UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

OPTIMISATION DE LA CROISSANCE DE CELLULES D'*Eschscholtzia californica* EN BIORÉACTEUR

JOËL SIROIS

DÉPARTEMENT DE GÉNIE CHIMIQUE

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION

DU DIPLÔME DE MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES

(GÉNIE CHIMIQUE)

JANVIER 1997

© Joël Sirois, 1997

National Library of Canada
Bibliothèque nationale du Canada

Acquisitions and Bibliographic Services
Acquisitions et services bibliographiques

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

Our file Notre référence

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

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

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

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

0-612-26516-1

Canada

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé :

OPTIMISATION DE LA CROISSANCE
DE CELLULES D'*Eschscholtzia californica* EN BIORÉACTEUR

présenté par : SIROIS Joël

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

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

M. BUSCHMANN Michael, Ph. D., président

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

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

M. KAMEN Amine, Ph.D., membre

REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord remercier mes collègues de travail de l'équipe de recherche BIOPRO de l'Université du Québec à Trois-Rivières (Danielle Jacob, Steve Fiset, Sophie Marcouiller, Isabelle Bergeron) et de l'École Polytechnique de Montréal (Dany Aubry, François Rioux, Mario Jolicoeur, Martin Gaudette, Laurence Lamboursain, Christophe Bazinet, Robert Wiliams, Luc Lavoie) pour leur support et leur aide à différents niveaux tout au long de mes études de maîtrise. La synergie présente dans ce groupe de travail en fait ressortir une efficacité et un professionnalisme incomparables.

Je désire sincèrement remercier ma famille (mon père René Sirois, ma mère Alice Bernier, ma soeur Isabelle et mon frère Mathieu) pour leur soutien à plusieurs égards tout au long de mes études. On ne peut progresser et atteindre ses propres objectifs sans sentir le support de nos proches face à notre philosophie de vie. Merci aussi à Isabelle et son conjoint, Luc Simard, pour leur hospitalité lorsque mes séjours à Montréal devaient se prolonger pendant quelques jours.

J'aimerais aussi remercier mon directeur de recherche, M. Michel Perrier pour son aide, sa compétence et sa confiance. C'est un plaisir de travailler avec lui et de discuter de différentes techniques de contrôle et d'estimation des procédés avec quelqu'un qui connaît à fond son domaine et ayant un intérêt très marqué pour l'avancement de ce champ scientifique.

Je désire particulièrement remercier mon codirecteur de recherche, M. Jean Archambault pour son expertise dans le domaine des cellules végétales et pour m'avoir initié à ce champ de travail que je considère des plus passionnant. Sans lui, je n'aurais probablement jamais connu les joies que représentent l'étude et la manipulation d'organismes vivants. Son désir de réussir, sa ténacité, sa confiance et son sens de l'humour en font un excellent partenaire de travail.

Finalement, je tiens sincèrement à remercier Caroline Dubé, ma conjointe, pour son infinie patience, son support omniprésent, sa compréhension et sa confiance. Elle a toujours été disponible pour discuter des cultures et partager mes humeurs quant à l'obtention de résultats gratifiants, mais aussi, lorsque les moins bons moments se présentaient. Elle m'a toujours encouragé, peu importe les obstacles.

RÉSUMÉ

Cette étude de la phase de croissance de cellules végétales est réalisée sur des cultures d'*Eschscholtzia californica* en bioréacteur à rubans hélicoïdaux (HRI) de 2 L et 5 L. Un système de commande et d'acquisition de données est utilisé pour suivre l'évolution des cultures, de même que des algorithmes de mesure des taux de respiration, de production de CO_2 et d'estimation de la concentration de CO_2 dissous.

Deux contrôleurs adaptatifs directs de la concentration en oxygène dissous sont conçus afin de diminuer le temps hors contrôle suite à une perturbation : le contrôleur adaptatif direct (CAD) et le contrôleur adaptatif direct basé sur le taux de respiration mesuré (CADm). Ceux-ci permettent une diminution du temps hors contrôle de 64 % (CAD) et de 70 % (CADm) par rapport à un contrôleur conventionnel linéaire (PI).

L'influence des nutriments sur la croissance de la biomasse sèche et sur la prolifération cellulaire est étudiée. Il apparaît que l'oxygène dissous, les hydrates de carbone ainsi que l'azote total sont indispensables à la croissance et à la prolifération des cellules en suspension alors que les ions phosphate, nitrate et ammoniaque sont nuisibles à la croissance et à la prolifération cellulaire.

Cependant, l'ajout périodique d'ammoniaque au milieu de culture permet d'accroître de plus de 100 % la concentration cellulaire obtenue à la fin de la période de croissance par rapport à une concentration finale traditionnelle (2×10^9 ¢ L^{-1}). De

même, l'ajout périodique de nitrate augmente de 50 à 100 % la concentration cellulaire finale mais de façon moins marquée et plus lente. Ce phénomène est probablement associé à un mécanisme d'induction et de répression de mécanismes enzymatiques de réduction du nitrate.

Lorsque la concentration en oxygène dissous est maintenue constante, les hydrates de carbone et le nitrate sont consommés proportionnellement à un accroissement de la biomasse sèche (X). Les rendements moyens calculés pour ces deux nutriments sont de 0.31 g X g^{-1} S et de 0.41 g X $mmol^{-1}$ NO_3. Quant aux ions phosphate et ammoniaque, ils sont assimilés plus rapidement que la croissance par les cellules. Les taux de consommation calculés sont de 0.003 mmol PO_4 g^{-1} X h^{-1} et de 0.016 mmol NH_4 g^{-1} X h^{-1}.

Afin de représenter l'accumulation du phosphate intracellulaire et l'effet étendu de l'ammoniaque sur la prolifération cellulaire, un nouvel outil mathématique est développé : les pseudo-concentrations intracellulaires de ces nutriments. Il est établi que les rendements moyens associés à ces nutriments intracellulaires sont de 4.00 g X $mmol^{-1}$ PO_{4i} et de 1.04 g X $mmol^{-1}$ NH_{4i}.

Un modèle de croissance de la biomasse sèche et de la prolifération cellulaire est développé. Celui-ci est pleinement autonome, c'est-à-dire qu'il ne dépend d'aucune variable externe. Effectivement, toutes variables (ex.: concentration en nutriment) ou paramètres (ex.: taux spécifique maximum de croissance) nécessaires à

l'estimation de la croissance sont aussi estimés par ce modèle. La consommation et l'utilisation des nutriments desquels dépendent la croissance et la prolifération cellulaire sont estimées par le modèle lui-même selon cette même concentration estimée en biomasse. Une nouvelle forme du taux spécifique de croissance en fonction des nutriments extracellulaires et intracellulaires est développée de manière à représenter la phénoménologie observée. Cette forme de cinétique de croissance est très polyvalente, décrivant adéquatement la croissance de la biomasse sèche et la prolifération cellulaire en fonction des concentrations en nutriments.

L'optimisation de la fiabilité du modèle par la détermination mathématique des paramètres des équations de cinétiques confirme l'effet néfaste du nitrate et de l'ion ammonium extracellulaire (et possiblement aussi du phosphate) sur la croissance et la prolifération cellulaire. De plus, cette optimisation fait ressortir l'effet positif et la nécessité de l'ammoniaque intracellulaire pour la prolifération cellulaire.

Finalement, la stratégie d'alimentation développée selon les prédictions du modèle de croissance pour maximiser la prolifération cellulaire donne d'excellents résultats avec l'obtention d'une concentration cellulaire finale près de 20 x 10^9 ¢ L^{-1}, ce qui représente une augmentation de 1 000 % par rapport aux concentrations finales habituelles en cuvées sans ajout. Ce résultat est d'autant plus satisfaisant que la prolifération est arrêtée par une limitation de transfert d'oxygène du système de

culture utilisé. Il est établi que la concentration finale aurait pu être triplée, soit plus de 60 x 10^9 ¢ L^{-1} sans cette limitation.

Des modifications au système de culture actuel sont recommandées afin d'augmenter le taux de transfert d'oxygène pour la poursuite des travaux en croissance et en production de métabolites secondaires.

ABSTRACT

This work concern the study of the growth of *Eschscholtzia californica* cells cultured 2 and 5 L helicoidal ribbon impeller bioreactors. A data acquisition and control system was used to monitore on-line culture parameters, oxygen uptake (OUR) and carbon dioxide productions (CPR) rates and the estimation of the dissolved carbon dioxide concentration (DCO_2).

Two new adaptive controllers were designed to reduce the off-control time following a disturbance. They are the Direct Adaptive Controller (CAD) and the measured OUR-based Direct Adaptive Controller (CAD_m). The off-control time usually obtained with conventional controllers (PI) was reduced by 64 % (CAD) and 70 % (CAD_m)

The effet of nutrients on the dried biomass growth and cell division were studied. The dissolved oxygen, carbohydrate and total extracellular nitrogen were essential for both the growth of biomass and cell concentration increase while extracellular phosphate, nitrate and ammoniac ions were found detrimental to growth.

Periodic addition of ammoniac in the medium increased the final cellular concentration by 100 %. This concentration was increased, but more slowly, by 50 to 100 % with the addition of nitrate. This last phenomenon resulted likely from delayed induction of nitrate reductase.

Using a constant dissolved oxygen concentration of 60 % air saturation, the carbohydrate and nitrate consumption rates followed dried biomass growth rate. The apparent yield of dried biomass (x) on carbohydrates and nitrates were 0.31 g X g^{-1} S and 0.41 g X $mmol^{-1}$ NO_3. The phosphate and ammoniac ions were absorbed rapidly from the medium and consumed intracellularly over a longer period of time. The specific consumption rates of these nutrients were 0.003 mmol PO_4 g^{-1} X h^{-1} and 0.016 mmol NH_4 g^{-1} X h^{-1}.

To describe the accumulation of intracellular phosphate and the utilization of intracellular ammoniac, a new mathematical tool was developed : the intracellular pseudo-concentration of these nutrients (po_{4i} and nh_{4i}). The apparent yield of these nutrients were 4.00 g X $mmol^{-1}$ PO_{4i} and 1.04 g X $mmol^{-1}$ NH_{4i}.

A new dry biomass and cell concentration model was developped. This model is fully independent of external variable. All parameters (ex.: specific growth rates) or variables (ex.: nutrient concentrations) needed to estimate the growth parameters are estimated by the model.

The extracellular uptake and intracellular comsumption of these nutrients influencing cell growth were estimated by the model based on the biomass concentration. A new formulation of the specific growth rate based on the extra- and intracellular nutrient concentration was developed to describe the cultures growth

behavior. This model describes well the biomass growth and the cell division as a function of nutrient concentrations.

Optimisation of the reliability optimization of the growth model by the mathematical determination of the kinetic equations parameters confirmed detrimental effect of nitrate and extracellular ammonium ions on cell growth. This optimization phase underlined the necessity of intracellular ammoniac to increase cell division.

A nutrient feeding strategy developed using the growth model to maximize cell division allowed an increase of 500 to 1 000 % (20 x 10^9 ¢ L^{-1}) as comparated to final concentration of batch cultures (2 à 4 x 10^9 ¢ L^{-1}). This interesting increase was limited by the culture system oxygen transfer rate. The estimated final cell concentration may have reach 60 x 10^9 ¢ L^{-1} without this limitation.

The culture system need to be modified to increase the oxygen transfer rate for the pursuit of this research on plant cell growth and secondary metabolites production.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS iv

RÉSUMÉ vi

ABSTRACT x

TABLE DES MATIÈRES xiii

LISTE DES ANNEXES xix

LISTE DES TABLEAUX xx

LISTE DES FIGURES xxii

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS xxx

NOMENCLATURE xxxi

1. INTRODUCTION 1

1.1 Cellules de plantes et métabolites secondaires 1

1.2 Problématique 2

1.3 Objectifs du projet 4

1.4 Méthodologie 4

2. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE 6

2.1 Cinétiques de croissance 7

2.1.1 Dépendance au substrat 7

2.1.2 Dépendance au produit 18

2.1.3 Dépendance au substrat et au produit 22

2.2 Modélisation de cultures 28

2.2.1 Définitions des types de modèles 28

2.2.2 Modèles publiés pour la culture de cellules végétales 30
2.3 Division versus expansion cellulaire 41
2.4 Facteurs de croissance 43
2.5 Maximalisation de la croissance 45

3. MATÉRIEL ET MÉTHODES 46
3.1 Lignée cellulaire et maintien 46
3.2 Culture en bioréacteur 47
3.2.1 Bioréacteur de 5 L 47
3.2.2 Bioréacteur de 2 L 49
3.2.3 Suivi et contrôle 51
3.3 Conditions d'opération 54
3.3.1 Cultures en cuvée 55
3.3.2 Cultures en cuvée alimentée 55
3.4 Cultures témoins en flacon 56
3.5 Échantillonage et suivi 57
3.6 Analytique 58
3.6.1 Hydrates de carbone 58
3.6.2 Macronutriments inorganiques 58

4. COMMANDE D'OXYGÈNE DISSOUS 61
4.1 Développement des contrôleurs 62
4.1.1 Contrôleur PI 62
4.1.2 Contrôleur adaptatif direct 64
4.1.3 Contrôleur adaptatif basé sur le taux de respiration 67
4.2 Résultats 69

5. ÉTUDE DE LA CROISSANCE DE CELLULES VÉGÉTALES 74

5.1 Travaux expérimentaux 74

5.2 Résultats de 6 cultures typiques 79

5.2.1 Culture en cuvée (1 ajout) 79

5.2.2 Cuvée alimentée en phosphate 82

5.2.3 Cuvées alimentées en nitrate 85

5.2.4 Cuvées alimentées en ammoniaque 91

5.3 Étude de l'impact des nutriments sur la croissance 96

5.4 Bioxyde de carbone 97

5.4.1 Effets sur la biomasse 97

5.4.2 Effets sur la concentration cellulaire 98

5.4.3 Estimation de la concentration de CO_2 dissous 98

5.4.4 Analyse de sensibilité des paramètres de l'estimation de la concentration de CO_2 dissous 101

5.5 Oxygène 105

5.5.1 Effets sur la biomasse 106

5.5.2 Effets sur la concentration cellulaire 106

5.6 Hydrates de carbones 106

5.6.1 Effets sur la biomasse 107

5.6.2 Effets sur la concentration cellulaire 108

5.6.3 Rendements et taux d'assimilation 109

5.7 Phosphate 115

5.7.1 Effets sur la biomasse 117

5.7.2 Effets sur la concentration cellulaire 119

5.7.3 Rendements et taux d'assimilation 121

5.8 Sels azotés 127

5.8.1 Nitrate 128

5.8.1.1 Effets sur la biomasse 128

5.8.1.2 Effets sur la concentration cellulaire 132

5.8.1.3 Rendements et taux d'assimilation 135

5.8.2 Amoniaque 136

5.8.2.1 Effets sur la biomasse 137

5.8.2.2 Effets sur la concentration cellulaire 142

5.8.2.3 Rendements et taux d'assimilation 147

5.9 Comparaison générale des effets des nutriments 150

6. MODÉLISATION DE LA PHASE DE CROISSANCE 154

6.1 Croissance de la biomasse sèche 155

6.1.1 Schème réactionnel 156

6.1.2 Constante de rendement et taux de réaction 160

6.1.3 Taux spécifique de croissance 161

6.1.4 Évaluation des paramètres non-calculés 167

6.1.5 Simulation du modèle de croissance 168

6.1.6 Optimisation de la fiabilité du modèle 178

6.1.6.1 Erreur relative moyenne d'estimation 178

6.1.6.2 Coefficient de détermination multiple empirique 181

6.1.6.3 Comparaison des deux techniques et analyse des résultats 184

6.1.6.3.1 Minimisation par l'erreur relative moyenne.. 184

6.1.6.3.2 Minimisation par le coefficient de détermination multiple empirique 193
6.1.6.3.3 Comparaison des deux techniques 193
6.1.6.3.4 Analyse de sensibilité 195
6.2 Prolifération cellulaire 198
6.2.1 Schème réactionnel 199
6.2.2 Taux spécifique de croissance 202
6.2.3 Évaluation des paramètres non-calculés 203
6.2.4 Optimisation de la fiabilité du modèle 206
6.2.4.1 Minimisation par l'erreur relative moyenne 207
6.2.4.2 Minimisation par le coefficient de détermination multiple empirique 213
6.2.4.3 Comparaison des deux techniques 219
6.2.4.4 Analyse de sensibilité 224
6.3 Modèle de croissance retenu 231

7. MAXIMALISATION DE LA CONCENTRATION CELLULAIRE .. 235
7.1 Simulations du procédé 235
7.2 Stratégie d'alimentation 236
7.3 Conditions expérimentales 241
7.4 Résultats 242
7.4.1 Limites du système de culture 247
7.4.2 Concentration cellulaire 249
7.4.3 Taux spécifique moyen de croissance 250
7.4.4 Productivité et autres paramètres descriptifs 251

8. DISCUSSION ET RECOMMANDATIONS 255

8.1 Étude de la croissance 255

8.2 Modèle de croissance 258

8.3 Maximalisation de la concentration cellulaire 262

8.4 Système de culture 263

8.5 Production de métabolites secondaires 264

9. CONCLUSION 266

BIBLIOGRAPHIE 267

LISTE DES ANNEXES

Annexe A Composition du milieu de culture B5 standard 281

Annexe B Mesure de la concentration cellulaire 284

Annexe C Nouvelles formes du taux spécifique de croissance de la biomasse sèche décrivant l'inhibition de la concentration de nutriments..... 288

Annexe D Représentation fonctionnelle de la croissance des cellules d'*Eschscholtzia californica* en fonction des nutriments principaux..... 292

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 5.1 Cultures de cellules d'*Eschscholtzia californica* réalisées en bioréacteur pour fins de caractérisation de la croissance de cellules végétales 75

Tableau 5.2 Cultures de cellules d'*Eschscholtzia californica* réalisées en flacon pour fins de caractérisation de la croissance de cellules végétales 77

Tableau 5.3 Rendements en hydrates de carbone pour la formation de biomasse sèche tirés de la littérature. 114

Tableau 5.4 Rendements en phosphate pour la formation de biomasse sèche tirés de la littérature. 126

Tableau 5.5 Comparaison des indices de croissance en biomasse sèche selon les stratégies d'alimentation expérimentées 151

Tableau 5.6 Comparaison des indices de prolifération cellulaire selon les stratégies d'alimentation expérimentées 152

Tableau 6.1 : Valeurs des constantes de rendement pour les principaux nutriments et des taux d'assimilation pour le phosphate et l'ammoniaque 161

Tableau 6.2 : Taux d'évaporation et volume d'échantillonage moyens pour les systèmes de cultures HRI 176

Tableau 6.3 : Paramètres de l'équation du taux spécifique de croissance de la biomasse sèche obtenus par la technique de minimisation de l'erreur relative moyenne 187

Tableau 6.4 : Paramètres du taux spécifique de croissance de la biomasse sèche fonction de l'ammoniaque intracellulaire obtenus par la technique de minimisation de l'erreur relative moyenne 191

Tableau 6.5 : Paramètres de l'équation du taux spécifique de croissance de la concentration cellulaire obtenus par la technique de minimisation de l'erreur relative moyenne 209

Tableau 6.6 : Paramètres de l'équation du taux spécifique de croissance de la concentration cellulaire obtenus par la technique de minimisation de l'erreur relative moyenne avec le phosphate intracellulaire 209

Tableau 6.7 : Paramètres du taux spécifique de prolifération cellulaire obtenus par la technique de maximalisation du coefficient de détermination multiple empirique 216

Tableau 6.8 : Paramètres du taux spécifique de prolifération cellulaire obtenus par la maximalisation du coefficient de détermination multiple empirique avec le phosphate intracellulaire 216

Tableau 6.9 : Erreur résiduelle obtenue des deux séances d'optimisation de la fiabilité du modèle de prolifération cellulaire 221

Tableau 6.10 . Paramètres du modèle de croissance de la biomasse sèche et de la prolifération cellulaire pour les cultures d'*Eschscholtzia californica* en suspension en bioréacteur 234

Tableau 7.1 : Impacts des nutriments sur les croissances de biomasse sèche et de concentration cellulaire 237

Tableau A.1 : Composition du milieu B5 283

LISTE DES FIGURES

Figure 2 .1 : Impact du substrat sur le taux de croissance spécifique selon Blackman (1905) 8

Figure 2.2 : Impact du substrat sur le taux de croissance spécifique selon Takamatsu et coll. (1983) 9

Figure 2.3 : Impact du substrat sur le taux de croissance spécifique selon Monod (1942) 10

Figure 2.4 : Impact du substrat sur le taux de croissance spécifique selon Tessier (1942) 11

Figure 2.5 : Impact du substrat sur le taux de croissance spécifique selon Moser (1958) 12

Figure 2.6 : Impact du substrat sur le taux de croissance spécifique selon Powell (1967) 12

Figure 2.7 : Impact du substrat sur le taux de croissance spécifique selon Axelsson et coll. (1984) 13

Figure 2.8 : Impact du substrat sur le taux de croissance spécifique selon Hoppe et Hansford (1982) 13

Figure 2.9 : Impact du substrat sur le taux de croissance spécifique selon Chen et Hashimoto (1978) 14

Figure 2.10 : Impact du substrat sur le taux de croissance spécifique selon Yue (1982) 14

Figure 2.11 : Impact du substrat sur le taux de croissance spécifique selon Jost et coll. (1973) 15

Figure 2.12 : Impact du substrat sur le taux de croissance spécifique selon Shehata et Marr (1971) 15

Figure 2.13 : Impact du substrat sur le taux de croissance spécifique selon Ming et coll (1988) 16

Figure 2.14 : Impact du substrat sur le taux de croissance spécifique selon Haldane (1968) 17

Figure 2.15 : Première forme de l'impact du substrat sur le taux de croissance spécifique selon Sokol et Howell (1981) 17

Figure 2.16 : Seconde forme de l'impact du substrat sur le taux de croissance spécifique selon Sokol et Howell (1981) 18

Figure 2.17 : Impact du produit sur le taux de croissance spécifique selon Hinshelwood (1946) 19

Figure 2.18 : Impact du produit sur le taux de croissance spécifique selon Hägglund (1983) 20

Figure 2.19 : Impact du produit sur le taux de croissance spécifique selon Aiba et coll. (1968) 20

Figure 2.20 : Première forme de l'impact du produit sur le taux de croissance spécifique selon Jerusaliwski et Engambervediev (1969) 21

Figure 2.21 : Impact du produit sur le taux de croissance spécifique selon Levenspeil (1980) 21

Figure 2.22 : Seconde forme de l'impact du produit sur le taux de croissance spécifique selon Jerusaliwski et Engambervediev (1969) 22

Figure 2.23 : Impact du substrat et du produit sur le taux de croissance spécifique selon Aiba et coll. (1968) 23

Figure 2.24 : Première forme de l'impact du substrat et du produit sur le taux de croissance spécifique selon Aborhey et Williamson. (1977) 24

Figure 2.25 : Impact du substrat et du produit sur le taux de croissance spécifique selon Bazua et Wilke. (1977)..... 24

Figure 2.26 : Impact du substrat et du produit sur le taux de croissance spécifique selon Ghose et Tyagi. (1979)..... 25

Figure 2.27 : Impact du substrat et du produit sur le taux de croissance spécifique selon Jin et coll. (1981) 25

Figure 2.28 : Impact du substrat et du produit sur le taux de croissance spécifique selon Sevely et coll. (1981) 26

Figure 2.29 : Seconde forme de l'impact du substrat et du produit sur le taux de croissance spécifique selon Aborhey et Williamson. (1977) 26

Figure 2.30 : Impact du substrat et du produit sur le taux de croissance spécifique selon Dourado et Calvet. (1983)..... 27

Figure 2.31 : Impact du substrat et du produit sur le taux de croissance spécifique selon Moulin et coll. (1980)..... 27

Figure 2.32 : Processus général de division cellulaire des cellules végétales..... 43

Figure 3.1 : Bioréacteur de 5 L à double rubans hélicoïdaux 49

Figure 3.2 : Bioréacteur de 2 L à double rubans hélicoïdaux 51

Figure 4.1 : Profils de concentrations d'oxygène dissous obtenus avec trois contrôleurs 70

Figure 4.2 : Comparaison des performances des trois contrôleurs. 71

Figure 5.1 Culture en cuvée : 2SH10 80

Figure 5.2 Culture en cuvée alimentée en phosphate : 2SH22 83

Figure 5.3 Culture en cuvée alimentée en nitrate : 5SH23 87

Figure 5.4 Culture en cuvée alimentée en nitrate : 5SH25 89

Figure 5.5 Culture en cuvée alimentée en ammoniaque : 2SH24 92

Figure 5.6 Culture en cuvée alimentée en ammoniaque : 2SH26 94

Figure 5.7 Analyse de sensibilité du pourcentage de variation de la concentration de gaz carbonique dissous en fonction du pourcentage de variation des paramètres de culture utilisés. 102

Figure 5.8 Calcul du rendement en hydrates de carbone par rapport à la biomasse pour la culture 5SH23 111

Figure 5.9 Évolution de l'indice de croissance de la biomasse sèche lors de la culture 2SH22 en fonction du temps 119

Figure 5.10 Évolution de l'indice de croissance de la concentration cellulaire lors de la culture 2SH22 en fonction du temps 120

Figure 5.11 Évolution de l'indice de croissance de la biomasse sèche lors de la culture 5SH23 en fonction du temps 130

Figure 5.12 Évolution de l'indice de croissance de la biomasse sèche lors de la culture 5SH25 en fonction du temps 132

Figure 5.13 Évolution de l'indice de croissance de la concentration cellulaire lors de la culture 5SH23 en fonction du temps 134

Figure 5.14 Évolution de l'indice de croissance de la concentration cellulaire lors de la culture 5SH25 en fonction du temps 135

Figure 5.15 Évolution de l'indice de croissance de la biomasse sèche lors de la culture 2SH24 en fonction du temps 139

Figure 5.16 Évolution de l'indice de croissance de la biomasse sèche lors de la culture 2SH26 en fonction du temps 141

Figure 5.17 Évolution de l'indice de croissance de la concentration cellulaire lors de la culture 2SH24 en fonction du temps 146

Figure 5.18 Évolution de l'indice de croissance de la concentration cellulaire lors de la culture 2SH26 en fonction du temps 147

Figure 5.19 : Comparaison de croissances de la biomasse sèche simulées avec les taux de croissances obtenus des expériences de la présente étude. 151

Figure 5.20 : Comparaison de croissances de la concentration cellulaire simulées avec les taux de croissances obtenus des expériences de la présente étude. 152

Figure 6.1 : Modélisation du volume pour les cultures effectuées en bioréacteur de type HRI. 176

Figure 6.2 : Représentation de la feuille de calcul Excel© dans laquelle le modèle de croissance de la biomasse sèche est implanté. 177

Figure 6.3 : Algorithme de la stratégie d'optimisation de la fiabilité du modèle de croissance de la biomasse sèche par l'erreur relative d'estimation..... 180

Figure 6.4 : Algorithme de la stratégie d'optimisation de la fiabilité du modèle de croissance de la biomasse sèche par le coefficient de détermination multiple empirique. 183

Figure 6.5 : Profil des taux spécifiques de croissance associés aux ions contenus dans l'équation du taux spécifique de croissance de la biomasse sèche 185

Figure 6.6 Courbes de croissance de la biomasse prédites par les modèles obtenus des différentes scéances d'optimisation des paramètres. .. 186

Figure 6.7 : Profil des taux spécifiques de croissance associés aux ions contenus dans l'équation du taux spécifique de croissance de la biomasse sèche fonction de l'ammoniaque intracellulaire..... 192

Figure 6.8 : Effet des variation des paramètres du taux spécifique de croissance de la biomasse sèche sur l'erreur relative moyenne d'estimation de la biomasse sèche. 196

Figure 6.9 : Effet des variation des paramètres du taux spécifique de croissance de la biomasse sèche sur le coefficient de détermination multiple empirique de la biomasse sèche. 197

Figure 6.10 : Représentation de la feuille de calcul Excel© dans laquelle le modèle de croissance de cellules végétales est implanté..... 206

Figure 6.11 : Profil des taux spécifiques de croissance associés aux ions lors de l'utilisation de l'erreur relative moyenne comme critère de minimisation de l'erreur résiduelle d'estimation de la concentration cellulaire 210

Figure 6.12 : Profil des taux spécifiques de croissance associés aux ions lors de l'utilisation de l'erreur relative moyenne comme critère de minimisation de l'erreur résiduelle d'estimation de la concentration cellulaire avec le phosphate intracellulaire 213

Figure 6.13 : Profil des taux spécifiques de croissance associés aux ions lors de l'utilisation du coefficient de détermination multiple empirique comme critère de minimisation de l'erreur résiduelle d'estimation de la concentration cellulaire 215

Figure 6.14 : Profil des taux spécifiques de croissance associés aux ions lors de l'utilisation du coefficient de détermination multiple empirique comme critère de minimisation de l'erreur résiduelle d'estimation de la concentration cellulaire avec le phosphate intracellulaire 217

Figure 6.15 Courbes de prolifération cellulaire prédites par les modèles obtenus des différentes scéances d'optimisation des paramètres. .. 220

Figure 6.16 : Effet des variations des paramètres du taux spécifique de croissance de la concentration cellulaire sur l'erreur relative moyenne d'estimation de la concentration cellulaire 225

Figure 6.17 : Effet des variations des paramètres du taux spécifique de croissance de la concentration cellulaire sur le coefficient de détermination multiple empirique de la concentration cellulaire 227

Figure 6.18 : Effet des variations des paramètres du taux spécifique de croissance de la biomasse sèche sur l'erreur relative moyenne d'estimation de la concentration cellulaire. 229

Figure 6.19 : Effet des variations des paramètres du taux spécifique de croissance de la biomasse sèche sur le coefficient de détermination multiple empirique de la concentration cellulaire 230

Figure 7.1 : Courbes de croissance obtenues par l'application de la stratégie d'alimentation maximisant la croissance cellulaire. 243

Figure 7.2 : Profil d'oxygène dissous résultant de l'application de la stratégie d'alimentation maximisante..... 247

Figure 7.3 : Profils de respiration obtenus par la méthode statique (Aubry, 1995) pour une culture typique et pour la culture à croissance optimum ainsi que mesuré en continu pour ces deux cultures 249

Figure 7.4 Évolution de l'indice de croissance de la concentration cellulaire lors de la culture 5SH27 en fonction du temps 251

Figure 7.5 : Comparaison de paramètres d'analyse de la croissance cellulaire pour différentes cultures. 252

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

CAD	Contrôleur adaptatif direct
CADm	Contrôleur adaptatif direct basé sur le taux de respiration mesuré
CDME	Coefficient de détermination multiple empirique
ERM	Erreur relative moyenne
PI	Contrôleur linéaire à action proportionnelle-intégrale

NOMENCLATURE

b_n	Mesure de l'oxygène dissous au temps n	mmol L^{-1}
c_z	Somme des carrés totale	g^2 L^{-2}
C ou OD	Concentration en oxygène dissous	mmol L^{-1}
C^* ou C^*_{air}	Concentration de saturation en oxygène de l'eau lorsqu'en contact avec de l'air	mmol L^{-1}
C^*_{gaz}	Concentration de saturation en oxygène de l'eau lorsqu'en contact avec un gaz autre que l'air	mmol L^{-1}
C_{PC}	Point de consigne de la concentration en oxygène dissous	mmol L^{-1}
CO_2D	Concentration en gaz carbonique dissous	mmol L^{-1}
CTR	Taux de transfert du gaz carbonique de la culture vers les gaz de sortie (Carbon-dioxide Transfer Rate)	mmol L^{-1} h^{-1}
e_n	Erreur de contrôle du contrôleur linéaire au temps n	mmol L^{-1}
e_k	Erreur historique de contrôle du contrôleur linéaire au temps k	mmol L^{-1}
e_y	Erreur relative moyenne d'estimation pour la culture y	--
e_z	Somme des carrés des erreurs d'estimations	g^2 L^{-2}
erm	Erreur relative moyenne d'estimation	%
f	Alimentation en substrat	(g ou mmol) L^{-1} h^{-1}
F	Alimentation en substrat	(g ou mmol) h^{-1}
k_La	Coefficient de transfert d'oxygène	h^{-1}

$\overline{k_L a_t}$	Coefficient de transfert d'oxygène estimé au temps t	h^{-1}
K_c	Gain du contrôleur linéaire	% ouverture $(mmol\ L^{-1})^{-1}$
n	Concentration en nutriment	$mmol\ L^{-1}$
n_{cor}	Concentration en nutriment corrigée	$mmol\ L^{-1}$
nh_4	Concentration en ammoniaque	$mmol\ L^{-1}$
NH_4	Ammoniaque total	mmol
no_3	Concentration en nitrate	$mmol\ L^{-1}$
NO_3	Nitrate total	mmol
OD ou C	Concentration en oxygène dissous	$mmol\ L^{-1}$
OUR	Taux de respiration cellulaire (Oxygen Uptake Rate)	$mmol\ L^{-1}\ h^{-1}$
$\overline{OUR_t}$	Taux de respiration cellulaire estimé au temps t	$mmol\ L^{-1}\ h^{-1}$
p_n	Action du contrôleur linéaire au temps n	% ouverture
$\overline{p}$	Action initiale du contrôleur linéaire	% ouverture
P	Produit métabolique	mmol
PCV	Fraction volumique de cellules centrifugées (Packed Cell Volume)	%
po_4	Concentration en phosphate	$mmol\ L^{-1}$
PO_4	Phosphate total	mmol
P_Q	Coefficient d'aération	h^{-1}
Q	Débit gazeux de sortie des produits métaboliques	(g ou mmol) h^{-1}
Q_b	Débit des gaz de bullage	$L\ h^{-1}$
Q_h	Débit des gaz d'aération de surface	$L\ h^{-1}$

Q_T	Débit total des gaz d'alimentation	$L\ h^{-1}$
R^2	Coefficient de détermination multiple empirique	--
R_Q	Quotient respiratoire	--
s	Concentration en sucres	$g\ L^{-1}$
S	Sucres totaux	g
SCV	Fraction volumique de cellules sédimentées (Settled Cell Volume)	%
t	Temps	h
T	Période d'échantillonage mathématique des contrôleurs adaptatifs	h
u	Échantillon analysé dans le calcul de l'erreur d'estimation	--
v	Nombre d'échantillons de la culture analysée pour le calcul de l'erreur relative moyenne d'estimation	--
v	Nombre d'échantillons totaux pour l'ensemble des cultures à analyser pour le calcul du coefficient de détermination multiple empirique	--
V	Volume de culture	L
x ou x_S	Concentration en biomasse sèche	$g\ L^{-1}$
$\bar{x}$	Concentration en biomasse sèche estimée	$g\ L^{-1}$
$\tilde{x}$	Concentration moyenne globale en biomasse sèche	$g\ L^{-1}$
x_H	Concentration en biomasse humide	$g\ L^{-1}$
X	Biomasse sèche totale	g

y	Culture analysée pour le calcul de l'erreur d'estimation	--
y_{air}	Fraction volumique d'oxygène dans l'air	%
y_{gaz}	Fraction volumique d'oxygène dans un gaz autre que l'air	%
Y	Variable contrôlée par un contrôleur adaptatif	--
Y_{PC}	Point de consigne de la variable contrôlée par un contrôleur adaptatif	--
z	Nombre de cultures analysées pour le calcul de l'erreur relative moyenne	--
α	Coefficient de transfert réduit	h^{-1}
$\bar{\alpha}_t$	Coefficient de transfert réduit estimé au temps t	h^{-1}
Δt	Période d'échantillonage mathématique du contrôleur linéaire	h
ϕ (F, Q)	Régresseur linéaire des paramètres estimés	--
γ	Gains d'estimation des paramètres	--
Γ	Matrice des gains d'estimation	--
λ_C	Gain de l'erreur de contrôle	--
θ	Matrice des paramètres estimés	--
τ_I	Constante de temps intégral du contrôleur linéaire	h
τ_D	Constante de temps dérivatif du contrôleur linéaire	h
ϕ	Concentration cellulaire	$10^9\ L^{-1}$

1. INTRODUCTION

De tout temps, l'Homme a su utiliser son environnement afin de subvenir à ses besoins primaires et secondaires. Il a ainsi pu survivre sous différentes conditions par une évolution personnelle et sociale jusqu'à ce jour, où l'espèce humaine est très organisée et où chaque individu s'est spécialisé face à la collectivité. Au fil de son évolution, l'être humain établi toujours ses actions sur le principe de survie. À cette fin, il recherche toujours à améliorer sa qualité de vie et à repousser les limites de la mort.

1.1 Cellules de plante et métabolites secondaires

Pour y arriver, l'Homme cherche à améliorer sa compréhension du fonctionnement de son être ainsi que l'interaction s'établissant entre lui et son environnement. De cette manière, il peut identifier les moyens à prendre ainsi que les ressources nécessaires pour améliorer et prolonger sa qualité de vie. Parmi les ressources naturelles utilisées, le monde végétal représente probablement la plus grande source de produits utilisés à ces fins, tels les aspects d'habitation, vestimentaires et particulièrement nutritionnels et médicaux.

Le monde végétal fourni une grande diversité de produits ayant un pouvoir plus ou moins grand de guérison de diverses maladies chez l'être humain. Parmi ceux-ci, se trouve la sanguinarine, utilisée à l'époque de la colonisation des Amériques par

les Amérindiens. Ces derniers mâchaient cette plante au liquide rouge sang sans savoir qu'elle leur évitait de très graves maladies buccales s'attaquant aux gencives.

Obtenue principalement de la plante *Sanguinaria canadensis* à l'état naturel, ce phytochimique est aussi produit en suspension de cellules de plante en bioréacteur par les espèces de *Papaveracea* (Aubry, 1995). Pour des raisons de disponibilité et d'utilisation lors de travaux précédents par l'équipe de recherche, les cellules d'*Eschscholtzia californica*, productrices d'alcaloïdes dont la sanguinarine, sont utilisées dans le cadre de ce projet.

1.2 Problématique

Jusqu'à ce jour, les scientifiques se basent principalement sur trois paramètres majeurs afin de déterminer le meilleur moment d'induction de la production de métabolites secondaires : la concentration en biomasse sèche, la concentration d'un ou de plusieurs nutriments (Archambault et coll., 1995) et le profil respiratoire (Aubry et coll., 1995).

À titre d'exemple, Archambault et coll. (1995) notent que la présence de phosphate limite la production d'alcaloïdes. Ces derniers obtiennent de meilleurs taux de production d'alcaloïdes (32 mg L^{-1} d^{-1}) en induisant la phase de production suite à l'épuisement de ce nutriment. Aubry (1995) obtient les meilleurs taux de production d'alcaloïdes benzophénantridines publiés à ce jour (68 mg L^{-1} d^{-1}) en induisant la phase de production à l'obtention d'un plateau du profil respiratoire. Toutefois, la

production de métabolites secondaires demeure limitée au potentiel des cellules présentes lors du plafonnement respiratoire.

