment. Technol., **61**, 429-433.

PATTERSON, W. I., CARREAU, P. J., YAP, C. Y. (1979). Mixing with helical ribbon agitators: Part II. Newtonian fluids. AIChE Journal, **25**, 516-521.

PAYNE, G.F., DAVISON, S.W. et TATE, J.L. (1990). Experimental constraints to studying the effects of dissolved oxygen and dissolved carbon dioxide on plant cell growth. Developments in Industrial Microbiology, **31**, 293-301.

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

RANE, K.D. et SIMS, K.A. (1994). Oxygen uptake and citric acid production by *Candida lipolytica* Y 1095. Biotechnology and Bioengineering, **43**, 131-137.

RHO, D., CHAURET, N., LABERGE, N., ARCHAMBAULT, J. (1992). Growth characteristics of *Sanguinaria canadensis* L. cell suspensions and immobilized cultures for production of benzophenanthridine alkaloids. Applied Microbiology and Biotechnology, **36**, 611-617.

ROBERTS, E. H., SMITH, R. D. (1977). The pentose phosphate pathway. The physiology and biochemistry of seed dormancy and germination.

ROBINSON, C.W. et WILKE, C.R. (1973). Oxygen absorption in stirred tanks: a correlation for ionic strength effects. Biotechnology and Bioengineering, **15**, 755-782.

ROUT, G.R., SAMANTARAY, S., MOTTELEY, J., YOKOYA, K., MANDEGARAN, Z., SARASAN, V., KANDASAMY, K., ROBBERTS, A.V. et DAS, P. (1998). Histology of in vitro organogenesis and somatic embryogenesis in callus cultures of Rosa. Biologia, **53**, 121-126.

ROYCE, P. N. (1992). Effect of changes in pH and carbon dioxide evolution rate on the measured respiratory quotient of fermentations. Biotechnology and Bioengineering, **40**, 1129-1138.

ROYCE, P. N. C., THORNHILL, N. F. (1991). Estimation of dissolved carbon dioxide concentrations in aerobic fermentations. AIChE Journal, **37**, 1680-1686.

RUBIO, F. C., GARCIA, J. L., MOLINA, E., CHISTI, Y. (1999). Steady-state axial profiles of dissolved oxygen in tall bubble column bioreactors. Chemical Engineering Science, **54**, 1711-1723.

RUCHTI, G. DUNN, I.J. et BOURNE, J.R. (1981). Comparison of dynamic oxygen electrode methods for the measurement of *K<sub>la</sub>*. Biotechnology and Bioengineering, **23**, 277-290.

RUFFIEUX, P.-A., von STOCKAR, U. et MARISON, W. (1998). Measurement of volumetric (OUR) and determination of specific ( $qO_2$ ) oxygen uptakes rates in animal cell cultures. Journal of Biotechnology, **63**, 85-95.

RUFTY, T. W. Jr., THOMAS, R. B., CURE, J. D., CURE, W. W. (1994). Growth response of cotton to CO<sub>2</sub> enrichment in differing light environments. Physiologia Plantarum, **91**, 503-509.

RYU, D. D. Y. et LEE, S. O. (1990). Determination of growth rate for plant cell cultures: comparative studies. Biotechnology and Bioengineering, **35**, 305-311.

SARGENT, P. A. et KING, J. (1973). Investigations of growth-promoting factors in conditioned soybean root cells and in the liquid medium in which they grow: ammonium, glutamine, and amino acids. Can. J. Bot., **52**, 1747-1755.

SCHLATMANN, J. E., MORENO, P. R. H., VINKE, J. L., ten HOOPEN, H. J. G., VERPOORTE, R., HEIJNEN, J. J. (1994). Effect of oxygen and nutrient limitation on ajmalicine production and related enzyme activities in high density cultures of *Catharanthus roseus*. Biotechnology and Bioengineering, **44**, 461-468.

SCHLATMANN, J. E., NUUTILA, A. M., van GULIK, W. M., ten HOOPEN, H. J. G., VERPOORTE, R., HEIJNEN, J. J. (1993). Scaleup of ajmalicine production by plant cell cultures of *Catharanthus roseus*. Biotechnology and Bioengineering, **41**, 253-262.

SCHLATMANN, J. E., VINKE, J. L., ten HOOPEN, H. J. G., HEIJNEN, J. J. (1995). Relation between dissolved oxygen concentration and ajmalicine production rate in high-density cultures of *Catharanthus roseus*. Biotechnology and Bioengineering, **45**, 435-439.

SHIBLI, R.A., SMITH, M.A.L. et KUSHAD, M. (1997). Headspace ethylene accumulation effects on secondary metabolite production in *Vaccinium pallidum* cell culture. Plant Growth Regulation, **23**, 201-205.

SHIELDS, R. W., KAO, E. I. (1994). An energy cost minimizing strategy for fermentation dissolved oxygen control. Bioprocess Engineering, **10**, 91-97.

SIEBERTZ, R., PROKSCH, P., WRAY, V., WITTE, L. (1989). Accumulation and biosynthesis of benzofurans in root cultures of *Eupatorium cannabinum*. Phytochemistry, **28**, 789-793.

SIFI, I. (1999). Projet de fin d'études, Université du Québec à Trois-Rivières, Canada.

SIROIS, S. (1997). Optimisation de la croissance de cellules d'*Eschscholtzia californica* en bioréacteur. Mémoire de maîtrise, École polytechnique de Montréal, Canada.

SISLER, E. C., WOOD, C. (1988). Interaction of ethylene and CO<sub>2</sub>. Physiologia Plantarium, 73, 440-444.

SKIRVIN, R. M., CHU, M. C., MANN, M. L., YOUNG, H., SULLIVAN, J. (1986). Stability of tissue culture medium pH as a function of autoclaving, time, and cultured plant material. Plant Cell Reports, 5, 292-294.

SMITH, J. M., DAVISON, S. W., PAYNE, G. F. (1990). Development of a strategy to control the dissolved concentrations of oxygen and carbon dioxide at constant shear in a plant cell bioreactor. Biotechnology and Bioengineering, 35, 1088-1101.

SNAPE, J. B. et THOMAS, N.H. (1989). How suspension cultures of *Catharanthus roseus* respond to oxygen limitation: Small-scale tests with application to large-scale cultures. Biotechnology and Bioengineering, 34, 1058-1062.

STUMM, W., MORGAN, J. J. (1996). Chapitre 4: Dissolved carbon dioxide. Aquatic Chemistry, Thirth Edition, 148-203.

STUMM, W., MORGAN, J. J. (1996). Chapitre 5: Atmosphere-Water interactions. Aquatic Chemistry, Thirth Edition, 148-204.

SUPHANTHARIKA, M., ISON, A. P., LILLY, M. D. (1995). The effect of cycling dissolved tension on the synthesis of the antibiotic difficidin by *Bacillus subtilis*. Bioprocess Engineering, 12, 181-186.

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

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

TATICEK, R. A., MOO-YOUNG, M., LEGGE, R. L. (1990). Effect of bioreactor configuration on substrate uptake by cell suspension cultures of the plant *Eschscholtzia californica*. Applied Microbiology and Biotechnology, **33**, 280-286.

TRIBE, L.A., BRIENS, C. L. et MARGARITIS, A. (1995). Determination of the volumetric mass transfert coefficient ( $k_{la}$ ) using the dynamic "gas out-gas in" method: analysis of errors caused by dissolved oxygen probes. Biotechnology and Bioengineering, **46**, 388-392.

USHIYAMA, K. (1991). Large scale culture of ginseng. Plant cell culture in Japan, 92-98.

van GULIK, W. M., MEIJER, J. J., ten HOOPEN, H. J. G. LUYBEN, A. M. et LIBBENGA, K. R. (1989). Growth of a *Catharanthus roseus* cell suspension culture in a modified chemostat under glucose-limiting conditions. Appl. Microbiol. Biotechnol., **30**, 270-275.

van GULIK, W. M., ten HOOPEN, H. J. G. et HEIJNEN, J. J. (1992). Kinetic and stoichiometry of growth plant cell cultures of *Catharanthus roseus* and *Nicotiana tobacum* in batch and continuous fermentors. Biotechnology and Bioengineering, **40**, 863-874.

van GULIK, W. M., ten HOOPEN, H. J. G. et HEIJNEN, J. J. (1993). A structured model describing carbon and phosphate limited growth of *Catharanthus roseus* plant cell suspension in batch and chemostat culture. Biotechnology and Bioengineering, **41**, 771-780.

van't RIET, K. et TRAMPER, J. (1991). Chapitre 8: Shear. Basic Bioreactor Design, 136-180.

van't RIET, K. et TRAMPER, J. (1991). Chapitre 9: Mixing. Basic Bioreactor Design, 183-219.

VELIKY, I. A. et ROSE, D. (1973). Nitrate and ammonium as nitrogen nutrients for plant cell cultures. Can. J. Bot., **51**, 1837-1844.

VERPOORTE, R. (1998). Exploration of nature's chemodiversity: The role of secondary metabolites as leads in drug development. DDT, **3**, 232-238.

VERPOORTE, R., van der HEIJDEN, R., SCHRIJFSEMA, J. (1993). Plant cell biotechnology for the production of alkaloids: present status and prospects. Journal of Natural Products, **56**, 186-207.

WILLIAMS, R. D., BÉDARD, C., CHAVARIE, C., ARCHAMBAULT, J. (1996). Production of sanguinarine by elicited plant cell cultures II. Further nutritional aspects. J. of Biotechnology, **46**, 107-120.

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

XU JF, XIE J, HAN AM, FENG PS et SU ZG (1998). Kinetic and technical studies on large-scale culture of *Rhodiola sachalinensis* compact callus aggregates with air-lift reactors. J. Chem. Technol. Biotechnol., **72**, 227-234.

YAP, C. Y., PATTERSON, W. I., CARREAU, P. J. (1979). Mixing with helical ribbon agitators: Part III. Non-Newtonian fluids. AIChE Journal, **25**, 522-531.

ZENG, Y., WU, Y., AVIGNE, W. T., KOCH, K. E. (1999). Rapid repression of maize invertases by low oxygen. Invertase / sucrose synthase balance, sugar signaling potential, and seedling survival. Plant physiology, **121**, 599-608.

ZHONG, J.-J., FUJIYAMA, K., SEKI, T. et YOSHIDA, T. (1994). A quantitative analysis of shear effects on cell suspension and cell culture of *Perilla frutescens* in bioreactors. Biotechnology and Bioengineering, **44**, 649-654.

ZHONG, J.-J., KONSTANTINOV, K. B., YOSHIDA, T. (1994). Computer-aided on-line monitoring of physiological variables in suspended cell cultures of *Perilla frutescens* in a bioreactor. Journal of Fermentation and Bioengineering, **77**, 445-447.

ZHONG, J.-J., XU, G.-R., YOSHIDA, T. (1994). Effect of initial sucrose concentration on excretion of anthocyanin pigments in suspended cultures of *Perilla frutescens* cells. World Journal of Microbiology and Biotechnology, **10**, 590-592.

ZHONG, J.-J., YOSHIDA, T. (1993). Effects of temperature on cell growth and anthocyanin production in suspension cultures of *Perilla frutescens*. Journal of Fermentation and Bioengineering, **76**, 530-531.

ZHONG, J.-J., YOSHIDA, T. (1995). High-density cultivation of *Perilla frutescens* cell suspensions for anthocyanin production: Effects of sucrose concentration and inoculum size. Enzyme Microb. Technol., **17**, 1073-1079.

**ANNEXE A : COMPOSITION DU MILIEU DE CULTURE**

**Tableau A . 1 : Composition du milieu utilisé**

<b>Macronutriments</b>	<b>mg·L<sup>-1</sup></b>	<b>mM</b>
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HC <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub>	1130	5
KNO <sub>3</sub>	2500	25
CaCl <sub>2</sub> ·2 H <sub>2</sub> O	150	1
MgSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O	250	1
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	134	1
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2 H <sub>2</sub> O	150	1,1
<b>Micronutriments</b>	<b>mg·L<sup>-1</sup></b>	<b>µM</b>
KI	0,75	4,5
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3	50
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	10	60
ZnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	2	7
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2 H <sub>2</sub> O	0,25	1
CuSO <sub>4</sub> ·5 H <sub>2</sub> O	0,025	0,1
CoCl <sub>2</sub> ·6 H <sub>2</sub> O	0,025	0,1
EDTA-ferrique	43	100
<b>Vitamines</b>	<b>mg·L<sup>-1</sup></b>	
Moy-inositol	100	
Acide nicotinique	1	
Pyridoxine.HCl	1	
Thiamine.HCl	10	
<b>Hormones</b>	<b>mg·L<sup>-1</sup></b>	
Kinétine	0,1	
Acide 2-4 dichlorophénoxyacétique	0,2	
pH	5,5	
Glucose	30000	

**ANNEXE B : COMPTE CELLULAIRE**

Le pH du 2 ml d'échantillon est tamponné à 4.5 par l'ajout de 4 à 5 ml de tampon citrate (voir tableau B.1) ce qui facilite la digestion enzymatique des parois cellulaires et le comptage subséquent. Le tout est laissé à décanter dans un tube de centrifugation et le surnageant est retiré. Le volume est par la suite complété à 4 ml à l'aide de la solution enzymatique (voir tableau B.2). Le tube est fermé et agité pour 2 h à 140 RPM à 26 ± 1°C. Ensuite, 50 µL de suspension cellulaire sont dilué avec 50 µL de fuchine liquéfiée afin de colorer les cellules. Les cellules sont ensuite déposés sur une plaque de comptage et recouverte d'une lamelle pour être immédiatement comptés sous le microscope.

**Tableau B . 1 : Composition du tampon citrate**

Tampon citrate	g L <sup>-1</sup>
Citrate de sodium	16,2
Acide citrique	9,6

**Tableau B . 2 : Composition de la solution enzymatique**

Solution enzymatique	par 100 ml de tampon citrate
Pectinase	110 µL
Cellulase	175 mg
Hemicellulase	230 mg