Afin d'augmenter ce potentiel de production, la croissance des cellules en suspension doit être étudiée afin d'accroître la concentration de cellules productrice au moment de l'élicitation. Comme démontré par Aubry (1995) et Pépin (1996), le profil respiratoire correspond à la croissance cellulaire en bioréacteur. Cependant le plafonnement des paramètres de suivi de croissance habituellement utilisés (biomasse humide et sèche) ne correspond pas au plafonnement de la respiration cellulaire. Pépin (1996) a démontré dans ses travaux que le profil de dénombrement cellulaire correspond à celui de la respiration. En comparant ces résultats à ceux obtenus par Aubry (1995) sur le moment de l'élicitation, il apparaît que l'induction de la phase de production doit être effectué alors que la concentration cellulaire est maximum, au plateau de respiration.

En se basant sur ces résultats, il devient primordial de maximiser la concentration cellulaire atteinte au moment de l'élicitation pour augmenter significativement la production d'alcaloïdes. La maîtrise de la phase de croissance apparaît donc être d'une importance capitale pour l'obtention d'une concentration cellulaire maximum menant à une production maximum de métabolites secondaires.

1.3 Objectifs du projet

L'objectif global de ce projet est de maximiser la croissance de cellules végétales de façon à augmenter de manière significative la production de métabolites secondaires lors de la phase subséquente de production. Afin d'y parvenir, trois objectifs spécifiques doivent être réalisés. Premièrement, l'étude de la croissance de cellules végétales en bioréacteur doit être réalisée de manière à accroître la compréhension des mécanismes de croissance. En second lieu, la modélisation de la croissance des cellules d'*Eschscholtzia californica* doit être effectuée dans le but de déterminer l'effet des nutriments sur le taux de croissance en biomasse sèche et sur la prolifération cellulaire ainsi que de permettre la réalisation de simulations de cultures. Finalement, la maximalisation de la prolifération et de la concentration cellulaire doit être effectuée de manière à rencontrer l'objectif global de ce projet de recherche.

1.4 Méthodologie

Afin de pallier au manque d'information sur l'état de la croissance lors du plateau de respiration, un nouvel outil caractérisant la croissance est mis au point. À l'aide du dénombrement cellulaire, des cultures de cellules végétales en suspension en bioréacteur sont effectuées. Ces cultures servent principalement à déterminer l'influence des divers facteurs environnementaux sur la croissance des cellules végétales. Afin d'amplifier certains aspects, des cultures sont réalisées en mode cuvée alors que d'autres le sont en cuvée alimentée.

Un contrôleur adaptatif d'oxygène dissous basé sur le taux de respiration est conçu de manière à restreindre l'impact négatif qu'a un changement dans la concentration de ce nutriment. Ce type de contrôleur est appliqué aux cultures étudiées de manière à améliorer la performance de contrôle ainsi qu'à accroître la capacité et la vitesse de stabilisation du contrôleur suite à une perturbation.

La phase de modélisation de la biomasse sèche est amorcée par l'établissement d'un schème réactionnel. Par la suite, le calcul des paramètres de consommation des nutriments (rendements et taux de consommation) est réalisé. Enfin, une cinétique de croissance est posée de manière à décrire les phénomènes présents dans ce type de culture, suivi de séances d'optimisation de la fiabilité du modèle par le changement des constantes de l'équation développée. Enfin, cette dernière étape est réalisée pour effectuer la modélisation de la croissance de la concentration cellulaire.

Finalement, des séances de simulations sont réalisées afin de déterminer la stratégie d'alimentation des nutriments maximisant la croissance de la concentration cellulaire. Suite à l'obtention d'une telle stratégie, celle-ci est appliquée pour une culture menant à une croissance maximum.

2. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Les cultures de cellules de plante en suspension sont étudiées depuis les années soixante pour leur potentiel de production de phytochimiques et utilisées entre autres par l'industrie pharmaceutique. Parmi celles-ci se trouve le taxol issu de *Taxus* et la sanguinarine produite par *Eschscholtzia californica*. Le marché annuel pour la commercialisation de tels produits s'élève à plusieurs milliards, (Verpoorte et coll., 1993) ce qui en fait un domaine de recherche privilégié de la part des scientifiques et des grandes compagnies pharmaceutiques de par le monde.

L'optimisation de la phase de croissance est envisagée dans le cadre de ce projet. Pour y arriver, les différents effets de croissance associés aux nutriments doivent être identifiés et modélisés dans le but de simuler différentes stratégies de croissance. Les premières sections de la recherche bibliographique portent sur les cinétiques et modèles de croissance développés jusqu'à ce jour et pouvant se rapporter aux cultures de cellules de plantes.

Afin d'accroître la production de métabolites secondaires par les cultures en suspension, la phase de croissance doit être comprise et optimisée. Pour y arriver, les mécanismes de croissance des cellules de plantes doivent êtres connus de manière à pouvoir les influencer dans un but de maximalisation de la concentration cellulaire. C'est ce sur quoi porte les deux parties suivantes de la recherche bibliographique afin d'identifier l'état des connaissances actuelles en la matière. Finalement, une brève

discussion est présenté quant à l'absence de stratégies maximisant la croissance cellulaire dans la littérature.

2.1 Cinétiques de croissance

Plusieurs publications rapportent les résultats sur les cinétiques de croissance de la biomasse. Cependant, celles discutées dans cette section ne concernent que des cinétiques pour lesquelles la croissance est fonction des sources nutritionnelles ou de résidus métaboliques (produits) dans le milieu de croissance. Il est à noter que toutes les structures des modèles de cinétique présentées sont des taux spécifiques de croissance et qu'elles n'ont pas nécessairement été développées à l'origine pour la culture de cellules végétales. Ces dernières sont regroupées par section (fonctions du substrat, du produit ou des deux) et selon l'allure générale de la courbe résultante.

2.1.1 Dépendance au substrat

En 1905 Blackman établit une relation entre le taux spécifique de croissance et la concentration en substrat dans le milieu de croissance. Il observe que le taux de croissance augmente proportionnellement à la concentration du substrat jusqu'à un maximum. L'équation posée (équation 2.1) présente une relation linéaire du taux de croissance avec le substrat jusqu'à une concentration où le taux spécifique de croissance devient constant. Cette relation semble la première établie.

Blackman (1905)

$$\mu(S) = \begin{cases} \dfrac{\mu^*}{K_M} & \text{si } S(t) \leq K_M \\ \mu^* & \text{si } S(t) \geq K_M \end{cases} \qquad 2.1$$

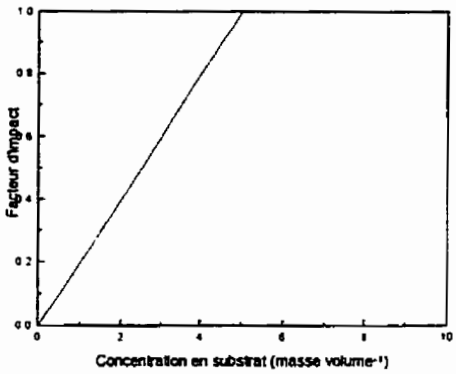


Figure 2.1 : Impact du substrat sur le taux de croissance spécifique selon Blackman (1905)

Dans le même regroupement, Takamatsu et coll., en 1983, établissent aussi une relation directe entre le taux spécifique de croissance et la concentration en substrat dans le milieu. Cette relation (équation 2.2), développée pour la croissance de boues activées, démontre qu'une concentration en substrat inférieure à la concentration critique de croissance provoque une décroissance de la biomasse. En augmentant cette concentration en substrat, le taux de décroissance diminue jusqu'à l'atteinte de la concentration critique en substrat à l'endroit où le taux de croissance augmente graduellement.

Takamatsu et coll. (1983) $\mu(S) = K_B(S - S_B)$ 2.2

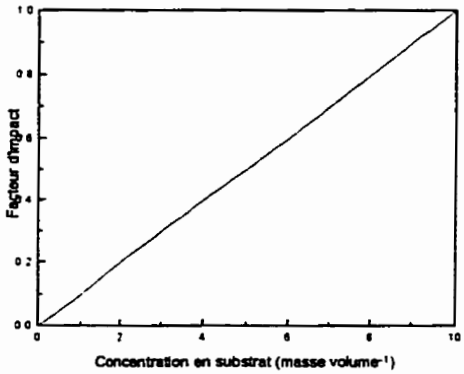


Figure 2.2 : Impact du substrat sur le taux de croissance spécifique selon Takamatsu et coll. (1983)

En 1942, Monod présenta une forme mieux adaptée à la croissance bactérienne. Sa relation (équation 2.3) présente une augmentation rapide du taux de croissance avec une augmentation de la concentration du substrat suivie d'un ralentissement de cette accroissement jusqu'à l'atteinte d'un maximum du taux spécifique de croissance où la concentration en substrat n'a plus d'influence. Cette relation est fortement utilisée pour la description de croissance de plusieurs type de cultures autant végétales, animales que bactériennes. Cette relation est maintenant une référence dans le domaine.

Monod (1942) $$\mu(S) = \mu^* \frac{S}{K_M + S} \qquad 2.3$$

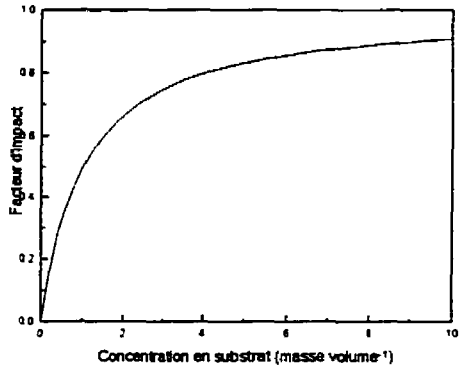


Figure 2.3 : Impact du substrat sur le taux de croissance spécifique selon Monod (1942)

Dans la même catégorie, plusieurs autres relations ont été développées. Tessier (1942) présente une adaptation de Blackman (1905) avec l'utilisation d'une notation exponentielle (équation 2.4) plutôt que la concentration de substrat au dénominateur comme l'a fait Monod. Moser (1958) ajoute un exposant à la concentration en substrat dans l'équation de Monod, lui permettant ainsi de mieux adapter l'impact du substrat. Powell (1967) présente une équation légèrement plus complexe (équation 2.6) qui ne respecte toutefois pas la notion de taux maximum de croissance qu'il intègre pourtant dans son équation. En effet, selon les valeurs des constantes, ce taux maximum peut être amplifié par sa relation, ce qui ne concorde pas avec la réalité. Les autres relations présentées dans cette catégorie, Axelsson et coll. (1984), Hoppe et Hansford (1982), Chen et Hashimoto (1978), Roques et coll. (1982),

Jost et coll. (1973), Shehata et Marr (1971) ainsi que Ming et coll. (1988), présentent toutes des modifications de l'équation de Monod. Ils utilisent l'équation de Monod (1942) et ajoutent des constantes ou tout simplement, répètent la relation initiale avec différentes constantes (équations 2.7 à 2.13).

Tessier (1942)

$$\mu(S) = \mu^*\left(1 - \exp\left[-\frac{S}{K_M}\right]\right) \qquad 2.4$$

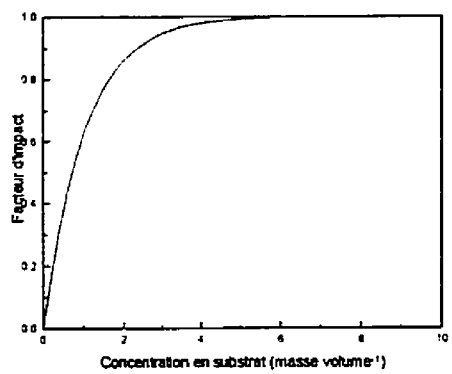


Figure 2.4 : Impact du substrat sur le taux de croissance spécifique selon Tessier (1942)

Moser (1958) $$\mu(S) = \mu^* \frac{S^\lambda}{K_M + S^\lambda} \qquad 2.5$$

avec $\lambda > 0$

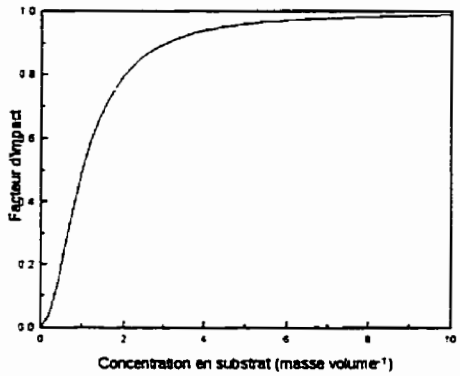


Figure 2.5 : Impact du substrat sur le taux de croissance spécifique selon Moser (1958)

Powell (1967) $$\mu(S) = \mu^* \frac{1}{2K_M}\left[K_M + S - \sqrt{K_M + S^2 - 4K_M S}\right] \qquad 2.6$$

avec $K_M > 0$

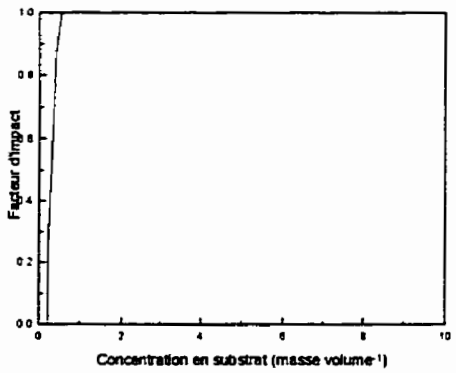


Figure 2.6 : Impact du substrat sur le taux de croissance spécifique selon Powell (1967)

Axelsson et coll. (1984) $$\mu(S) = \mu^* \frac{S}{K_M + S} + Y\pi S \qquad 2.7$$

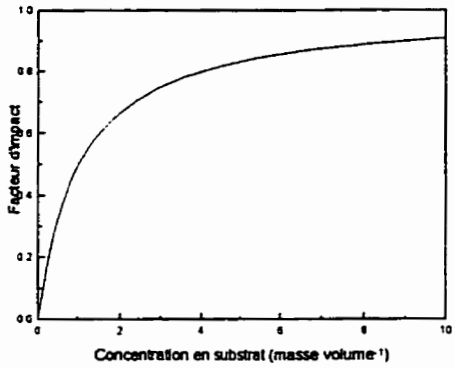


Figure 2.7 : Impact du substrat sur le taux de croissance spécifique selon Axelsson et coll. (1984)

Hoppe et Hansford (1982) $$\mu(S) = \mu^* \frac{S}{K_M + S} \frac{K_M}{K_M + Y(S_{a\,lim\,ent\square} - S)} \qquad 2.8$$

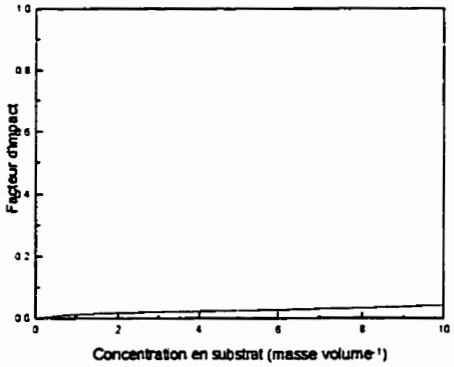


Figure 2.8 : Impact du substrat sur le taux de croissance spécifique selon Hoppe et Hansford (1982)

Chen et Hashimoto (1978) $\mu(S) = \mu^* \frac{S}{K(S_{a\,lim\,ent\square} - S) + S}$ 2.9

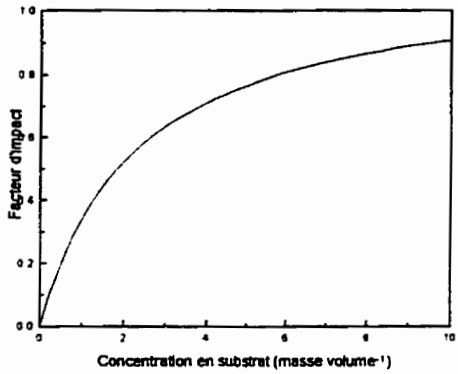


Figure 2.9 : Impact du substrat sur le taux de croissance spécifique selon Chen et Hashimoto (1978)

Yue (Roques et coll., 1982) $\mu(S) = \mu^* \frac{S}{K(S_{a\,lim\,ent\square} - S) + K_M + S}$ 2.10

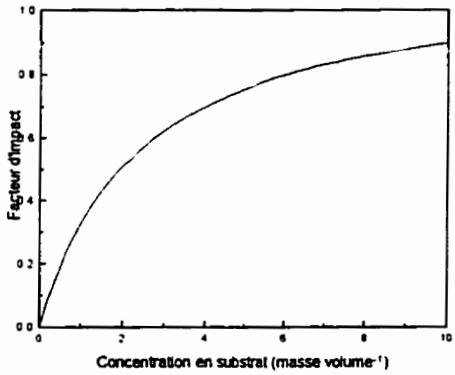


Figure 2.10 : Impact du substrat sur le taux de croissance spécifique selon Yue (1982)

Jost et coll. (1973) $$\mu(S) = \mu^* \frac{S^2}{(K_{M1} + S)(K_{M2} + S)} \qquad 2.11$$

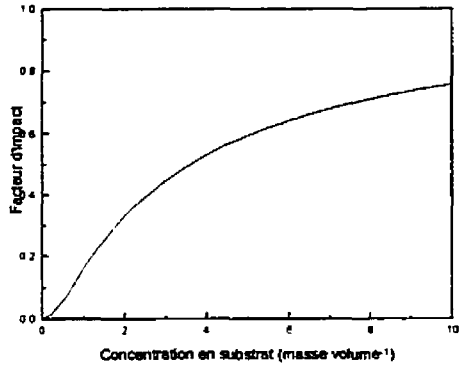


Figure 2.11 : Impact du substrat sur le taux de croissance spécifique selon Jost et coll. (1973)

Shehata et Marr (1971) $$\mu(S) = \mu_1^* \frac{S}{K_{M1} + S} + \mu_2^* \frac{S}{K_{M2} + S} \qquad 2.12$$

$$\text{où } \mu^* = \mu_1^* + \mu_2^*$$

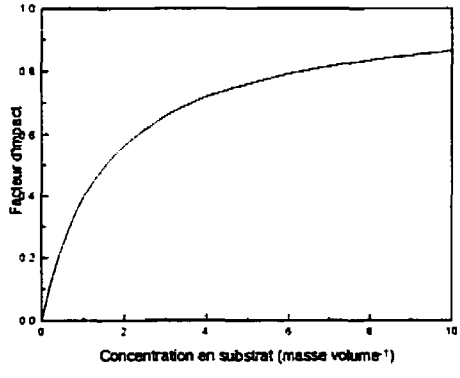


Figure 2.12 : Impact du substrat sur le taux de croissance spécifique selon Shehata et Marr (1971)

Ming et coll. (1988) $$\mu(S) = \mu^* \frac{S^2}{K_1 + S^2} \qquad 2.13$$

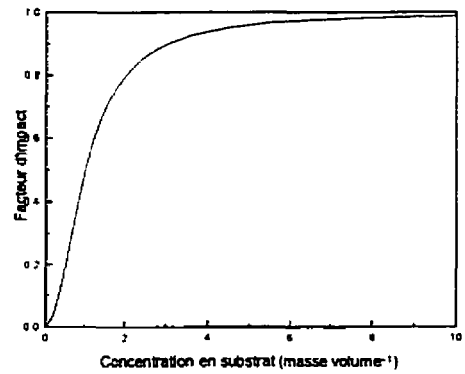


Figure 2.13 : Impact du substrat sur le taux de croissance spécifique selon Ming et coll (1988)

La troisième catégorie présente des relations où une concentration optimale de substrat est définie, i.e. une concentration en substrat pour laquelle le taux de croissance est maximum. Haldane (1968) développe une relation entre le taux spécifique de croissance et la concentration en substrat (équation 2.14) où en l'augmentant, le taux de croissance augmente jusqu'à un maximum suivi d'une diminution du taux de croissance atteignant un plateau minimum. Ce profil est aussi obtenu au moyen des deux relations (équations 2.15 et 2.16) développées par Sokol et Howell (1981).

Haldane (Andrews, 1968) $$\mu(S) = \mu_0 \frac{S}{K_M + S + S^2/K_I} \qquad 2.14$$

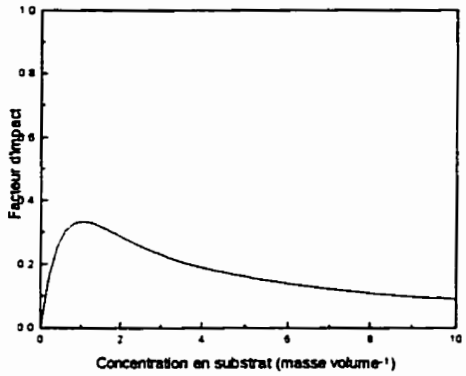


Figure 2.14 : Impact du substrat sur le taux de croissance spécifique selon Haldane (1968)

Sokol et Howell (1981) $$\mu(S) = \mu^* \frac{K_1 S}{K_2 + S^2} \qquad 2.15$$

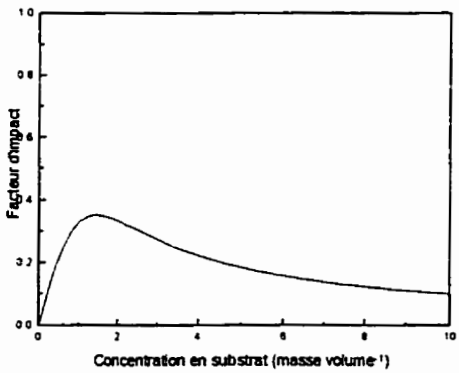


Figure 2.15 : Première forme de l'impact du substrat sur le taux de croissance spécifique selon Sokol et Howell (1981)

$$\mu(S) = \mu^* \frac{K_1 S}{K_2 + S^{K_3}} \qquad 2.16$$

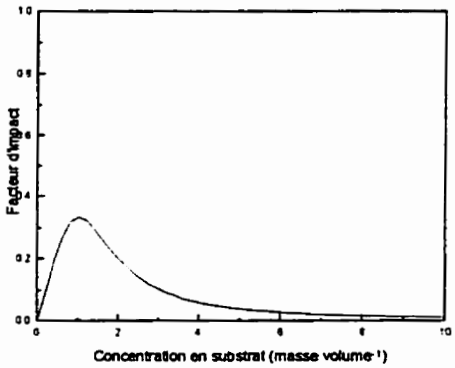


Figure 2.16 : Seconde forme de l'impact du substrat sur le taux de croissance spécifique selon Sokol et Howell (1981)

2.1.2 Dépendance au produit

Presque tous ces modèles indiquent une relation favorable entre le taux spécifique de croissance et la concentration en substrat. Toutefois il se peut que certains facteurs présents dans le milieu de croissance nuisent aux cultures. C'est le cas de beaucoup de produits métaboliques résiduels.

En 1946, Hinshelwood établie une relation entre le taux spécifique de croissance et la concentration en produits métaboliques dans un milieu de culture bactérien. Il y observe une relation directe d'abaissement du taux de croissance avec une augmentation de la concentration de ce produit (équation 2.17). Par la suite,

plusieurs autres auteurs présentent des relations semblables ou légèrement modifiées. C'est le cas de Aiba et coll. (1968), Jerusaliwski et Engambervediev (1969) et Hägglund (1983) qui proposent des profils plus courbés de même que des taux spécifiques de croissance pouvant être négatifs (équation 2.18 à 2.20). Levenspeil (1980) introduit une formulation intéressante (équation 2.21) qui représente une concentration spécifique en produit, inhibant complètement la croissance. Avec une concentration inférieure ou supérieure, le taux spécifique de croissance est augmenté. Contrairement au phénomène d'inhibition présenté jusqu'à maintenant face au produit, Jerusaliwski et Engambervediev (1969) présente une seconde forme où, tel le substrat, le produit présent en plus grande quantité dans le milieu de croissance favorise la croissance (équation 2.22).

Hinshelwood (1946) $$\mu(P) = \mu^* - K_1(P - K_2) \qquad 2.17$$

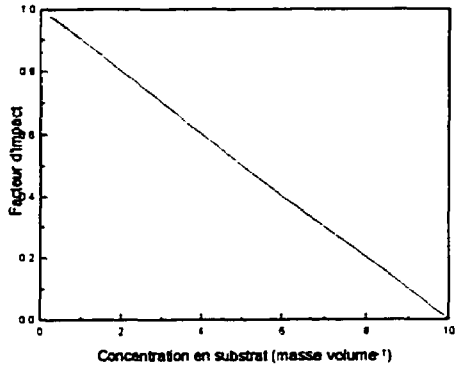


Figure 2.17 : Impact du produit sur le taux de croissance spécifique selon Hinshelwood (1946)

Hägglund (1983) $$\mu(P) = K_1 - K_2 \frac{P}{K_3 + P} \qquad 2.18$$

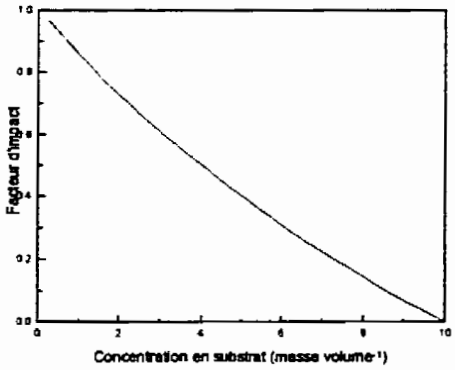


Figure 2.18 : Impact du produit sur le taux de croissance spécifique selon Hägglund (1983)

Aiba et coll. (1968) $$\mu(P) = \mu^* e^{-K_1 P} \qquad 2.19$$

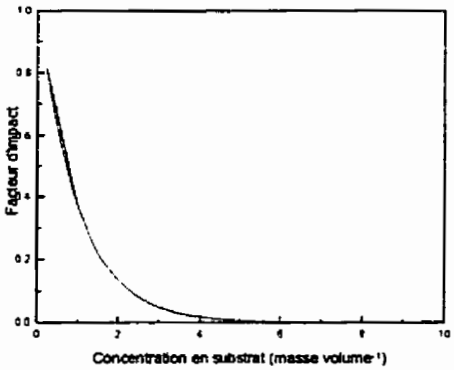


Figure 2.19 : Impact du produit sur le taux de croissance spécifique selon Aiba et coll. (1968)

Jerusaliwski et Engambervediev (1969) $\mu(P) = \mu^* \frac{K_P}{K_P + P}$ 2.20

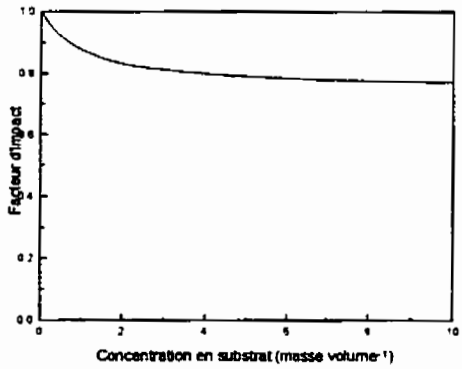


Figure 2.20 : Première forme de l'impact du produit sur le taux de croissance spécifique selon Jerusaliwski et Engambervediev (1969)

Levenspeil (1980) $\mu(P) = \mu^* \left[1 - \frac{P}{P_L} \right]^n$ 2.21

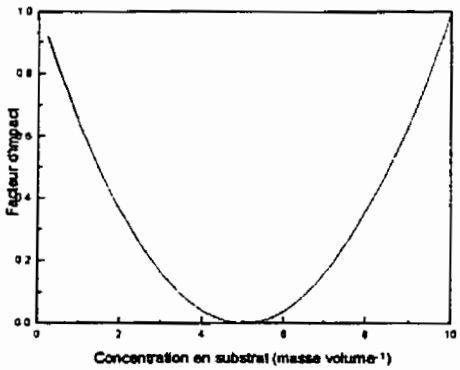


Figure 2.21 : Impact du produit sur le taux de croissance spécifique selon Levenspeil (1980)

Jerusaliwski et Engambervediev (1969) $\mu(P) = \mu^* \frac{P}{K_P + P}$ 2.22

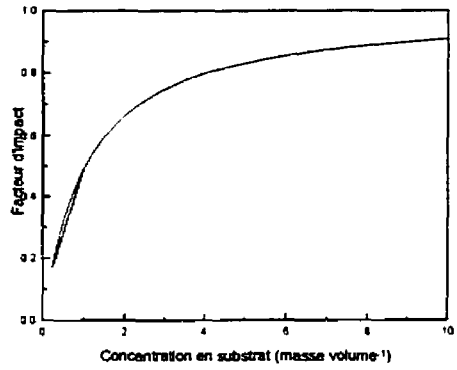


Figure 2.22 : Seconde forme de l'impact du produit sur le taux de croissance spécifique selon Jerusaliwski et Engambervediev (1969)

2.1.3 Dépendance au substrat et au produit

Finalement, quelques modèles comprenant l'effet combiné du substrat et du produit ont aussi été publiés. Cependant, dans la plupart des cas, il ne s'agit que d'une combinaison d'équations présentées ci-haut, directement ou légèrement modifiées. C'est ce que présentent Aiba et coll. (1968), Aborhey et Williamson (1977), Bazua et Wilke (1977), Ghose et Tyagi (1979), Jin et coll. (1981), Sevely et coll. (1981) et Dourado et Calvet (1983) et (équations 2.23 à 2.30). Toutefois, Moulin et coll. (1980) présentent une relation où les effets des deux facteurs sont réellement combinés (équation 2.31). Par contre, comme c'est le cas pour Powell (1967), les allures

résultantes de cette relation ne respectent pas la réalité du taux spécifique maximum de croissance. Ce type de relation biaise l'effet inhibiteur ou favorable associé au nutriment.

Aiba et coll. (1968) $$\mu(S,P) = \mu^* \frac{S}{K_M + S} \exp(-K_I P) \qquad 2.23$$

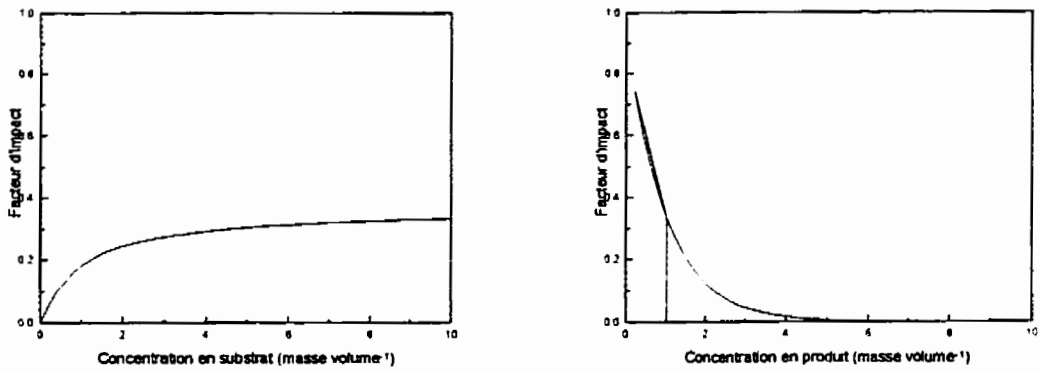


Figure 2.23 : Impact du substrat et du produit sur le taux de croissance spécifique selon Aiba et coll. (1968)

Aborhey et Williamson (1977) $\mu(S,P) = \mu^* \frac{S}{K_M + S} \frac{P}{K_P + P}$ 2.24

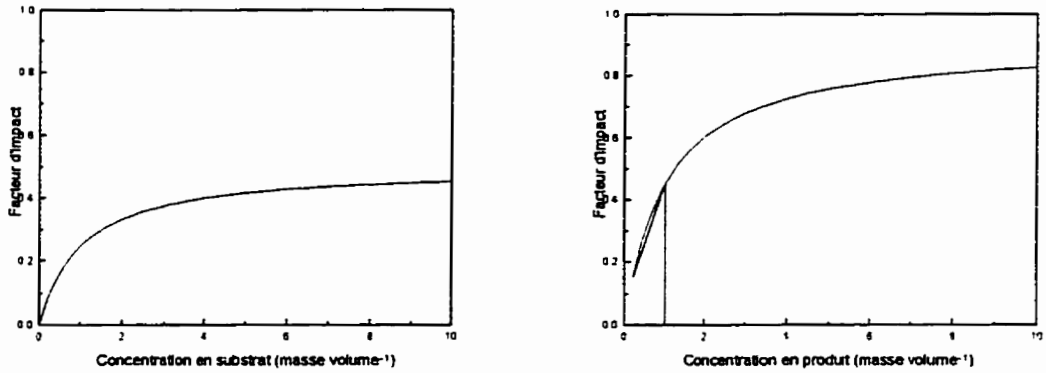


Figure 2.24 : Première forme de l'impact du substrat et du produit sur le taux de croissance spécifique selon Aborhey et Williamson. (1977)

Bazua et Wilke (1977) $\mu(S,P) = \mu^* - \frac{S}{K_M + S} \frac{K_1 P}{K_2 - P}$ 2.25

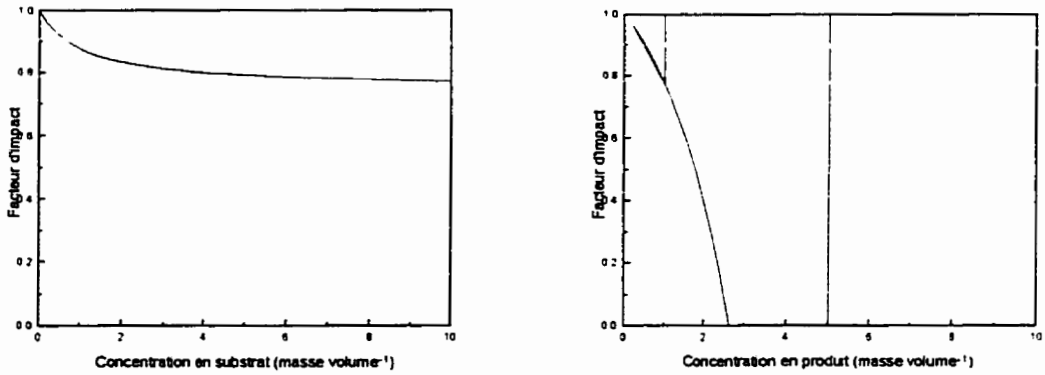


Figure 2.25 : Impact du substrat et du produit sur le taux de croissance spécifique selon Bazua et Wilke. (1977)

Ghose et Tyagi (1979) $$\mu(S,P) = \mu_0 \frac{P}{K_P + P + S^2/K_I}\left(1 - \frac{P}{P_L}\right) \qquad 2.26$$

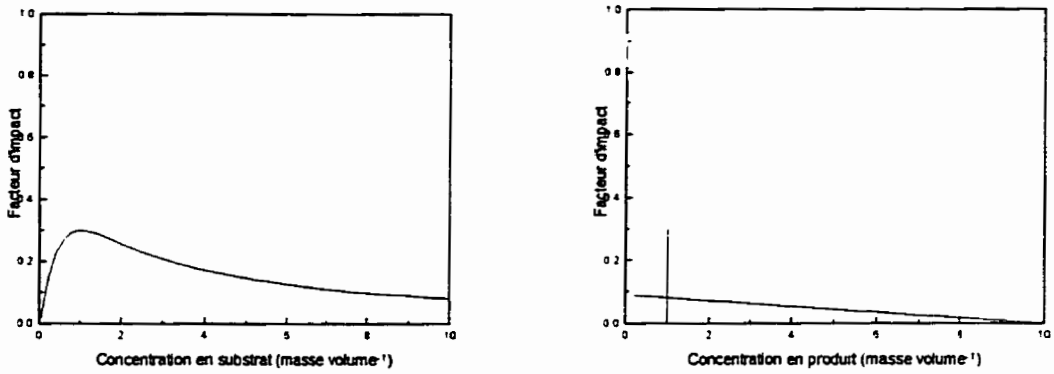


Figure 2.26 : Impact du substrat et du produit sur le taux de croissance spécifique selon Ghose et Tyagi. (1979)

Jin et coll. (1981) $$\mu(S,P) = \mu^* \frac{S}{K_M + S}\exp(-K_1 P - K_2 S) \qquad 2.27$$

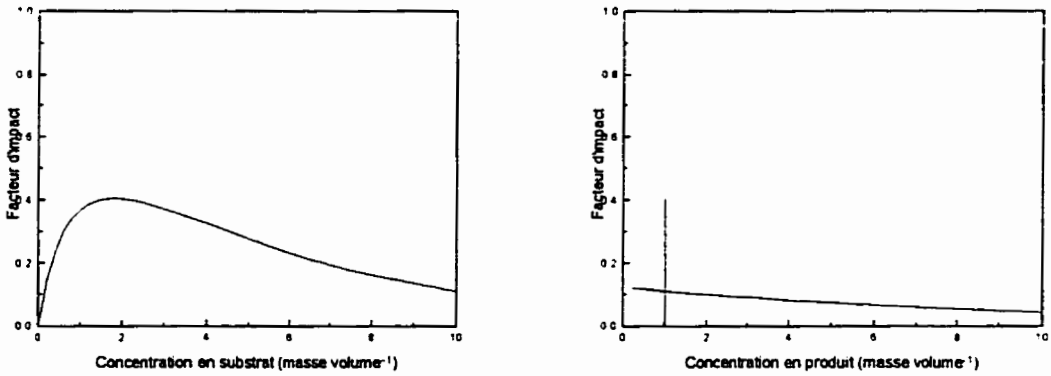


Figure 2.27 : Impact du substrat et du produit sur le taux de croissance spécifique selon Jin et coll. (1981)

Sevely et coll. (1981) $$\mu(S,P) = \mu^* \frac{S}{K_M + S} \frac{K_P}{K_P + P}\left(1 - \frac{P}{P_L}\right) \qquad 2.28$$

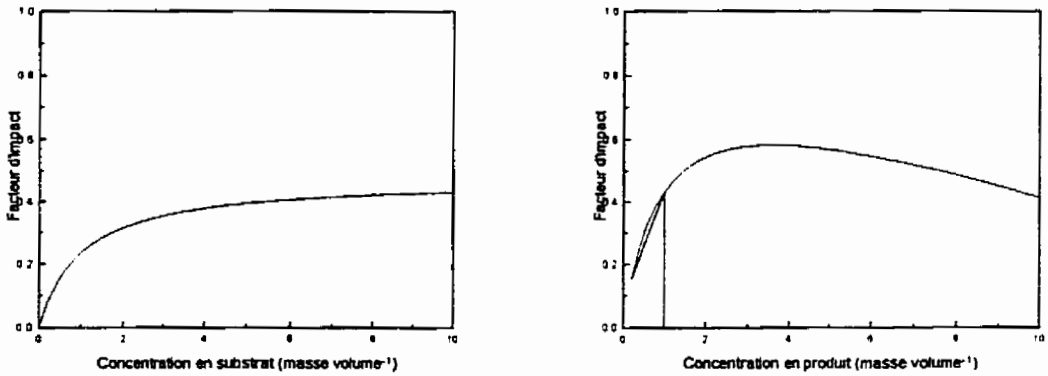


Figure 2.28 : Impact du substrat et du produit sur le taux de croissance spécifique selon Sevely et coll. (1981)

$$\mu(S,P) = \mu^* \frac{S}{K_M + S} \frac{S}{S + K_P P} \qquad 2.29$$

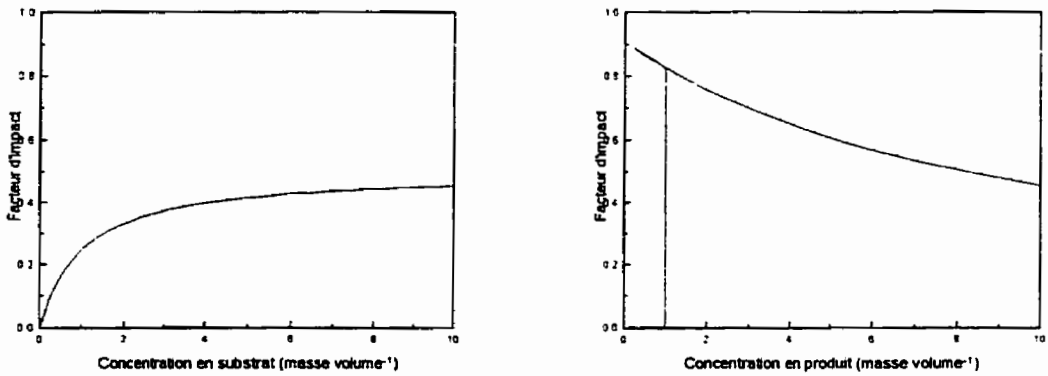


Figure 2.29 : Seconde forme de l'impact du substrat et du produit sur le taux de croissance spécifique selon Aborhey et Williamson. (1977)

Dourado et Calvet (1983) $$\mu(S,P) = \mu^* \frac{S}{K_M + S + S^2/K_I} \frac{K_P}{K_P + P}\left(1 - \frac{P}{P_L}\right) \qquad 2.30$$

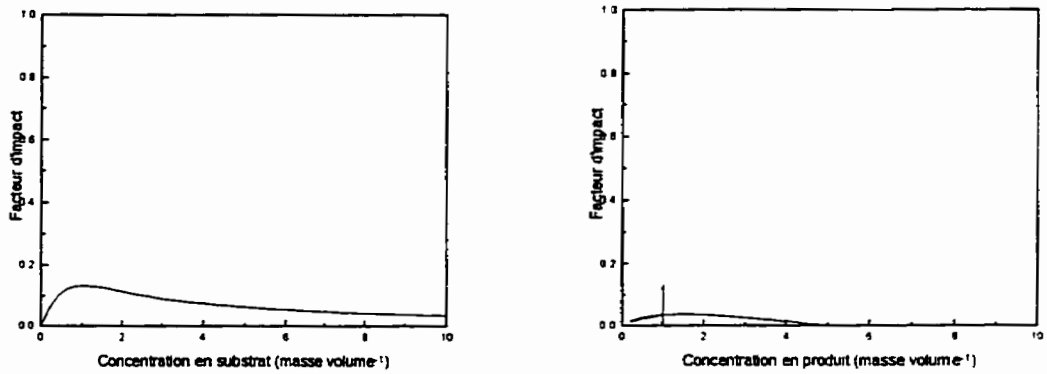


Figure 2.30 : Impact du substrat et du produit sur le taux de croissance spécifique selon Dourado et Calvet. (1983)

Moulin et coll. (1980) $$\mu(S,P) = \mu^* \exp\left(-K_1 P + K_2[S - K_3] - K_4 P(S - K_3)\right) \qquad 2.31$$

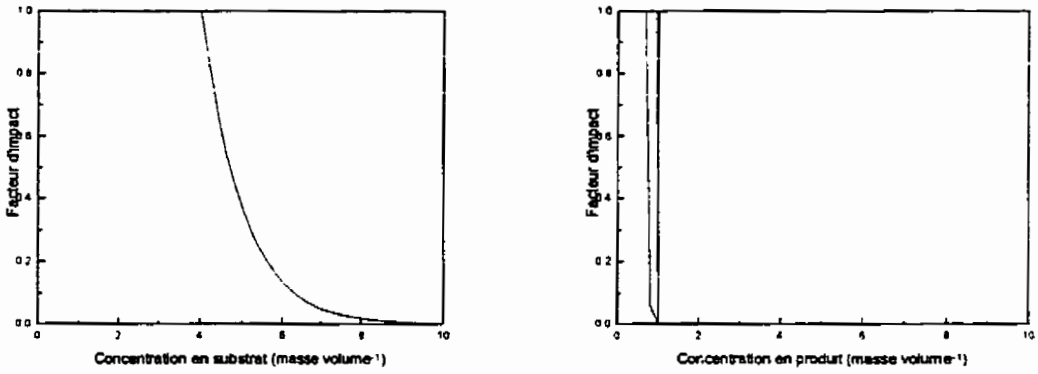


Figure 2.31 : Impact du substrat et du produit sur le taux de croissance spécifique selon Moulin et coll. (1980)

2.2 Modélisation de cultures

L'étude accrue des cultures a permis aux scientifiques d'en comprendre un peu plus sur les interactions régissant l'évolution de la biologie. C'est dans cette veine que sont apparus les premiers modèles tentant de décrire la croissance de cellules bactériennes. Une des principale qualité d'un modèle, outre sa capacité à servir de base à un processus d'optimisation, consiste à fournir de l'information scientifique. Selon la forme finale d'un modèle de croissance, il est possible d'évaluer l'impact de certains facteurs sur la croissance et d'en contrôler l'intensité.

2.2.1 Définitions des types de modèles

La forme d'un modèle lui octroie certaines particularités bien utiles selon les objectifs fixés. Les caractéristiques associées à la forme d'un modèle de croissance définies ici sont tirées de Barford et Hall (1978).

Un modèle est tout d'abord de type stochastique ou déterministique. Un modèle stochastique considère la cellule comme la base des relations métaboliques se déroulant dans le système. Ce genre de modèle considère chaque cellule individuellement face à la culture étudiée. Il est utilisé pour la description de cultures où les cellules n'agissent pas de manière uniforme présentant ainsi plusieurs fluctuations par rapport à la moyenne, soit l'ensemble de la culture.

Un modèle stochastique peut être distribué ou ségrégué. Un modèle distribué fait référence aux cellules comme étant une partie intégrante du milieu de culture alors qu'un modèle ségrégué considère l'ensemble des cellules sans tenir compte du milieu de culture. Les modèles ségrégués sont utilisés lorsque certaines composantes doivent être exprimées par rapport aux cellules elles-mêmes et non par rapport au volume de culture. Par exemple, les concentrations des composés intracellulaires sont généralement exprimées en mmol g^{-1} X. Inversement, les composantes des modèles distribués sont définies sur une base du volume total de culture.

Un modèle déterministique considère l'ensemble des cellules comme une masse uniforme qui évolue au même rythme selon les mêmes transformations métaboliques. Les phénomènes expliqués ne représentent qu'une moyenne de l'ensemble des phénomènes se déroulant à ce moment.

Un modèle déterministique peut être distribué ou ségrégué. De plus, il peut être structuré ou non. Un modèle est dit structuré lorsqu'il considère les différentes composantes des cellules. En général, ces modèles considèrent l'ensemble des cellules comme la somme de deux ou trois groupes de cellules de compositions différentes. Un modèle non-structuré considère l'ensemble des cellules de compositions uniformes.

2.2.2 Modèle publiés pour la culture de cellules végétales

Afin de se concentrer sur la cultures de cellules végétales et ses particularités, seuls les modèles décrivant la croissance de ce genre de cellules en suspension sont retenus et présentés dans cette section. L'ordre choisi pour les aborder est chronologique de manière à faire ressortir l'évolution scientifique dans ce domaine.

En 1980, Grm et Mele présentent un modèle de croissance de cellules de *Claviceps purpurea* ainsi que leur production d'alcaloïdes. Leur modèle déterministique est structuré et distribué. Ils assument que la biomasse est répartie en quatre catégories : A: la biomasse absorbant le substrat et fabriquant de nouvelles constituantes cellulaires; B: la biomasse en pleine croissance; C: la biomasse produisant des lipides et des alcaloïdes sans croissance et D: la biomasse inerte. La cinétique de croissance de la biomasse A associée au sucrose est de type Monod (1942) (équation 2.3) alors que les diverses transformations des autres biomasses sont supposées proportionnelles à la biomasse en transformation. Des constantes définissent les cinq autres taux de réaction. La consommation du sucrose est associée à la formation de la biomasse A selon une relation de proportionnalité alors que la production de métabolites secondaires est directement associée à la biomasse C selon le même type de relation.

Cette approche de la croissance et de la production des cultures de cellules végétales est très intéressante mais devient rapidement complexe à réaliser considérant le nombre d'états différents octroyés à la biomasse et les relations à établir entre chacun d'entre eux. Le modèle démontré présente quelques lacunes. Les auteurs ont observé l'influence du phosphate sur la conversion de la biomasse absorbante (A) en biomasse divisante (B). Toutefois, étant donné leur incapacité à modéliser cet impact, une relation tout à fait arbitraire est établie mentionnant qu'après 48 heures de culture, le changement d'état de la biomasse A en biomasse B s'atténue pour devenir nul. De plus, les paramètres déterminés pour l'obtention du profil d'une culture ne sont pas transférables pour la modélisation d'une autre culture. En effet, les auteurs mentionnent qu'ils ne comprennent pas pourquoi, dans certains cas, la portion totale de biomasse ainsi que la quantité d'alcaloïdes produits sont moindres alors qu'ils sont supérieurs pour d'autres cultures. L'utilité d'un tel modèle est fort réduite s'il ne peut être utilisé que pour la description d'une seule culture déjà réalisée.

En 1981, Pazoutová et coll. présentent un modèle découlant d'une étude sur la même espèce, *Claviceps purpurea*. Ils présentent un modèle accentuant l'effet du phosphate sur la croissance de la biomasse. Ce modèle moins complexe ne définit qu'une seule biomasse dont la croissance est fonction exclusivement du phosphate extracellulaire. Ce modèle est déterministique, ségrégué et non-structuré. La cinétique de croissance utilisée est propre aux auteurs, soit un trinôme à constituants linéaire, exponentiel et d'ordre 2. La consommation du phosphate extracellulaire est de forme

Monod (1942) (équation 2.3). Quant à la concentration intracellulaire en phosphate libre, elle est estimée comme la différence entre la consommation du phosphate extracellulaire et la somme des pertes causées par lyse cellulaire et par la transformation en phosphate non-libre. La production d'alcaloïdes suit la première forme de cinétique de Jerusaliwski et Engambervediev (1969), mais dans laquelle la concentration en produit est mise au carré et catalysée par la biomasse.

Cette approche de modélisation de la croissance de *Claviceps purpurea* est plus utile que la précédente d'un point de vue compréhension et optimisation des procédés. En effet, ce dernier modèle, de par sa capacité à décrire l'évolution de plus d'une culture à différentes conditions, permet d'admettre la généralité du phénomène métabolique observé et de poursuivre les recherches de modélisation en ce sens.

En 1986, Drapeau et coll. présentent une cinétique de croissance de la biomasse sèche et humide uniquement dépendante de la concentration en sucres dans le milieu de culture. La relation obtenue à la fois pour *Dioscorea deltoidea* et *Catharanthus roseus* est de type Monod (1942) (équation 2.3). Aucune équation décrivant sa consommation en sucres n'est présentée. En outre, les effets des sucres, du phosphate et de l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique sur la production de métabolites secondaires sont rapportés sans traitement mathématique. Dans ce cas, l'appellation de modèle est assez ambiguë si ce n'est les deux seules équations de

croissance de biomasses sèche et humide que l'on peut déduire. Ce modèle est déterministique, distribué et non-structuré.

Les résultats présentés ne se rapportent qu'à la cinétique de croissance de la biomasse, la même pour les deux espèces végétales en suspension. Il aurait été intéressant que les auteurs présentent cette cinétique dans un modèle de croissance réel bien formulé. En considérant les résultats rapportés, l'utilisation immédiate du modèle en étant déduit est impossible considérant que ce dernier n'est pas autonome. Effectivement, l'évolution de la variable qu'ils décrivent (la biomasse) est directement liée à une variable non décrite par le modèle (les sucres).

Quinlan (1986) rapporte pour une première fois le développement d'un modèle dont la croissance de la biomasse est directement liée aux concentrations extracellulaires en nutriments. L'expérimentation est réalisée en cuvée alimentée. Ce modèle est basé sur la cinétique de croissance logistique présentée à l'origine par Fencl (1966) mais modifiée pour tenir compte de l'effet de limitation d'un nutriment. Ce modèle a été expérimenté avec succès pour décrire la croissance en semi-continu de plusieurs espèces dont *Daucus carota*. Ce modèle est déterministique, distribué et non-structuré.

L'utilisation d'un modèle logistique ne permet une bonne estimation de la croissance de la biomasse que lorsqu'il n'y a aucun nutriment limitant. L'ajout d'un terme de limitation nutritionnelle représente déjà une amélioration. Toutefois,

l'utilisation d'une telle forme, même modifiée n'amène aucune information nouvelle et utilisable puisque la cinétique demeure basé sur la logistique qui peut être changé par la moindre variation des conditions environnementales.

En 1989, Bailey et Nicholson présentent un nouveau modèle pour les cultures de cellules de plantes. Celui-ci décrit l'évolution des biomasses sèche viable, non viable et totale, de la biomasse humide, de la synthèse du produit et de la consommation du substrat. De plus, de manière à être autonome, le modèle décrit aussi l'évolution du rapport biomasse humide/biomasse sèche et de la viabilité, fonction de ce ratio. Cette dernière relation est basée sur une fragilité supérieure au stress mécanique des plus grosses cellules. Ce modèle est déterministique, distribué et structuré. Aucune cinétique de croissance n'est spécifiée. Une valeur constante est assignée au taux spécifique de croissance.

La forme proposée par ce modèle est très intéressante du fait que la biomasse est scindée en composantes ayant différentes propriétés sans que le modèle en soit grandement compliquée comme ce fût le cas pour Grm et Mele (1980). Cependant, ce modèle démontre quelques faiblesses. Aucune donnée de concentration en substrat n'est disponible. Afin de contrer cette importante lacune, les auteurs fixent la concentration initiale en substrat à 1.0 g L^{-1}, ce qui est bien loin de la réalité, de manière à obtenir une courbe standardisée. Aucun rendement ne peut donc être calculé quant à l'utilisation du substrat. De plus, la valeur fixée étant très petite, elle ne permet

pas d'apprécier le type de cinétique de croissance en cours lors de telles cultures ce qui explique la relation linéaire obtenue avec le substrat.

Frazier (1989) présente un modèle original pour décrire la croissance de *Dioscorea deltoidea*. Sa principale hypothèse consiste à affirmer qu'un métabolite essentiel à la croissance fuit des cellules vers le milieu de culture. Cette hypothèse permet d'expliquer la phase de latence en début de culture qui serait attribuable à la perte de ce métabolite. Le taux de croissance varie selon une cinétique de Monod (1942) (équation 2.3) par rapport à ce métabolite alors que la production de ce dernier est reliée à la concentration en substrat par la même cinétique. Ce modèle est déterministique, distribué et non-structuré. Lors de l'application de ce modèle à une culture de *Dioscorea deltoidea*, Frazier pose que le sucrose est rapidement transformé en glucose et fructose à l'intérieur même de la cellule ou sur leur paroi et que l'excès de ces formes de nutriments diffuse vers le milieu. Frazier en vient à la conclusion que pour ces cellules, la principale cause de présence de la phase de latence consiste en une fuite des monosaccharides vers le milieu de culture.

De tels résultats n'ont jamais été publiés suite à cette étude. Il serait d'ailleurs surprenant qu'un tel phénomène se produise réellement puisque le glucose est directement utilisé comme source nutritionnelle pour la culture de cellules de plantes alors qu'une phase de latence non liée à la concentration utilisée est présente. En outre, aucune augmentation de la biomasse sèche n'est observée alors qu'il est

supposé y avoir pompage des nutriments extracellulaires, ce qui va à l'encontre de l'hypothèse posée. Il est important de noter que la forme octroyée à un modèle doit reposer sur des phénomènes réellement observés de manière à ne pas en tirer de conclusions biaisées par la forme choisie.

En 1990, Taticek propose un modèle de croissance pour la biomasse des cellules d'*Eschscholtzia californica*. Ce modèle décrit la consommation du substrat (carbohydrates) par l'utilisation du taux spécifique de croissance combiné à un rendement réel et à un coefficient de maintenance. Toutefois, la croissance de la biomasse est décrite à l'aide d'une équation logistique où le taux spécifique de croissance est obtenu par un lissage des données expérimentales. Ce modèle est déterministique, distribué et non-structuré.

L'utilisation d'un modèle logistique n'est pas d'un grand recours pour l'obtention de renseignements sur les phénomènes de croissance ainsi que pour l'optimisation du procédé. En effet, le profil obtenu est drastiquement modifié par une limitation nutritionnelle ou par l'ajout de nutriments étant donné qu'il ne tient pas compte des interactions avec le milieu de culture. De plus, la détermination du taux spécifique par un lissage des données expérimentales implique que le modèle n'est pas utilisable pour la description d'autres cultures comme le requière une phase d'optimisation.

Curtis et coll. (1991) présentent un modèle décrivant la croissance de la biomasse de cellules *Papaver somniferum* en limitation nutritionnelle en phosphate. La croissance linéaire de la biomasse qu'ils observent est associée à une limitation nutritionnelle en phosphate intracellulaire libre. La cinétique de croissance de la biomasse est basée sur cette concentration en phosphate intracellulaire libre selon une forme polynomiale propre aux auteurs. Le modèle est déterministique, ségrégué et non-structuré.

Le modèle développé est convenable pour les conditions de culture de cette équipe. Toutefois, l'obtention de profils linéaires n'étant pas le lot des cultures végétales, ce modèle n'est pas facilement transférable à d'autres espèces ou même simplement à d'autres systèmes de culture avec la même espèce.

Hooker et Lee (1992) rapportent un modèle développé pour décrire la croissance de cultures de *Nicotiana tabacum*. Une cinétique de Monod (1942) (équation 2.3) décrit la transformation du sucrose extracellulaire en glucose extracellulaire, la formation et la consommation du glucose, la consommation des nutriments extracellulaires autres que les carbohydrates, les variations en concentration des nutriments intracellulaires totaux ainsi que les pertes en biomasse dues à la respiration. De plus, l'évolution de composantes intermédiaires intracellulaires y est présentée ainsi que celles des composantes structurales et de la concentration en métabolites. Ce modèle est déterministique, ségrégué et structuré.

Les courbes de ce modèle décrivent les données expérimentales de la biomasse sèche, des carbohydrates, des métabolites secondaires produits et des composés phénoliques. Toutefois, ce modèle est assez complexe, ce qui oblige les auteurs à déterminer arbitrairement certains paramètres.

van Gulik et coll. (1992) présentent un modèle des cinétiques de croissance de *Catharanthus roseus* et *Nicotiana tabacum* pour des cultures en cuvée et en cuvée alimentée. La cinétique de croissance de la biomasse est associée au glucose selon une forme de Monod (1942) (équation 2.3) et considère une consommation d'énergie pour la maintenance. La consommation du glucose est aussi décrite selon une cinétique de Monod. La consommation en oxygène ainsi que la production en gaz carbonique sont modélisées selon un rendement à la croissance accompagné d'un coefficient de maintenance. Ce modèle est déterministique, distribué et non-structuré.

Les courbes obtenues par ces chercheurs sont très satisfaisantes quant au substrat pour *Catharanthus roseus* ainsi que pour le substrat et la biomasse pour *Nicotiana tabacum*. Toutefois, l'estimation des profils de respiration pour les deux espèces n'est pas aussi précise que le souhaitaient les auteurs.

En 1993, ces derniers (van Gulik et coll., 1993) reformulent leur modèle d'une façon structurée. Ce dernier décrit l'évolution de la biomasse selon quatre composés : le phosphate libre, les composés phosphorylés, les carbohydrates entreposés ainsi que la biomasse structurale. De plus, les consommations du phosphate

et des carbohydrates extracellulaires sont présentées. Les cinétiques sont de forme Monod (1942) intégrale ou légèrement modifiée. La production de gaz carbonique et la consommation d'oxygène sont modélisées. Le modèle est déterministique, distribué et structuré.

La modélisation appliquée aux résultats de cette équipe décrit bien les profils expérimentaux. Ce genre de modèle est très utile. Pas compliqué outre mesure, représentant des phénomènes réels, il fournit de l'information quant au déroulement des différentes étapes métaboliques ainsi que leur cinétique de réaction, de même qu'il permet une phase d'optimisation de la croissance de la biomasse suite à son développement.

Guardiola et coll. (1995) présentent un modèle de croissance reliant la production de métabolites secondaires à la croissance de la biomasse de cultures végétales en suspension pour *Vitis vinifera*. L'évolution de la biomasse, du substrat et du produit y est présentée en fonction de la concentration en substrat dans le milieu de culture selon une relation de Monod (1942). Le modèle est déterministique, distribué et non-structuré.

Les profils obtenus sont représentatifs des conditions expérimentales autant pour des cultures en cuvée que pour des cultures en cuvée alimentée. Cependant, afin d'obtenir de bonne estimation du reste des cultures en cuvée alimentée, le début des courbes est ignoré parce que mal estimé.

Finalement, il est intéressant de noter que Albiol et coll. (1995) ont utilisé l'approche des estimateurs neuronaux afin de développer un modèle de croissance de la biomasse de *Daucus carota* en fonction des concentrations en sucrose, en glucose ainsi qu'en fructose. Le modèle est bien sûr déterministique, distribué et non-structuré.

Cette approche leur permet, après seulement deux essais, d'obtenir des courbes suivant les données expérimentales. Toutefois, appliqué de cette manière, ce type d'estimateur ne fournit aucune information pertinente quant au comportement des cellules par rapport à ces nutriments ni quant à une possible phase d'optimisation. Cependant, il pourrait être intéressant d'utiliser de tels estimateurs pour déterminer un paramètre ou un ensemble de paramètres compris dans un modèle traditionnel dont les valeurs ne peuvent être déterminées expérimentalement. De tels estimateurs pourraient aussi être utilisés pour évaluer une variable du procédé, comme par exemple un taux de croissance ou de consommation, dont l'obtention d'un profil dans le temps permettrait d'en tirer de l'information sur les phénomènes l'affectant.

En somme, tous les modèles présentés dans la littérature ne sont formulés qu'en fonction de la biomasse alors qu'aucun d'entre eux ne prédit l'évolution de la concentration cellulaire. Ceci représente donc un manque quant à une description adéquate de l'évolution de cultures de cellules végétales. Cette lacune scientifique doit donc être remédiée de manière à obtenir une description convenable des phénomènes

de croissance de ce type de cellules en suspension et en optimiser la croissance cellulaire.

2.3 Division versus expansion cellulaire

Jusqu'à ce jour, la croissance de suspensions de cellules végétales est caractérisée et modélisée par l'augmentation de sa concentration en biomasse. Ce paramètre peut être suivi de deux façons différentes : la biomasse humide, pesée immédiatement après filtration à la suite d'un échantillonnage, ainsi que la biomasse sèche mesurée suite à un séchage complet de la biomasse humide. Cette dernière est plus appropriée pour effectuer un suivi de croissance car elle exclue la quantité d'eau emprisonnée dans les cellules.

Toutefois, comme mentionné dans la problématique, le suivi de la biomasse ne peut permettre d'envisager l'obtention d'une culture à production de métabolites secondaires optimale. En effet, rien dans la courbe de croissance de la biomasse ne permet d'identifier le plafonnement en respiration, meilleur moment pour l'élicitation. Afin de contrer cette difficulté, une nouvelle approche de suivi de culture est développé.

Chez les cellules végétales, la croissance cellulaire s'effectue selon le schème général illustré à la figure 2.32.A. La cellule mère prend de l'expansion. Suite au scindement du noyau accompagné de la réplication de l'ADN, un phragmoplaste se forme au centre de la cellule et amorce l'étape de la division cellulaire. Ce

phragmoplaste s'étend alors d'une paroi à l'autre de la cellule pour former la plaque cellulaire. Dès lors, la cellule mère est divisée en deux cellules filles qui à leur tour effectueront le même processus. En comparant les profils de croissance de la biomasse sèche (B) et de la concentration cellulaire (C), il apparaît évident que ces deux paramètres sont incomplets en soit, mais complémentaires pour décrire adéquatement la croissance de suspensions de cellules végétales. Afin d'obtenir une meilleure caractérisation des phénomènes se déroulant dans les suspensions de cellules végétales, la biomasse sèche ainsi que la concentration cellulaire seront utilisées pour décrire la croissance cellulaire.

Pépin (1996) et Quinlan (1986) sont d'ailleurs les seuls à faire référence à ce mécanisme de division cellulaire lors de cultures de cellules végétales. Selon Pépin (1996), la concentration cellulaire permet de mieux caractériser la croissance de ses cultures que la biomasse. Toutefois, dans le cas de Quinlan, seule la concentration cellulaire est utilisée, ne se référant nullement à l'expansion de la biomasse. De plus, les quantités de cellules présentées sont très peu élevées (0.001 à 0.03 x 10^9 ¢ L^{-1}) et les techniques de compte cellulaire ne sont pas rapportées. Ceci ne laisse aucunement présager la possibilité d'utiliser ces résultats pour quelque fin que ce soit.

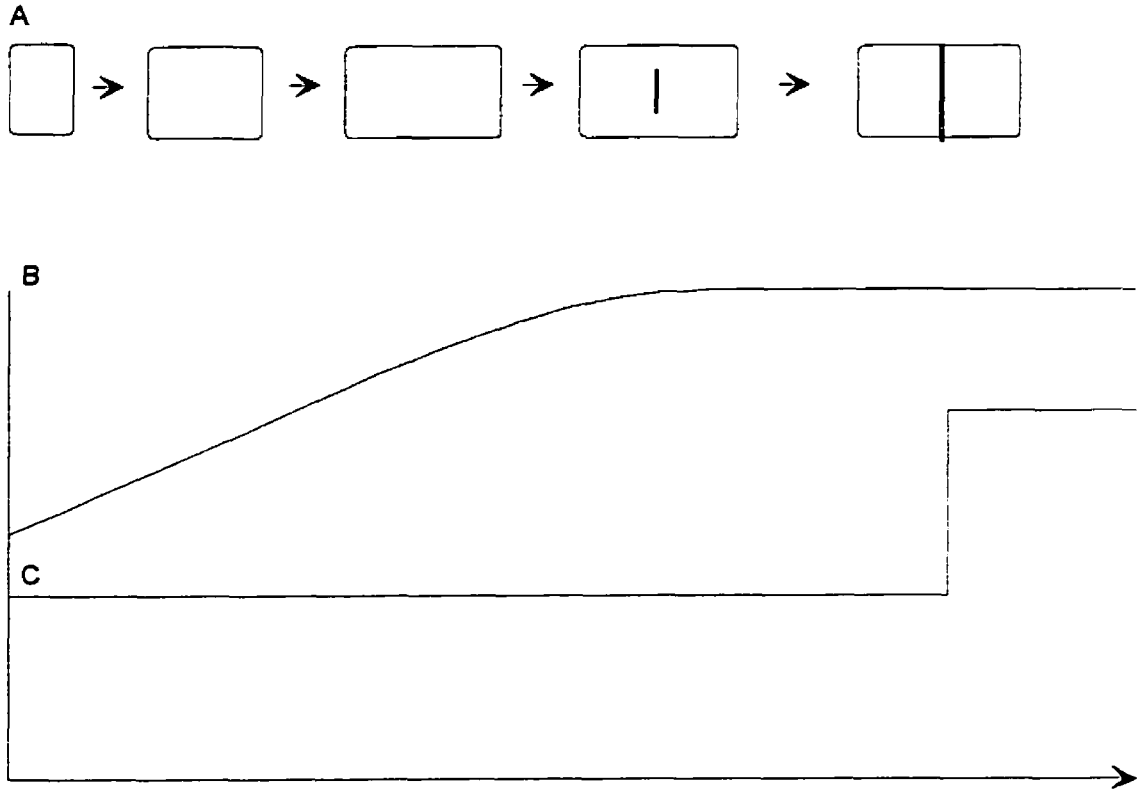


Figure 2.32 **Processus général de division cellulaire chez les cellules végétales.** A. Représentation adaptée de Kleinsmith (1988). B. Profil de croissance de la biomasse sèche lors de la division cellulaire. C. Profil de croissance de la concentration cellulaire lors de la division cellulaire.

2.4 Facteurs de croissance

Beaucoup de composés, y compris des nutriments inorganiques, ont des effets importants sur la croissance végétale (Alberts et coll., 1992). Parmi ceux-ci, les régulateurs de croissance végétale, petites molécules qui traversent facilement la paroi cellulaire, agissent spécifiquement sur cette capacité. Ces derniers sont utilisés par les

plantes afin de coordonner certaines activités cellulaires, orienter leur développement de même que répondre à des stimuli environnementaux. Ils se classent en cinq catégories (Alberts et coll., 1992), soient les auxines, les gibbérellines, les cytokinines, l'acide abscissique et l'éthylène.

Dans le cas de cultures de cellules végétales en suspension, deux de ces régulateurs représentent un intérêt particulier : les auxines et les cytokinines. Les auxines entre autres fonctions, favorisent le grossissement et l'élongation cellulaire. L'auxine utilisée pour les cultures d'*Eschscholtzia californica* est synthétique, l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D). Les cytokinines favorisent plutôt la division cellulaire. Ce type d'hormone est généralement primordiale afin de soutenir la prolifération cellulaire.

Dans certaines conditions où les divers régulateurs de croissance sont accessibles, la disponibilité en nutriments peut devenir limitante. De plus, dans quelques cas, la nature même du nutriment utilisé peut avoir une incidence sur le taux de croissance cellulaire du fait que la voie métabolique requise diffère et peut être plus longue à se réaliser et plus énergivore. Par exemple, l'ion ammonium est directement fixé à des sites glutaminiques alors que l'ion nitrate doit tout d'abord être réduit. C'est dans l'optique d'un impact nutritionnel considérable que l'étude de la croissance de cellules végétales en suspension est réalisée. À titre d'exemple, Pépin (1996) a

déterminé que l'ajout d'ammoniaque à des cultures de *Vitis vinifera* permet de prolonger la période de division cellulaire.

2.5 Maximalisation de la croissance

En ce qui a trait à la maximalisation de la croissance de cellules végétales, aucune publication traitant principalement de ce sujet et de techniques utilisées pour y parvenir n'a été recensée.

3 MATÉRIEL ET MÉTHODES

3.1 Lignée cellulaire et maintien

Les cellules végétales utilisées dans le cadre de cette étude sont de l'espèce *Eschscholtzia californica.* La lignée utilisée (EC6) a été développée par le Dr. Robert Williams du Centre de recherche en ingénierie des bioprocédés BIOPRO de l'École Polytechnique de Montréal. L'utilisation de cette lignée qui date de plus de 10 ans permet de faciliter la reproductibilité des résultats (Curtis et coll., 1991) ce qui est primordial au succès de l'étape de modélisation de la croissance.

Les suspensions cellulaires sont cultivées dans les flacons de culture de 500 ml contenant 200 ml de suspension au moyen d'un milieu nutritionnel B5 standard (Gamborg et coll., 1968) présenté à l'annexe A auquel sont ajouté 0.2 mg L^{-1} d'acide 2,4-dichlorophenoxyacétique (2,4-D), 0.1 mg L^{-1} de kinétine et 30 g L^{-1} de sucrose. Le pH est ajusté à 5.5 à l'aide d'une solution aqueuse de KOH à une concentration de 1 N avant une stérilisation de 20 minutes à 121 °C et 1 bar.

Les sous-cultures sont réalisées périodiquement (tous les 5 à 10 jours) lorsque le volume de cellules sédimentées est de 80 à 90 %. La proportion de l'inoculum par rapport au volume total de sous-culture varie de 20 à 35 % selon la croissance des cultures. Les flacons sont agités à 120 rpm à l'aide d'un agitateur orbital avec une lumière continuelle et à température contrôlée de 26 ± 1°C.

Suite à une première période de croissance variant entre 48 et 72 heures selon l'importance de la croissance, des sels d'ammonium et de phosphate, $(NH_4)_2SO_4$ et $(NH_4)_2HPO_4$, sont ajoutés de manière à ramener la concentration de ces ions à 20 et 2 mmol L^{-1} respectivement.

3.2 Culture en bioréacteur

Deux réacteurs opérés de manière similaire sont utilisés dans le cadre de ce projet. Le premier possède un volume effectif moyen de 5 L et le second à un volume nominal de 2 L.

3.2.1 Bioréacteur de 5 L

Le bioréacteur de 5 L possède une hélice à double rubans hélicoïdaux afin d'assurer une agitation efficace à faible taux de cisaillement pour les cellules. La compagnie Bioexpert inc. (Québec, Canada) a déterminé la configuration de l'hélice et des chicanes de surface selon les dimensions du réacteur de 11 L originalement conçu par Jolicoeur et coll. (1992). Ce bioréacteur (figure 3.1) est équipé de sondes de mesure de la température, de la conductivité, du pH et d'oxygène dissous. La sortie des gaz est reliée à un moniteur infrarouge pour la mesure de la concentration de gaz carbonique. L'agitation de la suspension est réalisée à l'aide d'un moteur de 0.5 hp à vitesse variable. Un tachymètre relié à l'arbre de transmission permet un contrôle de cette vitesse d'agitation.

Le bioréacteur possède des ports d'échantillonnage, d'inoculation ainsi qu'un système d'alimentation en nutriments et en milieu. Les gaz d'alimentation sont stérilisés par pénétration à l'aide de lits denses de laine de verre alors qu'un possible retour par les gaz de sortie est stérilisé par interception à l'aide de filtres stériles de 0.45 µm (Bacterial air vent, Gelman Sciences).

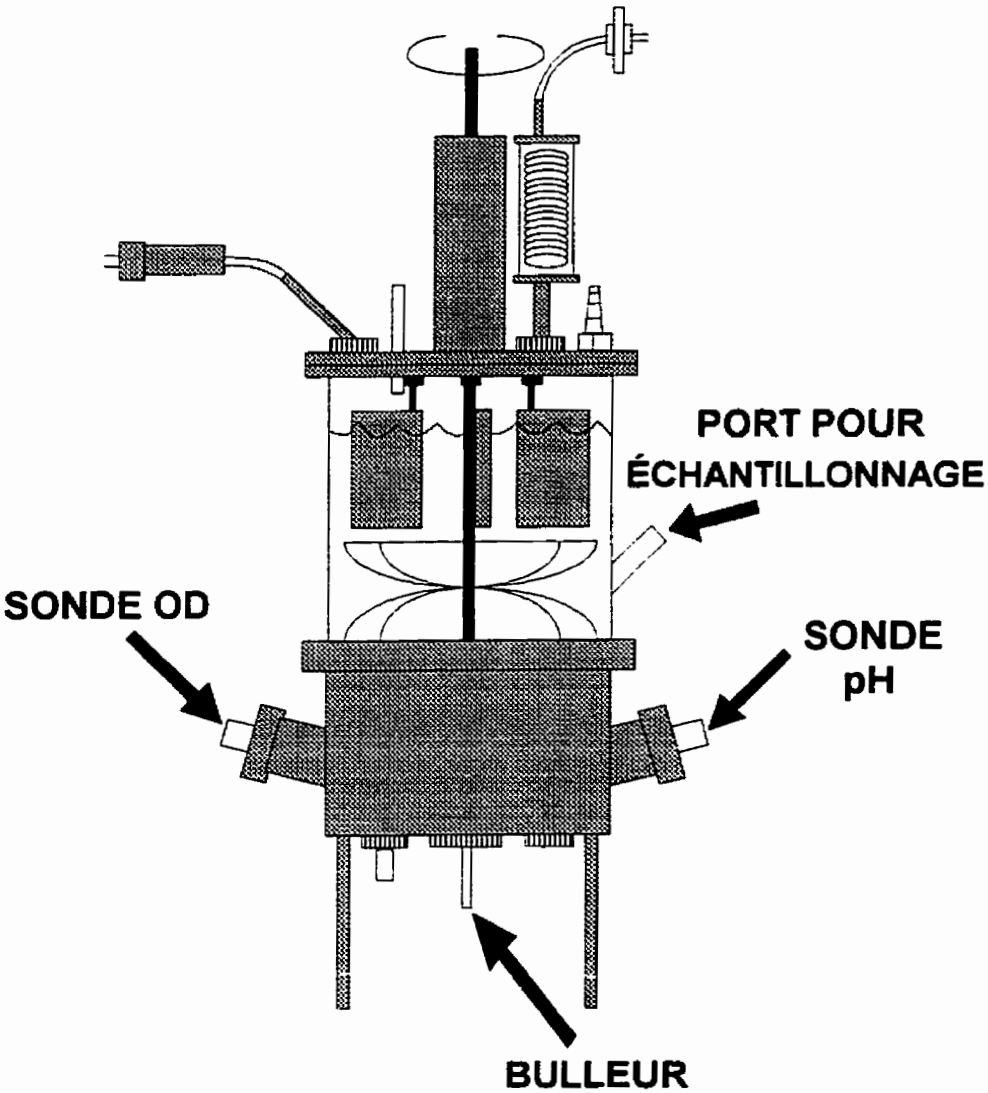


Figure 3.1 : **Bioréacteur de 5 L à double rubans hélicoïdaux.** Adapté de Aubry (1995)

3.2.2 Bioréacteur de 2 L

Le bioréacteur de 2 L est de configuration similaire à celles du 5 et 11 L (Jolicoeur et coll., 1992). Il est composé d'un réservoir en verre sur lequel repose un

couvercle en acier inoxydable (SS-316) usiné et fixé par l'utilisation de brides et d'un joint caoutchouté. L'agitation est réalisée par une hélice à doubles rubans hélicoïdaux ainsi que par des chicanes de surface.

Ce bioréacteur (figure 3.2) est équipé de sondes permettant un suivi en continu de la température, de la conductivité, du pH et de l'oxygène dissous. La sortie des gaz est reliée au même moniteur à infrarouge mentionné précédemment. L'agitation de la suspension est assurée par un moteur (Stir-pak®, modèle 4554-10, Cole Parmer) dont la vitesse est ajustée manuellement et mesurée périodiquement à l'aide d'un tachymètre portable (modèle 20904-010, VWR). L'ensemble de l'instrumentation est relié au système de Bioexpert (Québec, Canada).

Ce bioréacteur possède aussi des ports d'échantillonnage, d'inoculation, d'alimentation en milieu et nutriments en plus d'être relié à des réservoirs de milieu et de nutriments ainsi qu'à un flacon d'inoculation. Les même conditions de stérilité sont utilisées pour ce réacteur à l'exception des gaz d'alimentation qui sont aussi stérilisés par interception.