**ANNEXE C : RÉSULTATS DES CULTURES EN BIORÉACTEURS**

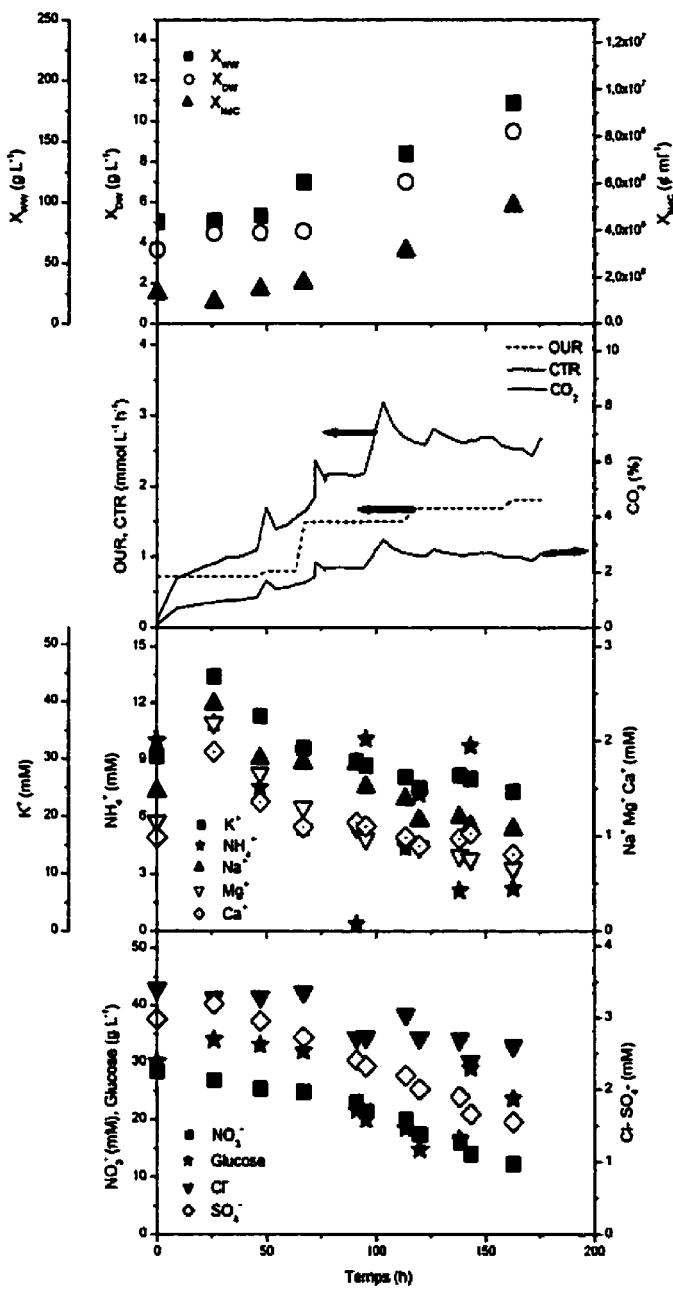


Figure C . 1 : FH08, Série 1, DO 90%, DCO<sub>2</sub> ~ 6%

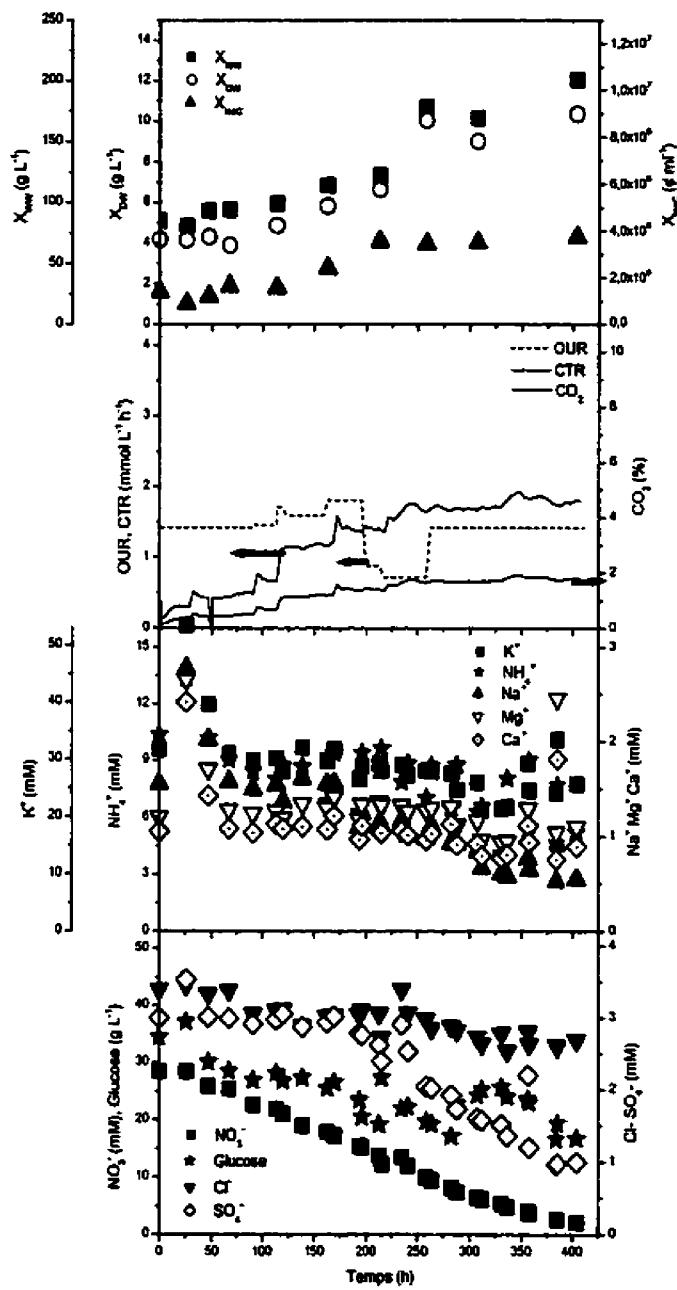
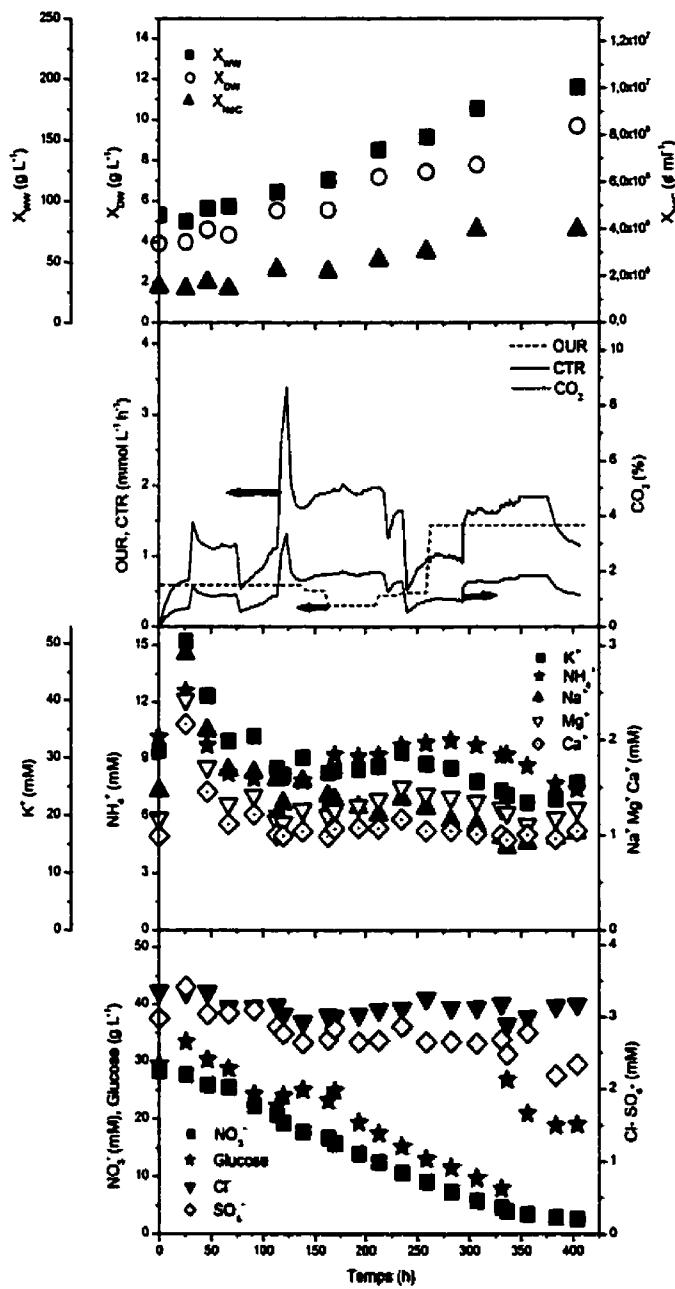


Figure C . 2 : FH09, Série 1, DO 30%, DCO<sub>2</sub> ~ 2.5%



**Figure C . 3 : FH10, Série 1, DO 10%, DCO<sub>2</sub> non disponible**

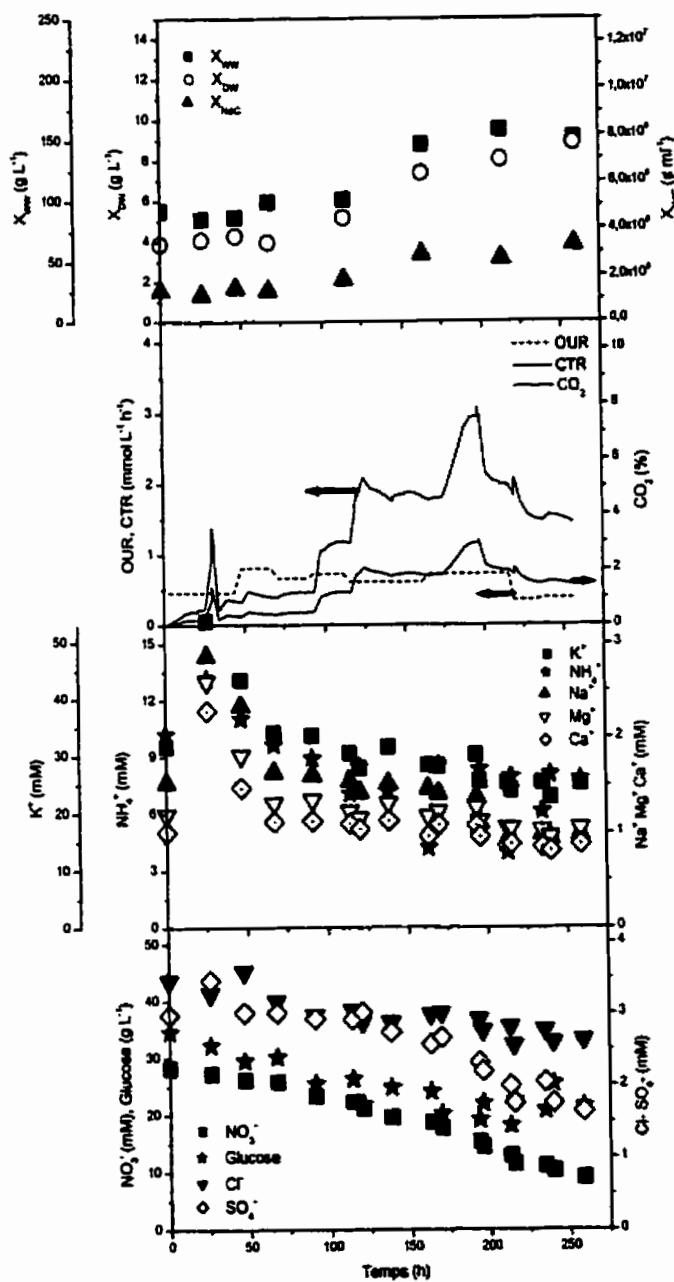


Figure C . 4 : FH11, Série 1, DO 60%, DCO<sub>2</sub> ~4%

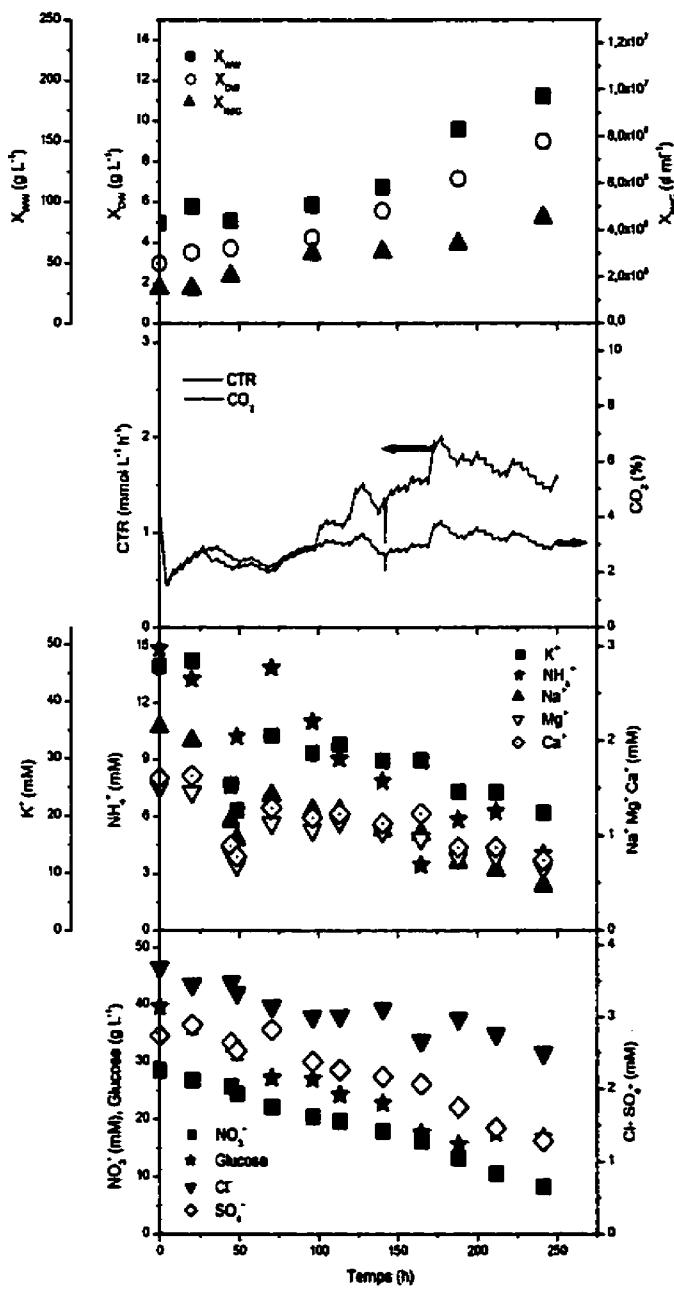
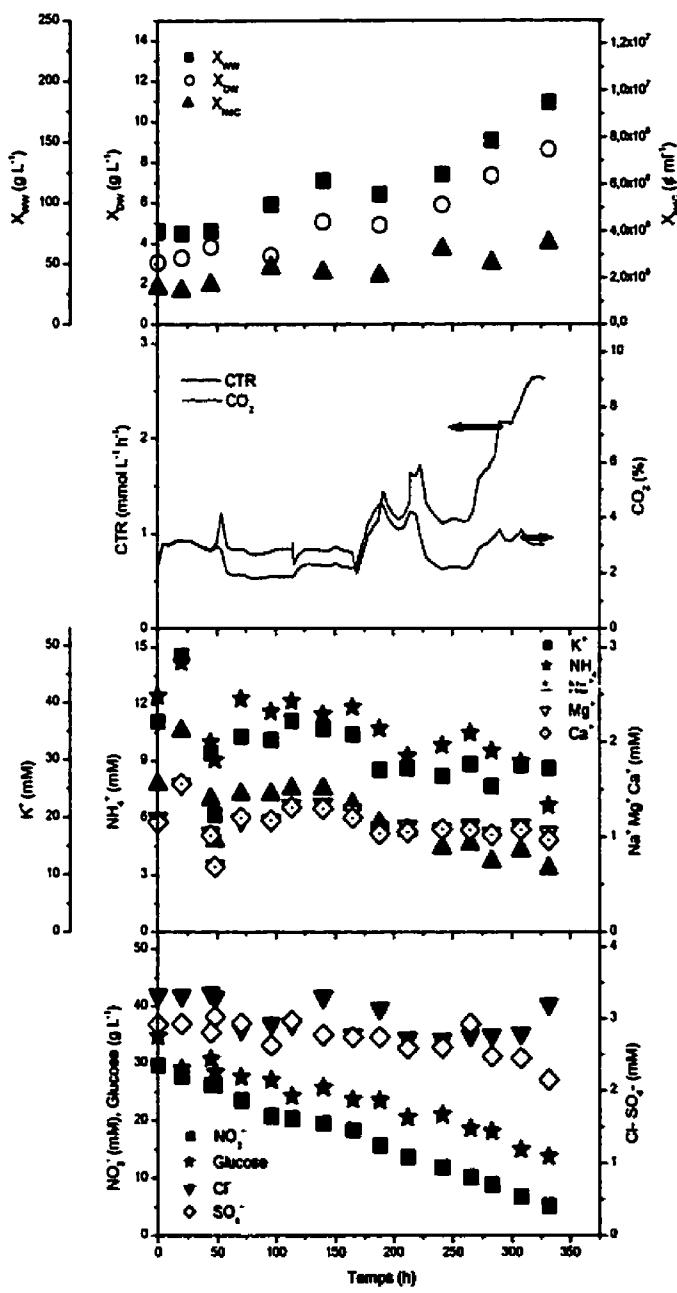


Figure C . 5 : FH13, Série 2, DO 30%, DCO<sub>2</sub> non disponible



**Figure C . 6 : FH15, Série 2, DO 10%, DCO<sub>2</sub> non disponible**

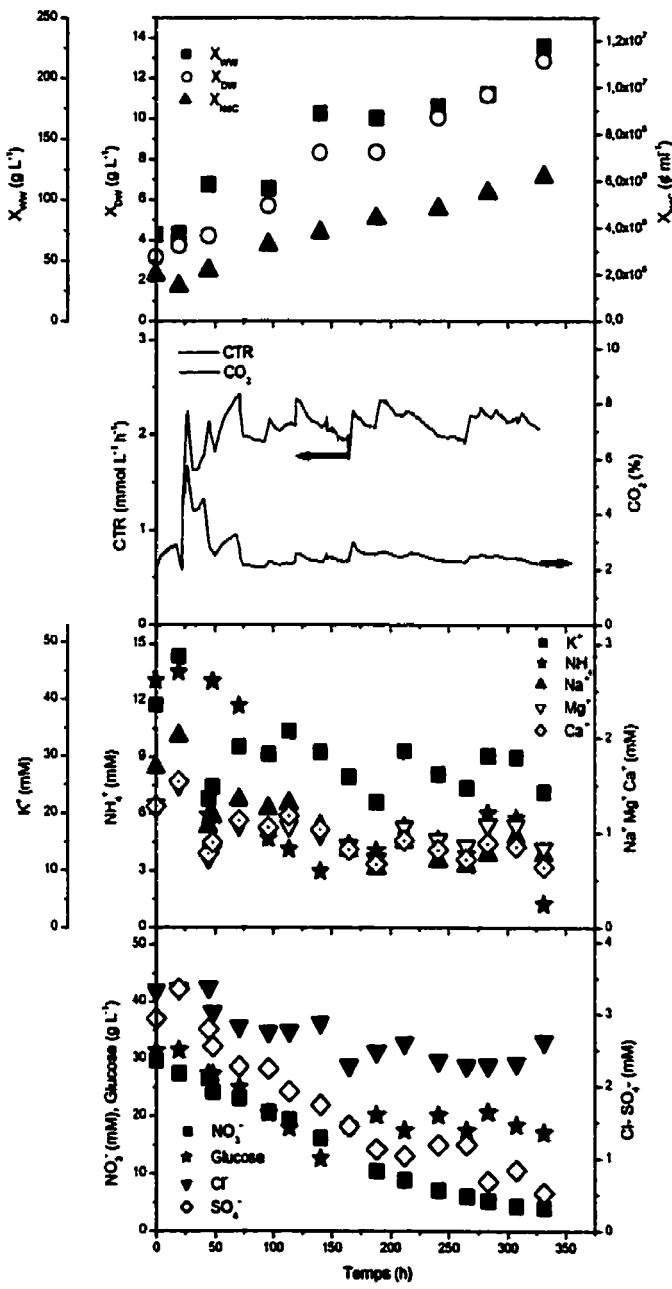
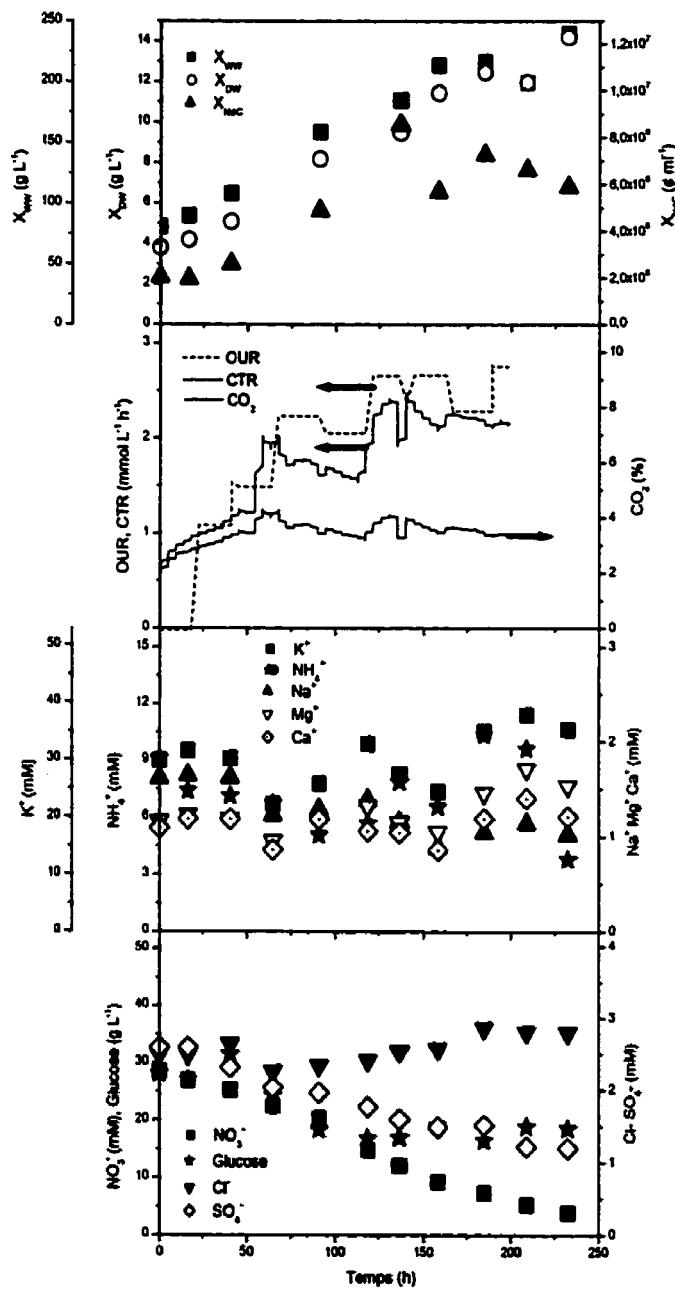