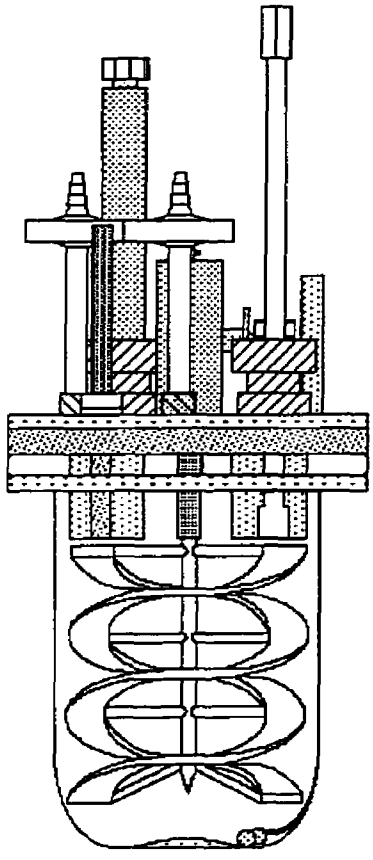


Figure 3.2 : **Bioréacteur de 2 L à double rubans hélicoïdaux.** Adapté de Sirois (1994)

3.2.3 Suivi et contrôle

La température est suivie en continu à l'aide d'une sonde à résistance électrothermique (RTD) collée à la paroi extérieure du bioréacteur. Le maintien de la température est assuré par un contrôle de la température de la pièce entière où se trouve la culture de cellules végétales à 26 ± 1 °C.

La conductivité de certaines cultures est mesurée à l'aide d'une sonde de fabrication artisanale permettant un suivi en continu. Elle est composée de deux tiges d'acier inoxydable (SS-316) de 3 mm de diamètre coincées par pression dans une gaine de Téflon©. La résistance entre les tiges distantes de 2.5 mm est mesurée à l'aide d'un ohmmètre (carte multi, Bioexpert inc., Québec, Canada). La calibration de cette sonde est faite à partir de solutions standards de NaCl étalonnées à l'aide d'un conductimètre portable pré-calibré (Oakton).

Le potentiel hydrogène (pH) de la culture est aussi suivi en ligne, grâce à une sonde stérilisable pré-pressurisée (Ingold, Combined pH electrode). Elle est calibrée à l'aide de solutions étalons à pH de 4.00 et 7.00 (Fischer Scientific) avant la stérilisation. La dérive de calibration est d'environ $1 \times 10^{0.01}$ H^+ d^{-1} avec un temps de réponse approximatif de 2 min. (Aubry, 1995).

La concentration en oxygène dissous des cultures est mesurée à l'aide d'une sonde polarographique stérilisable (Ingold). Suite à une période de polarisation de 24 heures, la calibration de cette sonde est réalisée après stérilisation dans le milieu de culture saturé à l'azote (0 % d'oxygène dissous) et à l'air (100 % d'oxygène dissous). La dérive maximum de la calibration est inférieure à 0.1 % d^{-1}.

La concentration en gaz carbonique dans les gaz de sortie est analysée grâce à un moniteur à infrarouge de haute précision (Modèle 870, Rosemount Analytical) d'une capacité de 0 à 10 %. La calibration est réalisée à l'aide d'azote

(0 %) et de gaz certifiés à 1.21 et 3.00 % en CO_2 (Air-Liquid). L'utilisation d'une vanne solénoïde trois voies commandée pour chaque réacteur permet une lecture des gaz de sortie de chacun, tour à tour pendant 15 minutes. Une période de 3 minutes au début de la période d'analyse de 15 minutes où aucune acquisition n'est prise est nécessaire afin de purger les conduites des gaz du réacteur précédemment analysé. Ce temps est largement suffisant puisque le temps de purge mesuré est inférieur à 1 minute.

Afin de fournir l'oxygène dissous nécessaire à la croissance des cellules végétales, un système de contrôle des gaz est associé au réacteur. Ce système a pour fonction le mélange d'air et d'oxygène de manière à faire varier la pression partielle d'oxygène dans les gaz d'alimentation. Le contrôle de la pression partielle est réalisée par la manipulation du débitmètre-contrôleur (FC-260, Tylan General) placé sur le conduit d'oxygène pour un débit total constant des gaz (FC-260, Tylan General). Le débit d'air varie s'ajuste de manière à combler la différence entre le débit total et le débit d'oxygène. L'alimentation totale en gaz est ensuite scindée en deux, aération de bullage et de surface, par le contrôle du débit de bullage (FC-260, Tylan General) coupé complètement, si nécessaire, à l'aide d'une vanne solénoïde.

L'ensemble de l'instrumentation servant à l'acquisition de données et au contrôle de la culture est relié à un système d'acquisition de données et de contrôle Bioexpert. La période d'échantillonnage digitale imposée au système est de 10 s de

manière à accroître les performances de contrôle et d'estimation des différents algorithmes. Ceci permet au système digital de s'approcher d'un système de contrôle et d'estimation analogique.

3.3 Conditions d'opération

L'inoculum des cultures est préparé de la même manière que sont faites les sous-cultures lors du maintien de la lignée cellulaire. Lors de l'inoculation, quelques flacons (3 et 7 pour les réacteurs de 2 et 5 L respectivement) contenant environ 200 ml de suspension cellulaire sont mélangés pour fournir la quantité totale d'inoculum nécessaire à la culture en bioréacteur (environ 25 % du volume total de culture).

Des volumes de 2.1 et 6.4 L de milieu sont préparé pour les cultures effectuées dans les réacteurs de 2 et 5 L respectivement. Le sucrose est stérilisé (20 min., 121 °C, 1 bar) dans une partie de l'eau requise pour le milieu (300 g L^{-1}, 400 ml par flacon d'un litre) alors que les régulateurs de croissance (0.2 g L^{-1} 2,4-D, 0.1 g L^{-1} kinétine) et les sels dissous dans le reste de l'eau sont stérilisés par filtration (Micro Culture Capsule 0.2 µm, Gelman Sciences) suite à l'ajustement du pH à 5.5. Les deux solutions stériles sont alors mélangées dans le réacteur.

La vitesse d'agitation est de 60 rpm, ce qui correspond à un temps de mélange d'environ 20 s et un taux de cisaillement de 30 s^{-1} (Aubry, 1995) dans le réacteur de 5 L. L'aération de la culture est assurée par une arrivée des gaz d'alimentation en surface ainsi qu'une arrivée par le fond, au centre, permettant de

meilleures conditions d'aération se reflétant par une augmentation de 6 fois du coefficient de transfert d'oxygène. Dans le bioréacteur de 2 L (60 rpm), il passe de 0.8 à 5 h^{-1} avec de l'eau (Sirois, 1994) alors qu'il passe de 2.7 à 16 h^{-1} dans le réacteur de 5 L (Aubry, 1995). Le débit d'aération varie entre 50 à 500 ml min^{-1} (réacteur de 2 L) et atteint 2000 ml min^{-1} dans le réacteur de 5L selon la demande de la fenêtre de plage permise présentée au chapitre 5.

3.3.1 Cultures en cuvée

La composition du milieu des cultures en cuvée est la même que celle utilisée pour le maintien de la lignée cellulaire (section 3.1) à l'exception de la concentration en sucrose qui atteint quelques fois 30 g L^{-1}. Cette variation dans la concentration en hydrates de carbone sert à diminuer la formation de mousse en début de culture ou à accroître la période de croissance en biomasse. Pour quelques cultures, la concentration initiale en nitrate est doublée de manière à vérifier son effet sur la croissance cellulaire.

3.3.2 Cultures en cuvée alimentée

Trois types de cuvées alimentées sont réalisées. Dans une première série, la composition initiale du milieu de culture est identique à celle des cultures opérées en cuvée. Après 48 à 72 heures, des sels d'ammoniaque et de phosphate, $(NH_4)_2SO_4$ et $(NH_4)_2HPO_4$, sont ajoutés de manière à augmenter la concentration de ces ions à des

concentrations variables d'une culture à l'autre pour identifier l'impact de chacun sur la croissance cellulaire.

Lors de la seconde série, la concentration d'un nutriment cible est réduite au minimum de subsistance pour les premières 24 heures dans la composition du milieu initial de culture. Par la suite, un ajout de ce nutriment concentré est effectué à chaque jour. Ce type d'expérimentation permet d'évaluer l'impact de ce nutriment sur la croissance de la biomasse ou de la concentration cellulaire. Cette stratégie d'alimentation est appliquée 1 fois au phosphate et 2 fois au nitrate et à l'ion ammonium.

Finalement, lors de la culture d'optimisation de la croissance cellulaire, une stratégie d'alimentation conjointe sur quatre nutriments est expérimentée, soit le sucrose, le phosphate, le nitrate et l'ammoniaque. Les concentrations initiales de ces nutriments sont donc minimales et suffisantes pour soutenir la croissance pendant 24 heures.

3.4 Cultures témoins en flacon

Lors des cultures en cuvée en bioréacteur, des cultures en flacons sont réalisées afin de comparer les résultats avec ceux obtenus en bioréacteur de manière à déceler toute anomalie liée aux cellules. Les flacons utilisés sont de 500 ml contenant 200 ml de suspension cellulaire. Les mêmes conditions d'inoculation et de préparation de milieu sont respectées.

Lors des cultures opérées en cuvée alimentée, une telle comparaison est impossible puisque les ajouts en nutriments dans les bioréacteurs sont effectués selon les calculs fournis par le modèle de croissance préliminaire. Sachant que ce modèle (chapitre 6) est développé pour la culture en bioréacteur et qu'il ne peut prédire la consommation des nutriments pour les cultures en flacon, il est impossible de calculer les quantités d'ajouts en nutriments pour les flacons. De plus, l'augmentation de la respiration cellulaire provoquée par de tels ajouts (chapitre 7) provoquerait une limitation nutritionnelle en oxygène dissous selon le transfert disponible (Aubry, 1995).

3.5 Échantillonnage et suivi

La période moyenne de culture pendant laquelle un échantillonnage est réalisé est de 15 jours et varie de 8 à 20 jours. Afin du suivre la croissance des cellules et la consommation des nutriments, des échantillons sont prélevé à des fréquences de 1 par 2 jours à 2 par jour.

Le pH (pHmeter, 805 MP, Fischer Scientific), la conductivité (Portable conductivity probe, Oakton), le volume de biomasse sédimentée pendant 30 min. (SCV, Settled Cells Volume) sont alors mesurés. L'échantillon est ensuite filtré (Glass fiber filter, Gelman Science) et le milieu de culture recueilli est congelé (-20°C) pour analyse ultérieure, alors que la biomasse humide récoltée est pesée, séchée (80°C, 24 h) puis pesée à nouveau. Ces opérations permettent de mesurer les concentrations en biomasse humide et sèche ainsi que le rapport poids humide/poids

sec des échantillons. La procédure de dénombrement cellulaire est présentée à l'annexe B de l'appendice.

3.6 Analytique

Le milieu recueilli précédemment est analysé par chromatographie en milieu liquide de manière à en déterminer les concentrations en hydrates de carbone et en ions.

3.6.1 Hydrates de carbones

La concentration en sucrose, glucose et fructose du milieu de culture est mesurée à l'aide d'un chromatographe en phase liquide à haute performance (HPLC) comportant une pompe volumétrique (6000A, Waters), un injecteur automatique (231/401, Gilson), un réfractomètre (132, Gilson), un élément chauffant (7980, Man-Tech) et un logiciel d'acquisition des données (Gilson). La séparation des hydrates de carbone est réalisée par une colonne de séparation (HPX87C, Biorad©) maintenue à température constante (80 °C). Le volume de milieu injecté est de 20 µl et la phase mobile (eau distillée filtrée) est alimentée à un débit de 1.0 ml min^{-1}.

3.6.2 Macronutriments inorganiques

Afin d'analyser la concentration des ions dans le milieu de culture recueilli après filtration de l'échantillon, un chromatographe en phase liquide à haute performance (HPLC) est aussi utilisé avec un détecteur électrochimique opéré en mode

conductivité (Dionex). L'appareil comprend une pompe et un injecteur automatique (Dionex). Le logiciel Dionex A1-450 sert au contrôle du HPLC ainsi qu'à l'acquisition des données.

Les anions sont séparés par une colonne 4 x 250 mm (IONPAC AS4A-SC, Dionex) et par un suppresseur anionique (ASRS-1, Dionex). La phase mobile est une solution aqueuse de bicarbonate (1.8 mmol L^{-1} Na_2CO_3 et 1.7 mmol L^{-1} $NaHCO_3$) alimentée à 2.0 ml min^{-1}. Quant aux cations, ils sont séparés par une colonne 4 x 250 mm (IONPAC CS-12, Dionex) et par un suppresseur cationique (CSRS-1, Dionex). La phase mobile est une solution aqueuse d'acide méthanosulfonique (20 mmol L^{-1}) alimentée à 1.0 ml min^{-1}.

Les concentrations en hydrates de carbone ainsi qu'en ions correspondent à la phase liquide de l'échantillon. Elles doivent donc être corrigées de manière à représenter la concentration en nutriments rapportée au volume de culture global. van Gulik (1992) suggère une correction des concentrations obtenues en fonction du volume de cellules centrifugées (PCV, Packed Cells Volume) selon :

$$n_{cor} = n(1-0.5PCV) \qquad 3.1$$

Il est déterminé en laboratoire (résultats non-publiés) que la relation entre le volume de cellules sédimentées (SCV) et le volume de cellules centrifugées (PCV) est :

$$PCV = 0.76SCV \qquad 3.2$$

En comparant les équations 3.2 et 3.3, nous obtenons l'équation 3.4 qui sert à corriger toutes les concentrations en nutriments obtenues des analyses avant leur utilisation pour interprétation et modélisation :

$$n_{cor} = n(1 - 0.38SCV) \qquad 3.3$$

4. COMMANDE D'OXYGÈNE DISSOUS

Une faible concentration d'oxygène dissous ralenti la croissance cellulaire. Inversement, une concentration trop élevée en oxygène peut aussi provoquer un ralentissement de la croissance cellulaire (Pépin, 1996). De plus, des fluctuations de cette concentration entraînent une diminution de la concentration cellulaire. Il est donc primordial de bien contrôler l'apport en oxygène à la culture de manière à permettre un accroissement du taux de croissance et de maintenir le niveau d'oxygène dissous à la concentration désirée sans perturbations drastiques.

Afin de rencontrer ces objectifs de contrôle, un nouveau type de contrôleur est conçu dans le cadre de cette étude. Il s'agît de contrôleur adaptatif d'oxygène dissous, basé sur la mesure du taux de respiration cellulaire. Ce contrôleur tout à fait novateur permet, pour une première fois, d'obtenir un meilleur contrôle de l'oxygène dissous que le permettaient les contrôleurs utilisés précédemment, combiné à une estimation valable de l'évolution du coefficient de transfert d'oxygène dans le milieu de culture (k_La), possibilité qui n'a jamais été obtenue précédemment pour le contrôle d'oxygène dissous. Afin d'en apprécier les avantages, une comparaison est effectuée entre ce nouveau contrôleur et un contrôleur standard PI (Aubry, 1995), ainsi qu'un contrôleur adaptatif direct standard.

4.1 Développement des contrôleurs

Tout d'abord, mentionnons que le transfert d'oxygène du gaz d'alimentation aux cellules consiste en une procédure comprenant plusieurs étapes dont le transfert du gaz d'alimentation au milieu de culture est l'étape limitante. Le modèle théorique reliant la concentration d'oxygène dissous aux taux de transfert d'oxygène et de respiration est représentée à l'équation 4.1.

$$\frac{dC}{dt} = k_L a(C^* - C) - OUR \qquad 4.1$$

4.1.1 Contrôleur PI

Afin de minimiser l'effet négatif de hauts taux d'aération (Archambault, 1991; Hegarty et coll., 1986; Kamen et coll., 1992; Jolicoeur et coll., 1992) et de vitesses d'agitation élevées (Mano et coll., 1990) sur les cellules végétales fragiles au cisaillement (Meijer et coll., 1993), la stratégie de contrôle adoptée consiste à manipuler la concentration en oxygène du gaz d'alimentation. Une modification de cette concentration se répercute sur le modèle par un changement de la concentration d'oxygène dans le film limitant à l'équilibre (C*) comme le montre l'équation 4.2

$$C^*_{gaz} = C^*_{air} \frac{y_{gaz}}{y_{air}} \qquad 4.2$$

où C^*_{air} représente la concentration à l'équilibre atteinte dans le film liquide lorsque le gaz d'alimentation est de l'air, y_{gaz} et y_{air} représentent respectivement la fraction volumique d'oxygène dans le gaz d'alimentation et dans l'air.

La conception du contrôleur conventionnel (Aubry, 1995) est faite selon l'équation de vélocité d'un contrôleur PID (Seborg et coll., 1989) afin d'éliminer l'effet de *reset windup* et la nécessité d'initialiser le contrôleur.

$$p_n = \overline{p} + K_c\left[e_n + \frac{\Delta t}{\tau_I}\sum_{k=1}^{n} e_k - \frac{\tau_D}{\Delta t}(b_n - b_{n-1})\right] \qquad 4.3$$

La partie dérivative de ce contrôleur est ici enlevée de manière à éliminer l'effet d'amplification du bruit de lecture de la sonde à oxygène dissous. De cette manière, un meilleur contrôle peut être obtenu. La technique de synthèse directe est utilisée afin de déterminer les paramètres du contrôleur (Morari et Zafiriou, 1989). Cette méthode permet l'obtention de paramètres conservateurs utilisables malgré la dynamique variable de la culture dans le temps. Les valeurs utilisées sont de 0.7 et 67 min. pour le gain et la constante intégrale de temps respectivement.

4.1.2 Contrôleur adaptatif direct

La dynamique des cultures de cellules de plantes change dans le temps selon la concentration en biomasse, la viscosité, les taux de transfert d'oxygène et de respiration ainsi que d'autres paramètres. De plus, le modèle théorique utilisé pour le contrôle de la concentration d'oxygène dissous (équation 4.1) est non-linéaire. Afin de contrer les problèmes occasionnés par ces facteurs, une loi de contrôle adaptative linéarisante (Bastin et Dochain, 1990) est conçue. Ce type de contrôleur appliqué au contrôle de l'oxygène dissous a d'ailleurs déjà été utilisé par quelques auteurs récemment (Smith et Davidson, 1990; Lee et coll., 1991; Oeggerli et coll., 1995).

La première étape est de définir une relation entre les variables d'entrée et de sortie du système, y_{gaz} et C. Ceci est réalisable en comparant les équations 4.1 et 4.2.

$$\frac{dC}{dt} = k_L a\left[\left(C^*_{air}\frac{y_{gaz}}{y_{air}}\right) - C\right] - OUR \qquad 4.4$$

La seconde étape consiste à sélectionner un modèle linéaire stable de référence pour le suivi de l'erreur. Le modèle utilisé est le suivant.

$$\frac{d(C_{PC} - C)}{dt} + \lambda_c(C_{PC} - C) = 0 \qquad 4.5$$

Considérant que le point de consigne ne change pas tout au long de la culture, l'équation précédente peut être réécrite de la manière suivante.

$$\frac{dC}{dt} = \lambda_c(C_{PC} - C) \qquad 4.6$$

La loi de contrôle est finalement obtenue en comparant les équations 4.4 et 4.6 tout en isolant la variable manipulée, la concentration d'oxygène du gaz d'entrée (y_{gaz}).

$$y_{gaz} = \left(\frac{y_{air}}{C^*_{air}}\right)\left[\left(\frac{\lambda_c(C_{PC} - C) + OUR}{k_L a}\right) + C\right] \qquad 4.7$$

Deux paramètres évolutifs contenus dans cette loi de contrôle sont inconnus en continu, le coefficient de transfert d'oxygène (k_La) et le taux de respiration (OUR). Ils doivent donc être estimés de manière à linéariser la loi de contrôle. Deux estimateurs directs de paramètres basés sur l'erreur de contrôle (Bastin et Dochain, 1990) sont alors conçus. La formule suivante représente la formule générale de ce type d'estimateur :

$$\frac{d\theta}{dt} = -\Gamma\phi(F,Q)(Y_{PC} - Y) \qquad 4.8$$

où θ est la matrice des paramètres estimés, Γ la matrice des gains, $\phi(F, Q)$ le régresseur linéaire, Y et Y_{PC} la variable contrôlée et son point de consigne. Les estimations ainsi

obtenues par cette équation remplacent chacun des paramètres dans la loi de contrôle. Finalement, l'algorithme du contrôleur adaptatif direct est le suivant :

$$y_{gaz} = \left(\frac{y_{air}}{C^*_{air}}\right)\left[\left(\frac{\lambda_c(C_{PC} - C) + \overline{OUR}}{\overline{k_L a}}\right) + C\right] \qquad 4.9$$

$$\overline{k_L a}_t = -\gamma_1 T\left[\left(C^*_{air}\frac{y_{gaz}}{y_{air}}\right) - C\right](C_{PC} - C)_{t-1} + \overline{k_L a}_{t-1} \qquad 4.10$$

$$\overline{OUR}_t = \gamma_2 T(C_{PC} - C)_{t-1} + \overline{OUR}_{t-1} \qquad 4.11$$

où T représente la période échantillonnage des données alors que les indices t et t-1 font référence au temps présent et au temps correspondant à l'échantillonnage précédent.

En travaillant avec des cultures dont la dynamique change considérablement tout au long de la culture, le taux d'aération peut devenir limitant au transfert d'oxygène ou trop élevé pour permettre un bon contrôle. Afin de contrer ce problème un contrôle de plage permise est ici ajouté à l'algorithme obtenu précédemment.

La concentration d'oxygène dans le gaz d'alimentation est mesurée et une moyenne est faite sur 1 heure. Le débit d'aération est alors réajusté à chaque heure, au besoin, selon l'algorithme de contrôle de plage permise suivant :

si (y_{gaz}<0.3) et (Q_b>0), $Q_b(t)=Q_b(t-1)-0.6\ L\ h^{-1}$ 4.12.a

si (y_{gaz}<0.3) et (Q_b=0), $Q_h(t)=Q_h(t-1)-0.6\ L\ h^{-1}$ 4.12.b

si (y_{gaz}>0.9) et (Q_h>0), $Q_h(t)=Q_h(t-1)-0.6\ L\ h^{-1}$ 4.12.c

$Q_b(t)=Q_b(t-1)+0.6\ L\ h^{-1}$ 4.12.d

si (y_{gaz}>0.9) et (Q_h=0), $Q_b(t)=Q_b(t-1)+0.6\ L\ h^{-1}$ 4.12.e

autrement $Q_b(t)=Q_b(t-1)$ 4.12.f

$Q_h(t)=Q_h(t-1)$ 4.12.g

4.1.3 Contrôleur adaptatif basé sur le taux de respiration

Ce type de contrôleur, pleinement conçu et développé lors de cette étude, est basé sur les mêmes hypothèses de fonctionnement que le précédent, à l'exception de l'estimation des paramètres inconnus en-ligne. Dans ce cas, la conception de ce contrôleur assume que si le nombre d'équations reliant les paramètres inconnus aux paramètres connus est inférieur au nombre de paramètres inconnus, une convergence des estimateurs vers des valeurs réelles est impossible. En conséquence, le même modèle théorique ainsi que la même loi de contrôle, légèrement modifiée toutefois, sont utilisés pour ce contrôleur à l'exception de la partie consacrée à l'estimation des paramètres.

Considérant qu'une seule équation est disponible pour relier la variable manipulée à la variable contrôlée, le nombre de paramètres inconnus doit être réduit de deux à un seul selon l'hypothèse posée précédemment. Pour ce faire, le taux de respiration est considéré comme quasi-constant pour une période de quelques heures. Cette hypothèse est admissible puisque que les cultures de cellules végétales présentent une forte variation de leur dynamique sur une grande période de culture mais changent de manière assez lente. Suite à ce raisonnement, la valeur du taux de respiration mesurée périodiquement par la technique de la pente corrigée en concentration d'oxygène (OUR_P) (Aubry, 1995) est directement utilisée par le contrôleur à la place d'un estimateur. Le contrôleur de plage permise est aussi utilisé avec ce contrôleur-ci.

D'autre part, afin d'éviter une perturbation soudaine de la concentration en oxygène dissous ainsi qu'un délai dans l'estimation du coefficient de transfert (k_La), ce dernier est remplacé dans l'algorithme de contrôle par un coefficient d'aération (P_Q) qui est une fonction polynomiale représentant l'impact d'un changement du taux d'aération sur le ceofficient de transfert d'oxygène accompagné d'un coefficient de transfert réduit (α) indépendant du taux d'aération.

$$\frac{dC}{dt} = \alpha P_Q \left[\left(C^*_{air} \frac{y_{gaz}}{y_{air}} \right) - C \right] - OUR \qquad 4.13$$

$$k_La = \alpha P_Q \qquad 4.14$$

De cette manière, lorsqu'un changement est appliqué au taux d'aération (Q_T), un échelon est aussitôt appliqué à l'estimation du taux de transfert (k_La) évitant ainsi un délai et une perte de contrôle momentanée de la concentration en oxygène dissous. L'algorithme de ce contrôleur est représenté par les équations qui suivent :

$$y_{gaz} = \left(\frac{y_{air}}{C^*_{air}}\right)\left[\left(\frac{\lambda_c(C_{PC} - C) + OUR_P}{\overline{\alpha}P_Q}\right) + C\right] \qquad 4.15$$

$$\overline{\alpha}_t = -\gamma_1 TP_Q\left[\left(C^*_{air}\frac{y_{gaz}}{y_{air}}\right) - C\right](C_{PC} - C)_{t-1} + \overline{\alpha}_{t-1} \qquad 4.16$$

$$\overline{k_La} = \overline{\alpha}P_Q \qquad 4.17$$

accompagné du contrôleur de plage permise, équations 4.12.a à 4.12.g.

4.2 Résultats

La figure 4.1 présente des courbes de concentration d'oxygène dissous, pour trois cultures différentes, contrôlée par les trois types de contrôleurs : conventionnel PI, adaptatif direct et adaptatif basé sur le taux de respiration. De manière générale, les trois types de contrôleur permettent de maintenir la concentration d'oxygène dissous au point de consigne et ce, sans de trop grandes variations. Les pointes de changement de concentration sont provoquées par une mesure dynamique du taux de respiration effectué toutes les 12 heures.

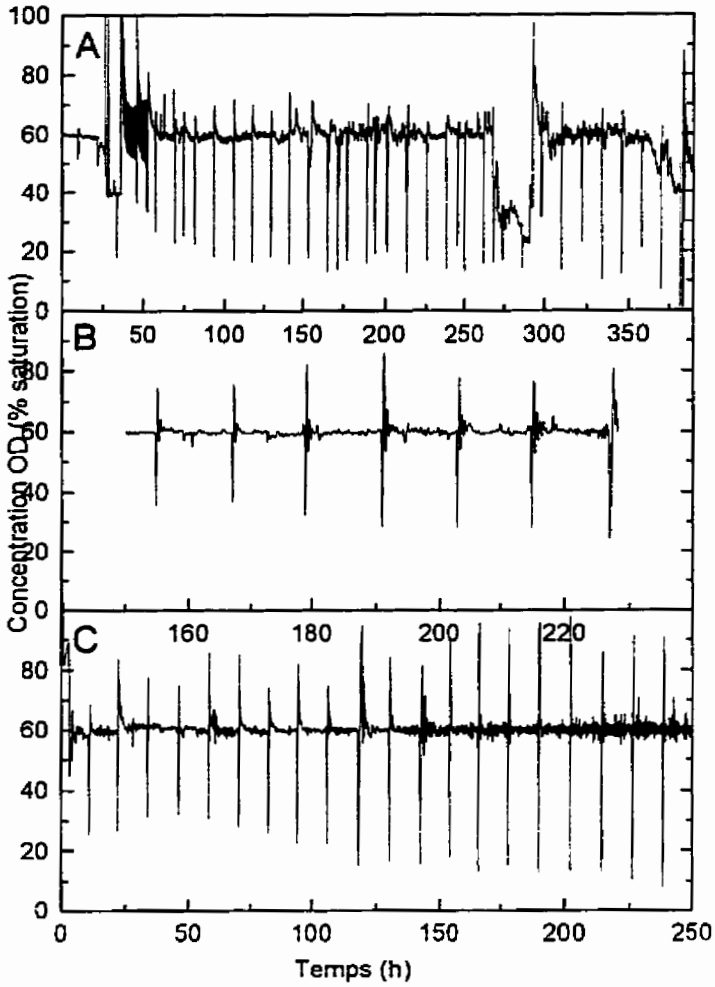


Figure 4.1 : **Profils de concentration d'oxygène dissous obtenus avec trois contrôleurs.** A. Standard (PI). B. Direct. C. Basé sur le taux de respiration

Outre l'aspect général de contrôle, différentes caractéristiques sont souhaitables pour un contrôleur. Tout d'abord, la vitesse de convergence lors d'une perturbation externe. Avec un contrôleur conventionnel, le temps total entre le moment où la mesure du taux de respiration débute et l'instant où la concentration en

oxygène dissout est revenue au point de consigne sans variations majeures (± 5 % du point de consigne) s'étend sur plus de 2 heure 42 minutes (figure 4.2) pour des conditions typiques de culture. Dans le présent cas, où la concentration choisie est largement supérieure à la concentration limite où se produit un arrêt de croissance, cet effet est plus ou moins perturbateur sur la croissance. Toutefois, dans un optique d'optimisation de procédé où la concentration d'opération est appelée à changer, cette réaction du contrôleur devient prédominante.

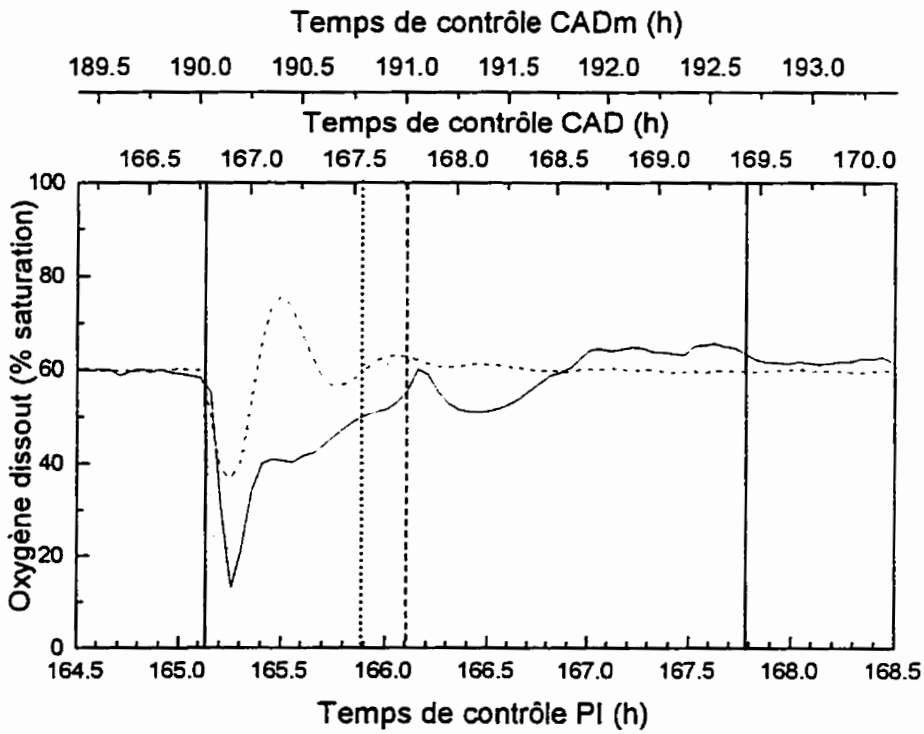


Figure 4.2 : **Comparaison des performances des trois contrôleurs.** —— Standard (PI). ----- Direct (CAD), ····· Basé sur le taux de respiration (CADm)

Afin de diminuer ce temps de réaction, le contrôleur adaptatif direct est appliqué aux cultures. Cette modification de l'algorithme de contrôle permet de diminuer le temps hors-contrôle de 2 heure 45 minutes à une période de moins de 60 minutes. Cette amélioration permet une diminution de 64 % du temps hors-contrôle, ce qui est très appréciable. Une seconde modification de l'algorithme de contrôle afin d'appliquer le contrôleur adaptatif basé sur le taux de respiration permet encore une fois de diminuer ce temps hors contrôle à moins de 50 minutes. Le temps hors contrôle est donc passé de plus de 165 minutes à moins de 50 minutes, ce qui représente une amélioration de plus de 70 % de cette performance de contrôle.

Une seconde caractéristique appréciée d'un contrôleur est sa capacité de fournir de l'informations. Le contrôleur conventionnel permet une appréciation qualitative des changements de dynamique de la culture de part la répercussion de ces changements sur sa vitesse de réaction à une perturbation. Toutefois, aucune information quantitative provenant de ce contrôleur ne peut être utilisée.

C'est précisément dans un but d'obtention d'information additionnelle que le contrôleur adaptatif direct est appliqué aux cultures de cellules végétales. Toutefois, ce contrôleur ne répond pas à la principale condition définie précédemment selon laquelle en présence d'un nombre d'équation théorique reliant les variables manipulée et contrôlée inférieur au nombre de variables inconnues en-ligne, il est impossible de d'obtenir d'estimés valables. En effet, dans ce cas, il n'y a qu'une équation reliant ces

deux variables alors que deux variables sont inconnues en continu, le coefficient de transfert d'oxygène et le taux de respiration. Sur cet aspect de potentiel d'information, ce contrôleur n'apporte rien de supplémentaire.

Finalement, le contrôleur adaptatif basé sur le taux de respiration ne contient qu'un paramètre inconnu en-ligne, le coefficient de transfert d'oxygène. Suite à l'expérimentation effectuée, il apparaît que ce contrôleur fourni une estimation continue et valable de ce taux de transfert d'oxygène, ce qui est grandement apprécié dans ce genre de culture afin de permettre une caractérisation générale instantanée en temps réel des phénomènes en cause.

En somme, le contrôleur adaptatif basé sur le taux de respiration permet un excellent contrôle de la concentration d'oxygène dissous tout en permettant une diminution de 78 % du temps hors contrôle et de fournir une estimation valable du taux de transfert d'oxygène dans le milieu de culture, supportant ainsi une caractérisation en temps réel des phénomènes en cours.

5. ÉTUDE DE LA CROISSANCE DE CELLULES VÉGÉTALES

5.1 Travaux expérimentaux

La première étape d'optimisation d'un procédé porte sur sa caractérisation. Pour effectuer cette caractérisation de la croissance cellulaire plusieurs cultures ont été réalisées. Les tableaux 5.1 et 5.2 résument le travail réalisé en bioréacteur et en flacons agités.

Tableau 5.1 Cultures de cellules d'*Eschscholtzia californica* réalisées en bioréacteur

Culture	Volume		Paramètres de culture suivis												
	2 L	5 L	¢	x_S	x_H	x_H/x_S	sucres	ions	pH	cond.	OUR	CTR	Rq	CO_2D	OD
2SH2	✓			✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓
2SH3	✓			✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓
2SH4	✓			✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓
5SH5		✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓
2SH6	✓			✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
5SH7		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
2SH8	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
5SH9		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
2SH10	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
5SH11		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
2SH12	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓
5SH13		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
2SH16	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
5SH17		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

Tableau 5.1 Cultures de cellules d'*Eschscholtzia californica* réalisées en bioréacteur (suite)

Culture	Volume		Paramètres de culture suivis												
	2 L	5 L	¢	x_S	x_H	x_H/x_S	sucres	ions	pH	cond.	OUR	CTR	Rq	CO_2D	OD
2SH20	✓			✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓				✓
5SH21		✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓				✓
2SH22	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
5SH23		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
2SH24	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
5SH25		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
2SH26	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
5SH27		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
2SH28	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
2SH30	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
5SH31		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
2SH32	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
5SH33		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
5SH34		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

Tableau 5.2 Cultures de cellules d'*Eschscholtzia californica* réalisées en flacons

Culture	Paramètres de culture suivis									
	¢	x_S	x_H	x_H/x_S	sucres	ions	pH	cond.	OUR	OD
SF1		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		
SF2		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
SF3		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
SF4		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		
SF5	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
SF6	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		
SF7		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
SF8		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		
SF9		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		
SF10		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		
SF11		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		
SF12		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		
SF13	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
SF14		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		
SF16	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
SF17	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		
SF18		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		
SF19		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		
SF20		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		
SF21		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		
SF22		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		
SF23		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		
SF24	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		

Tableau 5.2 **Cultures de cellules d'*Eschscholtzia californica* réalisées en flacons** (suite)

Culture	Paramètres de culture suivis									
	¢	x_S	x_H	x_H/x_S	sucres	ions	pH	cond.	OUR	OD
SF25	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		
SF26		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		
SF27	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		
SF28		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		
SF29	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		
SF30		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		
SF31	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		
SF32	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		
SF33	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		
SF34	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		
SF35	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		
SF36	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		
SF37	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		
SF38	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		
SF39	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		
SF40	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		
SF41	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		
SF42	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		

5.2 Résultats de 6 cultures typiques

Parmi toutes les cultures effectuées, les six suivantes représentent l'ensemble des caractéristiques étudiées. La première est réalisée en cuvée où un seul ajout est effectué. Quant aux cinq autres, elles sont opérées en cuvée alimentée d'un nutriment sélectionné pour chaque expérience.

5.2.1 Culture en cuvée (1 ajout)

La cultures 2SH10 (figure 5.1) est opérée en cuvée avec une composition de milieu B5 standard (annexe A) à l'inoculation. L'objectif de cette culture est d'observer une courbe de croissance standard à laquelle un ajout ponctuel en nutriment est effectué. Après environ 60 heures de culture, de l'ammoniaque (8.5 mmol L^{-1}) ainsi que du phosphate (1.6 mmol L^{-1}) sont ajoutés à la culture.

La biomasse atteinte est de 12 g L^{-1} pour une concentration initiale de 2.8 g L^{-1} après environ 175 heures de culture. En ce qui a trait à la concentration cellulaire, elle était de 1.0×10^9 ¢ L^{-1} à l'inoculation et a atteint 4.0×10^9 ¢ L^{-1} après aussi 175 heures de culture.