Figure C . 7 : FH16, Série 2, DO 90%, DCO<sub>2</sub> non disponible



**Figure C . 8 : FH21, Série 3, DO 120%, DCO<sub>2</sub> 4.5%**

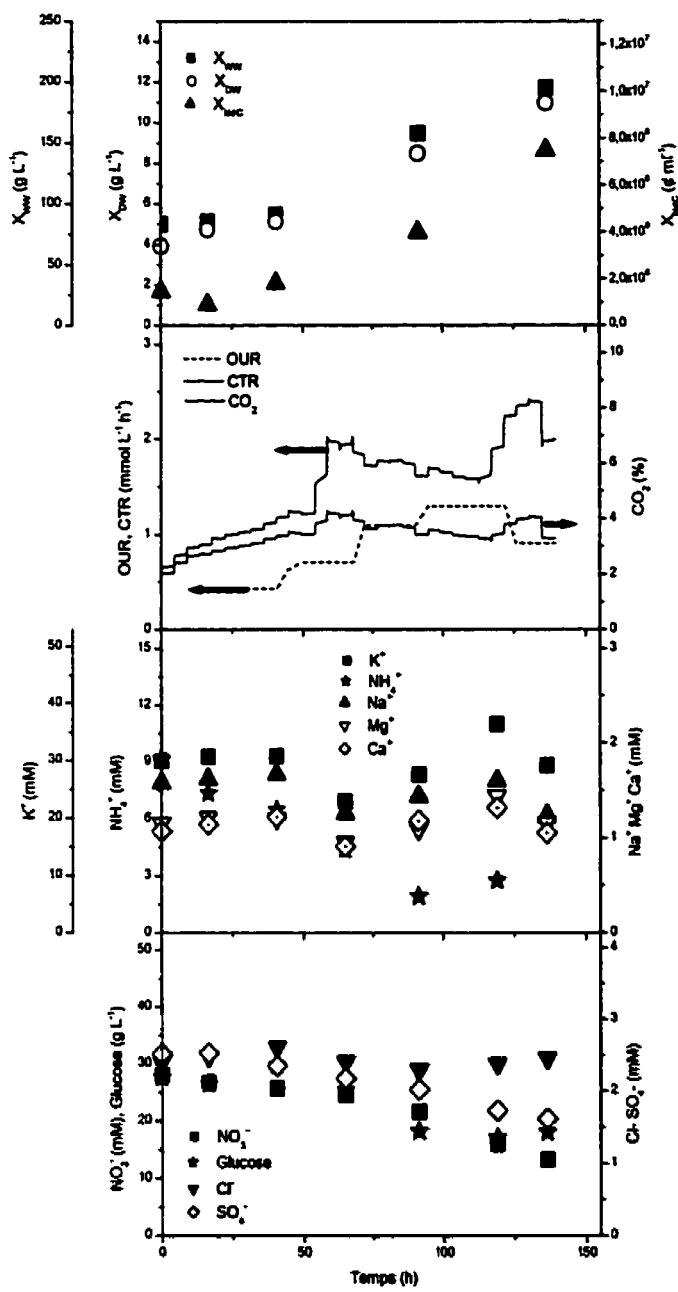


Figure C . 9 : FH22, Série 3, DO 180%, DCO<sub>2</sub> ~8%

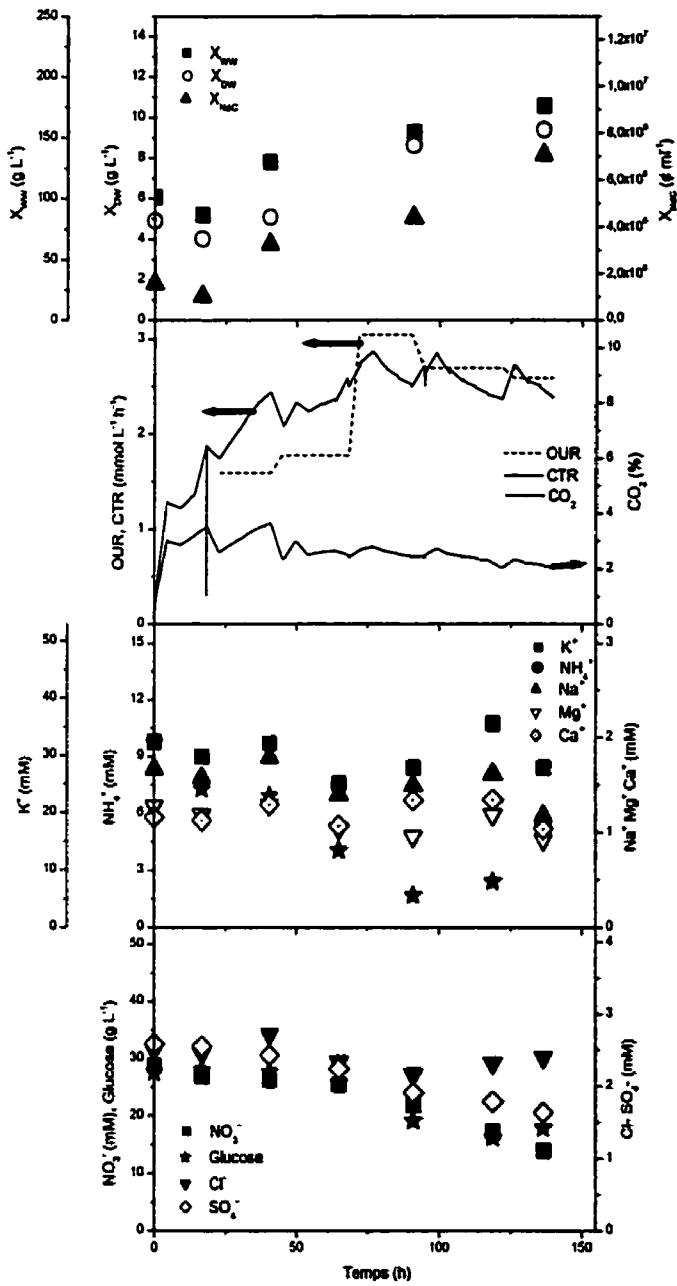


Figure C . 10 : FH23, Série 3, DO 90%,  $\text{DCO}_2 \sim 4.5\%$

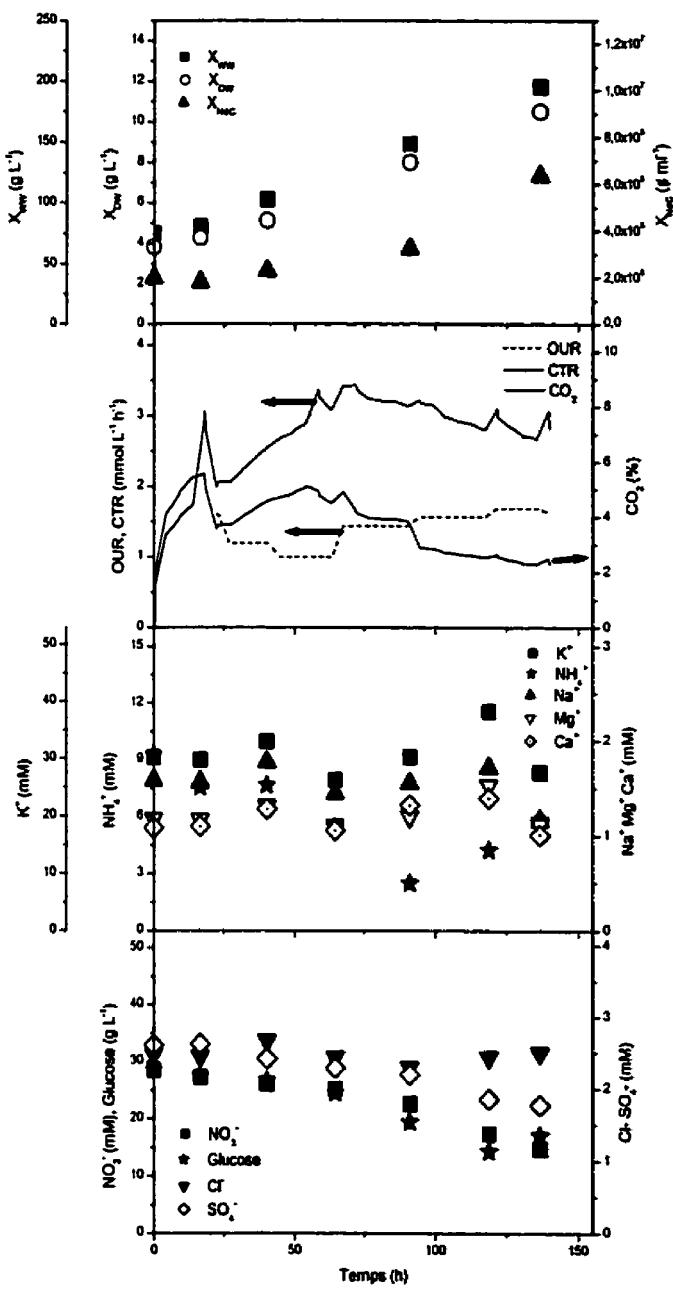


Figure C . 11 : FH24, Série 3, DO 240%, DCO<sub>2</sub> 5.5%

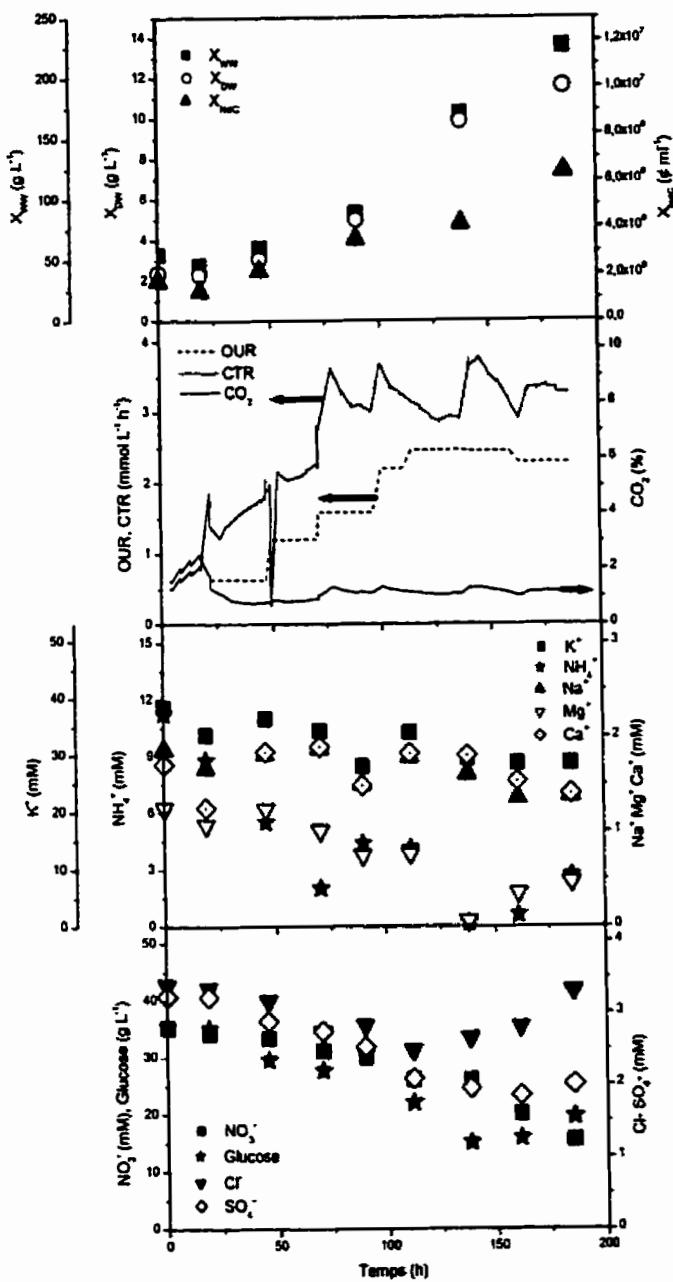


Figure C . 12 : FH27, Série A, DO 60%, DCO<sub>2</sub> 1.25%

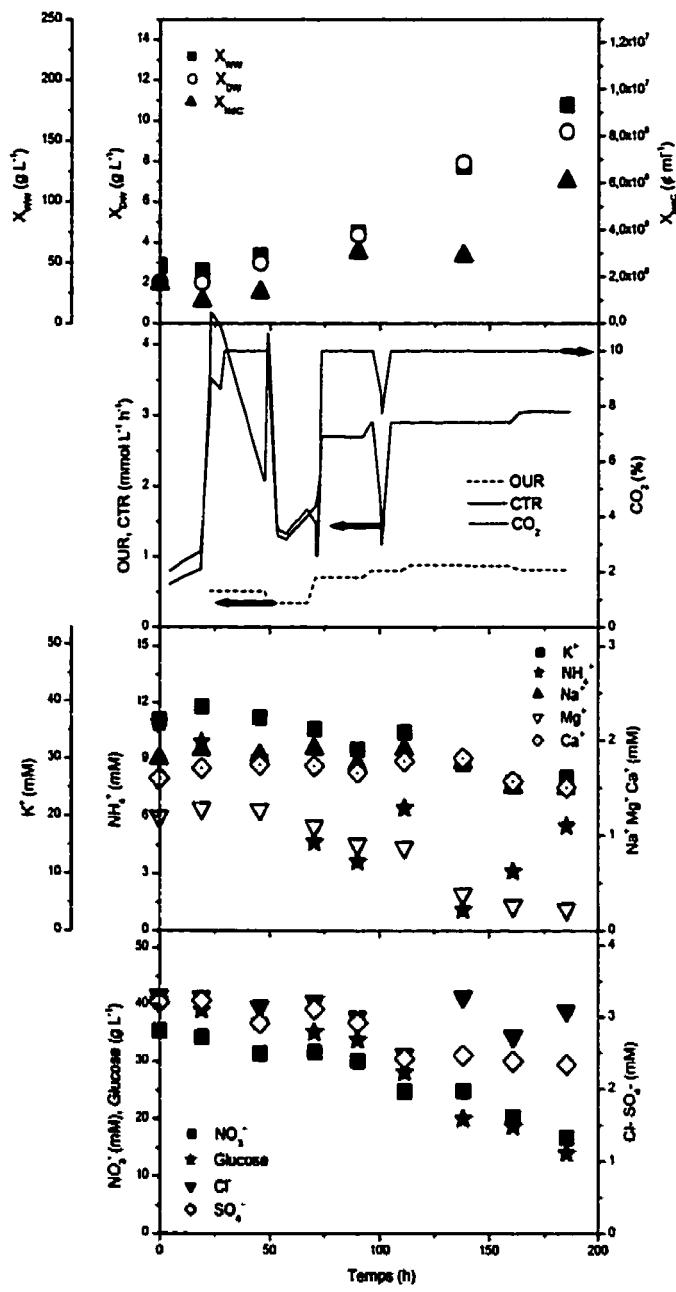


Figure C . 13 : FH28, Série A, DO 60%, DCO<sub>2</sub> 19%

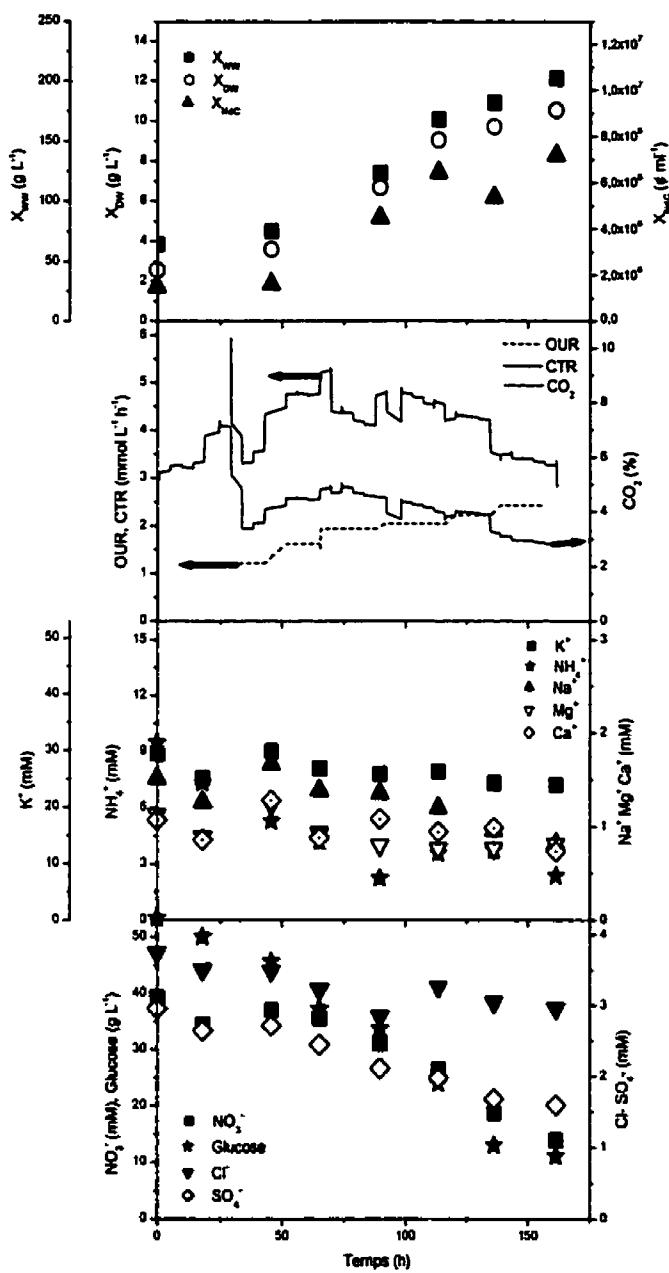


Figure C . 14 : FH29, Série 4, DO 180%, DCO<sub>2</sub> ~4%