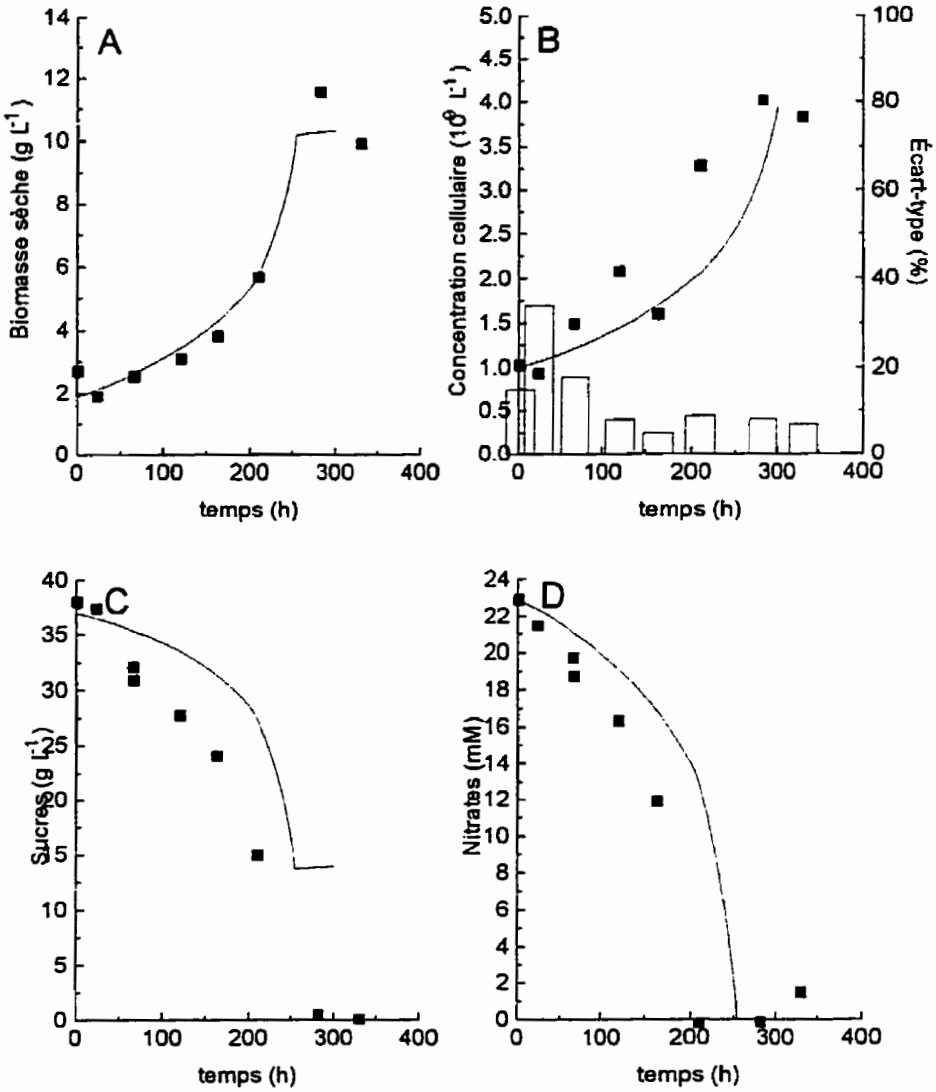


Figure 5.1 **Culture en cuvée : 2SH10.** A. biomasse sèche. B. concentration cellulaire. C. hydrates de carbone. D. nitrates. Courbes estimées ultérieurement par le modèle de croissance.

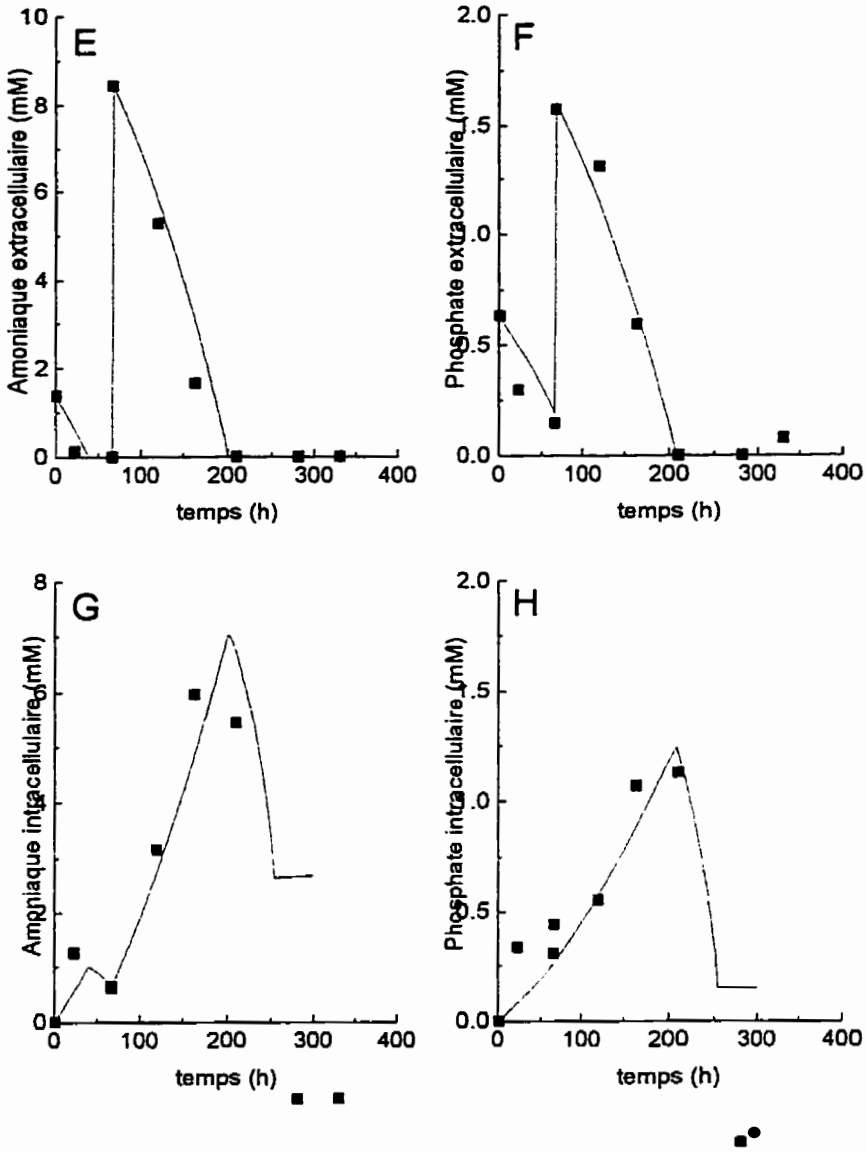


Figure 5.1 **Culture en cuvée : 2SH10** (suite). E. ammoniaque extracellulaire. F. phosphate extracellulaire. G. ammoniaque intracellulaire. H. phosphate intracellulaire. Courbes estimées ultérieurement par le modèle de croissance.

5.2.2 Cuvée alimentée en phosphate

La stratégie d'alimentation développée pour la culture 2SH22 (figure 5.2) consiste en des ajouts périodiques d'ions phosphates en quantité minimale. La restriction appliquée est de maintenir la pseudo-concentration intracellulaire de ce nutriment toujours supérieure ou égale à 0.05 mmol L^{-1}, concentration fixée arbitrairement selon les observations précédentes de manière à ne pas créer de manque nutritionnel et à minimiser les ajouts ($po_{4e} \rightarrow 0$, $po_{4i} > 0.05$ mmol L^{-1}). Cette stratégie permet d'étudier l'effet d'une diminution des concentrations et d'un apport supplémentaire en phosphate tout en permettant de vérifier si la concentration de cet ion affecte la croissance en biomasse.

Les concentrations initiales en nutriments sont celles mentionnées dans la composition du milieu B5 standard à l'exception du phosphate dont la concentration (0.1 mmol L^{-1}) est celle requise pour éviter une pénurie jusqu'au prochain ajout après 24 heures de culture.

La biomasse atteinte dans ce cas est de 8.0 g L^{-1} pour une concentration initiale de 3.0 g L^{-1} après environ 200 heures de culture. En ce qui a trait à la concentration cellulaire, elle était de 1.4×10^9 ¢ L^{-1} à l'inoculation et a atteint 3.2×10^9 ¢ L^{-1} après environ 175 heures de culture.

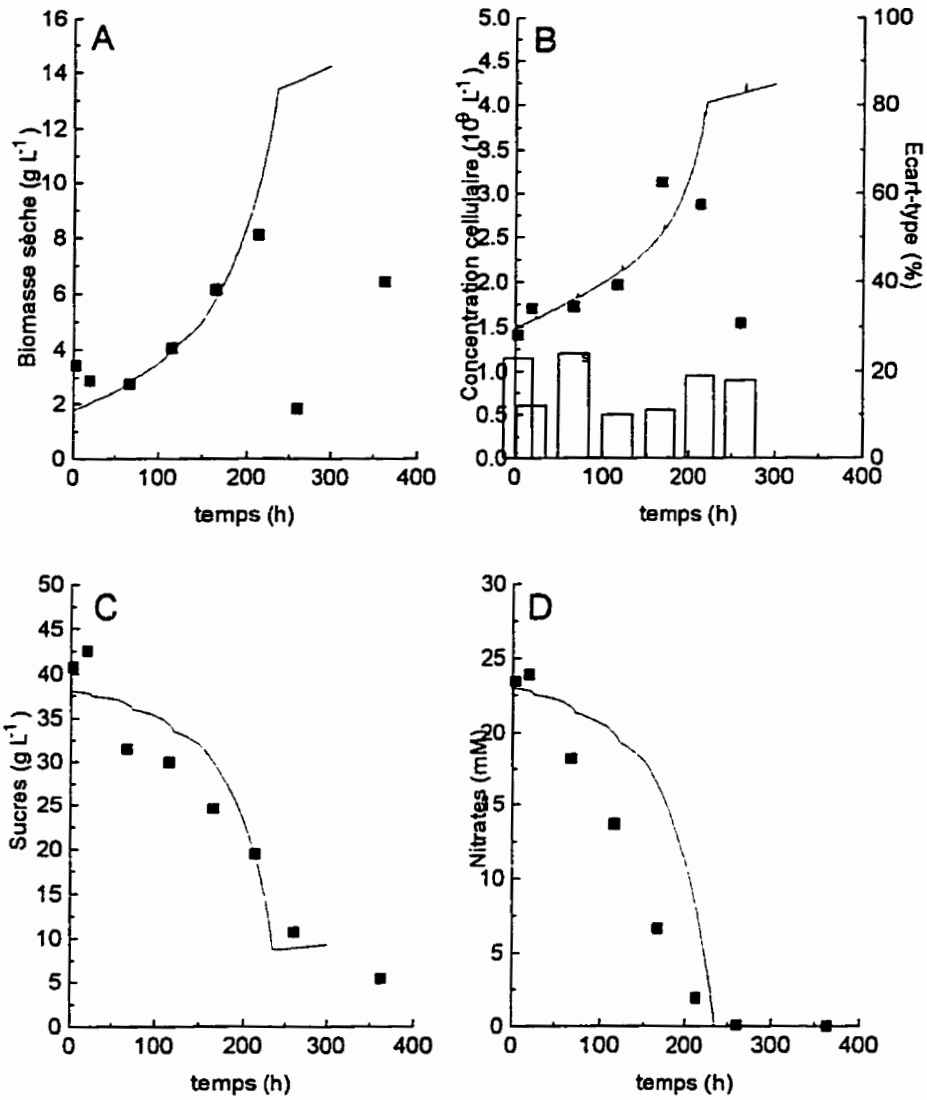


Figure 5.2 **Culture en cuvée alimentée en phosphate : 2SH22.** A. biomasse sèche. B. concentration cellulaire. C. hydrates de carbones. D. nitrates. Courbes estimées ultérieurement par le modèle de croissance.

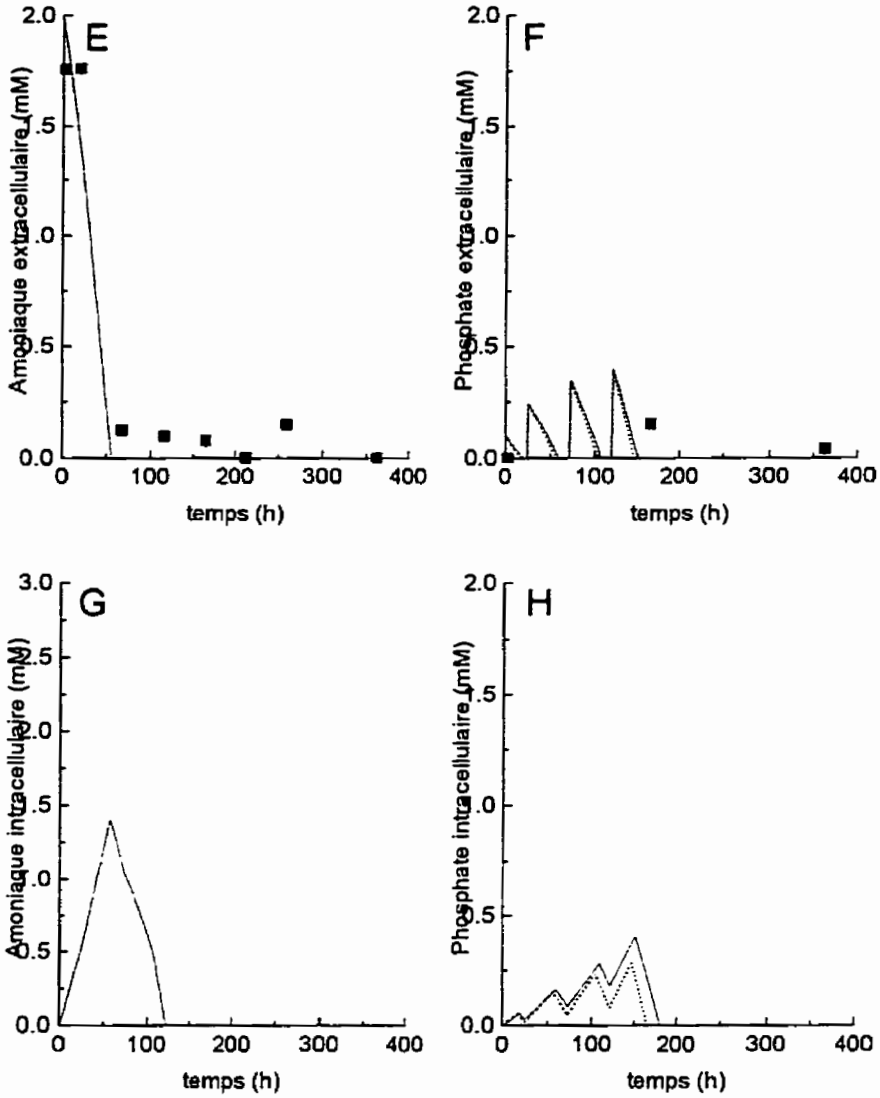


Figure 5.2 **Culture en cuvée alimentée en phosphate : 2SH22** (suite). E. ammoniaque extracellulaire. F. phosphate extracellulaire. G. ammoniaque intracellulaire. H. phosphate intracellulaire. Courbes estimées ultérieurement par le modèle de croissance.

5.2.3 Cuvées alimentées en nitrate

Deux cultures sont réalisées en cuvée alimentée avec du nitrate soit les cultures 5SH23 et 5SH25. La première culture 5SH23 (figure 5.3) est réalisée afin de déterminer l'effet d'une diminution des concentrations en nitrate sur les croissances en biomasse sèche et en concentration cellulaire. Dans cette optique, la stratégie développée est d'ajouter de petites quantités de nitrates de manière à ce qu'il y en ait toujours mais en quantité minimale ($no_3 \rightarrow 0^+$), afin de soutenir la croissance pour les 24 heures suivantes sans plus.

Afin de vérifier ce résultat, la culture 5SH25 (figure 5.4) est effectuée avec la même stratégie d'alimentation ($no_3 \rightarrow 0^+$). Comme l'indique la figure 5.4 un problème dans l'alimentation en nitrate provoque une accumulation largement supérieure aux concentrations envisagées. Toutefois, cet incident permet une approche différente de l'étude des effets de concentration du nitrate. Une présence accrue mais différée du nitrate dans le milieu permet d'étudier le même phénomène que lors de l'expérience précédente (5SH23, figure 5.3) mais de façon inverse; l'effet d'une faible concentration de nitrate en début de culture suivi d'une augmentation proportionnelle de la concentration de ce nutriment sur les croissances.

Pour ces cultures, les concentrations initiales des autres nutriments sont celles mentionnées pour la préparation du milieu B5 standard à l'exception du nitrate dont la quantitée est fixée à 5 mmol L^{-1} pour la culture 5SH23 de manière à suffire à la

consommation des cultures pendant les premières 24 heures de culture (1.5 mmol L^{-1}) pour la culture 5SH25.

En ce qui a trait à la culture 5SH23, la concentration en biomasse atteinte est de 16.0 g L^{-1} après 275 heures de cultures alors qu'elle était de 3.0 g L^{-1} à l'inoculum. Quant à la concentration cellulaire, elle est passée de 1.0 à 8.0 x 10^9 ¢ L^{-1} après 275 heures. La concentration en biomasse sèche atteinte lors de la seconde culture, 5SH25, est de 14.0 g L^{-1} après 350 heures de cultures pour une concentration initiale de 4 g L^{-1}. Dans ce cas, la concentration cellulaire est passée de 1.2 à 6.0 x 10^9 ¢ L^{-1} après 250 heures.

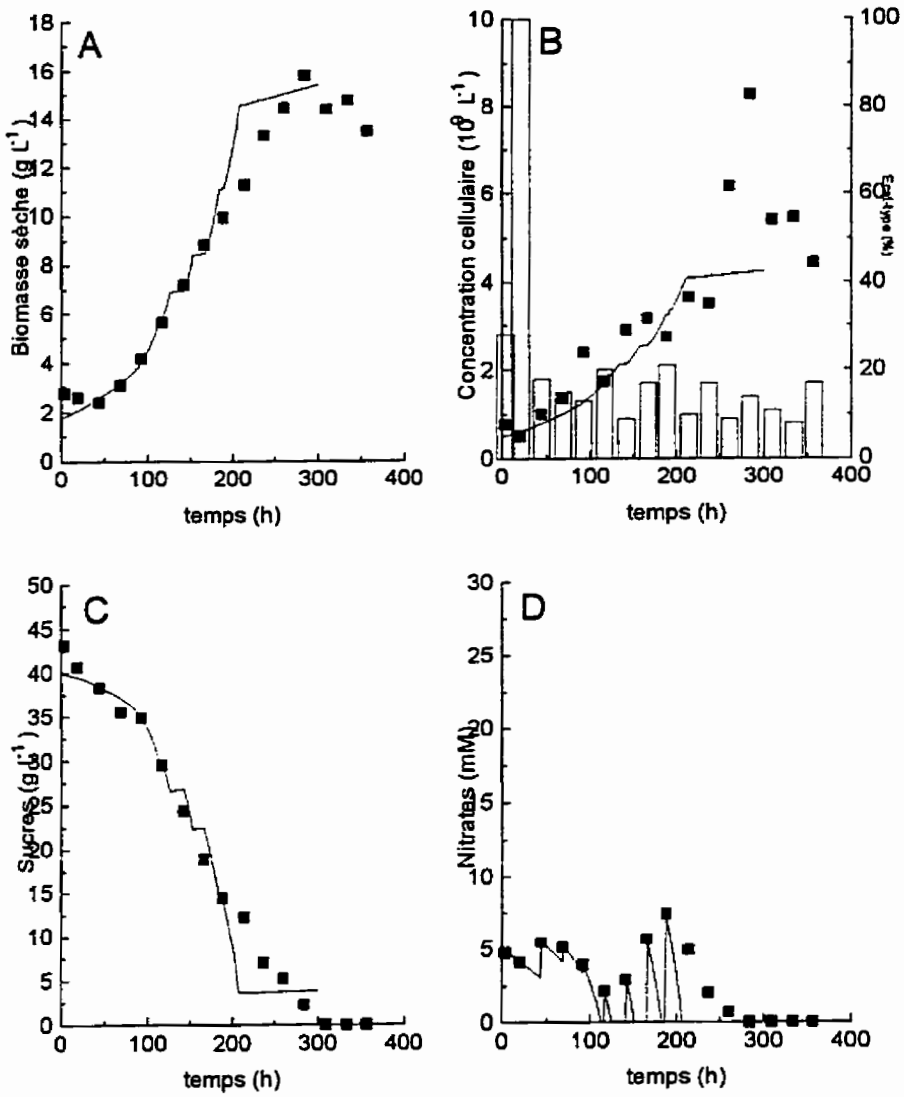


Figure 5.3 **Culture en cuvée alimentée en nitrate : 5SH23.** A. biomasse sèche. B. concentration cellulaire. C. hydrates de carbone. D. nitrates. Courbes estimées ultérieurement par le modèle de croissance.

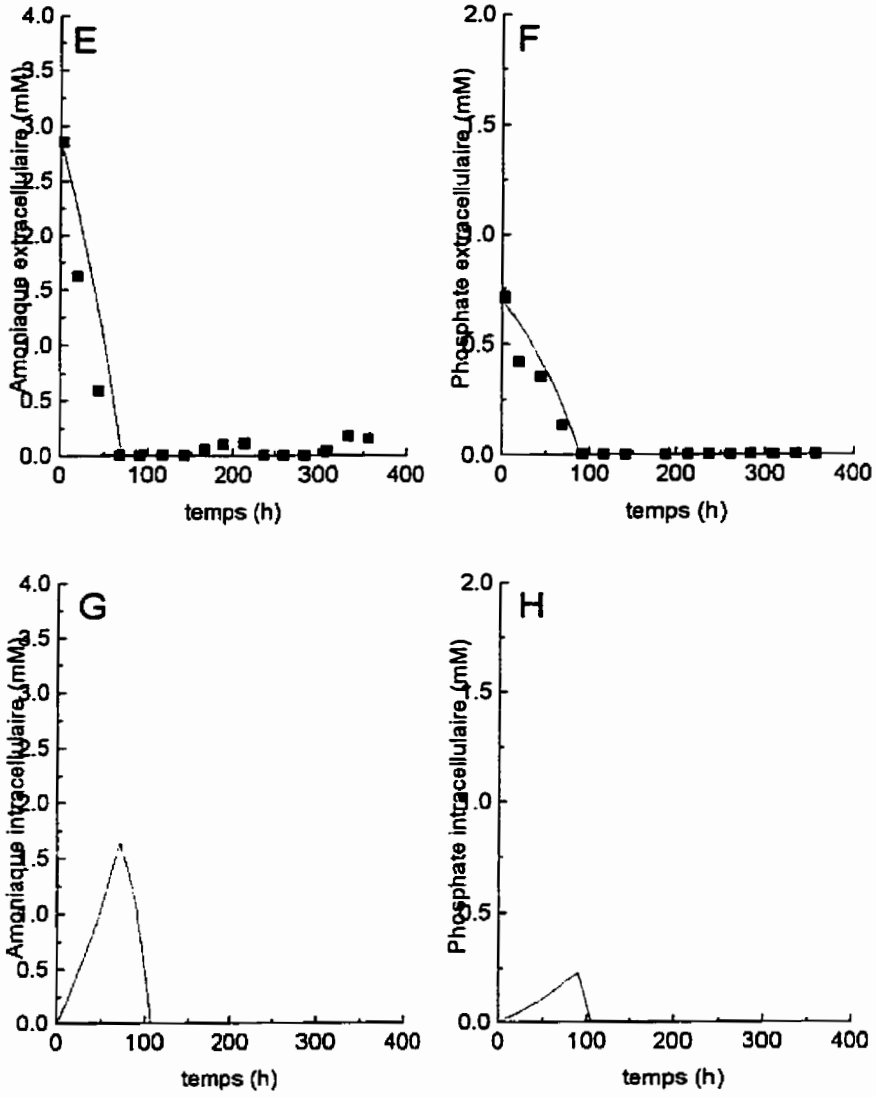


Figure 5.3 **Culture en cuvée alimentée en nitrate : 5SH23** (suite). E. ammoniaque extracellulaire. F. phosphate extracellulaire. G. ammoniaque intracellulaire. H. phosphate intracellulaire. Courbes estimées ultérieurement par le modèle de croissance.

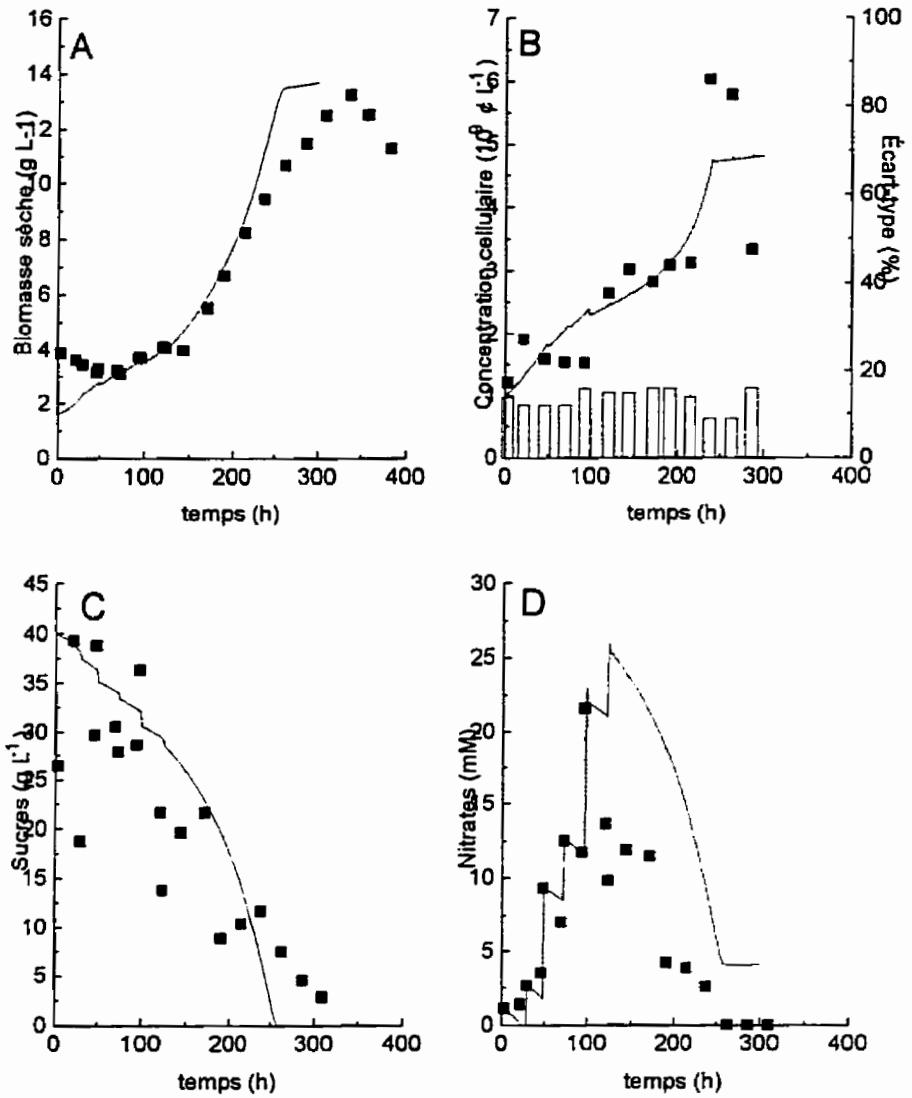


Figure 5.4 **Culture en cuvée alimentée en nitrate : 5SH25.** A. biomasse sèche. B. concentration cellulaire. C. hydrates de carbone. D. nitrates. Courbes estimées ultérieurement par le modèle de croissance.

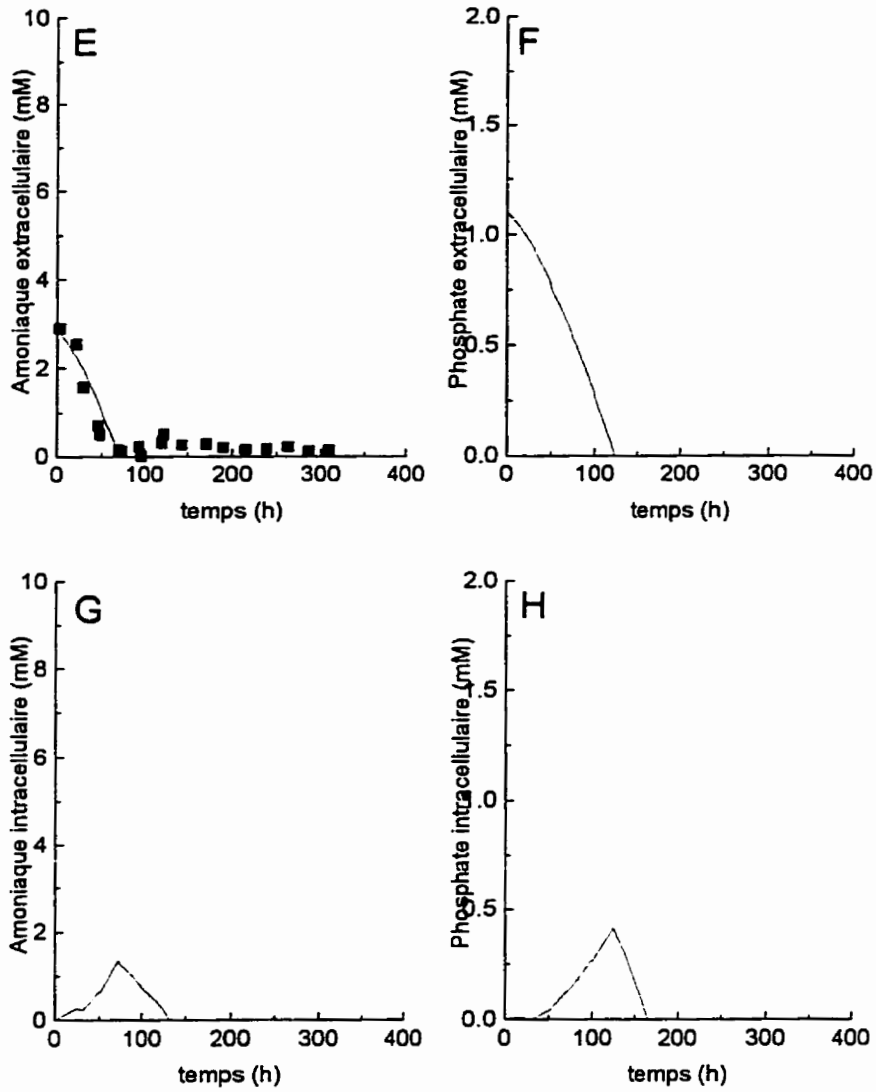


Figure 5.4 **Culture en cuvée alimentée en nitrate : 5SH25** (suite). E. ammoniaque extracellulaire. F. phosphate extracellulaire. G. ammoniaque intracellulaire. H. phosphate intracellulaire. Courbes estimées ultérieurement par le modèle de croissance.

5.2.4 Cuvées alimentées en ammoniaque

Les deux dernières cultures présentées sont réalisées en cuvée alimentée en ammoniaque. Tout d'abord, lors de la culture 2SH24 (figure 5.5), la stratégie choisie est d'alimenter l'ion ammonium de manière à ce qu'il soit toujours présent dans le milieu de culture mais en quantité minimale ($nh_{4e} \rightarrow 0^+$). Cette culture permet d'étudier l'effet de la présence et de l'augmentation de la disponibilité de cet ion sur la croissance cellulaire. Afin de vérifier l'effet d'un apport supérieur d'ammoniaque sur la croissance de la biomasse sans le biaisement de l'effet d'omniprésence, la culture 2SH26 (figure 5.6) est réalisée. Dans ce cas-ci, la stratégie d'alimentation, basé sur le schème d'assimilation et d'utilisation proposé ultérieurement, est de permettre une disponibilité permanente de l'ammoniaque pour la croissance cellulaire sans toutefois maintenir cet ion omniprésent dans le milieu ($nh_{4e} \rightarrow 0$, $nh_{4i} > 0.2$ mmol L^{-1}). Les concentrations des autres nutriments lors de l'inoculation de ces cultures sont celles mentionnée à l'annexe A, soit la composition B5 standard, à l'exception de l'ammoniaque.

Lors de la culture 2SH24, la concentration en biomasse sèche est passée de 3.5 g L^{-1} à 8 g L^{-1} en plus de 260 heures alors que la concentration cellulaire passait de 1.5 à 4.8 x 10^9 ¢ L^{-1} en près de 250 heures. Quant à la culture 2SH26, la concentration en biomasse sèche est passé de 2.0 g L^{-1} à 11 g L^{-1} en 340 heures alors que la concentration cellulaire passe de 2 à 8.8 x 10^9 ¢ L^{-1} en près de 250 heures.

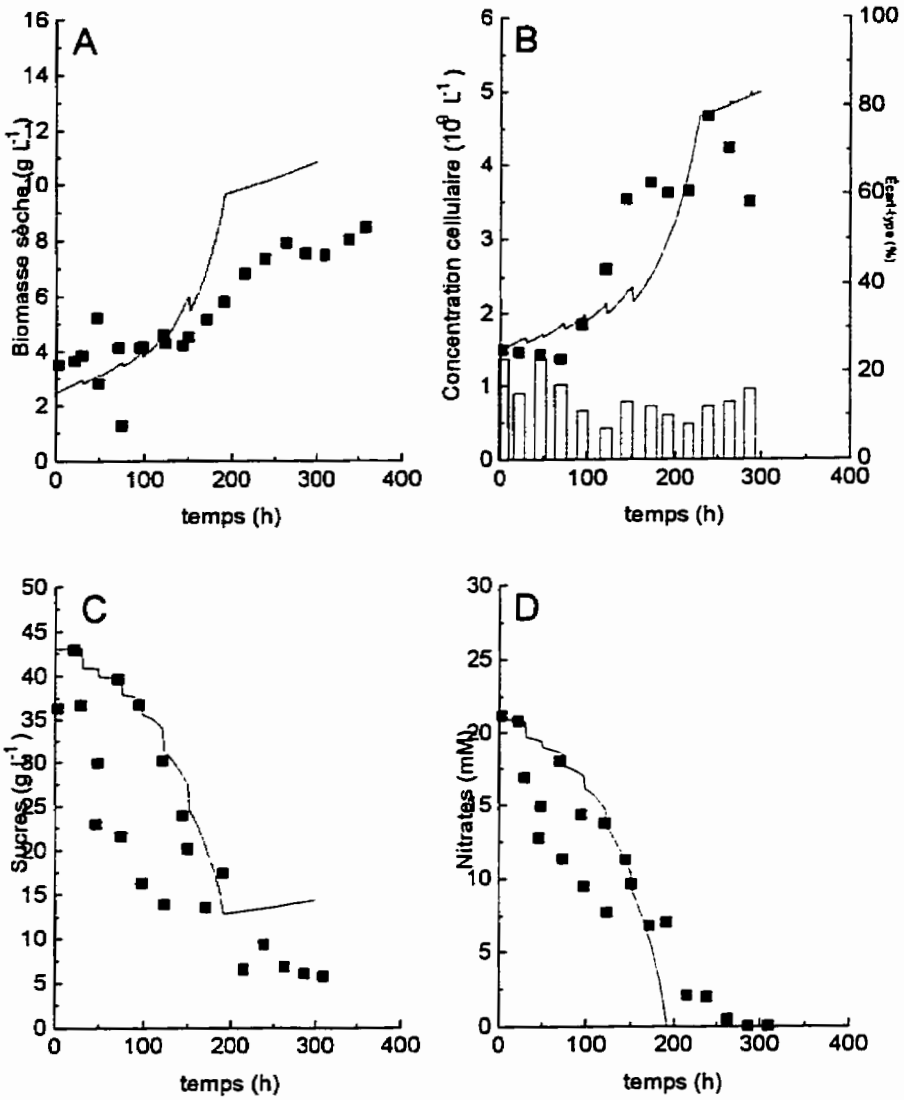


Figure 5.5 **Culture en cuvée alimentée en ammoniaque : 2SH24.** A. biomasse sèche. B. concentration cellulaire. C. hydrates de carbone. D. nitrates. Courbes estimées ultérieurement par le modèle de croissance.

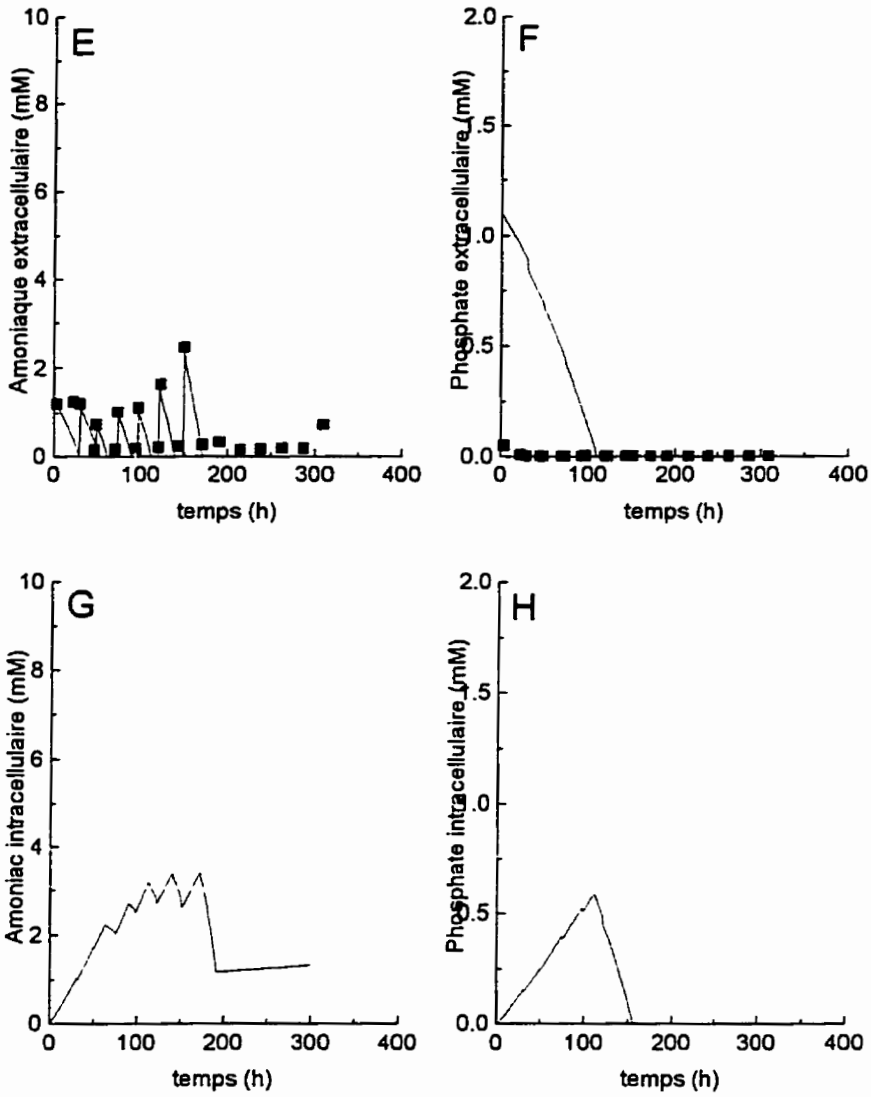


Figure 5.5 **Culture en cuvée alimentée en ammoniaque : 2SH24** (suite). E. ammoniaque extracellulaire. F. phosphate extracellulaire. G. ammoniaque intracellulaire. H. phosphate intracellulaire. Courbes estimées ultérieurement par le modèle de croissance.