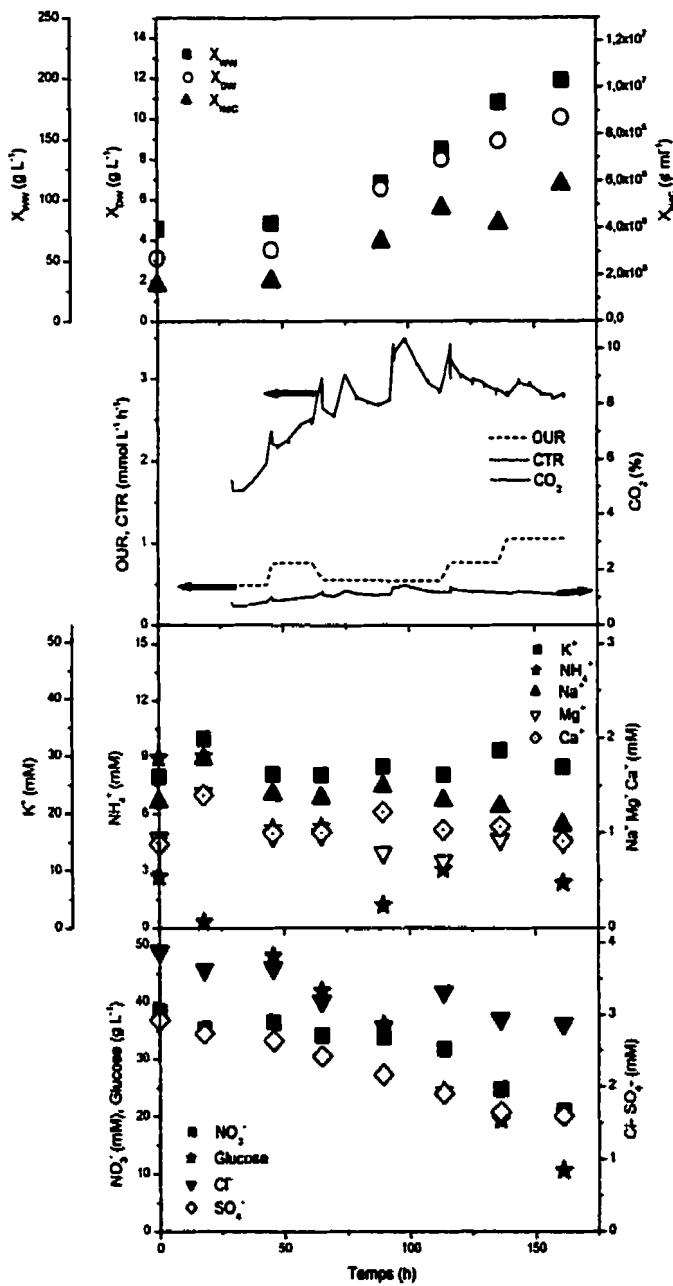


Figure C . 15 : FH30, Série 4, DO 240%, DCO<sub>2</sub> 1.75%

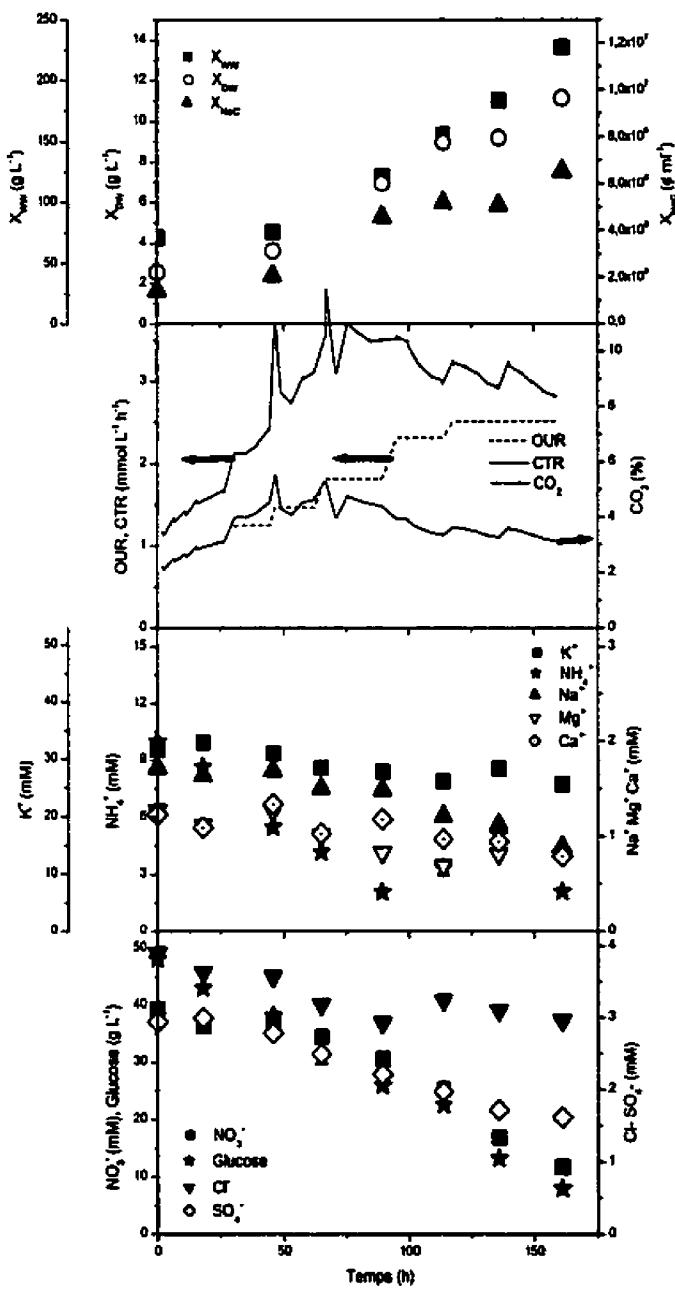


Figure C . 16 : FH31, Série 4, DO 120%, DCO<sub>2</sub> 5%

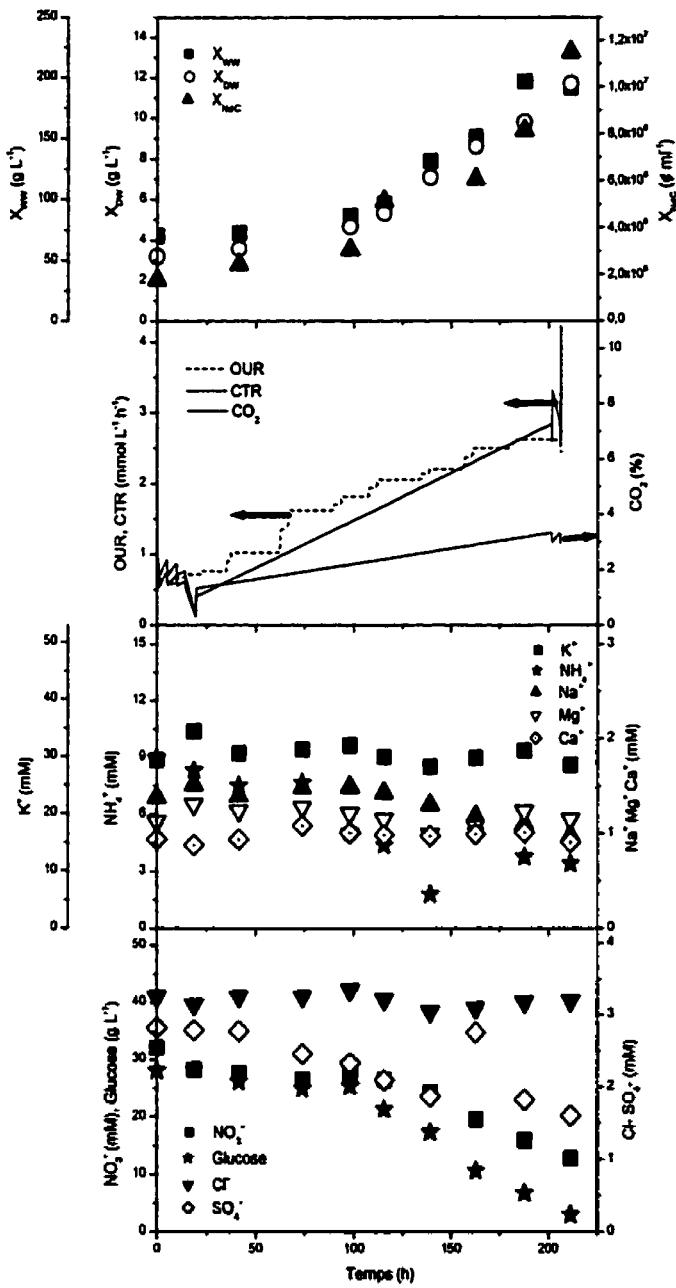


Figure C . 17 : FH32, Série B, DO 120%, DCO<sub>2</sub> 4%

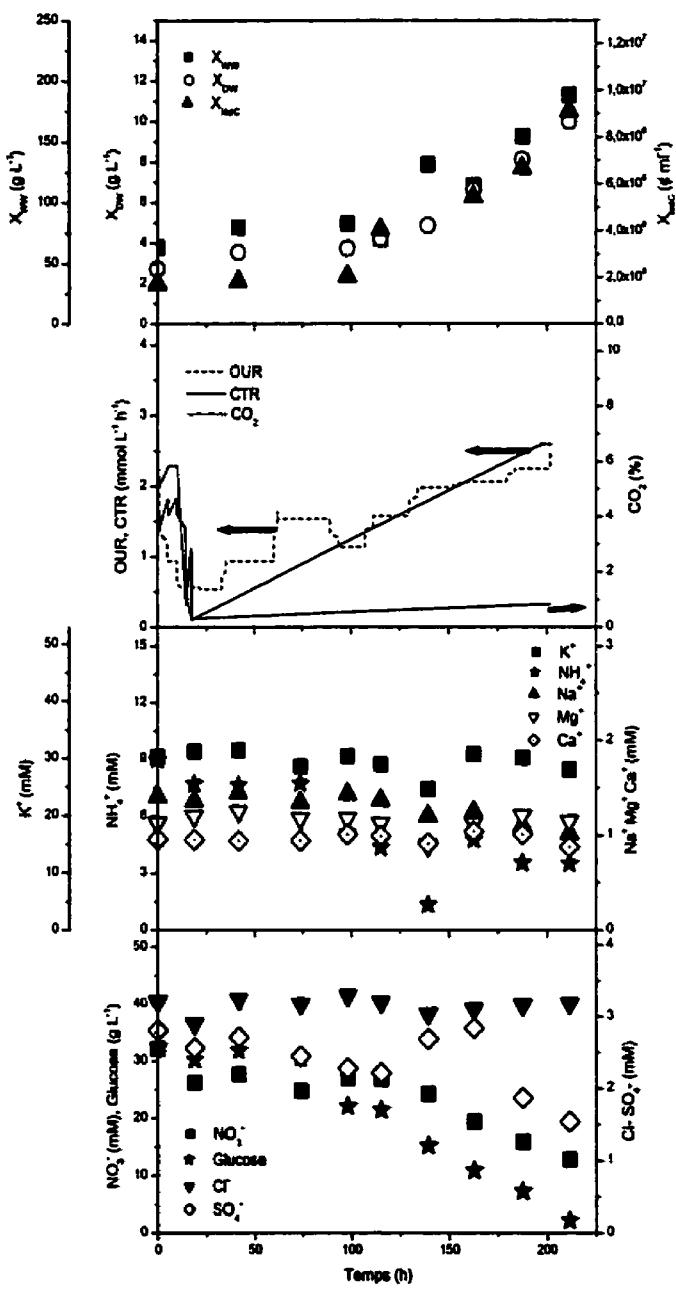


Figure C . 18 : FH33, Série B, DO 120%, DCO<sub>2</sub> 8%

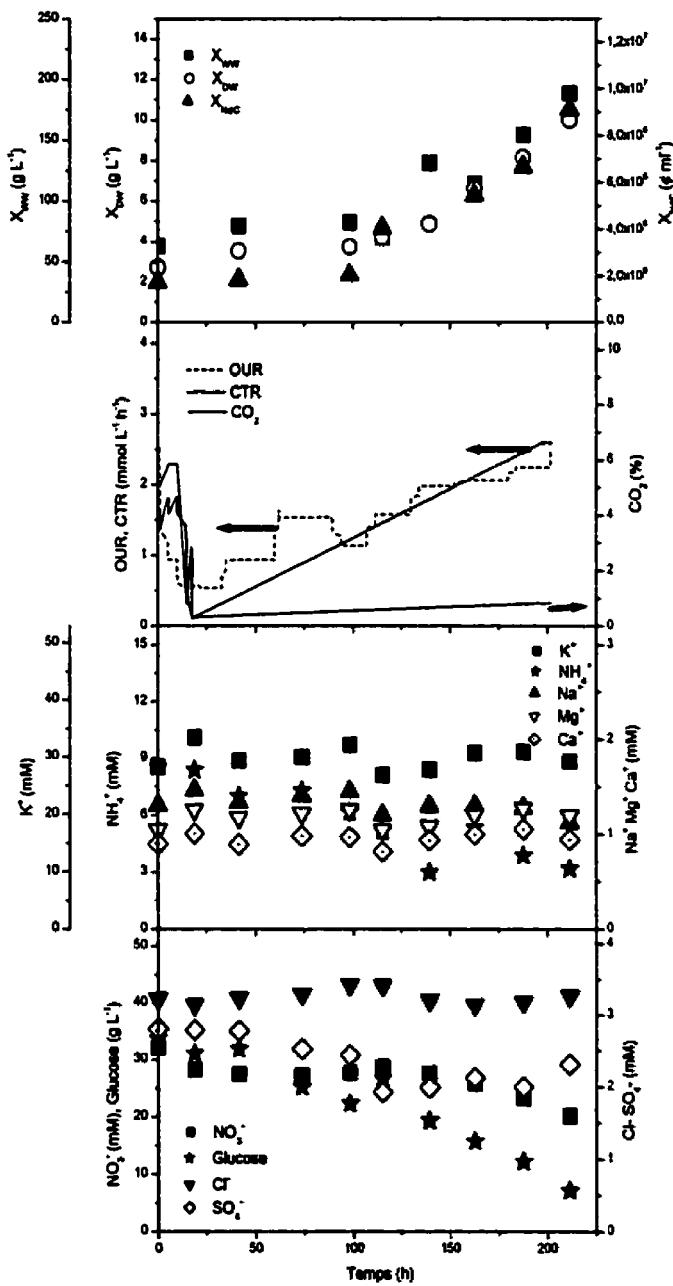


Figure C . 19 : FH34, Série B, DO 120%, DCO<sub>2</sub> 1%

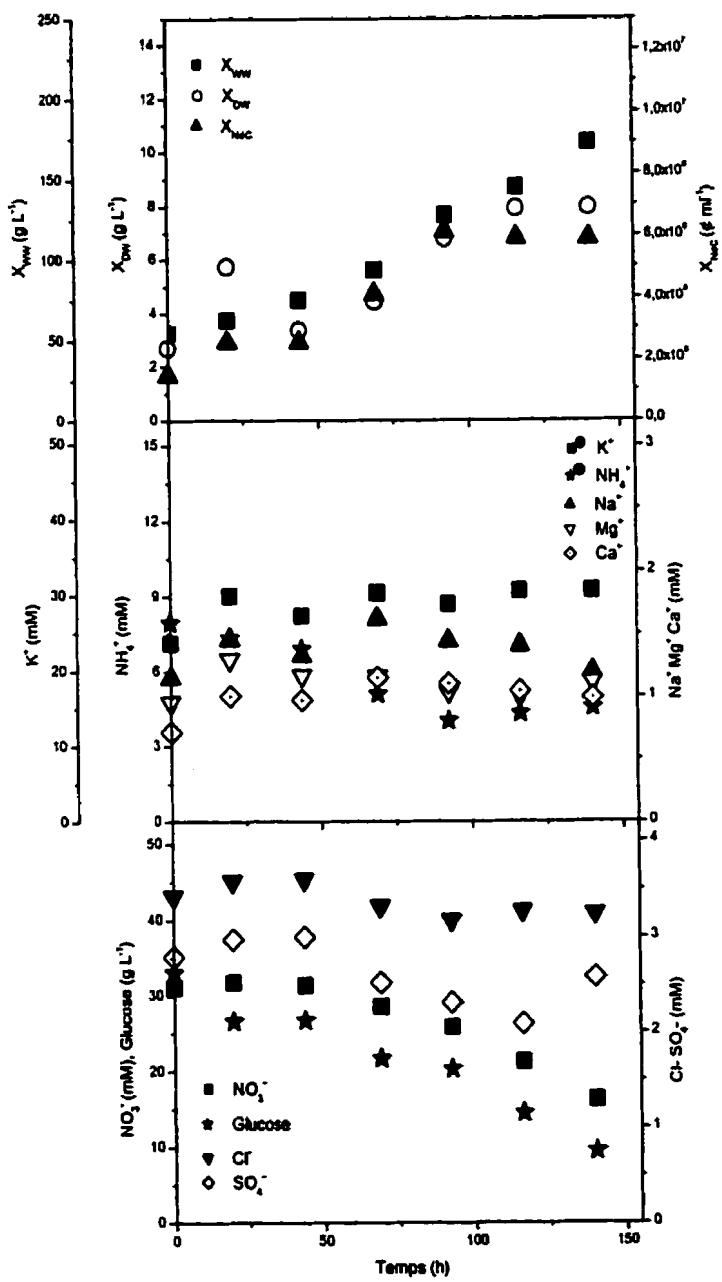


Figure C . 20 : FH35, Série C, DO 120%,  $DCO_2$  4%

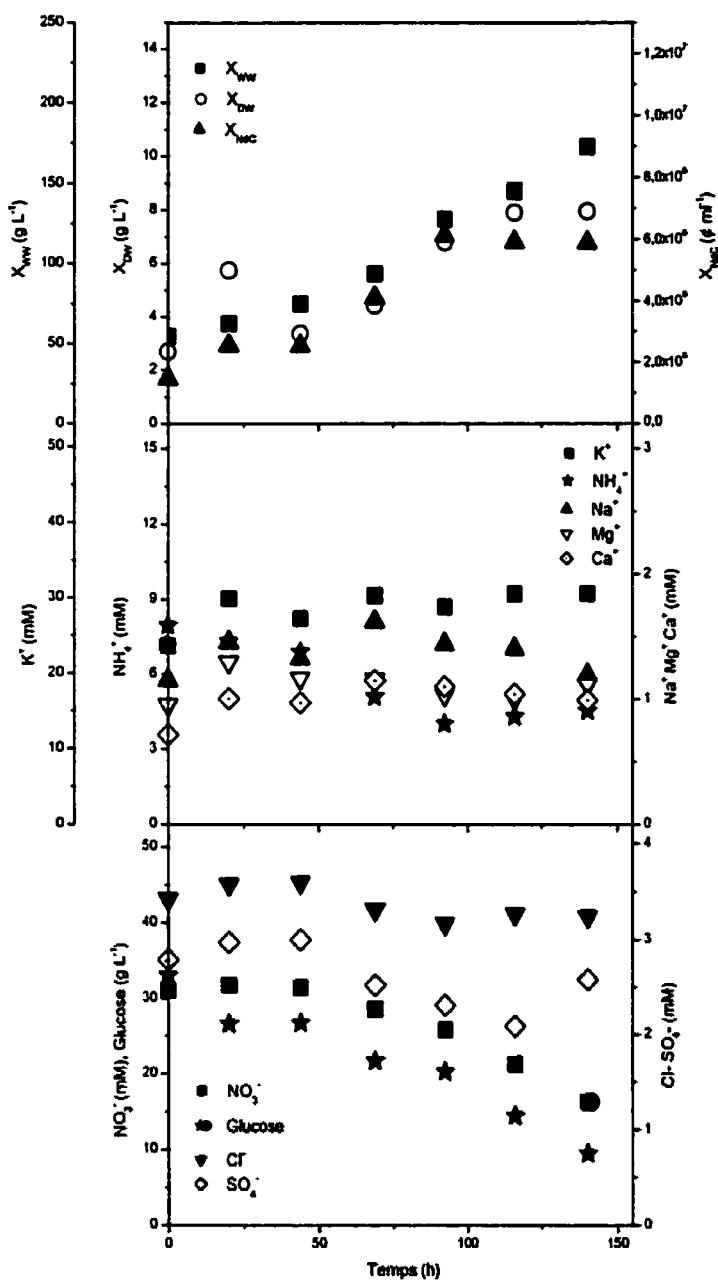


Figure C . 21 : FH37, Série C, DO 120%,  $\text{DCO}_2$  1%

## **ANNEXE D : ASSIMILATION SPÉCIFIQUE DES NUTRIMENTS**

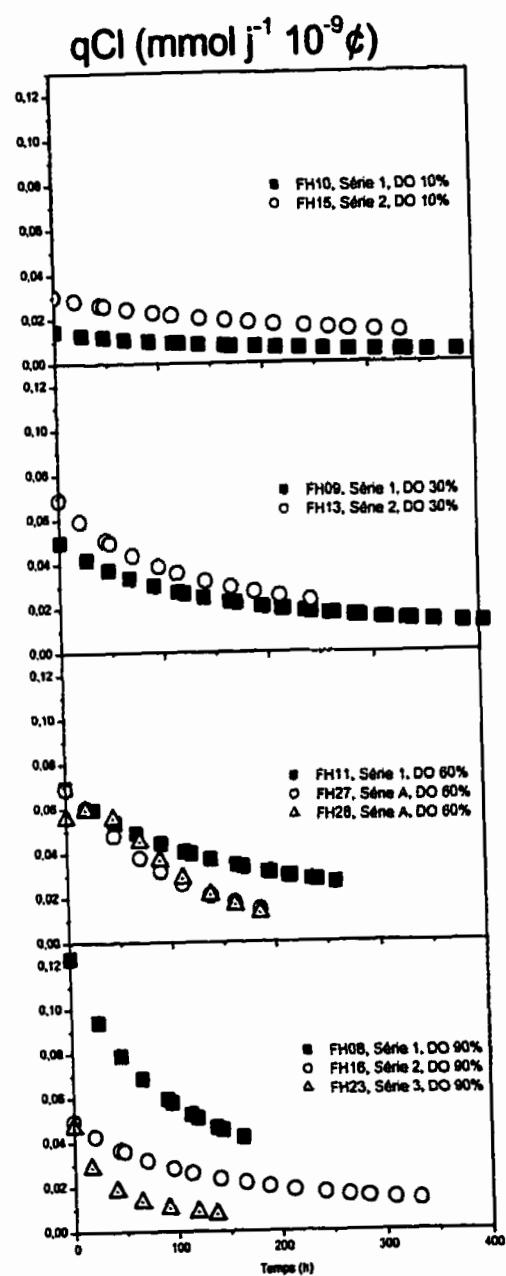
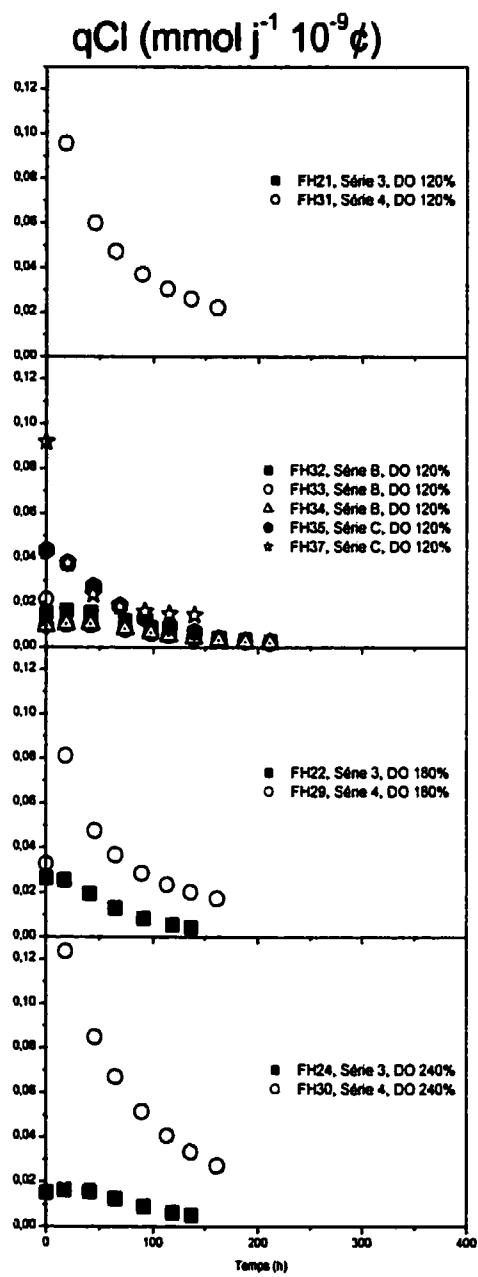


Figure D . 1 : Assimilation spécifique du chlore en NdC, DO < 100%



**Figure D . 2 : Assimilation spécifique du chlore en NdC, DO > 100%**

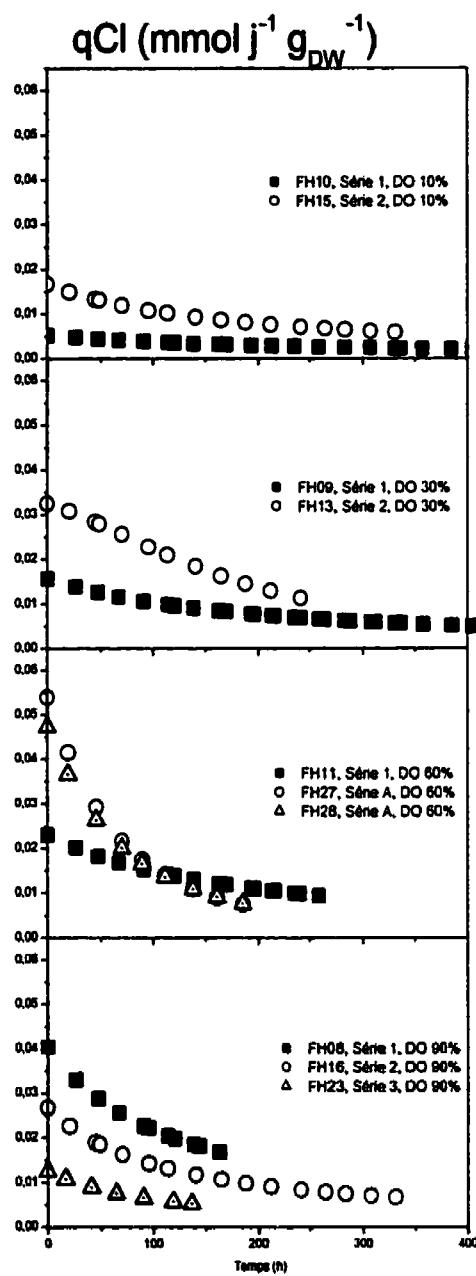


Figure D . 3 : Assimilation spécifique du chlore en  $X_{\text{MS}}$ , DO < 100%

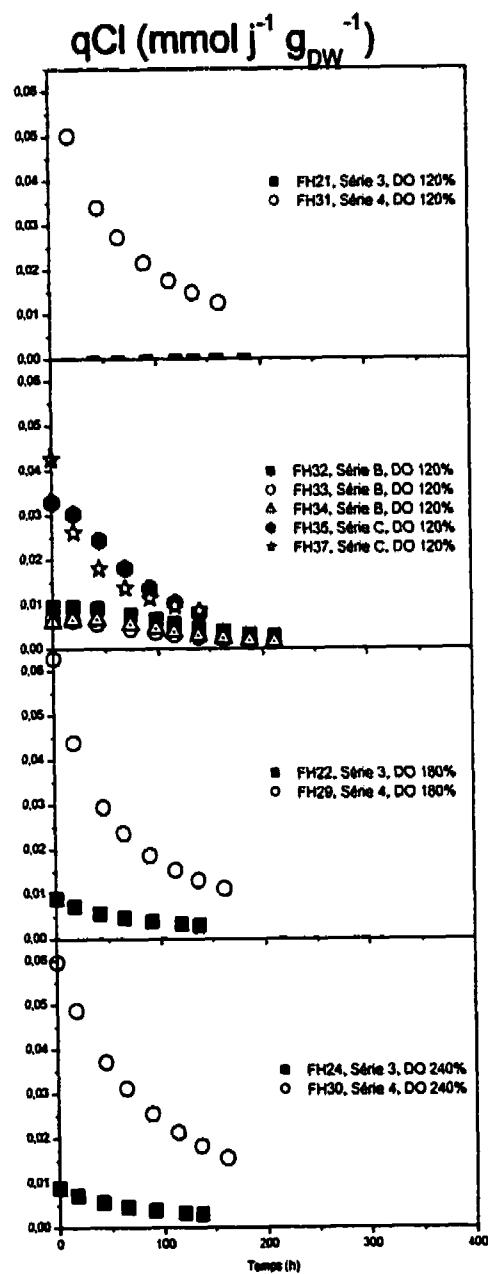


Figure D . 4 : Assimilation spécifique du chlore en  $X_{\text{MS}}$ , DO > 100%

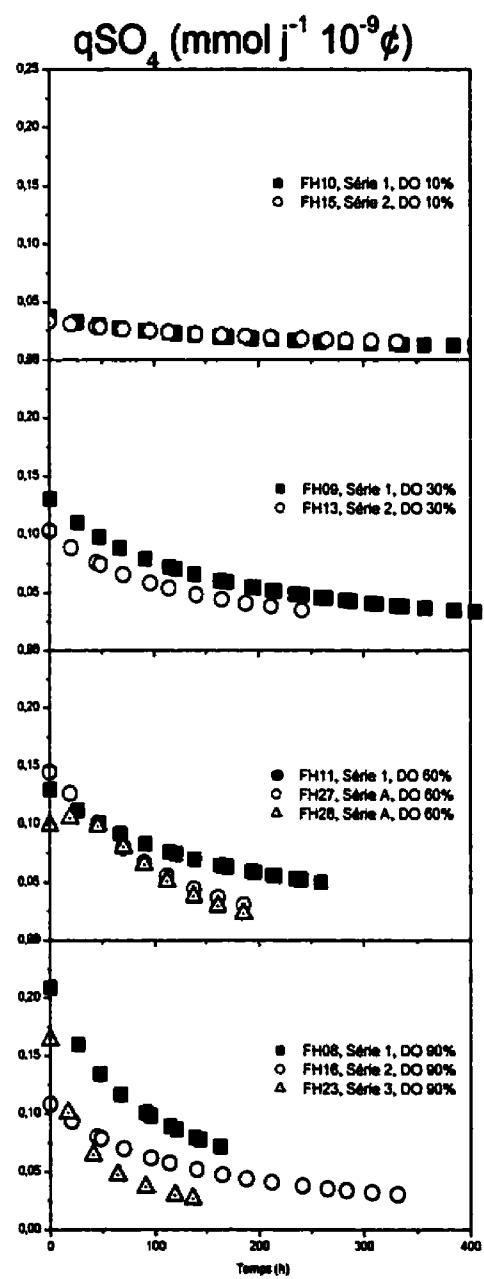


Figure D . 5 : Assimilation spécifique du sulfate en NdC, DO < 100%

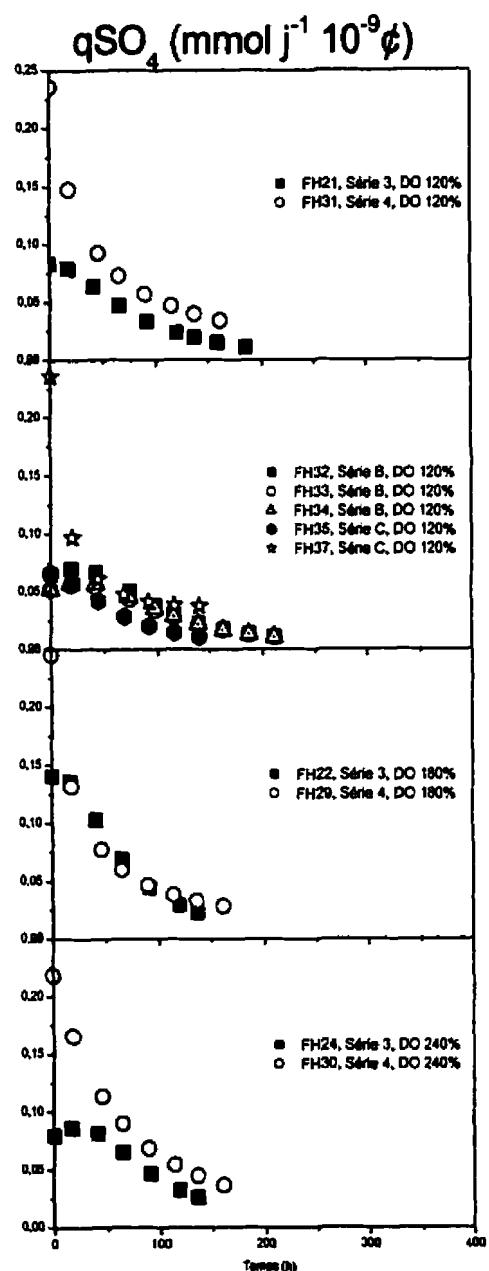
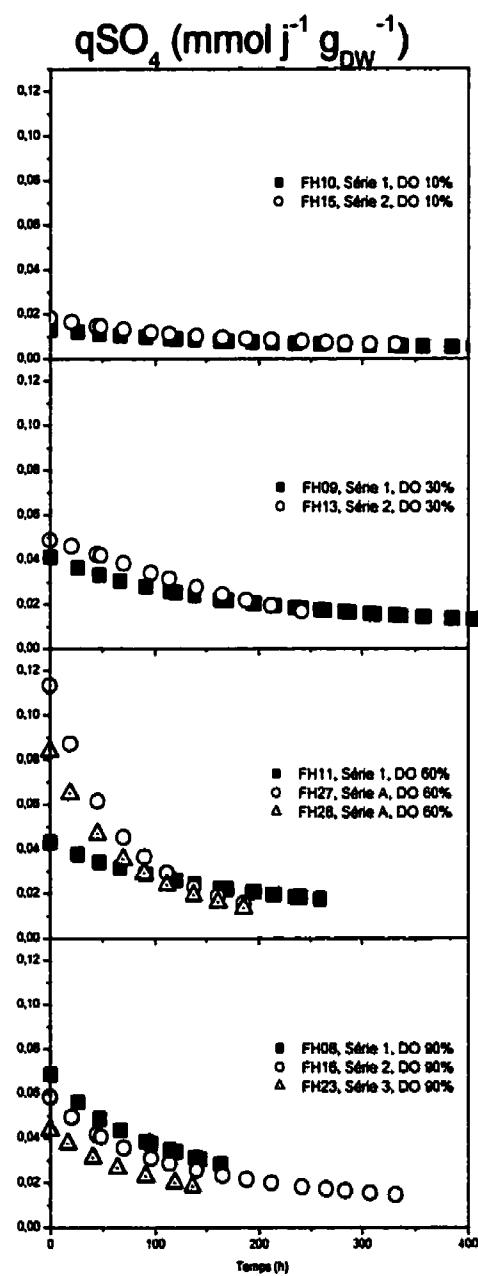