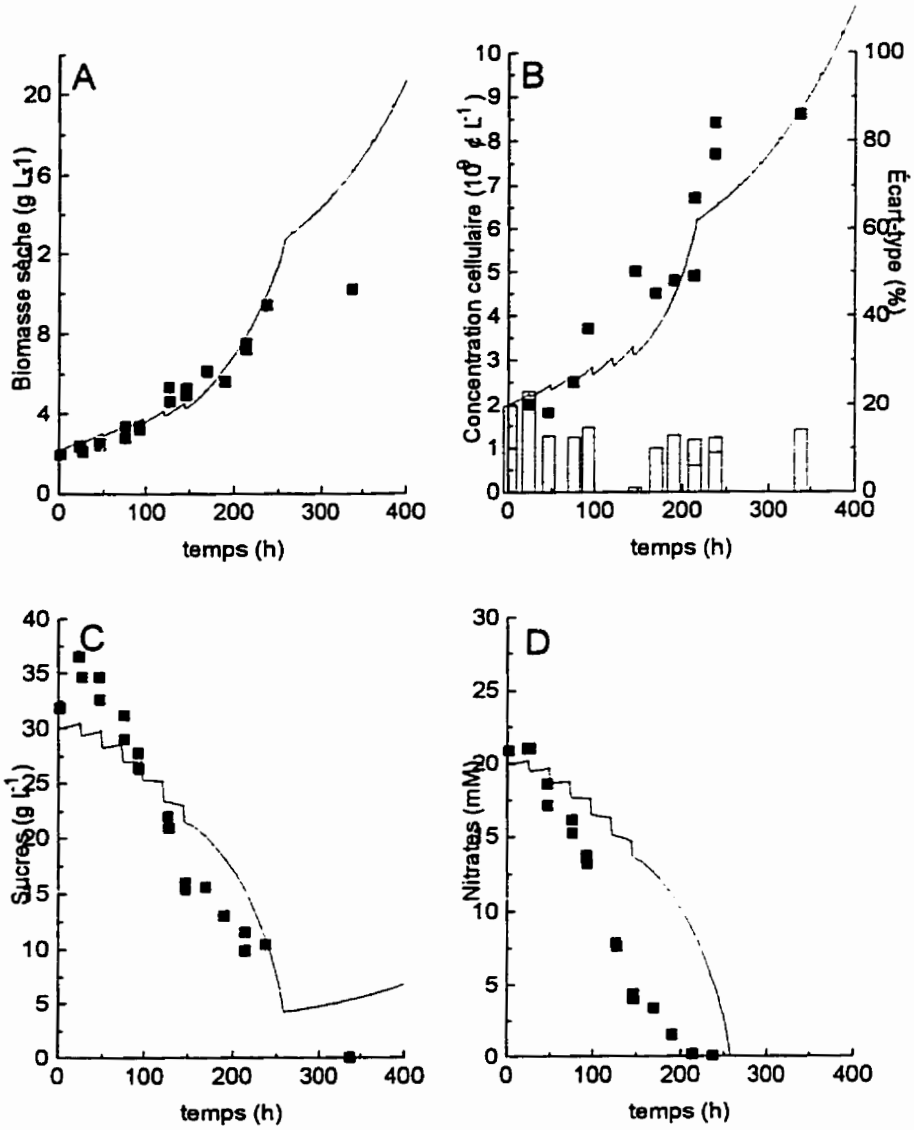


Figure 5.6 **Culture en cuvée alimentée en ammoniaque : 2SH26.** A. biomasse sèche. B. concentration cellulaire. C. hydrates de carbone. D. nitrates. Courbes estimées ultérieurement par le modèle de croissance.

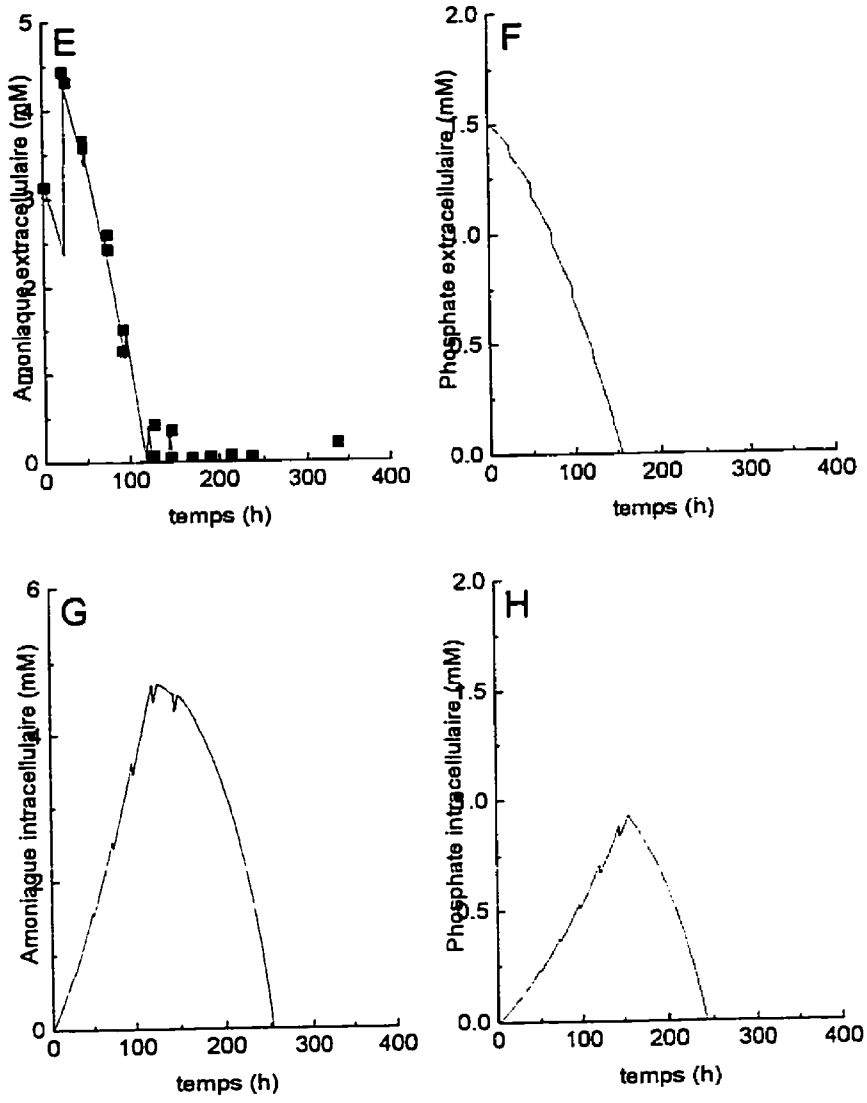


Figure 5.6 **Culture en cuvée alimentée en ammoniaque : 2SH26** (suite). E. ammoniaque extracellulaire. F. phosphate extracellulaire. G. ammoniaque intracellulaire. H. phosphate intracellulaire. Courbes estimées ultérieurement par le modèle de croissance.

5.3 Étude de l'impact des nutriments sur la croissance

Suite à une série d'expérimentations effectuées avec *Eschscholtzia californica* et à la consultation de travaux réalisés avec *Vitis vinifera* (Pépin, 1996), il apparaît que la croissance de cellules végétales en suspension est fortement liée aux nutriments présents dans le milieu de culture. Certains nutriments tel l'ammoniaque semblent même avoir un effet direct sur les taux spécifiques de croissance de la biomasse sèche et de la prolifération cellulaire. C'est sur cet aspect que la présente étude est réalisée. Les nutriments auxquels les effets les plus importants sont associés sont traités individuellement dans les sections qui suivent.

En ce qui a trait aux autres nutriments analysés mais non-mentionnée (Ca, Cl, Fe, K, Mg, Na, SO_4), ils doivent toujours être présents aux mêmes concentrations pour toutes les cultures effectuées de manière à ne pas provoquer de variation sur les taux spécifiques de croissance d'une culture à l'autre. Si cette condition n'est pas respectée, il devient impossible d'associer un effet remarqué lors d'une culture à un nutriment ou à un autre. De plus, les nutriments non-étudiés ne doivent en aucun temps devenir limitants. Dans ce cas aussi, l'analyse des résultats de cultures pourrait être faussée par cet événement non désiré.

5.4 Bioxyde de carbone

Lors de cultures de cellules végétales, une partie des hydrates de carbone fournis comme nutriments aux cellules (40 à 50 %) est transformée en bioxyde de carbone au cours de la respiration cellulaire. La plus grande partie de ce gaz est extraite du milieu par entraînement occasionné par le gaz d'aération faible en CO_2 (air enrichie en O_2).

5.4.1 Effets sur la biomasse

Certains auteurs ont observé une relation entre la concentration de gaz carbonique dissous dans le milieu de culture et la croissance de la biomasse. En effet, si cette concentration est trop basse ou inversement trop élevée, une diminution du taux de croissance est observable. Lors de son étude sur le sujet, Archambault (1991) rapporte que des cultures de cellules immobilisées de *Catharanthus roseus* présentent une augmentation du taux de croissance moyen lorsque le gaz d'alimentation est enrichi à 2 % de gaz carbonique. Toutefois, ce taux de croissance est moindre lorsque les cultures sont alimentées avec de l'air ou un gaz enrichi à 5 % de bioxyde de carbone.

Selon cet auteur, la raison d'un tel comportement réside en une diminution de la viabilité cellulaire associée à la concentration de gaz carbonique dissous. Lorsque la culture est aérée avec un gaz à faible teneur en CO_2, il y a dégazage en gaz

carbonique de la solution. Inversement, lors de l'utilisation d'un gaz d'aération trop enrichi en CO_2, la concentration de ce dernier dans le milieu de culture augmente affectant aussi la viabilité cellulaire.

De plus, la présence à différentes concentrations du gaz carbonique dissous affecte la production d'éthylène par les cellules. Quoique non traité lors de cette étude, l'éthylène est rapporté comme régulateur ralentissant généralement la croissance de cultures de cellules végétales en suspension. Sisler et Wodd (1988) rapportent une certaine synergie entre ces deux gaz. En effet, des concentrations différentes de CO_2 dissous peuvent inhiber l'effet néfaste de l'éthylène ou inversement l'amplifier, ainsi que ralentir ou stimuler son taux de production.

5.4.2 Effets sur la concentration cellulaire

Jusqu'à ce jour, aucune relation entre la prolifération cellulaire et le taux de bioxyde de carbone dissous n'est répertoriée. Il faut remarquer que peu d'études ont réalisé un suivi de la concentration cellulaire.

5.4.3 Estimation de la concentration de CO_2 dissous

Considérant la relation entre la concentration en CO_2 dissous et le taux de croissance de la biomasse, une mesure de ce paramètre doit être effectuée en continu. Si possible, un contrôle doit de plus être appliqué à ce paramètre de manière à le maintenir à un niveau optimal. Cependant, les sondes disponibles à ce jour pour la

mesure de ce paramètre ne sont fiables que sur une période de 24 à 48 heures. Considérant que la période de croissance moyenne des cellules utilisées pour la présente étude s'étend sur plus de 300 heures, cette possibilité ne peut être envisagée.

Afin de contrer ce problème, Aubry (1995) a conçu un estimateur mathématique pour la concentration de bioxyde de carbone dissous dans le milieu de culture en fonction des conditions d'opération. L'estimateur est basé sur un bilan massique réalisé sur le CO_2 dans le système de culture. Ce bilan assume que la pression partielle du gaz carbonique à l'intérieur des bulles de gaz dans le milieu liquide (P_b) se situe entre la pression partielle dans le gaz d'aération (P_i) et la pression partielle du CO_2 lorsque la bulle éclate en surface (P_L).

$$\frac{dDCO_2}{dt} = k_L a_s \left[\frac{Po}{H} - DCO_2\right] + k_L a_b \left[\frac{P_b}{H} - DCO_2\right] + CTR \qquad 5.1$$

où DCO_2 représente le gaz carbonique dissous, $k_L a_s$ et $k_L a_b$ les coefficients de transfert de surface et de bullage respectivement, H la constante d'Henry et CTR le taux de transfert en gaz carbonique mesuré en continu.

En supposant que le système est en pseudo-équilibre, le gaz carbonique dissous est estimé selon :

$$DCO_2 = \frac{k_L a_s \frac{Po}{H} + k_L a_b \frac{P_b}{H} + CTR}{k_L a_g} \qquad 5.2$$

où k_La_g représente la somme des coefficients de transfert ($k_La_s + k_La_b$).

Connaissant le coefficient de transfert global du procédé (k_La_g) (Aubry, 1995) ainsi que le taux de transfert de surface (k_La_s mesuré sans gaz de bullage), il est possible de déterminer le coefficient de transfert de bullage (k_La_b). La seule inconnue réside en la pression partielle du gaz carbonique à l'intérieur des bulles dans la phase liquide. Comme le mentionne Aubry (1995), il est possible de supposer que cette pression (P_b) est égale à celle des bulle éclatant à la surface du liquide (P_L) lorsque le système est parfaitement agité. C'est ce qui est assumé dans le cadre de la présente étude. Dans ce cas, l'estimateur de gaz carbonique dissous est représenté par l'équation suivante :

$$DCO_2 = \frac{k_La_s\frac{Po}{H} + k_La_b\frac{P_o}{H}\frac{Q_{gt}}{Q_{gi}} + k_La_sk_La_b\frac{P_o}{H^2}\frac{V_LRT}{Q_{gi}} + CTR}{k_La_s + k_La_b + k_La_sk_La_b\frac{1}{H}\frac{V_LRT}{Q_{gi}}} \qquad 5.3$$

où Q_{gt} et Q_{gi} représentent respectivement le débit d'aération total et de bullage, alors que V_L représente le volume du milieu de culture, R la constante des gaz et T la température du milieu. C'est sur cette dernière équation qu'est basé le suivi en continu de la concentration en gaz carbonique dissous dans le milieu de culture.

Malgré l'approche méthodique et rigoureuse effectuée lors de la conception de cet estimateur, certains paramètres de l'équation sont calculés dans des

conditions qui ne sont pas celles des cultures de cellules. C'est le cas du coefficient de transfert de surface (k_La_s) et du fait même, du coefficient de transfert par bullage (k_La_b). Effectivement, le coefficient de transfert de surface est calculé suite à une caractérisation des phénomènes de transfert des gaz à l'intérieur du bioréacteur avec de l'eau. Or, la dynamique de transfert entre le milieu de culture et les gaz d'aération, particulièrement en surface, est bien différente de celle de l'eau et change considérablement dans le temps avec des variations en viscosité, en concentration cellulaire ainsi qu'avec l'apparition d'une mousse de surface. Pour ces raisons, une analyse de l'impact de la valeur de ces paramètres doit être effectuée de manière à en apprécier la précision.

5.4.4 Analyse de sensibilité des paramètres de l'estimation de la concentration de CO_2 dissous

Dans le cadre de la présente étude, l'estimateur de gaz carbonique dissous est utilisé pour s'assurer de la présence d'un niveau semblable (2 à 10 %) de gaz carbonique dissous dans le milieu de culture. De manière à pouvoir qualifier l'estimation obtenue, une analyse de sensibilité est réalisée sur les paramètres de culture pris en considération par ce modèle.

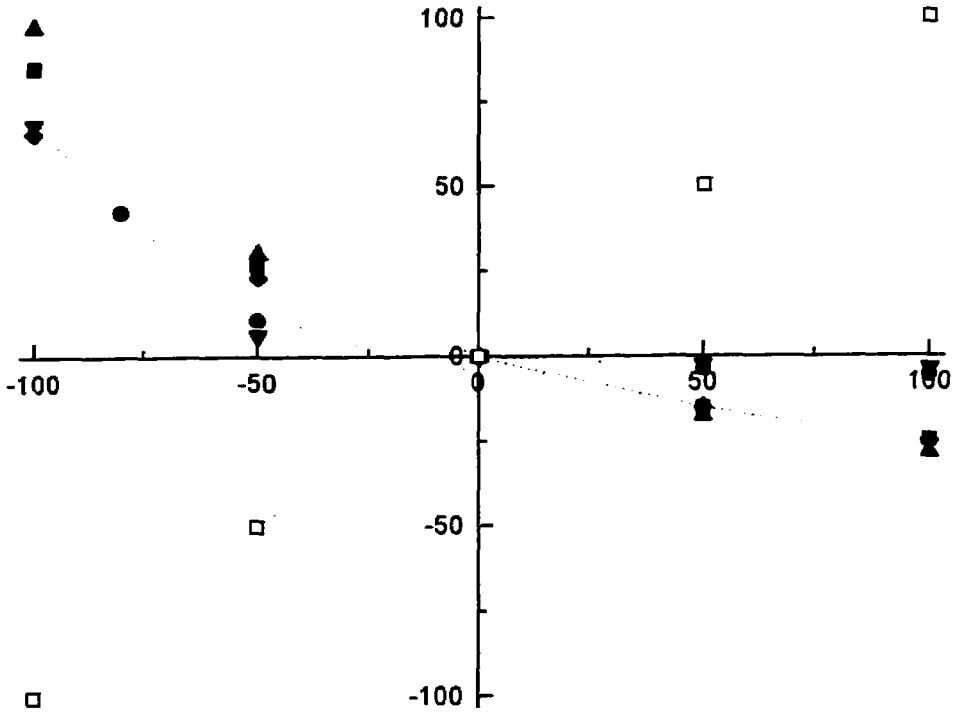


Figure 5.7 **Analyse de sensibilité du pourcentage de variation de la concentration de gaz carbonique dissous en fonction du pourcentage de variation des paramètres de culture utilisés.** ● débit de gaz total ■ débit de bullage ▲ coefficient de transfert d'oxygène de surface ▼ coefficient de transfert d'oxygène par bullage ◆ volume de la culture ◻ concentration de gaz carbonique dans les gaz de sortie

Comme le montre la figure 5.7, la précision de la mesure ou l'estimation des paramètres de culture utilisés par l'estimateur de CO_2 dissous affecte la valeur obtenue. La première mesure utilisée est celle de la concentration en gaz carbonique des gaz de sortie. L'estimation du CO_2 dissous dans le milieu de culture présente une relation directe avec ce paramètre. Ceci est tout à fait logique puisque le modèle d'estimation du bioxyde de carbone dissous dans le milieu de culture développé par

Aubry (1995) est essentiellement basé sur cette mesure. L'appareil utilisé pour obtenir cette mesure doit donc être précis, ce que démontre Aubry dans son mémoire de maîtrise.

Parmi les paramètres de culture utilisés, le débit de gaz total affecte peu l'estimation obtenue. La mesure et le controle de ce dernier par un débitmètre contrôleur ajoute à la précision globale et élimine ainsi cette mesure comme source d'erreur de l'estimation. Toutefois, le débit de bullage affecte de manière plus significative l'estimation du CO_2 dissous. Ceci s'explique par un effet de dégazage du système de culture proportionnellement au débit appliqué. La mesure de ce paramètre doit donc être précise. L'utilisation de débitmètres contrôleurs pour la mesure des débits de gaz total et de surface satisfait cette exigence en assurant indirectement une mesure précise du débit de bullage.

L'effet de la mesure du volume du culture sur l'estimation du CO_2 dissous semble avoir un impact significatif considérant la plage d'analyse de sensibilité utilisée. Toutefois, la mesure du volume prise visuellement à chaque jour sur un échelle de mesure précalibrée, peut contenir une erreur d'au plus 2 %. Cette mesure n'affecte donc nullement la précision de l'estimateur.

L'estimation du coefficient de transfert d'oxygène de bullage n'affecte que très légèrement l'estimation du bioxyde de carbone dissous. L'impact d'une erreur d'estimation de ce paramètre de culture peut donc être négligé. Par contre,

l'estimation du coefficient de transfert d'oxygène par la surface est l'élément présentant le plus grand impact sur l'estimation du CO_2 dissous, outre la mesure directe du CO_2 présent dans les gaz de sortie. En effet, une erreur d'estimation de ce paramètre de ± 50 % provoque une erreur d'estimation du bioxyde de carbone dissous de près de ± 20-30 % ce qui est très significatif. Une telle erreur sur la mesure du coefficient de transfert d'oxygène par la surface est considérable considérant que la valeur choisie est celle mesurée par une aération de surface uniquement avec un volume fixe d'eau. Sachant que la dynamique de culture change avec le temps et que la présence de mousse en surface lors des cultures fait diminuer cette valeur, il est possible que l'erreur sur cette valeur dépasse les 50 % et tende même vers les 100 %, ce qui est dramatique pour l'estimateur.

Cette erreur est assez importante pour qu'aucun contrôle ne soit raisonnablement appliqué. Et considérant que ce paramètre peut influencer la croissance des cellules végétales (Archambault, 1991), cette lacune devrait être corrigée dans une étude subséquente. Pour ces raisons, l'estimation obtenue du CO_2 dissous ne peut être utilisée qu'à titre indicatif du niveau de concentration compte tenue de son incertitude.

5.5 Oxygène dissous

L'oxygène dissous représente un des nutriments-clé pour la culture de cellules de plantes en suspension. En effet, une absence d'oxygène ou une concentration trop faible (Pépin, 1996) a pour effet de diminuer et même d'empêcher les différentes réactions métaboliques de la croissance cellulaire. Il est donc nécessaire d'assurer un apport constant de ce nutriment.

L'effet de différentes concentrations d'oxygène dissous sur la croissance de la biomasse et la prolifération cellulaire n'est pas étudié ici. Une concentration constante équivalente à 60 % de saturation de l'eau en air est utilisée considérant les résultats convenables obtenus précédemment (Aubry, 1995). Cette concentration d'opération est suffisamment supérieure à la concentration limitante (Archambault, 1991; Jolicoeur et coll., 1992) rapportée pour les cellules végétales, soit environ 15 % de la saturation de l'eau en air. Malgré absence de caractérisation de ce nutriment, quelques points sont abordés pour faire ressortir certaines observations.

De tous les nutriments nécessaires à la prolifération cellulaire, l'oxygène est certainement celui représentant le plus de difficultés à être fourni suffisamment pour combler la demande cellulaire (Taticek et coll., 1990). En effet, considérant sa faible solubilité dans le milieu liquide, l'oxygène doit continuellement être alimenté afin de combler les quantités consommées par les cellules et d'en assurer une disponibilité permanente.

5.5.1 Effets sur la biomasse

Aucun effet direct de la concentration constante d'oxygène dissous (60 % de saturation) sur la croissance de la biomasse n'est observé pour l'ensemble des cultures effectuées. Il est donc permis d'affirmer que cette concentration choisie est convenable. Toutefois, pour des raisons de productivité, l'impact de ce nutriment sur la croissance de la biomasse de cultures d'*Eschscholtzia californica* devrait être abordé dans une étude postérieure.

5.5.2 Effets sur la concentration cellulaire

En ce qui a trait à la concentration cellulaire, il semble que l'oxygène dissous ait un impact autre qu'un effet de concentration. En effet, comme il sera démontré ultérieurement, une variation de la concentration d'oxygène dissous provoquerait une diminution de la concentration cellulaire.

5.6 Hydrates de carbones

Les sucres (sucrose, glucose et fructose) sont utilisés comme seule source de carbone dans le milieu de culture. Les cellules s'en servent à la fois comme source d'énergie et comme source de précurseurs pour la synthèse organique dans le processus anabolique. Le carbone ainsi que l'oxygène tiré de ces sucres peuvent d'ailleurs représenter jusqu'à 90 % de la masse cellulaire (Pépin, 1996). Le sucrose contenu dans le milieu de culture subie tout d'abord une hydrolyse extracellulaire suivie

d'une consommation préférentielle non exclusive du glucose sur le fructose (Aubry, 1995).

Alors que les cellules en suspension de certaines espèces de plantes comme *Cathanranthus roseus* peuvent accumuler les hydrates de carbone sous forme d'amidon (Rho et coll., 1991; van Gulik et coll., 1992), les cellules d'*Eschscholtzia californica* (Taticek et coll., 1990) tout comme celles de *Nicotiana tabacum* (van Gulik et coll., 1992), de *Taxus cuspidata* (Fett-Neto et coll., 1994) et de *Vitis vinifera* (Pépin, 1996) ne peuvent réaliser une telle opération d'entreposage des sucres. En effet, ces dernières utilisent les hydrates de carbone au fur et à mesure qu'elles le nécessitent et ce dès leur entrée à l'intérieur de la cellule. Il en résulte donc un arrêt de croissance accompagné d'une mortalité cellulaire lorsqu'il y a pénurie de ce nutriment dans le milieu de culture.

5.6.1 Effets sur la biomasse

Ce phénomène est perceptible lors de certaines cultures dont 2SH10 effectuées au cours de la présente étude. Il est possible d'observer à la figure 5.1 qu'un peu avant 300 heures suivant le début de la culture, la biomasse sèche cesse de croître et même diminue alors que la quantité d'hydrates de carbones présents dans le milieu tend vers zéro. Ce même phénomène est observé au cours de la culture 5SH25 présenté à la figure 5.4. Un peu avant 350 heures de culture, la présence d'hydrates de carbone devient négligeable et à ce moment, la quantité de biomasse sèche cesse de

croître pour régresser. Dans l'ensemble, tant qu'il y a présence d'hydrates de carbone dans le milieu extracellulaire, la biomasse continue de croître mais à des rythmes variables et non reliés à la quantité résiduelle d'hydrates. Ceci confirme ce que rapportent Curtis et coll. (1991), soit que la concentration finale en biomasse est fonction de la quantité d'hydrates de carbone injectés dans le milieu de culture.

En somme, l'omniprésence d'hydrates de carbone dans le milieu de culture est requise pour assurer la croissance de la biomasse considérant que les cellules d'*Eschscholtzia californica* ne peuvent les accumuler à l'intérieur d'elles-même.

5.6.2 Effets sur la concentration cellulaire

La même relation n'est pas aussi évidente pour la concentration cellulaire. En effet, lors de la culture 2SH10, la concentration cellulaire cesse de croître environ au même moment que la disparition des hydrates de carbones, vers 300 heures de culture. Toutefois, au cours de la culture 5SH25, la concentration cellulaire cesse de croître (à environ 250 heures de culture) bien avant la disparition des hydrates de carbones du milieu vers 350 heures de cultures, ce qui peut aussi être associé à une limitation nutritionnelle d'une autre nature.

Il apparaît donc que les sucres sont essentiels à la viabilité cellulaire mais ne garantissent pas la continuité de la division cellulaire par leur présence dans le milieu de culture.

5.6.3 Rendements et taux d'assimilation

Lors de l'élaboration du modèle de croissance décrit au chapitre suivant, les coefficients de rendement des différents nutriments sont nécessaires. Ils sont donc calculés dans ce chapitre suite à l'étude spécifique de chacun des nutriments.

Les hydrates de carbones sont utilisés dès leur disparition du milieu de culture pour la création de matière organique. Comme démontré à la figure 5.8, la courbe de consommation de ce nutriment est du premier ordre, ce qui permet de calculer les rendements en sucre pour la biomasse ainsi que pour la concentration cellulaire. Les rendements calculés ici sont des rendements apparents du fait qu'on considère qu'une certaine quantité de nutriment consommée provoque une certaine augmentation nette du paramètre de croissance choisi, soit la biomasse sèche ou la concentration cellulaire. Ce genre de rendement est d'ailleurs largement utilisé dans la littérature pour une première caractérisation des suspensions cellulaires végétales (MacCarthy et coll, 1980; Taticek et coll, 1990; Rho et André, 1991; Westgate et coll, 1991; van Gulik et coll., 1993; Pépin, 1996).

Le rendement apparent est utilisé par opposition au rendement vrai, lequel défini la quantité exacte de nutriment nécessaire pour former une nouvelle quantité du paramètre de croissance choisi. Ce dernier type de rendement est toujours utilisé avec un coefficient de maintenance, lequel défini la quantité de nutriment nécessaire pour maintenir les activités métaboliques non-associés à la croissance d'une certaine quantité

du paramètre de croissance choisi. Le rendement vrai et le coefficient de maintenance sont aussi utilisés dans la littérature (Drapeau et coll., 1986; Schnapp et coll., 1991; van Gulik et coll., 1992), principallement lors d'une caractérisation très spécifique des cultures. En somme, le rendement réel ainsi que le coefficient de maintenance d'un nutriment forment implicitement le rendement apparent. Ce dernier comprend aussi les effets du système de culture et de l'environnement sur l'utilisation du nutriment à des fins de croissance cellulaire (Taticek et coll, 1990).

Le calcul du rendement apparent des hydrates de carbones pour la biomasse sèche ($Y_{S/BS}$) est effectué sur plus de 20 cultures séparément selon la pente obtenue à la figure 5.8.

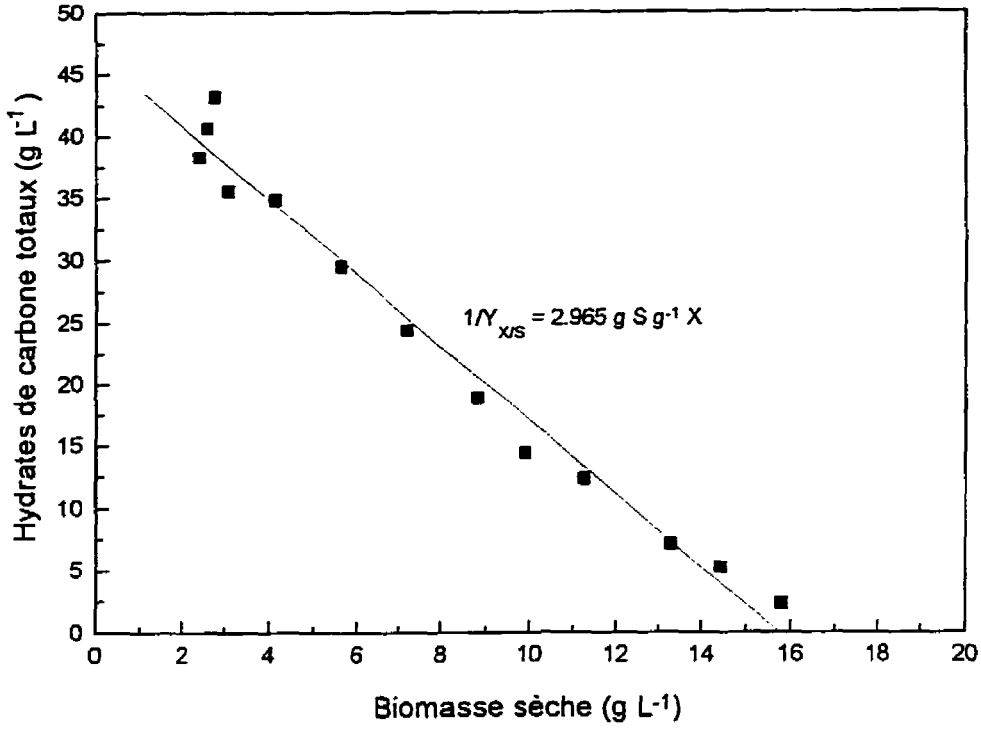


Figure 5.8 : **Calcul du rendement en hydrates de carbones par rapport à la biomasse pour la culture 5SH23**

Le résultat obtenu est de 0.36 gramme de biomasse sèche pour 1 gramme d'hydrates de carbones consommés. L'écart type sur cette valeur est de 0.13, ce qui représente un coefficient de variation (Baillargeon, 1990) de 35 %. Ce coefficient de variation permet d'apprécier la dispersion des valeurs autour de la moyenne arithmétique. Les coefficients de régressions linéaires obtenus varient de 0.4 à 0.99.

Ces variations s'expliquent par des pertes de sucres par le milieu de culture constituant ainsi un artefact à l'utilisation des hydrates de carbones pour la croissance en biomasse. En effet, lors d'un débit des gaz de bullage trop important, une partie des

sucres est expulsée du milieu formant ainsi une mousse à la surface du volume de culture. Afin de diminuer l'erreur sur le calcul de ce paramètre qui se répercutera sur l'estimation du modèle de croissance, les valeurs de rendement obtenues de cultures présentant une trop grande différence par rapport à l'ensemble sont retirées pour le calcul final du rendement moyen. Suite à cette opération, le rendement en sucres pour la biomasse retenu pour fins de modélisation et d'optimisation est de 0.31 gramme d'augmentation de biomasse par gramme de sucre consommé (n=15). L'écart-type calculé est de 0.05, ce qui représente un coefficient de variation de 17 %.

Le tableau 5.3 permet de comparer les résultats obtenus lors de cette étude avec ceux se trouvant dans la littérature pour diverses lignées cellulaires. Il apparait que le rendement obtenu (0.31 g X g^{-1} S) est du même ordre que ceux présentés dans la littérature. En effet, ceux présentés pour Eschscholtzia californica par Aubry (1995) varient entre 0.30 et 0.43 g X g^{-1} S. Toutefois, Taticek et coll. (1990) rapportent des rendement légèrement supérieurs (0.42 à 0.50 g X g^{-1} S) ce qui peut être causé par la configuration différente du bioréacteur et des conditions d'opération.

En ce qui a trait à la concentration cellulaire, le rendement apparent obtenu à partir de 12 cultures est de 0.15 x 10^9 ¢ g^{-1}. L'écart-type correspondant est de 0.13 x 10^9 ¢ g^{-1}, ce qui représente un coefficient de variation de 89 %. Pour les mêmes raisons que précédement, certains résultats sont exclus pour le calcul du rendement moyen. Suite à cette opération, le rendement final retenu est de

0.079×10^9 ¢ g^{-1} avec un écart-type de 0.015×10^9 ¢ g^{-1} soit un coefficient de variation de 19 %. Ces valeurs ne peuvent être comparées avec la littérature puisque aucune équipe de recherche n'a publié des résultats de rendement basés sur la concentration cellulaire.

Tableau 5.3 Rendements en hydrates de carbones pour la formation de biomasse sèche tirés de la littérature.

Rendement apparent ($g X g^{-1} S$)	Rendement réel ($g X g^{-1} S$)	Coefficient de maintenance ($g S g^{-1} X h^{-1}$)	Hydrate(s) de carbone	Espèce	Source
0.51			total	*Catharanthus roseus*	Ducos et Pareilleux (1986)
0.31-0.35			glucose	*Catharanthus roseus*	van Gulik et coll., (1989)
0.18-0.65			total	*Catharanthus roseus*	Archambault, (1991)
0.49			glucose	*Catharanthus roseus*	Rho et André, (1991)
0.36-0.44			total	*Catharanthus roseus*	Jolicoeur et coll., (1992)
	0.68	0.0081	glucose	*Catharanthus roseus*	van Gulik et coll., (1992)
0.28			glucose	*Cephalotaxus harringtonia*	Westgate et coll., (1991)
0.48			sucrose	*Claviceps purpurea*	Grm et Mele (1980)
0.17-0.39			total	*Daucus carota*	Dougall et coll., (1983)
0.41			total	*Dioscorea deltoidea*	Drapeau et coll., (1986)
0.32			sucrose	*Dioscorea deltoidea*	Frazier (1989)
0.42-0.50	0.69	0.002-0.008	total	*Eschscholtzia californica*	Taticek et coll., (1990)
0.30-0.43			sucrose	*Eschscholtzia californica*	Aubry, (1995)
0.43	0.77	0.0047	lactose	*Medicago sativa*	Pareilleux et Chaubet, (1981)
0.45			succrose	*Nicotiana tabacum*	Kato et coll., (1977)
0.44	0.6	0.0036	sucrose	*Nicotiana tabacum*	Kato et Nagai, (1979)
	0.52	0.106	sucrose	*Nicotiana tabacum*	Schnapp et coll. (1991)
	0.65	0.0061	glucose	*Nicotiana tabacum*	van Gulik et coll., (1993)
0.26-0.29			sucrose	*Papaver somniferum*	Curtis et coll. (1991)
0.47	0.57	0.0032	total	Pommes	Pareilleux et Chaubet, (1980)
	0.80	0.003-0.008	sucrose	*Vitis vinifera*	Guardiola et coll. (1995)
0.38			sucrose	*Vitis vinifera*	Pépin, (1996)

5.7 Phosphate

Le phosphate est présent dans le milieu de culture afin de subvenir aux besoins des cellules pour la synthèse de l'acide nucléique, de phospholipides, de nucléotides ainsi que de sucres phosphatés (Ashihara et Tokoro, 1985). De plus, il participe fortement au cycle énergétique lors de la synthèse de l'adénosine triphosphate (ATP) (Ashihara et Ukaji, 1986).

Ses principaux effets sont d'augmenter la disponibilité de l'adénosine triphosphate jusqu'à un seuil maximum, de provoquer une augmentation du taux de production de protéine par une baisse des réserves d'acides aminées et de provoquer une diminution de protéases (Payne et coll., 1991). Dans ce dernier cas, une augmentation des taux de consommation en oxygène est à prévoir (Pépin, 1996). De plus, la présence de phosphate tend à diminuer la production de métabolites secondaires comme le rapportent certains auteurs (Knobloch et coll., 1981; Mantell et coll., 1983; Bramble et coll., 1990; Panda et coll., 1992; van Gulik et coll., 1993) ou, dans le même ordre d'idée, une diminution de la concentration en phosphate permet d'augmenter la production de métabolites secondaires (Fujita et coll., 1981; Knobloch et coll., 1981; Mantell et coll., 1983; Yamakawa et coll., 1983; Hall et Yeoman, 1986; Knobloch et coll., 1986; Bramble et coll., 1990). Dans la même optique, Newell et Curtis (1989) rapportent que le meilleur moment pour induire la production de

métabolites secondaires est immédiatement à la disparition des ions phosphates dans le milieu.

Comme démontré aux figures 5.1 et 5.6, le phosphate est rapidement assimilé par les cellules, qu'elles soient en période de croissance ou de latence. Cette consommation rapide du phosphate rapportée dans la littérature (Brodelius et Vogel, 1985; Aubry, 1995; Pépin, 1996) est associée à un mécanisme d'entreposage de réserves phosphoriques. Une fraction de ces réserves est contenue dans le cytosol à concentration constante, environ 100 à 150 µmol g MS^{-1} selon Curtis et coll. (1991) et 0.38 µmol 10^9 $¢^{-1}$ selon Amino et coll. (1983). Le surplus accumulé se trouve alors emmagasiné dans la vacuole sous forme d'orthophosphate (Brodelius et Vogel, 1985).

La présence de ce nutriment dans le milieu semble avoir de nombreuses retombées. Curtis et coll. (1991) ont démontré que, pour leur système, le taux de croissance spécifique et la concentration finale de la biomasse pouvaient dépendre de la concentration initiale de phosphate dans le milieu de cultures en cuvées. De plus, considérant que les concentrations en phosphate sont faibles, les quantités de ce nutriment accumulées dans l'inoculum peuvent influencer la croissance et du même coup, les calculs de rendements. Certains auteurs ont d'ailleurs observé une croissance directement liée à une limitation nutritionnelle en phosphate (Dougall et Weyrauch, 1980; Grm et Mele, 1980; Quinlan, 1986; van Gulik et coll., 1993). En ce qui a trait à la concentration cellulaire, Hirose et coll. (1990) rapportent qu'une réduction de la

concentration initiale de phosphate à pour effet d'inhiber la division cellulaire, accompagnée d'une accumulation marquée de métabolites secondaires.

Dans le but de posséder un outil représentant l'accumulation de ce nutriment, une pseudo-concentration intracellulaire en phosphate, po_{4i}, est définie. Comme décrit dans le chapitre matériel et méthodes, cette pseudo-concentration permet d'estimer l'évolution des ions phosphates dans le temps, soit leur accumulation et leur utilisation. Pazoutova et coll. (1981) ont d'ailleurs observé une cinétique de croissance de la biomasse proportionnelle à la concentration intracellulaire en phosphate.

5.7.1 Effets sur la biomasse

La stratégie d'alimentation développée pour la culture 2SH22 consiste en des ajouts périodiques d'ions phosphate en quantité minimale. Cette stratégie permet d'étudier l'effet d'une diminution des concentrations et d'un apport supplémentaire en phosphate tout en vérifiant si la concentration de cet ion affecte la croissance en biomasse.

Les courbes résultantes de cette expérimentation sont présentées à la figure 5.2. Il est possible d'y observer que la concentration finale en biomasse n'atteint que 8 g L^{-1} pour une concentration initiale de plus de 3 g L^{-1} et ce, pour une présence normale en hydrates de carbones, 40 g L^{-1} lors de l'inoculation. Ce résultat est toutefois trompeur. En effet, après 200 heures de culture, moment où la croissance en

biomasse est interrompue de façon drastique, un manque de nitrates survient dans le milieu. L'impact du nitrate sur les cultures d'Eschscholtzia sera discuté dans une section ultérieure mais il est dès lors possible d'associer cette interruption de croissance à cette pénurie d'ions nitrate et non à une diminution de la concentration des ions phosphate.

Toutefois, comme le montre la figure 5.9, le taux de croissance effectif obtenu est supérieur à ceux observés en cultures en cuvée, soit 0.0075 h^{-1} comparé à 0.0066 h^{-1}. Cette augmentation de 14 % du taux de croissance effectif est très probablement causée par une diminution de la concentration des ions phosphate présents dans le milieu, puisque aucune autre modification n'est faite par rapport aux cultures normales. Curtis et coll. (1991) rapportent d'ailleurs des taux de croissance inversement proportionnels à la concentration initiale en phosphate dans des cultures en cuvée. En somme, la concentration des ions phosphate dans le milieu de culture semble nuire à la croissance de la biomasse sèche.

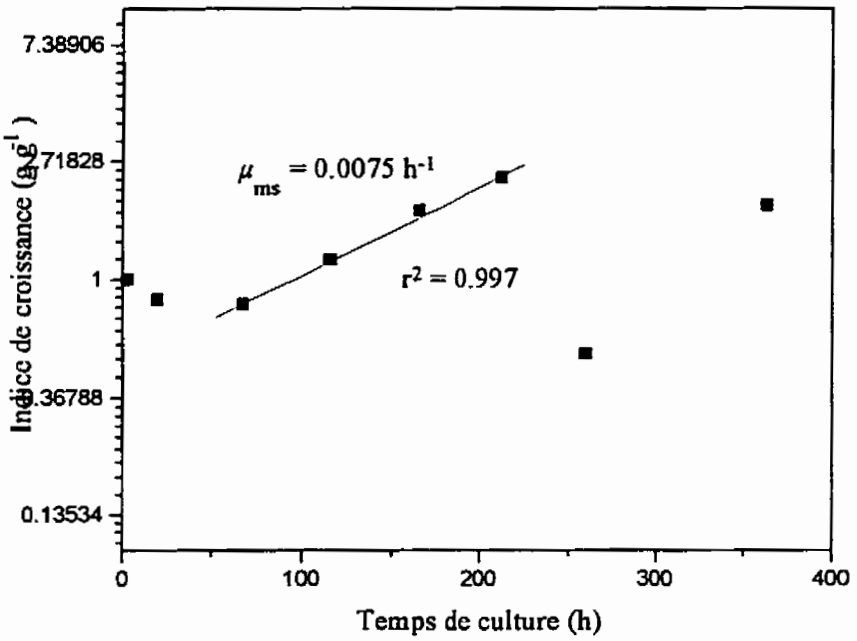


Figure 5.9 : Évolution de l'indice de croissance de la biomasse sèche lors de la culture 2SH22 en fonction du temps

5.7.2 Effets sur la concentration cellulaire

Lors de cette culture, 2SH22, alimentée en phosphate, la concentration cellulaire est passée de 1.5 x 10^9 ¢ L^{-1} à un peu plus de 3.0 x 10^9 ¢ L^{-1}. Considérant que cette concentration finale est à peu près la même que celles obtenues lors de cultures opérées en cuvée, soit 2.0 à 3.0 x 10^9 ¢ L^{-1}, il n'est pas possible d'identifier

d'impact, favorable ou non, causé par le phosphate sur le processus de division cellulaire.

Toutefois, en observant le taux de croissance effectif calculé pour cette culture à la figure 5.10, il apparaît qu'une présence étendue en phosphate ralentie le processus de division cellulaire de manière significative. En effet, le taux obtenu est de 0.0041 h^{-1} alors qu'il est de 0.0051 h^{-1} pour des cultures normales, soit une diminution de 20 %. En somme, une présence plus fréquente de l'ion phosphate ralentie la croissance cellulaire pour les cellules d'*Eschscholtzia californica*.

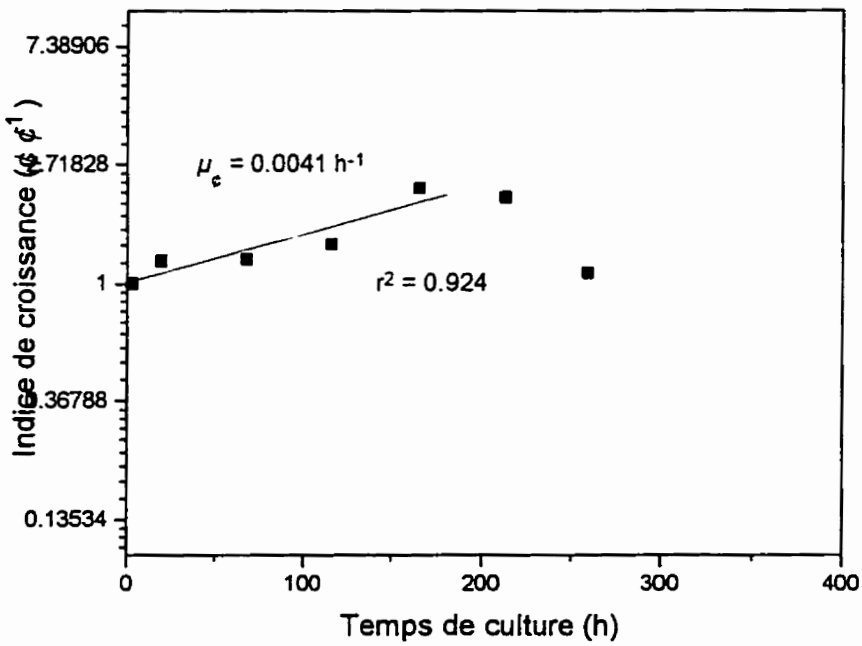


Figure 5.10 : Évolution de l'indice de croissance de la concentration cellulaire lors de la culture 2SH22 en fonction du temps

5.7.3 Rendements et taux d'assimilation

Considérant que le phosphate est dans un premier temps absorbé par les cellules et que, dans un deuxième temps, il est utilisé par celles-ci, un taux d'assimilation doit tout d'abord être calculé ainsi qu'un rendement à la consommation.

L'absorption de cet ion par les cellules est faite selon un certain potentiel d'assimilation. Considérant que la cellule absorbe ce nutriment par sa membrane cellulaire et que ce dernier est entreposé dans la vacuole cellulaire, il est réaliste de prétendre que cette assimilation est faite proportionnellement à la quantité de biomasse présente. Selon ce raisonnement, une quantité donnée de biomasse (g) peut assimiler l'ion phosphate à un certain rythme (mmol h^{-1}), et le rythme global est augmenté proportionnellement à la quantité de biomasse présente. Le taux global d'assimilation du phosphate, qui demeure constant (Sakano, 1990), est alors calculé en mmol PO_4 h^{-1} g^{-1} X.

Suite aux calculs effectués sur 15 cultures, le taux global d'assimilation du phosphate par la biomasse est de 0.0036 mmol g^{-1} h^{-1}. L'écart-type obtenu est de 0.0024, ce qui représente un coefficient de variation de 67 %. Cette forte variation est principalement due à la petitesse des taux en présence et donc, à une plus grande difficulté d'identification. De plus, elle peut être expliquée par une absence de mesure réelle de la concentration intracellulaire en phosphate, ce qui peut influencer le taux d'assimilation selon un effet de saturation. Afin d'améliorer la fiabilité du paramètre,

les résultats présentant une moins bonne description de la consommation de ce nutriment dans leurs cultures sont retirés. Suite à cette procédure, les valeurs enlevées étant aussi celles s'éloignant généralement de la moyenne obtenue, un taux d'assimilation du phosphate de 0.0030 mmol g^{-1} h^{-1} est obtenu avec un écart-type de 0.0015 représentant un coefficient de variation de 50 %. Malgré cette variation encore assez forte, le profil estimé de la concentration extracellulaire du phosphate décrit la consommation de ce nutriment avec l'utilisation de cette valeur comme paramètre du taux de consommation.

Suite à cette assimilation, le phosphate est utilisé par la cellule pour synthèse de la biomasse. Afin de calculer des pseudo-rendements à la consommation du phosphate nécéssaires lors de la modélisation, une hypothèse de consommation est ici formulée. Il s'agit de poser que l'ion phosphate est limitant à la prolifération cellulaire ce qui permet de supposer que sa concentration intracellulaire rapportée au volume de culture devient nulle au moment où la concentration cellulaire plafonne. En se basant sur cette hypothèse, le rendement en biomasse sèche est calculé par différentiels, soit le rapport de la quantité totale d'ion ajouté au milieu de culture par la différence de biomasse sèche entre le moment où la concentration cellulaire atteint son maximum et l'inoculation. Cette relation est représentée par l'équation qui suit.

$$Y_{X/PO_{4i}} = \frac{\left(X|_{t_{max}} - X|_{t=0}\right)}{\Sigma PO_{4e}} \tag{5.4}$$

Suite au calcul des rendements pour chaque culture et à l'observation des courbes de concentration de phosphate intracellulaire, il sera possible de valider ou infirmer cette hypothèse. En effet, si les courbes de concentration intracellulaire en phosphate résultantes prédisent l'atteinte d'une concentration nulle coïncidant avec un arrêt de la prolifération cellulaire, cette hypothèse de limitation nutritionnelle à la prolifération cellulaire pourra être admise. Toutefois, en reprenant les résultats obtenus lors de la culture 2SH22, il est peu probable que ce phénomène se produise.

En effectuant ce calcul sur près de 20 cultures, un rendement moyen de 4.86 g $mmol^{-1}$ est obtenu avec un écart-type de 1.55 représentant un coefficient de variation de 32 %. Cette variation peut s'expliquer par une série d'expérience, dans les premières cultures, où la concentration initiale en phosphate est toujours la même, ce qui peut causer un artefact lors de l'analyse de ce résultat. En outre, le calcium précipitant les ions phosphate (Bramble et Graves, 1991), il est possible de croire que moins la quantité de phosphate présente est importante, plus cette erreur est amplifiée. C'est le cas pour une seule culture sur l'ensemble de celle étudiées. Cette erreur n'est donc pas nécessairement représentée ici. De plus, Dougall et coll. (1983) rapportent que les rendements en nutriments, entre autres en phosphate, varient en fonction des taux de dilution pour des cultures opérées en semi-continu. Toutefois, ce phénomène n'est pas étudié dans le cadre de ce projet. Encore dans ce cas-ci, l'élimination des résultat moins fiables (les plus divergeant) permet de déterminer un rendement de 4.07

g X $mmol^{-1}$ PO_4 avec un écart-type de 0.89 représentant un coefficient de variation réduit à 22 %.

Des rendements en phosphate pour différentes espèces sont présentés au tableau 5.4 à titre de comparaison. Il apparait alors que le rendement calculé dans la présente étude est du même ordre que ceux présentés dans la littérature (1.35 à 12.39 g X $mmol^{-1}$ PO_4). Toutefois, aucune étude n'est effectuée avec l'espèce utilisée ici, *Eschscholtzia californica*. Il apparait tout de même que le rendement calculé est plausible.

Le rendement désiré sur une base de concentration cellulaire est calculé de manière semblable, soit le rapport de la quantité totale d'ions ajoutés au milieu de culture par la différence de concentration cellulaire entre le maximum et l'inoculation, représenté par l'équation qui suit.

$$Y_{¢/PO_{4i}} = \frac{\left(¢|_{t_{max}} - ¢|_{t=0}\right)}{\Sigma PO_{4e}} \tag{5.5}$$

Calculé sur 8 cultures, le rendement moyen obtenu est de 1.69 x 10^9 ¢ $mmol^{-1}$ avec un écart-type de 1.55, soit un coefficient de variation de 92 %. Cette très grande variation peut être causé par une prolifération cellulaire indépendante de la quantité de phosphate utilisé. En outre, comme spécifié précédemment, la présence de phosphate intracellulaire dans l'inoculum n'est pas à

négliger considérant les faibles concentrations en présence. Toutefois, une filtration des données est effectuée et le rendement final obtenu est de 1.07×10^9 ¢ $mmol^{-1}$ (n=6) avec un écart-type de 0.39 et un coefficient de variation de 36 %.

Tableau 5.4 Rendements en phosphate pour la formation de biomasse sèche tirés de la littérature.

Rendement apparent ($g \times mmol^{-1}$ PO_4)	Rendement réel ($g \times mmol^{-1}$ PO_4)	Coefficient de maintenance ($mmol$ PO_4 $g^{-1} \times h^{-1}$)	Espèce	Source
2.84			Banane	Curtis et coll., (1991)
4.21			Bindweed	Curtis et coll., (1991)
12.39			*Claviceps purpurea*	Pazoutova et coll., (1981)
3.37 à 8.00			*Daucus carota*	Dougall et Weyrauch (1980)
	3.10 à 4.74	0.004	*Daucus carota*	Dougall et coll.., (1983)
2.50			*Daucus carota*	Curtis et coll., (1991)
3.24			Millet	Curtis et coll., (1991)
1.35			*Nicotiana tabacum*	Curtis et coll., (1991)
3.00			*Papaver somniferum*	Curtis et coll., (1991)
2.24			Pomme de terre	Curtis et coll., (1991)

5.8 Sels azotés

Lors de la croissance de cellules végétales en suspension, une certaine quantité d'azote doit leur être fourni. La cellule végétale nécessite en effet une ou plusieurs sources d'azote pour la synthèse d'acides aminées et nucléiques ainsi que de protéines. Dans certains cas (van Gulik, 1993), plus de 90 % de l'azote consommé par la cellule sert à la formation de protéines.

Cette demande en azote est comblée par l'ajout d'ions nitrate et ammonium dans le milieu de culture. Ces deux ions sont utilisés par les cellules lors de leur croissance comme le démontrent les cultures 2SH10 et 5SH25 présentées aux figures 5.1 et 5.4. Toutefois, la présence d'ion ammonium (NH_4) supprime ou inhibe l'action de la nitrite réductase (Rose et coll., 1975), ce qui peut expliquer une consommation des nitrates plus faible ou nulle, rapportée dans certaines publications dont Pépin (1996), en présence d'ion ammonium. De plus, l'ammoniaque, de forme plus réduite que le nitrate, est utilisé préférentiellement à ce dernier étant directement utilisable.

Par ailleurs certains auteurs (Jessup et Fowler, 1976; Yamakawa et coll., 1983; Do et Cormier, 1991; Crawford, 1995; Su, 1995) rapportent que l'impact du ratio ammonium - nitrate présent dans le milieu de culture est aussi très important par rapport aux taux spécifiques de croissance et de production de métabolites secondaires pour certaines espèces. Par contre, certaines cultures acclimatées peuvent croître en absence de l'un ou l'autre de ces deux sels si toutefois l'autre est présent en quantité

suffisante pour soutenir les taux de croissance résultants. Fait intéressant, Payne et coll. (1991) suggèrent que l'utilisation d'une source d'azote organique puisse améliorer significativement la croissance de la biomasse et peut-être même la production de métabolites secondaires.

5.8.1 Nitrate

Le nitrate est utilisé comme source majeure d'azote pour les cellules végétales. C'est de loin le nutriment, hydrates de carbone mis à part, présent en plus grande quantité dans la composition du milieu de culture utilisé (annexe A). Lors de son assimilation par la cellule, il doit tout d'abord être réduit en ammonium sous l'action de la nitrate réductase et de la nitrite réductase (Payne et coll., 1991). Dès lors, il peut être utilisé pour la formation d'acides aminées et de protéines.

5.8.1.1 Effets sur la biomasse

Deux cultures (5SH23 et 5SH25) sont réalisées dans le but précis de déterminer l'influence du nitrate sur la croissance des cellules d'*Eschscholtzia californica*. Les résultats obtenus de celles-ci sont présentés aux figures 5.3 et 5.4 respectivement.

En observant les résultats de la première série de cultures effectuées (2SH2 à 5SH21), il apparaît que l'ion nitrate est essentiel au maintien d'une croissance de la biomasse mais possiblement à la fois nuisible à cette croissance si présent en trop

grande quantité. Cette présomption de nécessité est d'ailleurs confirmée par quelques cultures réalisées subséquemment. En effet, comme le démontre la figure 5.2 représentant les résultats de la culture 2SH22, le nitrate est épuisé après 200 heures de culture. À ce moment, quoiqu'il y ait encore assez d'hydrates de carbone (20 g L^{-1}) pour soutenir une croissance de la biomasse, elle cesse de croître et régresse même. Ce résultat démontre qu'un manque de nitrate dans le milieu de culture provoque la fin de la période de croissance en biomasse. Ce même phénomène est observable lors de la culture 2SH24 (figure 5.5) où la biomasse cesse de croître après 250 heures de culture, moment où un manque de nitrate dans le milieu de culture est observé. Toutefois, il reste à démystifier l'effet de la concentration de ce nutriment dans le milieu.

Dans cette optique, la stratégie développée pour la culture 5SH23 est d'ajouter de petites quantités de nitrate de manière à ce qu'il y en ait toujours et en quantité minimale ($no_3 \rightarrow 0^+$), afin de soutenir la croissance pour les 24 heures suivantes sans plus. Les courbes de croissance obtenues sont présentées à la figure 5.3. Après une courte période de latence (~50 heures), une croissance normale et continue de la biomasse a lieu jusqu'à l'épuisement des hydrates de carbone et du nitrate vers 300 heures de culture. Comme indiqué à la figure 5.11 cette stratégie a pour effet d'augmenter le taux de croissance effectif à 0.0079 h^{-1}, comparé à 0.0066 h^{-1} pour une culture type, ce qui représente un accroissement de 20 %. Il apparaît donc qu'effectivement une diminution de la concentration de nitrate dans le milieu entraîne une augmentation du taux de croissance de biomasse.

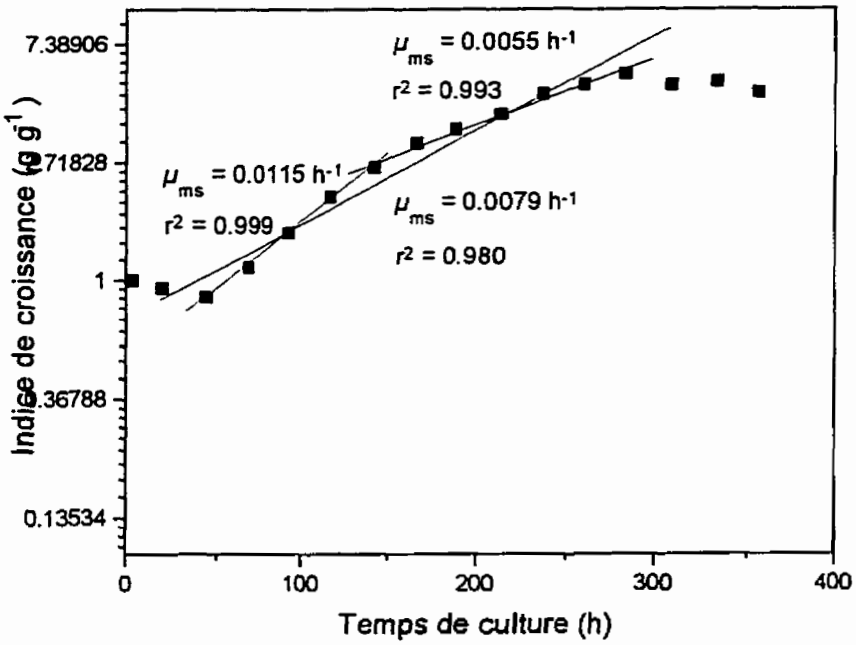


Figure 5.11 : Évolution de l'indice de croissance de la biomasse sèche lors de la culture 5SH23 en fonction du temps

Afin de vérifier ce résultat, la culture 5SH25 est effectuée avec la même stratégie d'alimentation ($no_3 \rightarrow 0^+$). Toutefois, une présence accrue mais différée du nitrate dans le milieu permet d'étudier le même phénomène que lors de l'expérience précédente (5SH23, figure 5.3) mais de façon inverse.

La concentration de nitrate est relativement élevée dans le milieu de culture jusqu'à ~150 heures, ce qui correspond approximativement à la période de latence observée en début de culture. De plus, le taux de croissance effectif obtenu, 0.0067 h^{-1}, bien inférieur à celui résultant de l'expérience précédente, n'est pas significativement

plus élevé que ceux obtenus pour des cultures types en cuvée. Contrairement aux observations faites à partir d'autres cultures, à environ 250 heures de culture, la concentration en biomasse sèche continue d'augmenter pour quelques 100 heures. Ce phénomène n'est observé uniquement que pour cette culture. Il est probable qu'une partie des nitrates accumulés dans les cellules d'*Eschscholtzia californica*, soient utilisés suite à leur pénurie dans le milieu de culture extracellulaire.

En somme, la présence de nitrate dans le milieu de culture nuit à la croissance de la biomasse. Toutefois, de façon générale, le nitrate est nécessaire à la croissance de la biomasse.

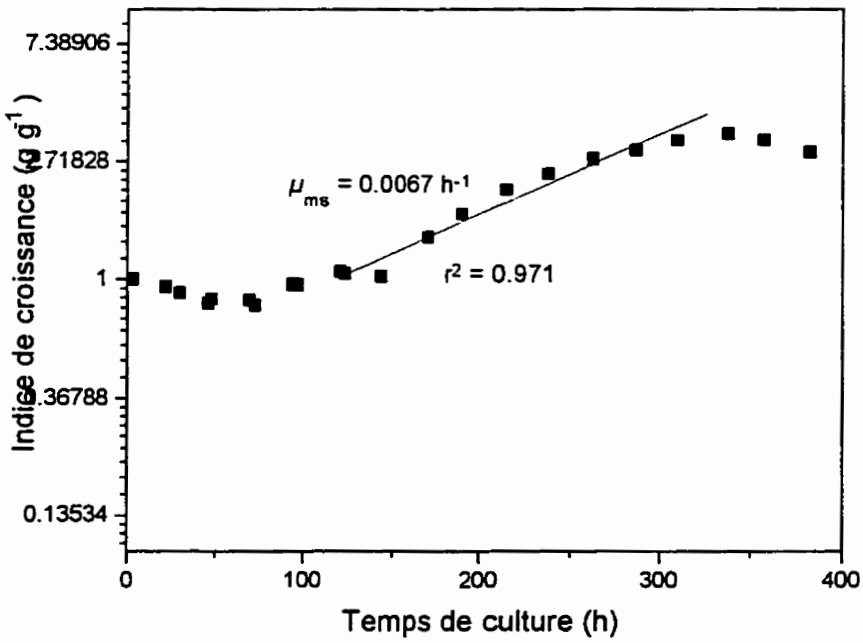


Figure 5.12 : Évolution de l'indice de croissance de la biomasse sèche lors de la culture 5SH25 en fonction du temps

5.8.1.2 Effets sur la concentration cellulaire

Lors de la culture à faible concentration en nitrate, 5SH23, la concentration cellulaire est passée de 0.9 x 10^9 ¢ L^{-1} à plus de 8.5 x 10^9 ¢ L^{-1}, ce qui représente près du triple de la concentration normalement atteinte en culture opérée en cuvée. Ce résultat est assez surprenant à prime abord puisque la seule différence majeure de cette culture est de diminuer la concentration du nitrate dans le milieu. Par contre, Henshaw et coll. (1966) rapportent que la production totale de cellules est augmentée par l'ajout de nitrate plus que par l'ajout de n'importe quel autre ion inorganique dans les suspensions de *Parthenocissus tricuspidata*. Toutefois, en calculant la somme des ajouts effectués, on arrive à une quantité totale de nitrate injecté de 25 mmol NO_3 L^{-1}, ce qui est la concentration normale du milieu $1_{.2}K_{.1}B_5$ standard. Ce n'est donc pas un effet de limitation nutritionnel qui permet une telle augmentation.

Lors de la culture réalisée à haute concentration en nitrate, 5SH25, la concentration cellulaire est passée de 1.2 x 10^9 ¢ L^{-1} à plus de 6.0 x 10^9 ¢ L^{-1}. Cette concentration représente plus du double de la concentration cellulaire normalement atteinte. Cette fois-ci, la somme des ajouts effectués avoisine 40 mmol NO_3 L^{-1} et la concentration cellulaire atteinte est inférieure à celle obtenue lors de la culture précédente, avec un total de 25 mmol NO_3 L^{-1}. Ce résultat confirme donc que l'effet

du nitrate sur la division cellulaire peut être associé à un effet de concentration plutôt qu'à un effet de limitation nutritionnel.

De plus, le taux de croissance effectif obtenu lors de la culture à haute concentration en nitrate différée, 5SH25, est légèrement supérieur au taux normal (0.0067 h^{-1} comparé à 0.0051 h^{-1}) alors que celui à faible concentration en nitrate l'est un peu plus (0.0083 h^{-1}).

En somme, la présence de nitrate nuit grandement à la division cellulaire selon un effet de concentration et non de limitation nutritionnelle.

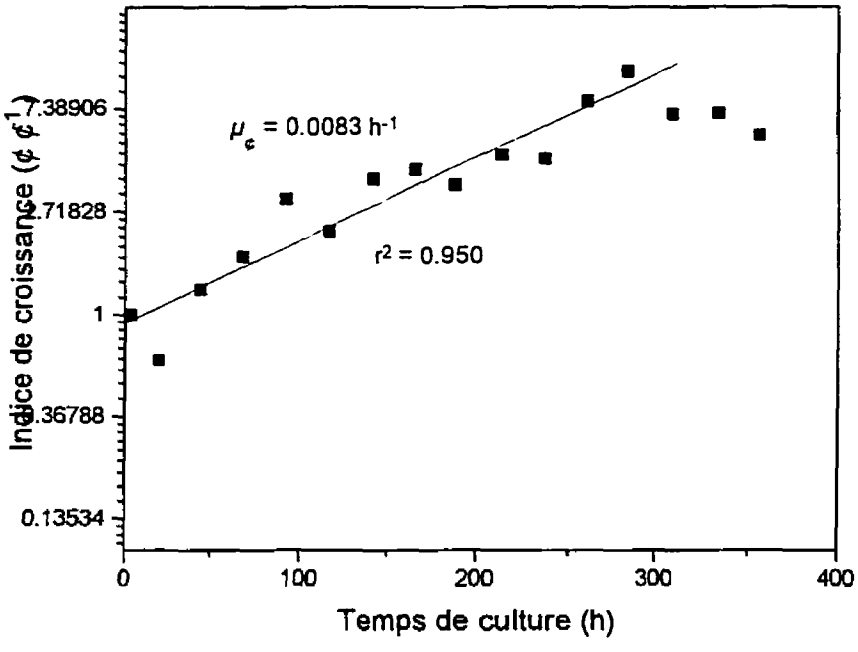


Figure 5.13 : Évolution de l'indice de croissance de la concentration cellulaire lors de la culture 5SH23 en fonction du temps

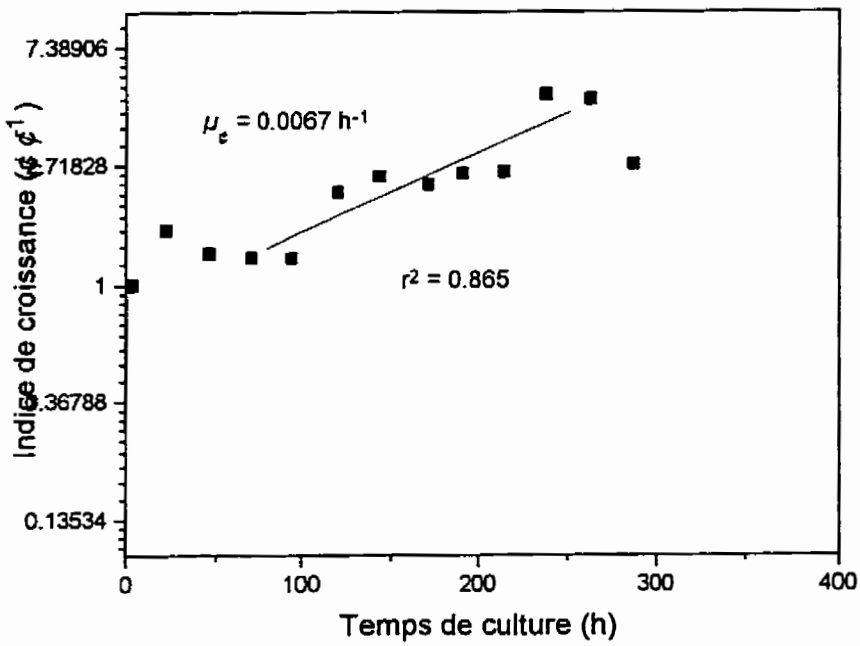


Figure 5.14 : **Évolution de l'indice de croissance de la concentration cellulaire lors de la culture 5SH25 en fonction du temps**

5.8.1.3 Rendements et taux d'assimilation

Deux tendances ressortent des résultats obtenus des cultures réalisées jusqu'à maintenant. La tendance générale laisse envisager une consommation du nitrate proportionnelle à l'accroissement de la biomasse, comme c'est le cas pour les hydrates de carbone qui sont utilisés au fur et à mesure de leur consommation. Ce comportement est représenté par un rendement direct à la croissance. Il est d'ailleurs possible que ce nutriment (NO_3) soit à la fois utilisé et entreposé par la cellule dans la vacuole sous forme d'acides aminés (Beck et Renner, 1989) alors que la relation le décrivant soit du premier ordre comme un rendement à la croissance.

Pour ces raisons, l'hypothèse selon laquelle la consommation du nitrate par la cellule est proportionnelle à la croissance de la biomasse est adoptée pour la présente étude. Cette hypothèse permet de diminuer la complexité mathématique du phénomène d'assimilation de ce nutriment par une description selon une courbe de premier ordre et d'en calculer un rendement apparent directement.

Le rendement en biomasse sèche obtenu, calculé sur près de 20 cultures, est de 0.47 g X $mmol^{-1}$ NO_3. L'écart-type résultant de cette opération est de 0.22 ce qui représente un coefficient de variation de 46 %. Suite à l'élimination des résultats discordants, la valeur obtenue est de 0.41 g X $mmol^{-1}$ NO_3 avec un écart-type de 0.14 représentant un coefficient de variation de 35 %. La variation obtenue s'explique par la description mathématique adoptée précédemment. En choisissant l'option d'un

rendement apparent, il est normal de diminuer la fiabilité de la description pour une augmentation de la simplicité mathématique. Ce rendement est d'ailleurs largement supérieur à celui présenté par Rho et André (1991) pour *Catharanthus roseus* de 0.23 g X $mmol^{-1}$ NO_3.

En ce qui a trait à la concentration cellulaire, le rendement obtenu est de 0.15 x 10^9 ¢ $mmol^{-1}$ NO_3 calculé sur 12 cultures. L'écart-type correspondant est de 0.07 avec un coefficient de variation de 49 %. Une fois les résultats à haute variabilité enlevés, le rendement retenu est de 0.13 x 10^9 ¢ $mmol^{-1}$ avec un écart-type de 0.04, ce qui représente un coefficient de variation de 33 %.

5.8.2 Ammoniaque

L'ion ammonium (NH_4) est aussi utilisé comme source d'azote pour les cellules. Ce dernier est assimilé par l'entremise de deux systèmes enzymatiques, soit la glutamate déshydrogénase et la glutamate synthétase (Ohmori, 1981; Payne et coll., 1991). Par ce processus, l'ion ammonium est transformé en glutamine par la cellule.

Il est possible d'observer aux figures 5.1 à 5.6 que l'ion ammonium disparaît rapidement du milieu et ce, peu importe qu'il y ait croissance de la biomasse ou non. D'ailleurs, dans les heures qui suivent l'inoculation, où une phase de latence et même quelquefois de décroissance est observée, l'ion ammonium est toujours absorbé par les cellules dès son apparition dans le milieu. Ce phénomène concorde avec ceux observés sur des graphiques présentés par Aubry (1996) et Pépin (1996). De plus, une

fois l'ion ammonium disparu, la croissance cellulaire se poursuit pendant plusieurs heures.

Le processus d'assimilation expliqué précédemment laisse croire que cet ion est dans un premier temps absorbé et fixé par la cellule sur des sites glutaminiques servant de transporteurs actifs. Dès lors, l'ion fixé est utilisé à partir de ces réserves intracellulaires pour la formation de composés cellulaires donc, pour la croissance. Afin de permettre une meilleure description des phénomènes en cause, une pseudo-concentration intracellulaire de l'ion d'ammonium est définie : nh_{4i} par opposition à nh_{4e}, la concentration d'ammoniaque extracellulaire.

5.8.2.1 Effets sur la biomasse

Lors des cultures 2SH24 et 2SH26 présentées aux figures 5.5 et 5.6, des ajouts périodiques de l'ion ammonium sont réalisés. Lors de la culture 2SH24, la stratégie choisie est d'alimenter l'ion ammonium de manière à ce qu'il soit toujours présent dans le milieu de culture mais en quantité minimale ($nh_{4e} \rightarrow 0^{+}$). Cette culture permet d'étudier l'effet de la présence et de l'augmentation de la disponibilité de cet ion sur la croissance cellulaire.

Alors que la biomasse passe généralement de 2 à 12 g L^{-1} dans une culture en cuvée normale sans ajouts (Aubry, 1995), elle n'atteint que 8 g L^{-1} pour une concentration de 3.5 g L^{-1} lors de l'inoculation et une concentration suffisante de 40 g L^{-1} en hydrates de carbone. Il est à noter qu'à 250 heures suivant l'inoculation,

un manque en nitrate survient. Comme spécifié précédemment, de manière générale la croissance en biomasse est arrêtée par un manque en nitrate dans le milieu de culture. Toutefois, comme le démontrent les figures 5.5 et 5.15, un phénomène de ralentissement de la croissance de la biomasse est observé dans ce cas-ci.

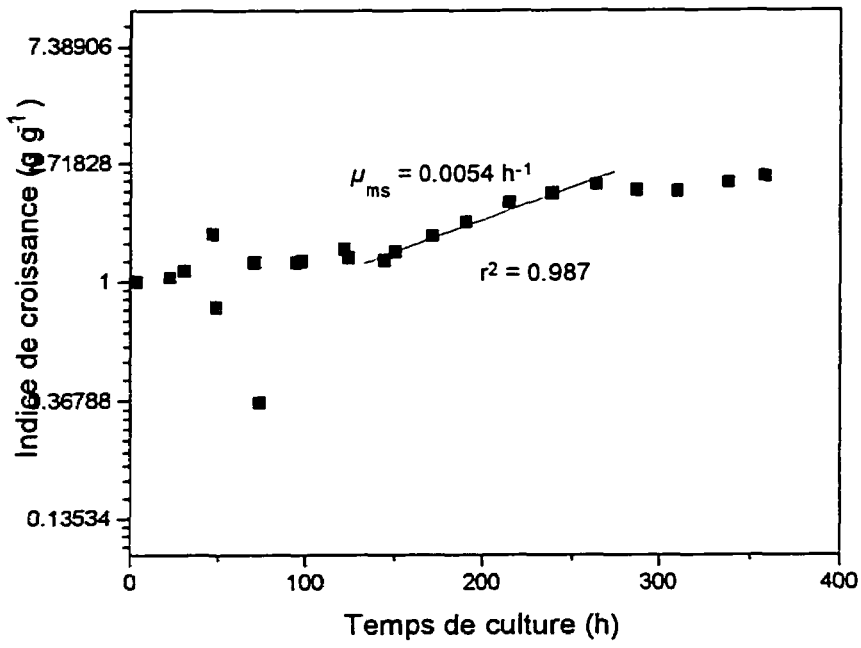


Figure 5.15 : Évolution de l'indice de croissance de la biomasse sèche lors de la culture 2SH24 en fonction du temps

Le taux de croissance effectif observé est de 0.0054 h^{-1} alors qu'il est de 0.0066 h^{-1} pour des cultures standards opérées en cuvée. Ce ralentissement de croissance ne peut être provoqué que par les ajouts périodiques de l'ion d'ammonium et par son omniprésence dans le milieu de culture. Il est donc possible de formuler l'hypothèse,

selon cette culture, que la présence d'ion ammonium dans le milieu de culture nuit à la croissance de la biomasse des cellules végétales.

Afin de vérifier l'effet d'un apport supérieur d'ammoniaque sur la croissance de la biomasse sans le biaisement de l'effet d'omniprésence, la culture 2SH26 est réalisée. Dans ce cas-ci, la stratégie d'alimentation, basé sur le schème d'assimilation et d'utilisation proposé, est de permettre une disponibilité permanente de l'ammoniaque pour la croissance cellulaire sans toutefois maintenir cet ion omniprésent dans le milieu ($nh_{4e} \rightarrow 0$, $nh_{4i} > 0.2$ mmol L^{-1}). La prédiction de la concentration intracellulaire de l'ammoniaque est réalisée selon la technique présentée dans la section matériel et méthodes et se doit d'être supérieure à 0.2 mmol L^{-1} en tout temps, concentration fixée arbitrairement selon les observations précédentes.

Lors de la préparation du concentré de milieu de culture, une erreur s'est glissée. En effet la quantité d'ions ammonium présente dans le concentré devait être telle qu'elle permettait une concentration d'ion ammonium intracellulaire toujours positive pour les 24 premières heures de culture sans plus. Toutefois, la quantité présente à l'inoculation est équivalente à celle habituellement utilisée pour des cultures cuvées. Ceci a pour simple effet de provoquer une présence d'ions ammonium dans le milieu supérieure à celle désirée mais habituelle.

Lors de cette culture, la biomasse sèche est passée de 2 à 10 g L^{-1}, ce qui est à peine inférieure aux cultures normales en cuvée (2 à 12 g L^{-1}) pour des concentrations en hydrates de carbones normales (35 g L^{-1}). Comparativement à ces dernières, lors de la culture à l'étude, 2SH26, quelques ajouts subséquents d'ions ammonium sont effectués. Ceci semble induire un léger ralentissement de la croissance de la biomasse et donc, tend à confirmer l'hypothèse émise précédemment, lors de l'étude de la culture 2SH24, selon laquelle la présence d'ions ammonium extracellulaire nuit à la croissance de la biomasse. Toutefois, étant donné que la présence extracellulaire de l'ion ammonium est moindre que lors de la culture précédente, l'impact sur la croissance est minime comme le montrent les figures 5.6 et 5.16 où un taux de croissance effectif de 0.0066 h^{-1} équivalent aux cultures opérées en cuvée est observé.