Figure D . 6 : Assimilation spécifique du sulfate en NdC, DO > 100%



**Figure D . 7 : Assimilation spécifique du sulfate en  $X_{\text{MS}}$ , DO < 100%**

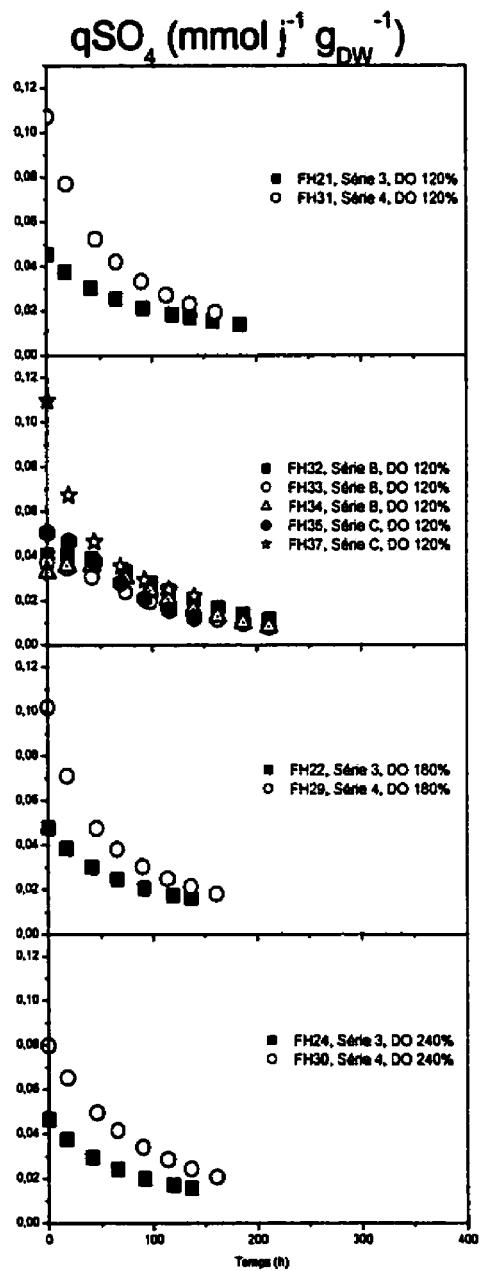
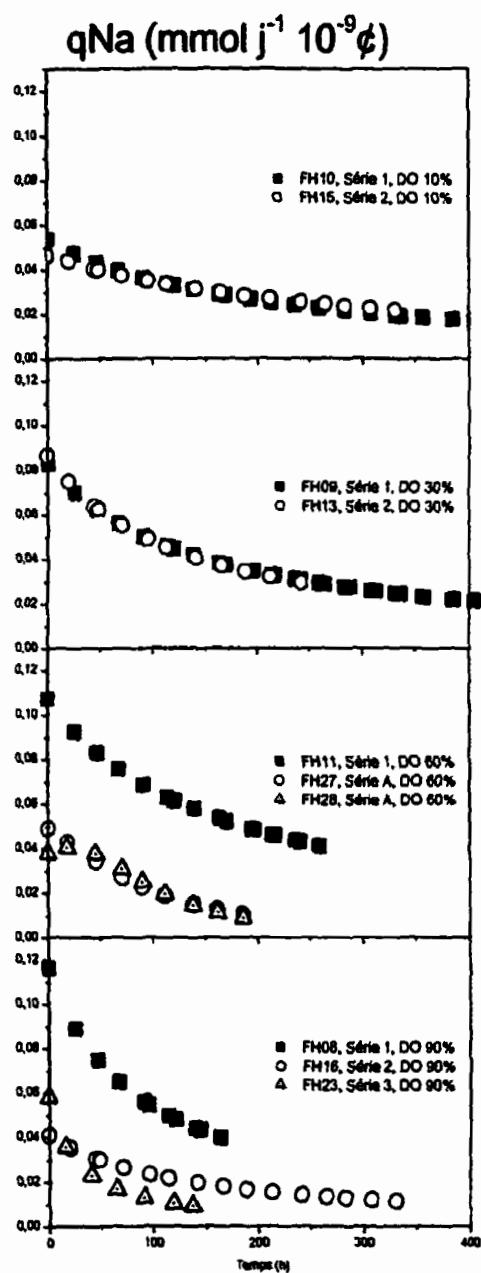


Figure D . 8 : Assimilation spécifique du sulfate en  $X_{\text{MS}}$ , DO > 100%



**Figure D . 9 : Assimilation spécifique du sodium en NdC, DO < 100%**

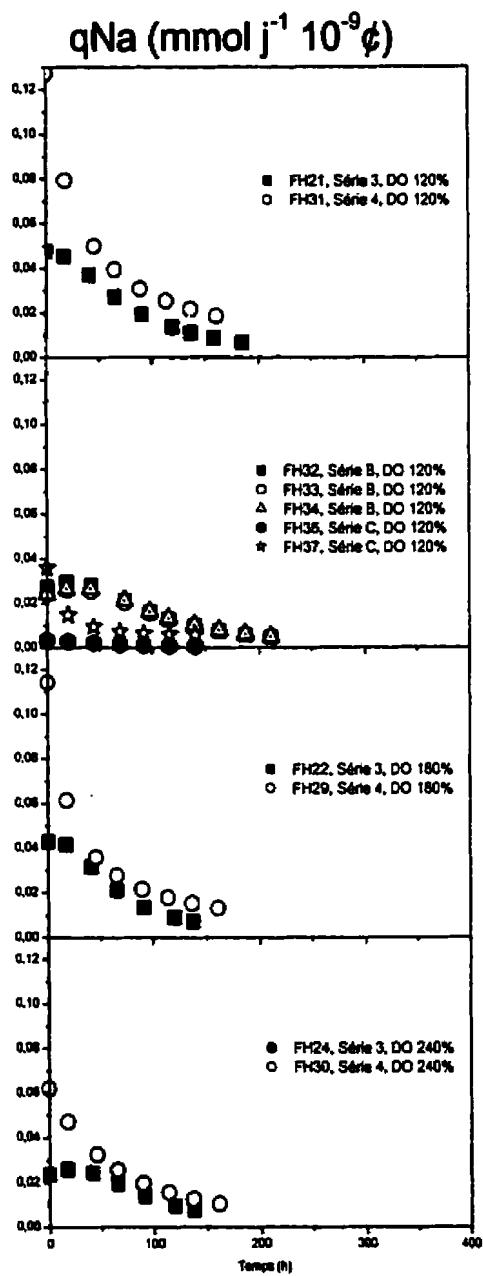


Figure D . 10 : Assimilation spécifique du sodium en NdC, DO > 100%

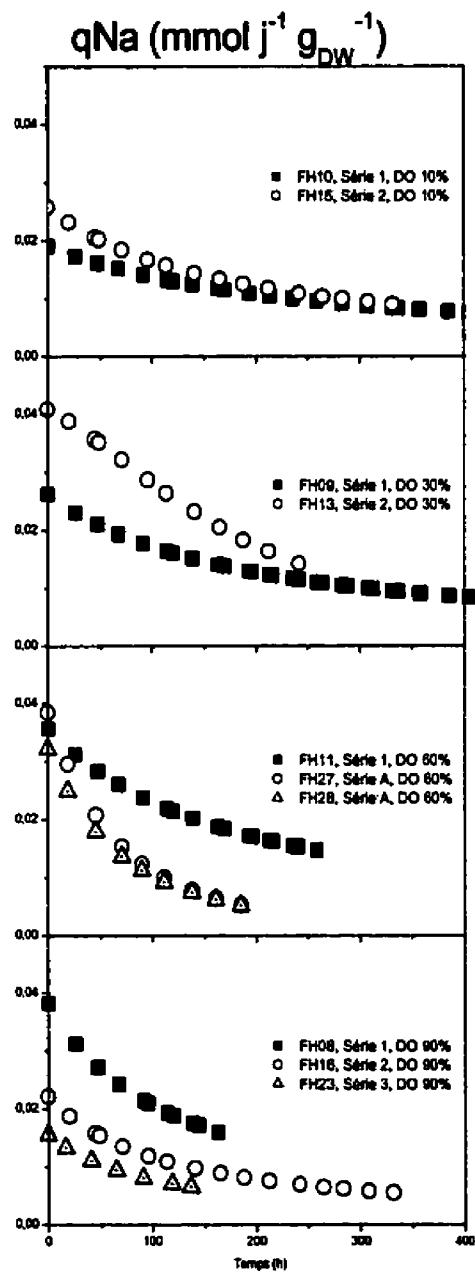


Figure D . 11 : Assimilation spécifique du sodium en  $X_{MS}$ , DO < 100%

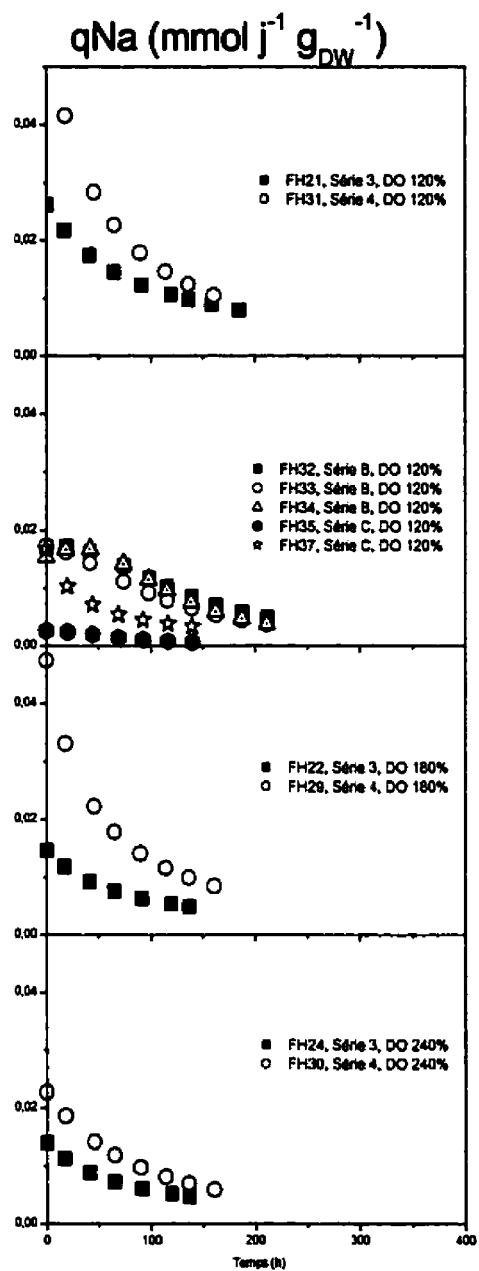


Figure D . 12 : Assimilation spécifique du sodium en  $X_{\text{MS}}$ , DO > 100%

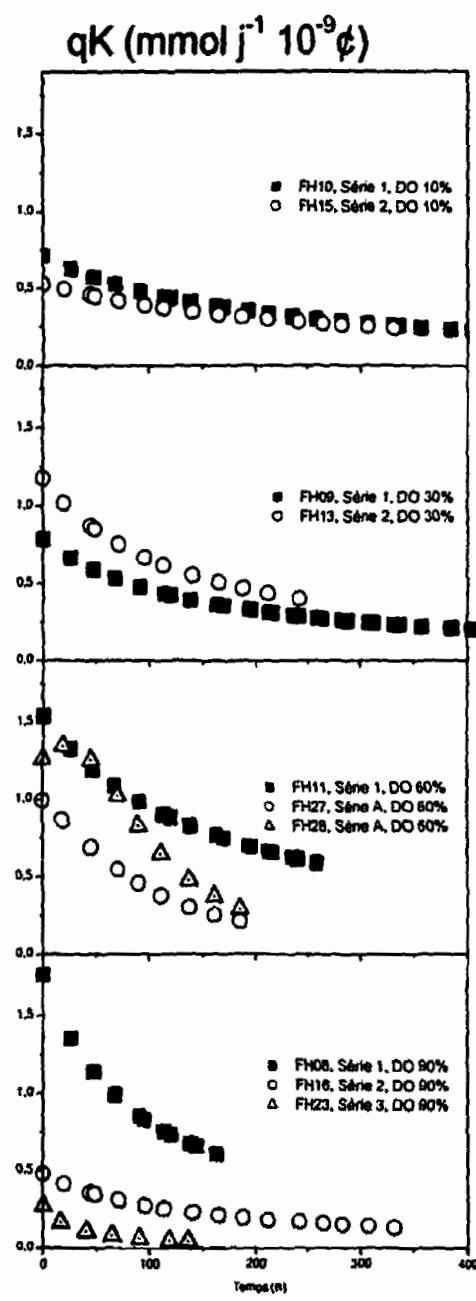


Figure D . 13 : Assimilation spécifique du potassium en NdC, DO < 100%

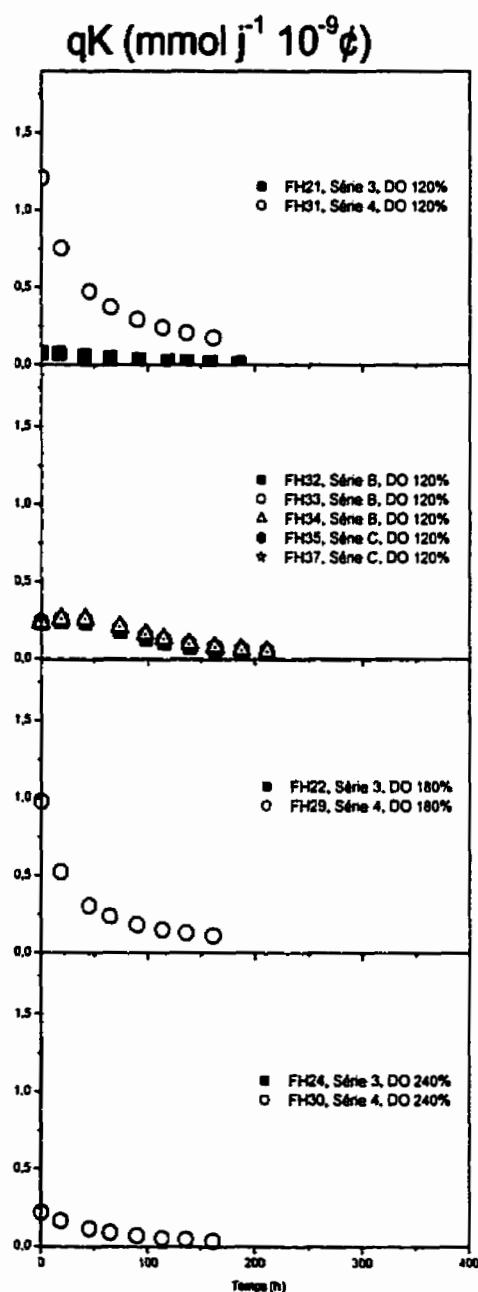


Figure D . 14 : Assimilation spécifique du potassium en NdC, DO > 100%

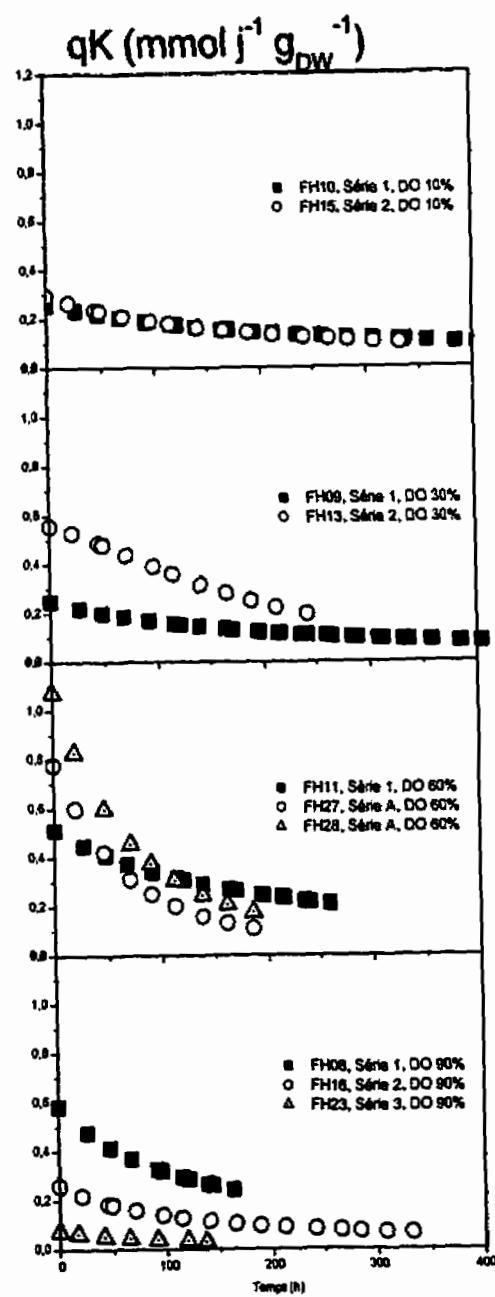


Figure D . 15 : Assimilation spécifique du potassium en XMS, DO < 100%

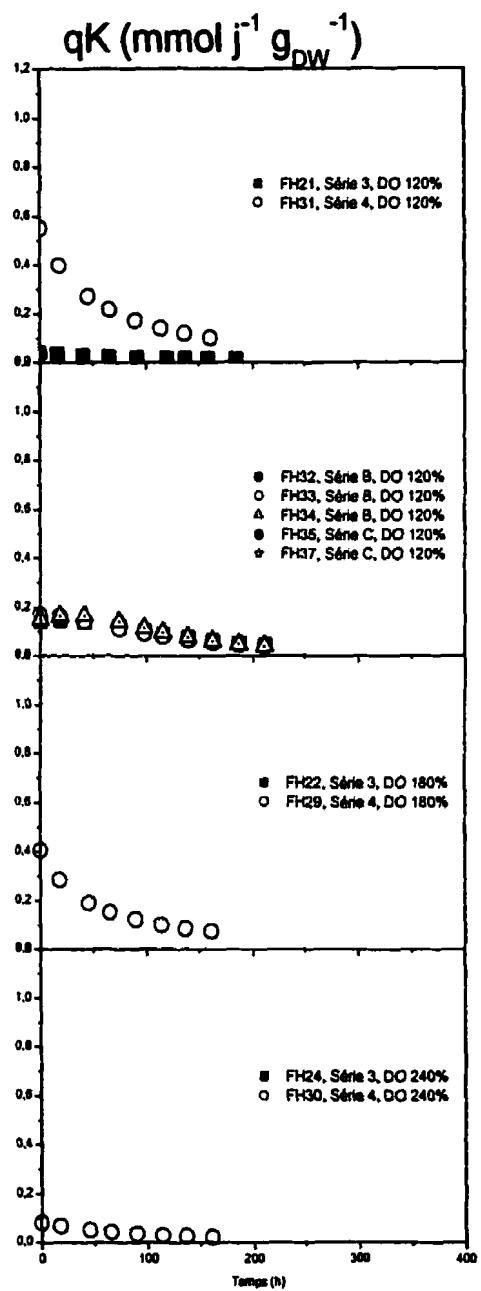


Figure D . 16 : Assimilation spécifique du potassium en X<sub>MS</sub>, DO > 100%

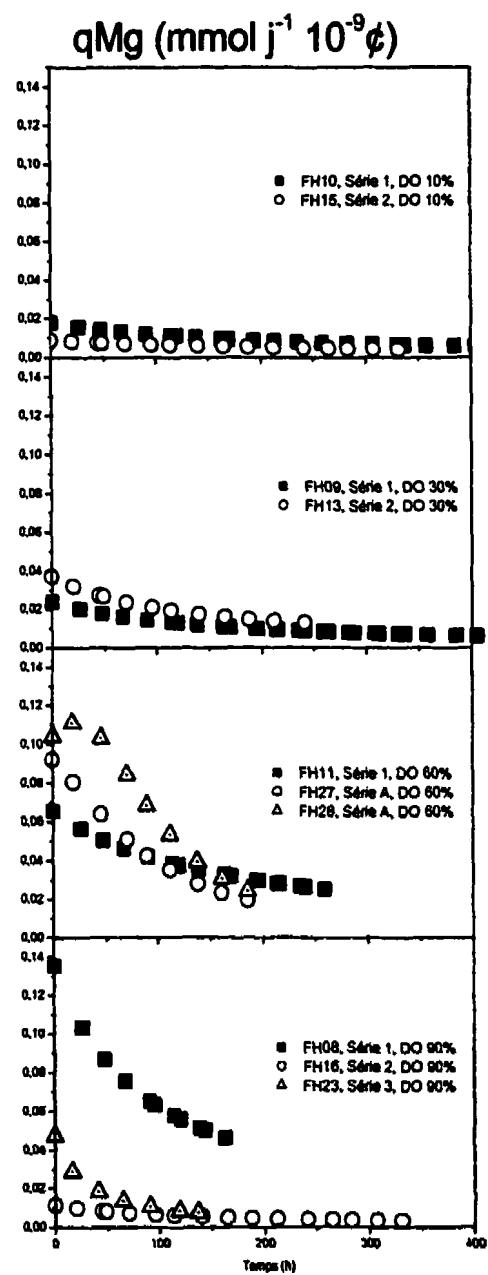


Figure D . 17 : Assimilation spécifique du magnésium en NdC, DO < 100%

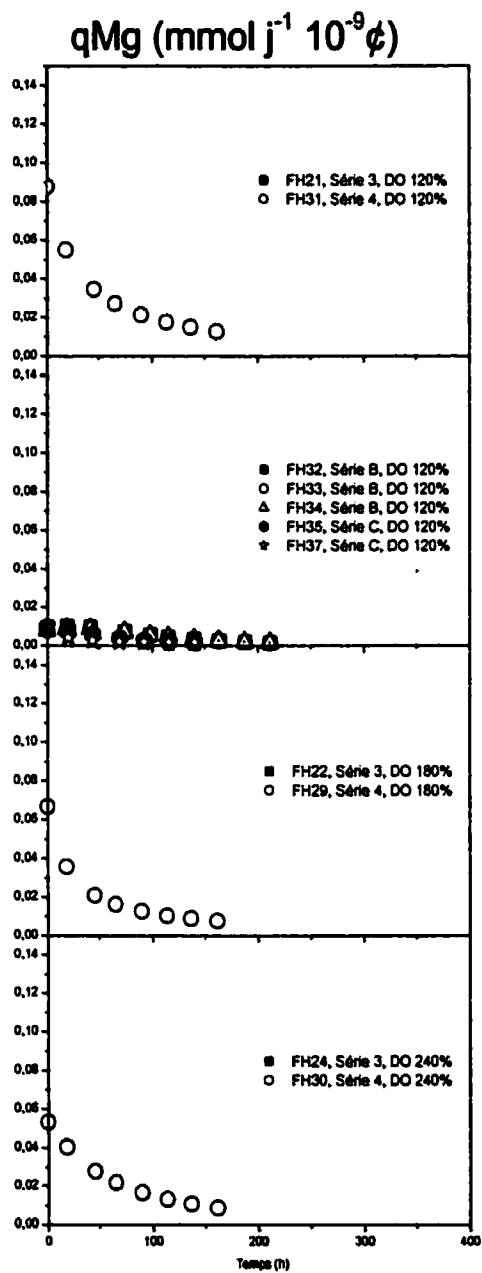


Figure D . 18 : Assimilation spécifique du magnésium en NdC, DO > 100%

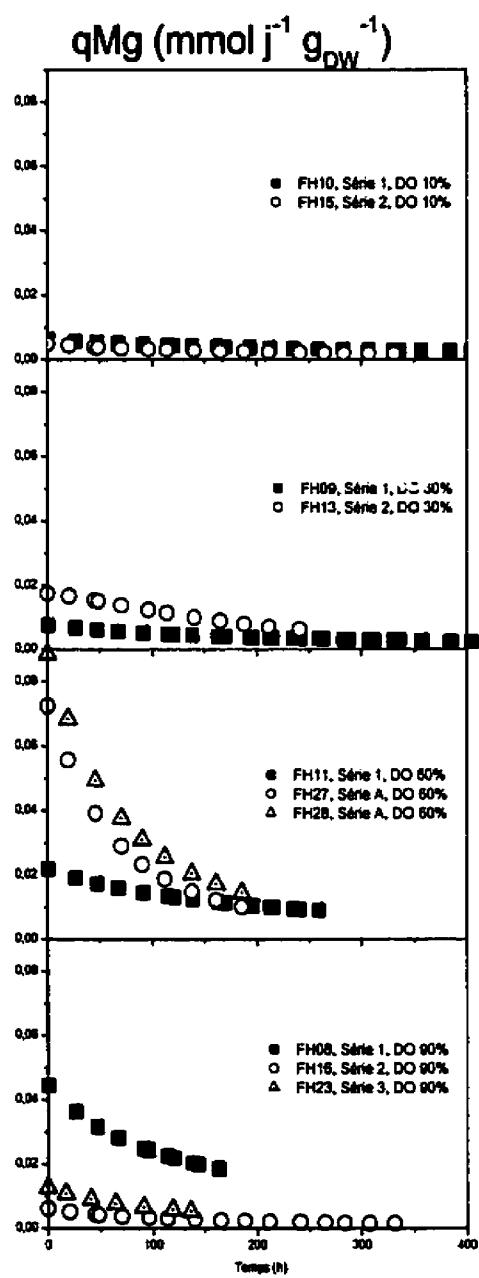


Figure D . 19 : Assimilation spécifique du magnésium en X<sub>MS</sub>, DO < 100%

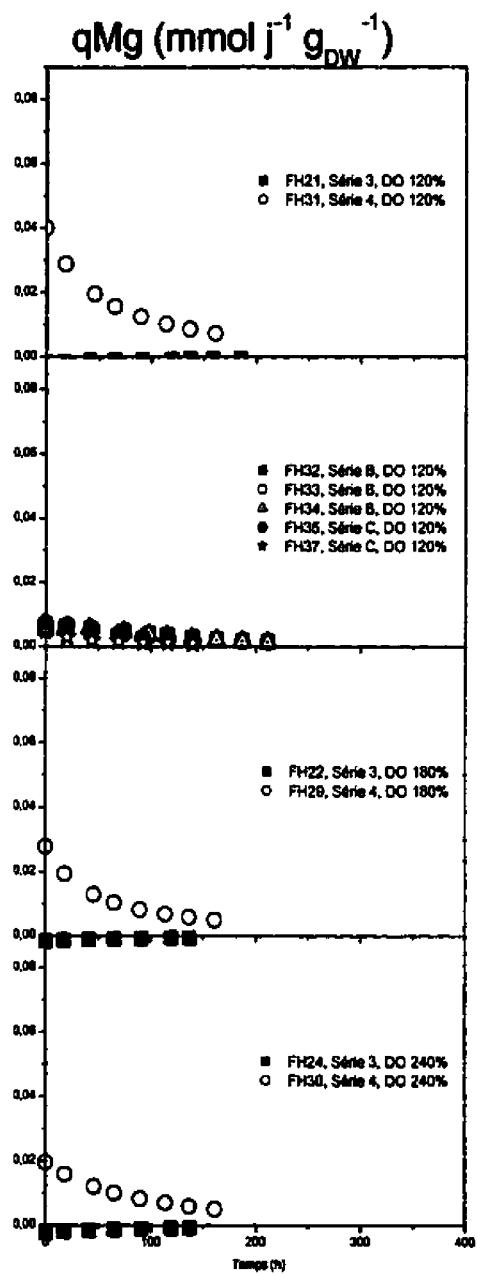


Figure D . 20 : Assimilation spécifique du magnésium en X<sub>MS</sub>, DO > 100%

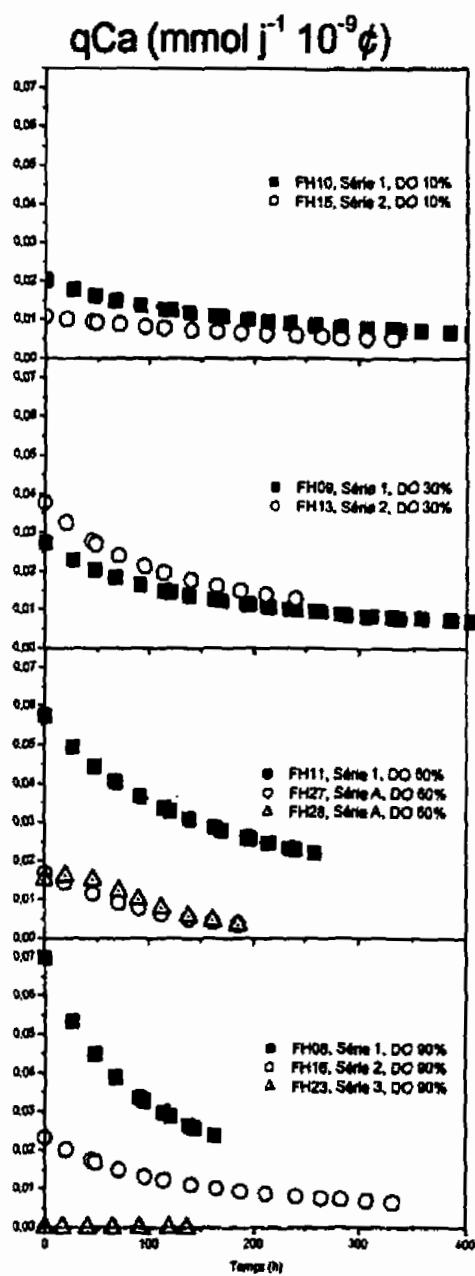
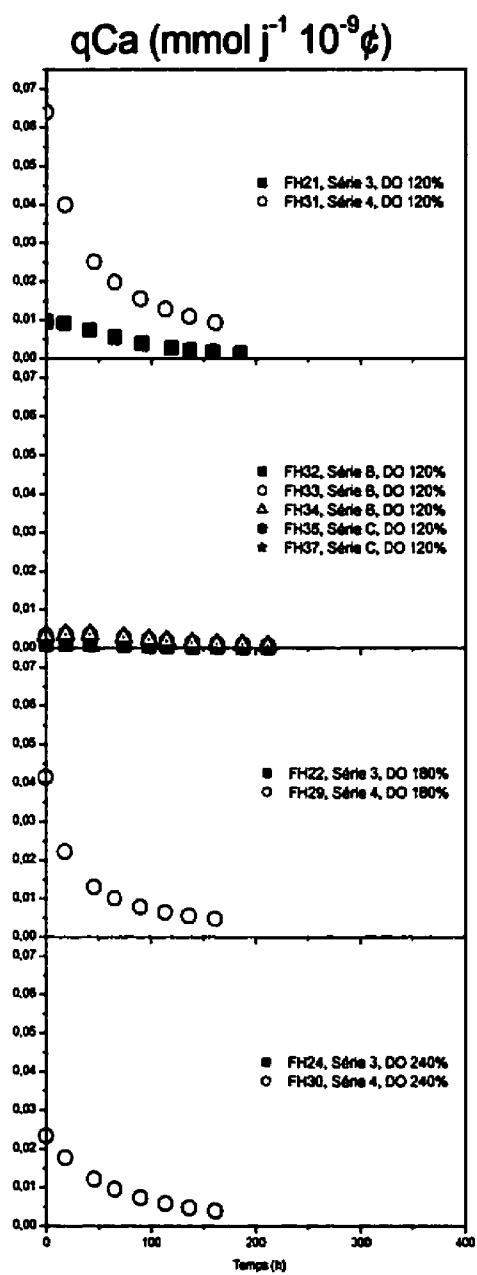


Figure D . 21 : Assimilation spécifique du calcium en NdC, DO < 100%



**Figure D . 22 : Assimilation spécifique du calcium en NdC, DO > 100%**

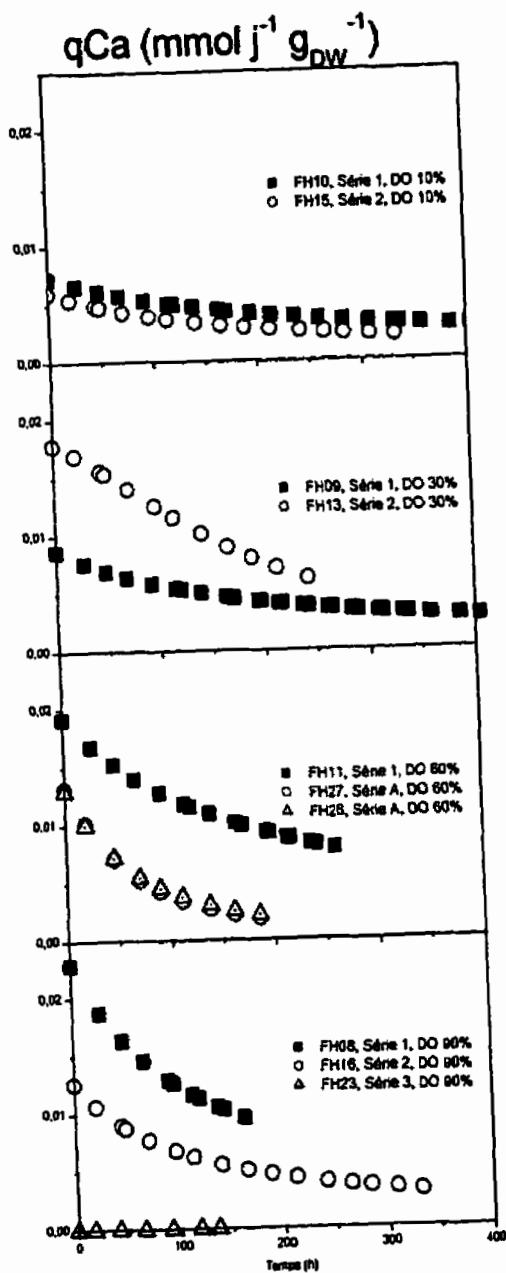


Figure D . 23 : Assimilation spécifique du calcium en  $X_{\text{MS}}$ , DO < 100%

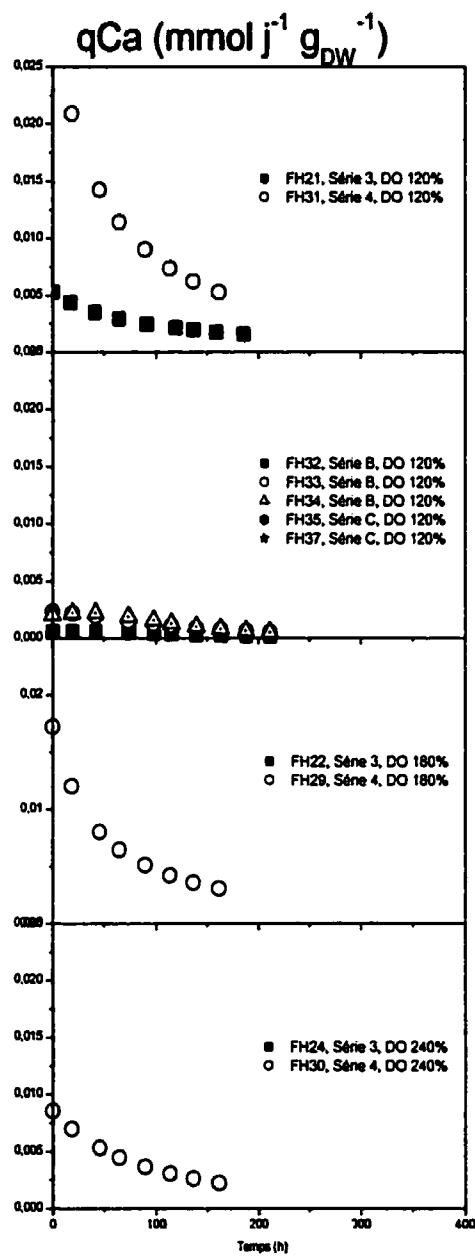
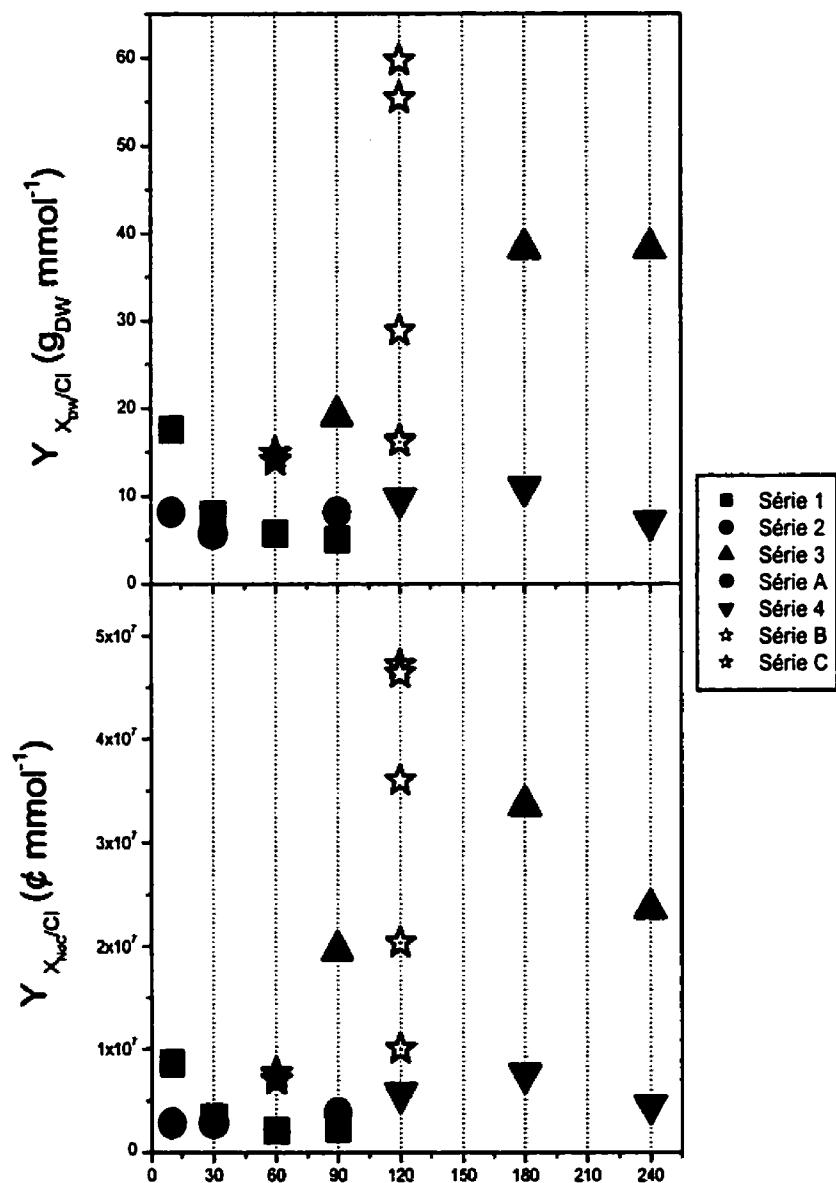
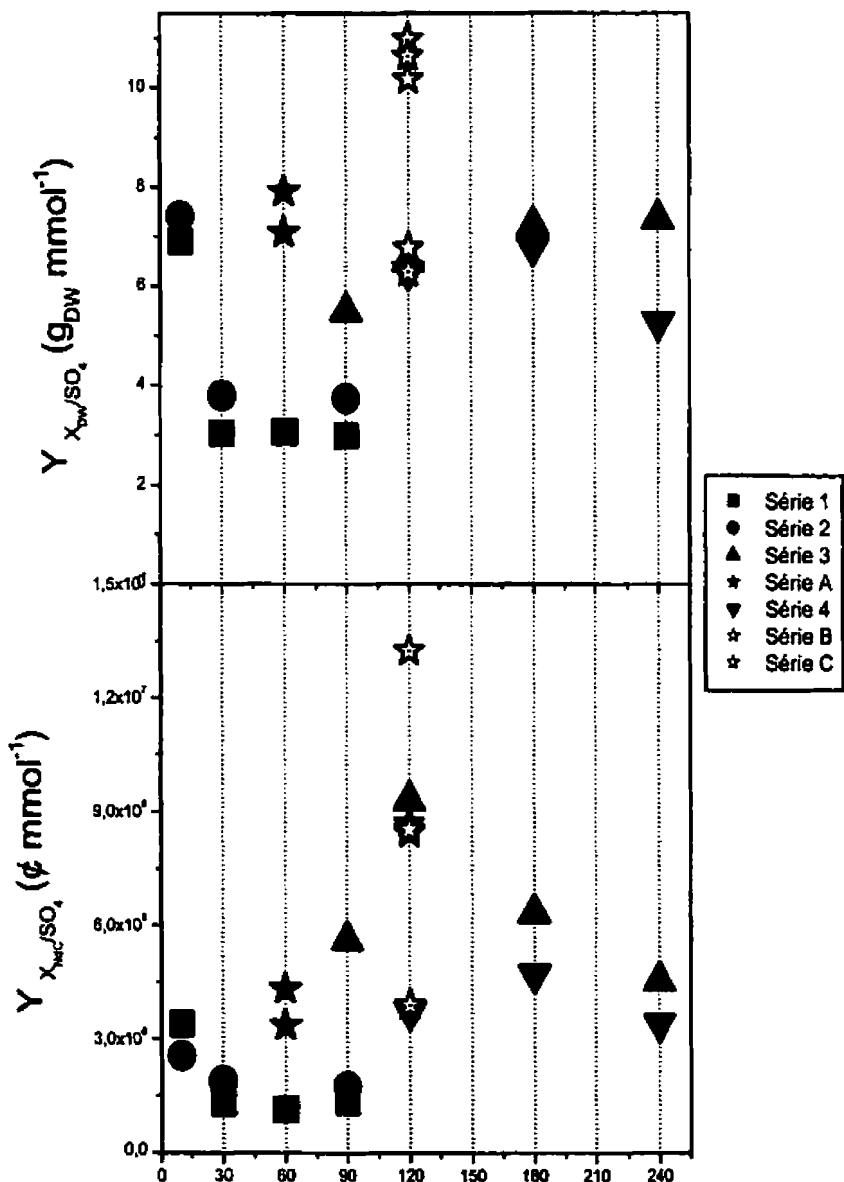


Figure D . 24 : Assimilation spécifique du calcium en X<sub>MS</sub>, DO > 100%

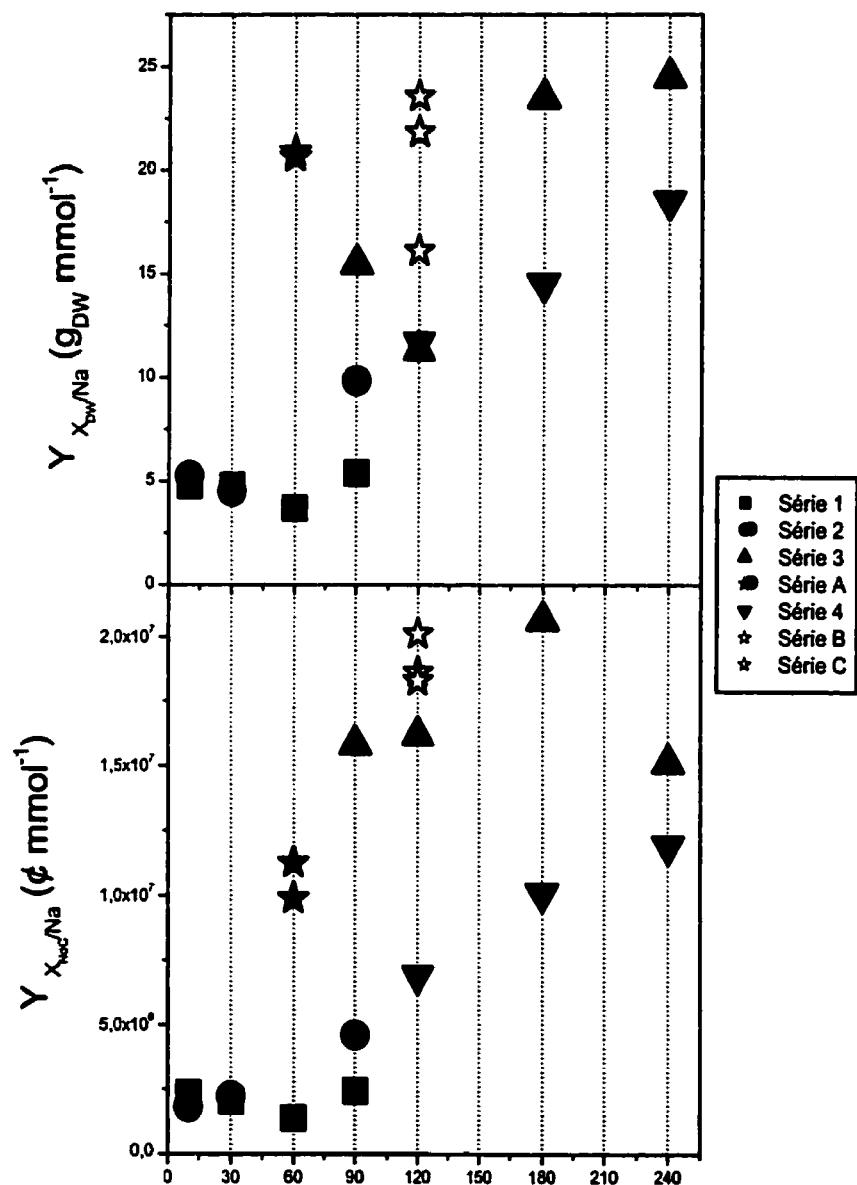
**ANNEXE E : RENDEMENTS APPARENTS**



**Figure E . 1 : Rendement apparent de la croissance en biomasse sèche et en nombre de cellules sur le chlore en fonction de la DO**



**Figure E . 2 : Rendement apparent de la croissance en biomasse sèche et en nombre de cellules sur le sulfate en fonction de la DO**



**Figure E . 3 : Rendement apparent de la croissance en biomasse sèche et en nombre de cellules sur le sodium en fonction de la DO**

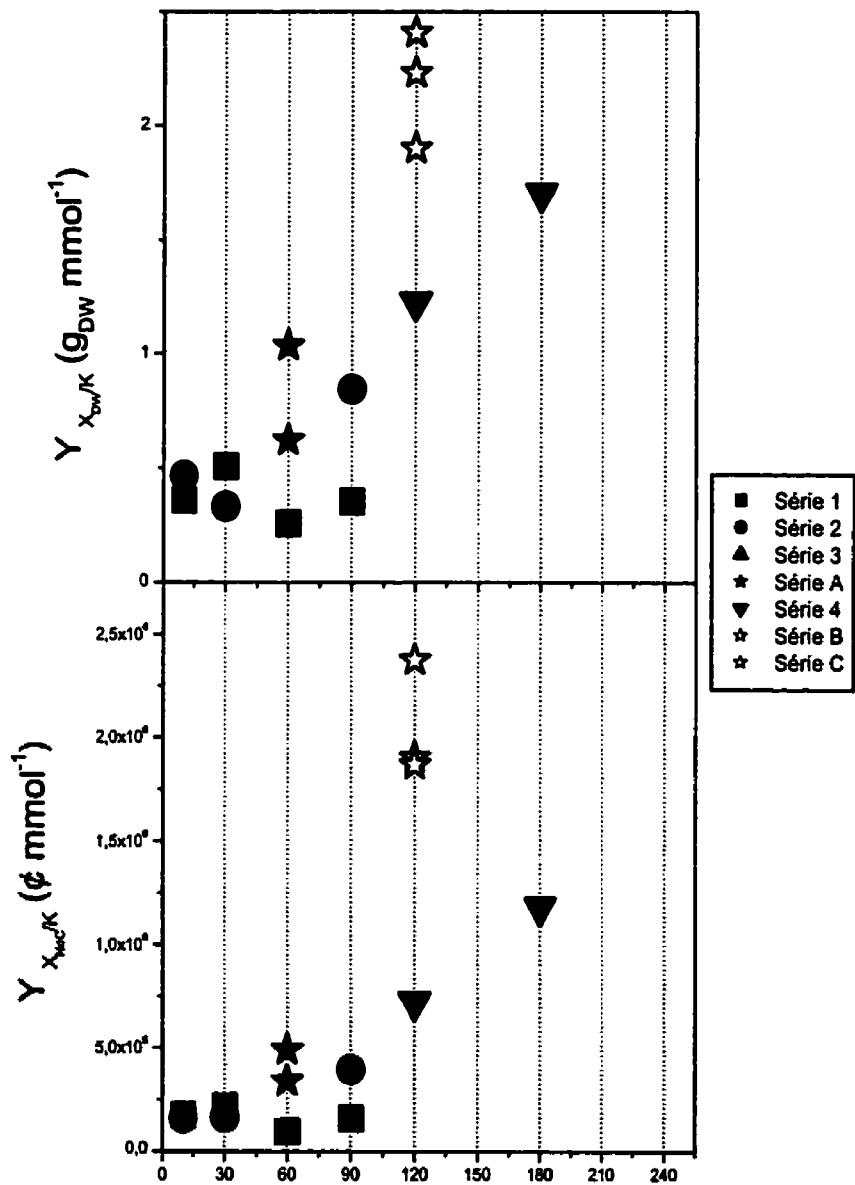
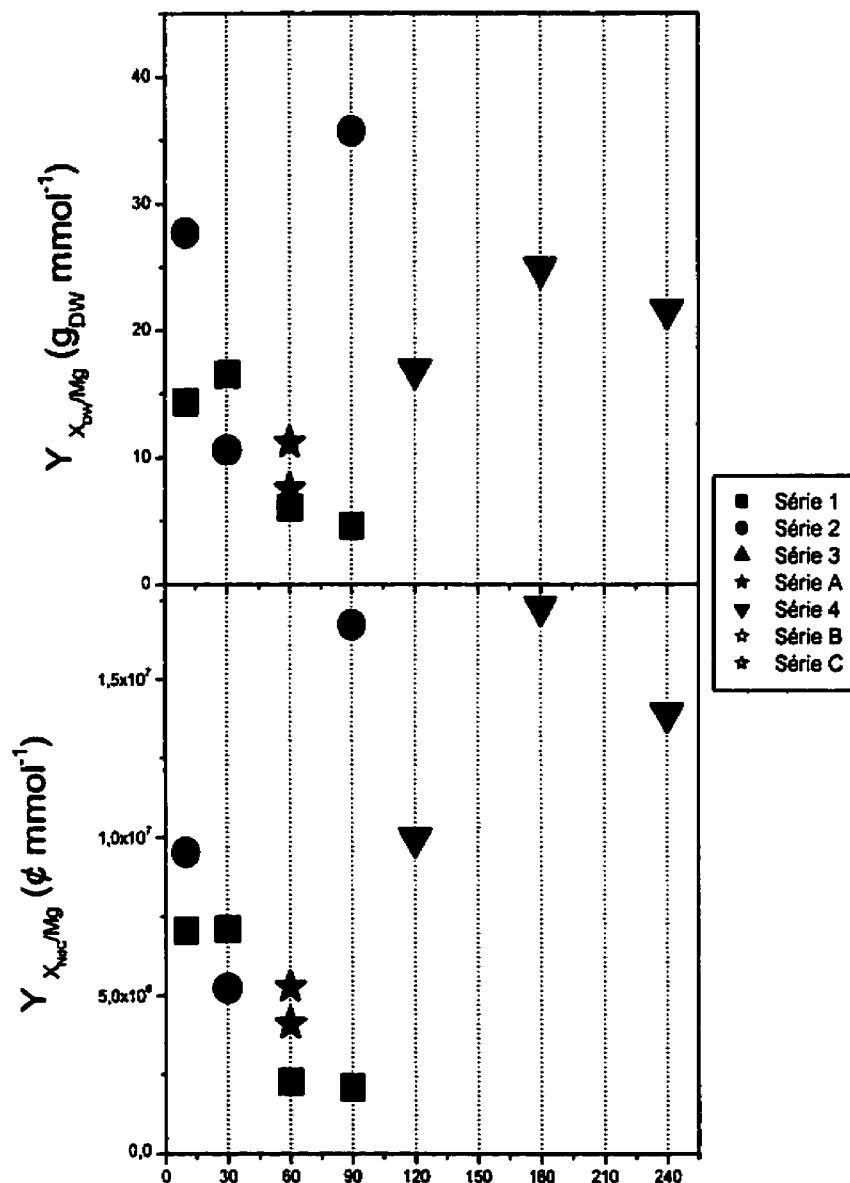
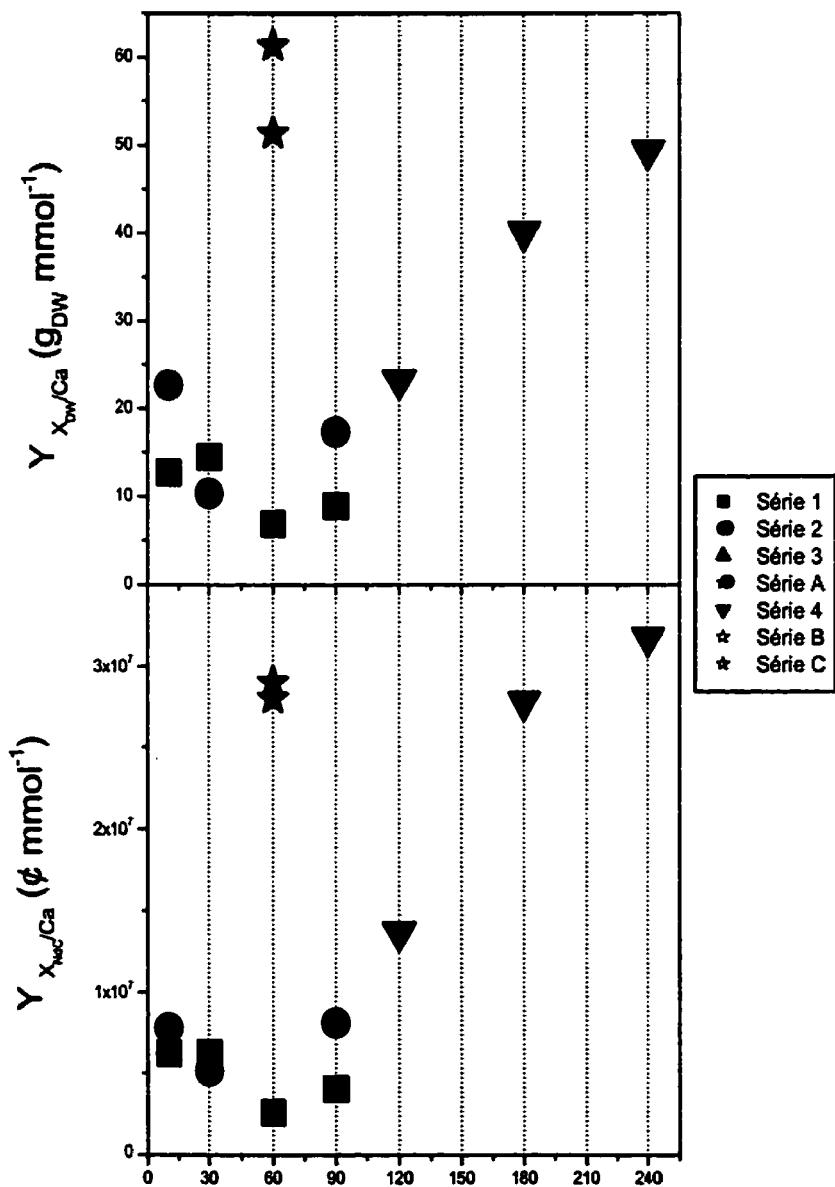


Figure E . 4 : Rendement apparent de la croissance en biomasse sèche et en nombre de cellules sur le potassium en fonction de la DO



**Figure E . 5 : Rendement apparent de la croissance en biomasse sèche et en nombre de cellules sur le magnésium en fonction de la DO**



**Figure E . 6 : Rendement apparent de la croissance en biomasse sèche et en nombre de cellules sur le calcium en fonction de la DO**