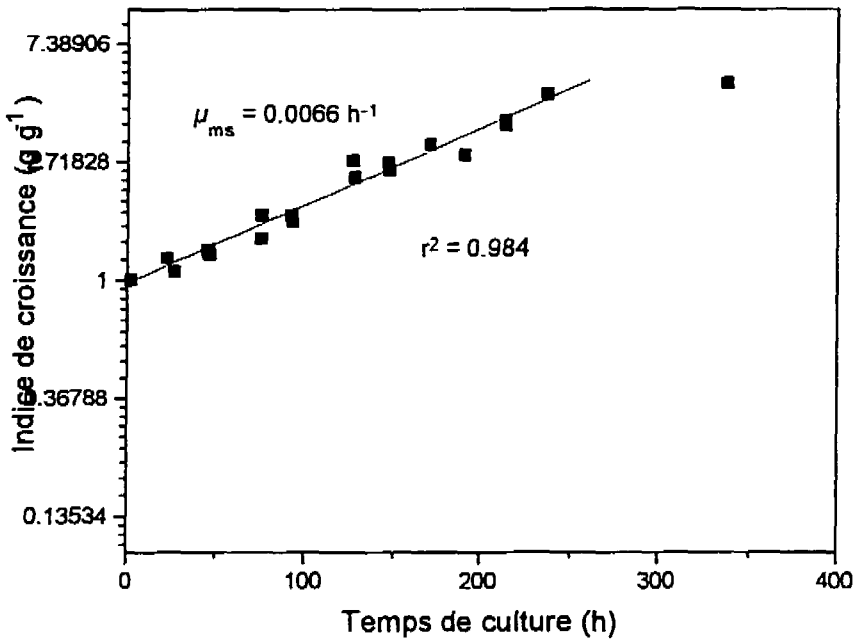


Figure 5.16 : Évolution de l'indice de croissance de la biomasse sèche lors de la culture 2SH26 en fonction du temps

Dans ce cas-ci, contrairement aux observations effectuées lors de l'étude de la culture 2SH24, aucune fluctuation majeure des nutriments est observée lors des ajouts d'ions ammonium. Toutefois, en comparant les quantités ajoutées, on s'aperçoit qu'elles étaient supérieures lors de la culture précédente (0.5 - 2 mmol L^{-1}) que lors de celle-ci (0.5 - 1.1 mmol L^{-1}). De plus, lors des ajouts effectués au cours de la culture 2SH24, les concentrations en ions ammonium sont très faibles ou inexistantes (nh4e → 0) ce qui provoque un différentiel soudain et appréciable de cet ion. Par contre, lors

des ajouts d'ions ammonium effectués au cours de la culture 2SH26, une quantité assez importante de cet ion est déjà présente dans le milieu de culture ce qui minimise l'impact d'un léger ajout. De plus, les deux dernières additions de nutriments lors de cette culture sont minimes et donc probablement sans effet de ce genre.

En somme, la présence d'ion ammonium dans le milieu de culture semble ralentir la croissance de la biomasse sèche de façon assez significative pour qu'il en soit tenu compte lors d'une modélisation subséquente.

5.8.2.2 Effets sur la concentration cellulaire

Lors de la première culture effectuée avec une alimentation d'ion ammonium ($nh_{4e} \rightarrow 0^{+}$), la concentration cellulaire est passée de 1.5×10^{9} ¢ L^{-1} à près de 5.0×10^{9} ¢ L^{-1}, ce qui représente le double de la concentration cellulaire habituellement obtenue pour des cultures opérées en cuvée, 2.0 à 3.0×10^{9} ¢ L^{-1} (résultats non publiés).

Considérant que la seule différence entre cette culture et celles effectuées précédemment est un apport supplémentaire d'ions ammonium, la concentration cellulaire obtenue permet de supposer que cette dernière est fortement liée à la présence de cet ion et qu'en condition normale d'opération (milieu de culture B5), l'ion ammonium est limitant à la division cellulaire. Toutefois, aucun effet positif ou négatif de l'omniprésence de cet ion dans le milieu de culture ne peut être observé sur l'ensemble de la culture dans ce cas-ci. Par contre, il semble qu'une série d'ajouts

serrés en début de culture à de faibles concentrations induisent une forte croissance cellulaire dans les heures qui suivent comme le démontre la figure 5.5

Ce phénomène peut être associé à l'augmentation de concentration intracellulaire en ammonium, concentration qui pourrait atteindre un seuil où l'utilisation pour la division cellulaire est significativement accrue. Considérant donc l'hypothèse selon laquelle l'ion ammonium est assimilé rapidement et fixé à des transporteurs actifs par la cellule, il apparaît donc que ce dernier doit être présent en quantité suffisante à l'intérieur de la cellule mais non nécessairement à l'extérieur de celle-ci. La deuxième stratégie d'alimentation de l'ion ammonium développée convient donc à ce raisonnement.

Lors de la culture 2SH26, la concentration cellulaire passe de 2×10^9 ¢ L^{-1} à près de 9×10^9 ¢ L^{-1}. Ceci peut s'expliquer par le fait que la grande quantité de l'ion ammonium extracellulaire présente dans le milieu de culture a pour effet de provoquer une augmentation rapide de la concentration intracellulaire de cet ion comme le montre la figure 5.6. En effet, une grande quantité de cet ion à l'inoculum a pour effet de faire augmenter la concentration intracellulaire à près de 5 mM, concentration modélisée, rapportée au volume total de culture. Cette concentration est supérieure à celle de 3 mM obtenue avec la culture précédente (figure 5.5). Les deux ajouts suivant l'épuisement de l'ion ammonium dans le milieu de culture permettent alors de maintenir

la concentration intracellulaire à un niveau quasi-constant pour approximativement une quarantaine d'heures.

Par la suite, comme les ajouts cessent, la concentration intracellulaire diminue jusqu'à un épuisement total. Cet épuisement concorde avec l'obtention d'un plateau de la concentration cellulaire à quelques heures près. Ce résultat tend à valider l'hypothèse selon laquelle l'ion ammonium contrôle la prolifération cellulaire dans le système employé en raison de son effet limitant à la division cellulaire.

Lors de la culture précédente (2SH24), un résultat si convainquant n'est pas obtenu dû au fait que le modèle utilisé pour déterminer la concentration intracellulaire de l'ion ammonium supposait mathématiquement un arrêt de croissance, et donc un arrêt de consommation des nutriments lors d'un manque de nitrate. Toutefois, en suivant la tendance descendante présente dans la courbe de concentration intracellulaire de l'ion ammonium avant son point d'inflexion final lors de la culture 2SH24 (figure 5.5), on peut prédire une concentration nulle vers 200 heures de culture. Ce moment concorde encore une fois, à quelques heures près, avec l'obtention de la concentration cellulaire maximale. De plus, comme pour la culture précédente, il semble que c'est lorsque la concentration intracellulaire atteint 2 mmol L^{-1} rapporté au volume de culture global que la division cellulaire s'amorce de façon significative lorsqu'il y a ajout d'ions ammonium (figures 5.6).

D'autre part, Goodchild et Givan (1990) rapportent que la quantité d'acide aminée vacuolaire est affectée par la présence et l'ajout d'ions ammonium pour *Acer pseudoplatanus*. Beck et Renner (1989) précisent que, pour *Chenopodium rubrum*, des ajouts d'ions ammonium favorisent la consommation de nitrate par une stimulation de la nitrate-réductase et que les acides aminés ainsi formés et entreposés dans la vacuole peuvent être expulsés vers le cytosol si la présence d'ions ammonium se fait trop forte. Ceci peut expliquer l'extension de la phase de croissance cellulaire suite à une pénurie du nitrate extracellulaire lors de la culture 2SH24 où de l'ammoniaque est ajouté.

De plus, en se rapportant au taux de croissance effectif calculé pour la culture 2SH24 présenté à la figure 5.17, il est possible d'y observer une très forte augmentation comparée aux cultures normales, soit de 153 %. Cependant, il est important de noter que la période de croissance où ce taux est observé est relativement courte. Lors de la culture 2SH26, le taux de croissance effectif calculé est de 0.0065 h^{-1}, ce qui est légèrement supérieur aux cultures normales, une augmentation de 27 %. Dans ce cas-ci, la période où ce taux s'applique est plus longue ce qui permet d'atteindre une concentration cellulaire supérieure à la culture 2SH24.

En somme, l'ion ammonium représente le nutriment clé pour l'induction ou la prolongation de la prolifération cellulaire pour le système étudié.

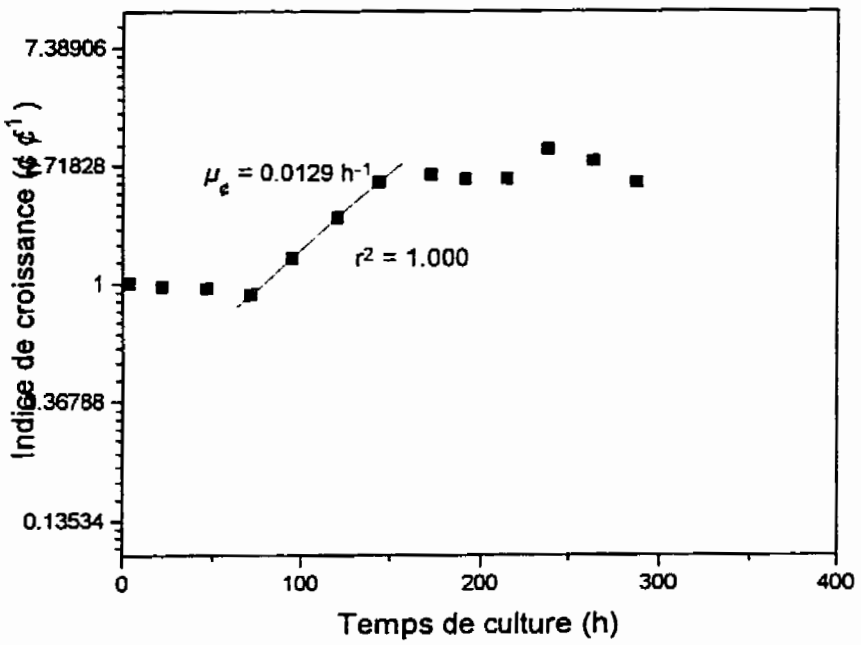


Figure 5.17 : **Évolution de l'indice de croissance de la concentration cellulaire lors de la culture 2SH24 en fonction du temps**

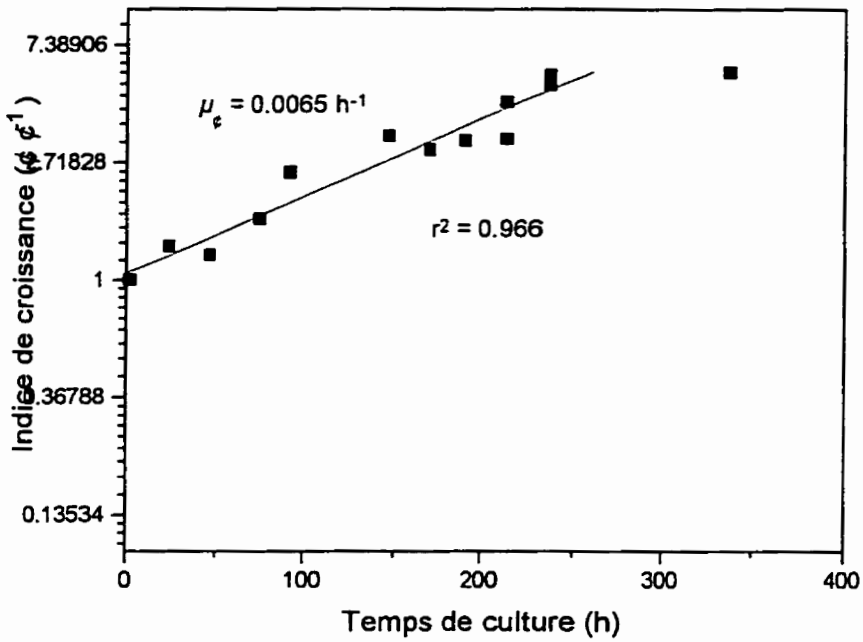


Figure 5.18 : Évolution de l'indice de croissance de la concentration cellulaire lors de la culture 2SH26 en fonction du temps

5.8.2.3 Rendements et taux de consommation

L'ion ammonium étant rapidement assimilé puis utilisé pour la formation de composés cellulaires, deux paramètres caractéristiques doivent être déterminés. Tout d'abord, dans un ordre chronologique, le taux de consommation de ce nutriment par les cellules est calculé.

D'un point de vue logique, l'absorption de cet ion par les cellules est faite selon un certain potentiel d'assimilation. Premièrement, il est considéré que la cellule absorbe ce nutriment par sa membrane cellulaire et que ce dernier est fixé sur des cycles glutaminiques situés dans le cytoplasme. Il est possible d'associer cette étape à une forme intermédiaire d'entreposage temporaire de l'ammoniaque. Il est alors réaliste de prétendre que l'assimilation de ce nutriment est faite proportionnellement à la quantité de biomasse. Selon ce raisonnement, une quantité donnée de biomasse (g) peut assimiler l'ion ammonium à un certain rythme (mmol h^{-1}), et le rythme global est augmenté proportionnellement à la quantité de biomasse présente. Le taux global d'assimilation de l'ion ammonium est alors calculé en mmol NH_{4e} h^{-1} g^{-1} X.

Calculé sur 15 cultures, le taux global d'assimilation de l'ion ammonium par la biomasse est de 0.017 mmol h^{-1} g^{-1}. L'écart-type obtenu est de 0.008, ce qui représente un coefficient de variation de 47 %. Toutefois, même si ce coefficient semble élevé, le profil estimé de la consommation de l'ion ammonium représente la réalité avec cette valeur de taux d'assimilation. Afin d'améliorer la description générale de cette consommation de l'ion ammonium extracellulaire, les résultats discordants sont retirés comme décrit précédemment pour des calculs de rendements. Suite à cette manipulation, le taux d'assimilation obtenu est de 0.016 mmol NH_{4e} h^{-1} g^{-1} X (n=13) avec un écart-type de 0.006, ce qui représente un coefficient de variation de 37 %. Quoique légèrement élevé comme coefficient de variation, la valeur obtenue décrie très bien le profil de consommation de cet ion.

Une fois assimilé, l'ion ammonium intracellulaire est utilisé par les cellules. Afin de calculer les rendements se rapportant à cet ion intracellulaire, la même hypothèse de consommation faite pour le phosphate est reprise ici. Il s'agit de poser que l'ion ammonium est limitant à la prolifération cellulaire ce qui permet de prétendre que sa concentration intracellulaire rapportée au volume de culture devient nulle au moment où la concentration cellulaire plafonne. Le rendement en biomasse sèche est calculé par différentiels, soit le rapport de la quantité totale d'ions ajoutés au milieu de culture par la différence de biomasse sèche entre le moment où la concentration cellulaire atteint son maximum et l'inoculation. Cette relation est représentée par l'équation qui suit.

$$Y_{X/NH_{4i}} = \frac{\left(X|_{t_{max}} - X|_{t=0}\right)}{\Sigma NH_{4e}} \qquad 5.6$$

Le rendement obtenu sur près de 20 cultures pour la biomasse sèche est de 1.45 g $mmol^{-1}$ avec un écart-type de 1.05, ce qui représente un coefficient de variation de 73 %. Après le retrait des résultats présentant les coefficients de régression les plus faibles, le rendement finale obtenu est de 1.04 g X $mmol^{-1}$ NH_{4e} (n=15) avec un écart-type de 0.23 et un coefficient de variation de 22 %.

Sur une base de concentration cellulaire, le rendement est calculé selon le rapport de la quantité totale d'ions ajoutés au milieu de culture par la différence de

concentration cellulaire entre le maximum et l'inoculation, représenté par l'équation qui suit.

$$Y_{¢/NH_{4i}} = \frac{\left(¢|_{t_{max}} - ¢|_{t=0}\right)}{\Sigma NH_{4e}} \qquad 5.7$$

Le rendement calculé sur 12 cultures est de 0.49 x 10^9 ¢ $mmol^{-1}$ avec un écart-type de 0.51, soit un coefficient de variation de 103 %. Il est possible que pour certaines cultures, les cellules de l'inoculum contenaient encore des ions ammonium utilisables ce qui se répercuterait sur les mesures obtenues. De plus, le peu de cultures utilisées (n=12) affecte aussi le coefficient de variation. Malgré ceci, les résultats provenant des cultures les plus variantes sont extraits et le rendement final retenu est de 0.30 x 10^9 ¢ $mmol^{-1}$ (n=9) avec un écart-type de 0.10, soit 34 % comme coefficient de variation.

5.9 Comparaison générale des effets des nutriments

Afin de comparer et d'aprécier l'effet des principaux nutriments (PO4, NO3 et NH4) sur les taux spécifiques de croissance de la biomasse sèche et de la concentration cellulaire, les figures 5.19 et 5.20 présentent l'évolution de l'indice de croissance ($x|_t$ / $x|_{t=0}$ ou $¢|_t$ / $¢|_{t=0}$) selon des taux spécifiques de croissance constants découlant des expériences précédentes.

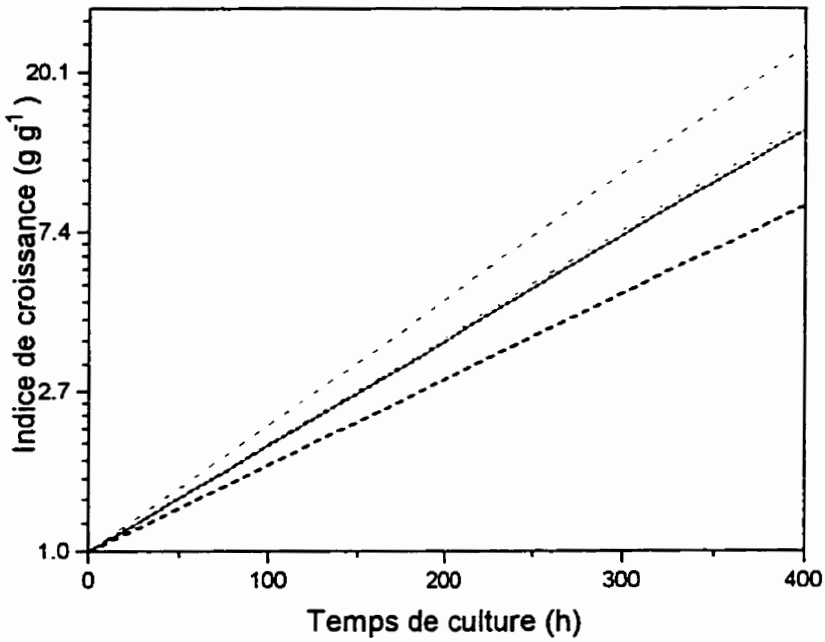


Figure 5.19 : **Comparaison de croissances de la biomasse sèche simulées avec les taux de croissances obtenus des expériences de la présente étude.** -·-·- 5SH23 no_3 inférieure, ····· 2SH22 po_4 inférieure, -··-··- 5SH25 no_3 supérieure et différée, ····· 2SH26 nh_3 inférieure, —— 2SH10 standard, - - - 2SH24 NH_4 omniprésent.

Tableau 5.5 **Comparaison des indices de croissance en biomasse sèche selon les stratégies d'alimentations expérimentées**

culture	Standard	2SH22	5SH23	5SH25	2SH24	2SH26
stratégie	---	bas po_4	bas no_3	haut no_3	$nh_4 > 0$	bas nh_4
Indice de croissance (-)	6.00	2.67	5.33	3.50	2.29	5.5

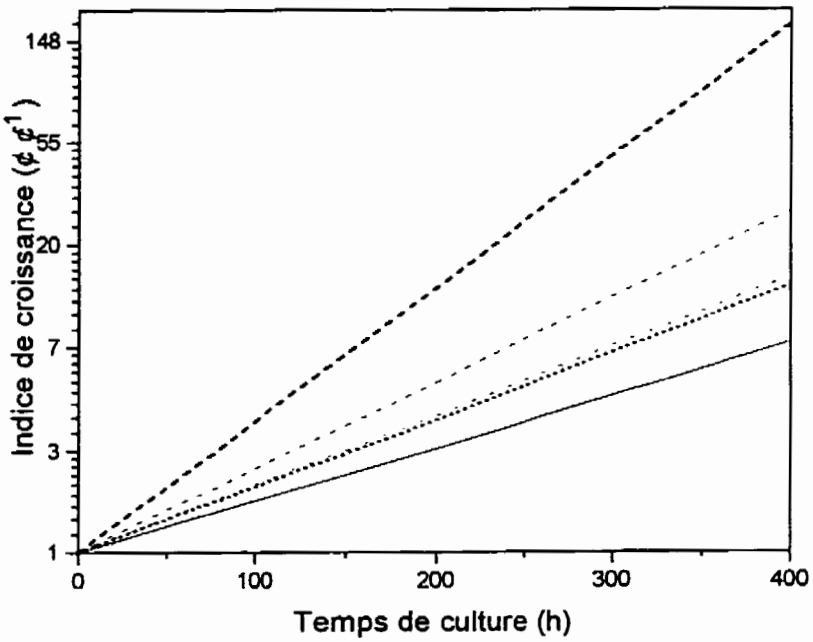


Figure 5.20 : **Comparaison de croissances de la concentration cellulaire simulées avec les taux de croissances obtenus des expériences de la présente étude.** - - - 2SH24 NH_4 omniprésent, -·-·- 5SH23 no_3 inférieure, -··-··- 5SH25 no_3 suppérieure et différée, ····· 2SH26 nh_3 inférieure, —— 2SH10 standard, ····· 2SH22 po_4 inférieure.

Tableau 4.6 **Comparaison des indices de prolifération cellulaire selon les stratégies d'alimentations expérimentées**

culture	Standard	2SH22	5SH23	5SH25	2SH24	2SH26
stratégie	---	bas po_4	bas no_3	haut no_3	$nh_4 > 0$	bas nh_4
Indice de prolifération (-)	4.00	2.29	8.50	6.50	3.2	4.4

De manière générale, la réduction des concentrations en nutriments dans le milieu de culture permet d'augmenter le taux spécifique de croissance en biomasse sèche et de manière encore plus marquée, le taux spécifique de prolifération cellulaire. Les résultats de cette série d'expérimentation laisse croire que la croissance de cellules végétales en bioréacteur peut être accrue par l'utilisation de milieu minimum ou à concentrations faibles en nutriments lorsque opéré en cuvée alimentée.

6. MODÉLISATION DE LA PHASE DE CROISSANCE

Suite à l'étude des principaux nutriments influençant les taux spécifiques de croissance de la biomasse sèche et de la concentration cellulaire, il est possible de réaliser une modélisation du système de croissance des cellules d'*Eschscholtzia californica* en suspension en bioréacteur. Cette modélisation est réalisée en deux étapes. Lors de la première partie, la consommation des nutriments d'influence majeure basée sur la biomasse sèche est déterminée. La croissance de la biomasse sèche est aussi modélisée pendant cette étape. Deuxièmement, l'évolution de la concentration cellulaire dans le bioréacteur est modélisée.

Il est à noter que la phase de modélisation n'est réalisée qu'avec les données obtenues des cultures en bioréacteur excluant complètement les cultures en flacon. Ceci s'explique par une meilleure uniformité des résultats obtenus en bioréacteurs et de plus, le modèle est développé dans l'optique d'une optimisation de la croissance des cellules végétales pour la production de métabolites secondaires en bioréacteurs.

Le développement du modèle s'effectue dans le cadre d'hypothèses de croissance formulées suite aux observations faites lors de la phase d'étude de cellules végétales. Les hypothèses émises sont les suivantes :

1. l'élément limitant la croissance de la biomasse sèche réside en un effet direct des concentrations des nutriments présents dans le milieu de croissance,

2. la division cellulaire peut être stimulée par l'ajout de certains nutriments dans le milieu de croissance,

3. la consommation des nutriments est basée sur l'accroissement en biomasse sèche,

6.1 Croissance de la biomasse sèche

Suite aux cultures réalisées lors de la phase d'étude de la croissance, les hypothèses suivantes régissant la croissance de la biomasse sèche en bioréacteur sont ajoutées :

1. ***le taux spécifique de croissance de la biomasse sèche est affecté négativement par une augmentation des concentrations en ions nitrate, phosphate et ammonium***,

2. les cellules d'*Eschscholtzia californica* n'accumulent pas de sucres intracellulaires sous forme utilisable; ***le taux spécifique de croissance de la biomasse devient négatif lorsque qu'il y a épuisement des hydrates de carbone extracellulaires***,

3. de manière générale, la présence de sels azotés extracellulaires est essentielle afin d'assurer un accroissement de la biomasse; ***le taux spécifique de croissance de la biomasse devient nul lorsque qu'il y a épuisement de l'azote extracellulaire***,

4. de manière générale, le nitrate est consommé proportionnellement à la croissance de la masse cellulaire d'*Eschscholtzia californica*; ***le nitrate est assimilé proportionnellement à un accroissement de la biomasse***,

5. les concentrations de phosphate et d'ammonium chutent rapidement dans le milieu alors que la période de croissance se poursuit sur plusieurs heures; ***les ions phosphate et d'ammonium sont assimilés rapidement et utilisés sur une plus grande partie de la période de croissance***,

6. Le volume de culture (1.9 à 2.0 L dans le réacteur de 2 L et de 5.0 à 6.0 L dans le réacteur de 5 L) diminue avec le temps mais de façon très lente (< 0.005 L d^{-1}); ***le volume de culture peut être considéré comme quasi constant entre deux échantillonnages mathématiques***.

En se basant sur l'ensemble de ces hypothèses, le modèle de croissance de la biomasse sèche est développé. Afin de faciliter cette étape, un schème réactionnel est défini en premier lieu.

6.1.1 Schème réactionnel

Un schème réactionnel consiste en une représentation schématisée des réactions se déroulant dans le système à l'étude. Il permet de comprendre facilement les phénomènes posés et l'interaction entre les différents éléments en présence. De plus, les équations différentielles formant le modèle de croissance découlent

directement du schème élaboré. Les équations 6.1.a à 6.1.c présentent donc le schème réactionnel formulé pour représenter de façon générale les phénomènes observés lors de l'étude de ce système.

$$po_{4e} \xrightarrow{\varphi 1} po_{4i} \qquad 6.1.a$$

$$nh_{4e} \xrightarrow{\varphi 2} nh_{4i} \qquad 6.1.b$$

$$s + no_3 + po_{4i} + nh_{4i} \xrightarrow{\varphi 3} x \qquad 6.1.c$$

Ce schème réactionnel représente donc la consommation rapide des ions phosphate et ammonium ainsi que leur mise en réserve, par les équations 6.1.a et 6.1.b. La croissance de la biomasse par autocatalysation accompagnée de la consommation d'hydrates de carbone (S), de nitrate (NO_3), de phosphate intracellulaire (PO_{4i}) et d'ammonium intracellulaire (NH_{4i}) est décrite par l'équation 6.1.c. Les équations différentielles constituant le modèle de croissance de la biomasse sèche en découlent directement comme le suggèrent Bastin et Dochain (1990). L'algorithme de résolution est le suivant :

1. le schème réactionnel comprend N composés ξ_i (i=1,...,N) et M réactions (j=1,...,M), dont les taux de réaction sont identifiés par φ_j (j=1,...,M),

2. la dynamique de concentration de chaque composant est régie par l'équation suivante:

$$\frac{d\xi_i}{dt} = \sum_{j\sim i} (\pm) k_{ij} \varphi_j - D\xi_i - q_i + f_i, \qquad 6.2.a$$

1. la notation j~i signifie qu'une sommation est réalisée sur les réactions ayant l'indexe j comportant le composé i,

2. k_{ij} est une constante (inverse du rendement apparent) strictement positive généralement sans dimension (g g^{-1}). Il est précédé d'un signe négatif si ξ_i est un réactif (i.e. s'il se situe dans la partie gauche du schème réactionnel) ou d'un signe positif si ξ_i est un produit (i.e. s'il se situe dans la partie droite du schème réactionnel),

3. q_i représente le débit du composé ξ_i s'échappant du réacteur sous forme gazeuse, et

4. f_i représente le débit d'alimentation du composé ξ_i s'il s'agît d'un composé extracellulaire.

Le modèle de la dynamique générale du système est donc définie par :

$$\frac{d\xi}{dt} = K\varphi(\xi, t) - D\xi - q(\xi) + f(\xi) \qquad 6.2.b$$

où

$$\xi^T=[\xi_1 \dots \xi_N] \qquad 6.3.a$$

$$\varphi^T=[\varphi_1 \dots \varphi_M] \qquad 6.3.b$$

$$q^T=[q_1 \dots q_N] \qquad 6.3.c$$

$$f^T=[f_1 \dots f_N] \qquad 6.3.d$$

$$K=[K_{ij}] : \text{ matrice N x M avec } K_{ij}=(\pm)k_{ij} \text{ si } j\sim i, \text{ sinon } K_{ij}=0 \qquad 6.3.e$$

Donc selon cette notation, le schème proposé précédemment pour le système de culture de cellules d'*Eschscholtzia californica* en suspension en bioréacteur peut être décrit par le système d'équations simplifié suivant :

$$\frac{d\xi}{dt} = K\varphi(\xi,t) - D\xi + f(\xi) \qquad 6.4$$

où

$$\xi^T=[x \;\; s \;\; no_3 \;\; po_{4e} \;\; nh_{4e} \;\; po_{4i} \;\; nh_{4i}] \qquad 6.5.a$$

$$\varphi^T=[\phi_1 x \;\; \phi_2 x \;\; \mu_x x] \qquad 6.5.b$$

$$f^T=[0 \;\; f_S \;\; f_{NO3} \;\; f_{PO4} \;\; f_{NH4} \;\; 0 \;\; 0] \qquad 6.5.c$$

$$K = \begin{bmatrix} 0 & 0 & k_x \\ 0 & 0 & -k_S \\ 0 & 0 & -k_{NO_3} \\ -k_{PO_{4e}} & 0 & 0 \\ 0 & -k_{NH_{4e}} & 0 \\ k^1_{PO_{4i}} & 0 & -k^2_{PO_{4i}} \\ 0 & k^1_{NH_{4i}} & -k^2_{NH_{4i}} \end{bmatrix} \qquad 6.5.d$$

6.1.2 Constantes de rendement et taux de réaction

Afin d'obtenir un modèle complet, certains paramètres doivent être déterminés. Il s'agît des constantes de rendement (K) et des taux de réaction (φ).

Les constantes de rendements sont définies à partir des coefficients de rendement apparent selon l'équation 6.6.

$$k_i = \frac{1}{Y_{x/i}} \qquad 6.6$$

En ce qui a trait aux taux de réaction, les deux premiers concernant le phosphate et l'ammoniaque extracellulaire ont été calculés au chapitre précédent. Le tableau 6.1 rapporte les résultats obtenus pour les constantes de rendement et les taux d'assimilation en phosphate et ammoniaque.

Tableau 6.1 : Valeurs des constantes de rendement pour les principaux nutriments et des taux d'assimilation pour le phosphate et l'ammoniaque

	S	NO_3	PO_{4e}	NH_{4e}	PO_{4i}	NH_{4i}
Unité i	g	mmol	mmol	mmol	mmol	mmol
k_i (unité i g^{-1} X)	3.21	2.42			0.25	0.96
ϕ_j (unité i h^{-1} g^{-1} X)			0.003	0.016		

6.1.3 Taux spécifique de croissance

Toutefois, le troisième taux de réaction décrivant la croissance de la biomasse est plus compliqué à déterminer. Le dernier taux de réaction issu du schème réactionnel comprend un terme décrivant la croissance de la biomasse sèche (μ) et le terme de concentration de biomasse (x). Le taux spécifique de croissance de la biomasse sèche (μ) représente la clé de la capacité du modèle à décrire l'évolution de concentration des composantes d'un système de culture. La qualité de la détermination de ce paramètre est primordiale quant à la réponse du modèle. Un intérêt particulier doit lui être apporté. La majeure partie du temps d'une phase de modélisation de cultures est investie dans cette opération.

L'équation du taux spécifique de croissance doit répondre à certains critères particuliers. Entre autre, elle doit refléter une certaine simplicité, la capacité de

décrire adéquatement l'évolution du profil de croissance de la biomasse, si possible de décrire les réactions métaboliques, et principalement, permettre une pleine autonomie du modèle. Permettre une pleine autonomie du modèle signifie que les variables dont est fonction le taux spécifique de croissance doivent obligatoirement être comprises et estimées par le modèle lui-même. Cette restriction est nécessaire à l'obtention d'un modèle de croissance apte à prédire le déroulement d'une culture en fonction des conditions initiales et des interventions effectuées tout au long de la croissance.

Lorsque le modèle est développé dans l'optique d'un suivi de culture pour l'estimation de variables non-mesurées, la dernière condition n'est pas requise. Au contraire, il est alors souhaitable de relier le taux spécifique de croissance de la biomasse ou certaines variables estimées par le modèle à une variable mesurée en continu dans le système de culture. De cette manière, l'erreur d'estimation peut être amoindrie permettant un meilleur suivi. De plus, si la culture réagit à une intervention externe ou différemment aux conditions de culture, l'association à une variable mesurée en continu permet une correction continuelle du modèle. Ce n'est toutefois pas l'objectif des présents travaux. En résumé, rendre le modèle pleinement autonome permet de procéder à une phase d'optimisation mais, en contre partie, diminue la fiabilité de la prédiction de l'évolution du profil de croissance de la biomasse.

Selon les résultats du chapître précédent couvrant l'étude de la phase de croissance, il apparaît que le taux spécifique de croissance de la biomasse sèche est

principalement affecté par la présence d'hydrates de carbones (s), d'azote extracellulaire total (n_t), ainsi que par la concentration en nitrate (no_3), en phosphate extracellulaire (po_{4e}) et possiblement en ammoniaque extracellulaire (nh_{4e}). Chaque effet doit donc être représenté dans l'équation du taux spécifique de croissance.

$$\mu_x = \mu^* \mu_S \mu_{N_t} \mu_{NO_3} \mu_{PO_{4e}} \mu_{NH_{4e}} \qquad 6.7$$

où μ^* représente le taux spécifique maximum de croissance de la biomasse alors que les μ_i représentent l'impact du nutriment i sur le taux spécifique de croissance de la biomasse sèche.

Comme démontré à la section 5.6.1, l'omniprésence des hydrates de carbone est nécessaire à la croissance de la biomasse sèche. Cette relation peut être représentée par la forme de Monod (1942), originalement développée pour la description de la croissance de micro-organismes bactériens soumis à une limitation en substrat :

$$\mu_S = \frac{s}{K_S + s} \qquad 2.3$$

où s représente la concentration en hydrates de carbones. K_S, la constante de Monod, représente la demi-saturation en substrat et correspond à la concentration de substrat pour laquelle le taux spécifique de croissance est réduit de moitié. Dans le cas où la présence du nutriment est requise en tout temps, cette constante tend vers 0 ($K_S \rightarrow 0$).

De même, l'influence de la concentration extracellulaire en azote total sur la cinétique de croissance de la biomasse sèche peut être représentée par l'équation de Monod avec la même condition pour la constante de saturation ($K_{Nt} \rightarrow 0$).

$$\mu_{N_t} = \frac{n_t}{K_{N_t} + n_t} \qquad 6.8$$

En ce qui a trait aux trois autres nutriments majeurs, il a été démontré que leur impact sur la croissance de la biomasse est négatif. Aucune modélisation d'un effet semblable n'est recensé dans la littérature ce qui empêche donc l'utilisation d'une expression d'un tel impact sur le taux spécifique de croissance. Toutefois, il est possible de faire une association avec l'impact qu'à généralement la présence d'un produit inhibiteur sur ce taux de croissance. En effet, certains auteurs présentent des équations décrivant ce genre d'impact provoqué par un produit de la cellule et non par un nutriment. Les équation présentées dans la première partie de la revue de la littérature et ayant trait à une inhibition du taux de croissance sont testées sans succès sur les données cumulées lors de cette étude.

Étant donné l'insuccès des modèles de taux de croissance publiés à décrire l'évolution de la biomasse en fonction des principaux nutriments, il ne reste qu'à développer une nouvelle équation le permettant. Cette conception d'outil mathématique est faite en considérant certains aspects d'ordre pratique. Tout d'abord, la simplicité prévaut. Plus l'outils mathématique développé est simple, plus son

ajustement le sera. De plus, dans le cadre de cet étude ou l'objectif principal est l'optimisation de la phase de croissance, la caractérisation du procédé à l'étude représente un atout précieux sans qu'il soit nécessaire d'obtenir de l'information scientifique sur le déroulement du métabolisme selon la forme de l'équation obtenue. D'après ces constatations, un modèle empirique représente la meilleure voie à envisager.

Plusieurs nouvelles formes de taux de croissance sont formulées et expérimentées avec les données recueillies lors des cultures effectuées. Celles-ci sont présentées à l'annexe C de l'appendice. Après plusieurs essais, une forme du taux spécifique de croissance de la biomasse décrivant cet impact négatif est retenu. Son développement est réalisé comme suit.

Jerusaliwski et Engambervediev (1969) présentent une forme de stimulation (semblable à Monod) et une forme d'inhibition par un produit métabolique sur le taux de croissance. La forme d'inhibition proposée par ces auteurs est la suivante :

$$\mu_P = \frac{K_P}{K_P + p} \qquad 6.9$$

où p représente la concentration du produit dans le milieu de culture et K_P est défini comme la constante de saturation représentant la concentration du produit inhibant de moitié le taux spécifique de croissance. Cette forme est intéressante mais ne représente

pas l'impact relatif de chaque nutriment. En effet, selon l'étude des cultures effectuées, il semble que l'impact du phosphate, par exemple, soit aussi important que celui du nitrate sur le taux de croissance (figure 5.19) alors que sa concentration est 25 fois inférieure dans le milieu de culture B5 standard. Cet aspect très particulier doit être considéré par la forme développée.

Levenspiel (1980), introduit un concept intéressant dans la modélisation d'effets inhibiteurs du taux de croissance spécifique de la biomasse sèche; il y inclus un terme qu'il nomme puissance de toxicité (n) :

$$\mu_P = \left[1 - \frac{p}{p_L}\right]^n \qquad 6.10$$

où p représente la concentration du produit et p_L la concentration limite du produit. Cette puissance de toxicité convient parfaitement pour décrire l'impact relatif de chacun des nutriments sur le taux spécifique de croissance de la biomasse sèche de cultures de cellules végétales.

De ces modèles publiés et selon les résultats obtenus, une nouvelle forme de taux spécifique de croissance est ici développée :

$$\mu_P = \frac{K_\xi^1}{K_\xi^1 + \xi^{K_\xi^2}} \qquad 6.11$$

où K_ξ^2 représente la puissance de toxicité et où K_ξ, la constante de saturation du nutriment ξ, est égale à $\left(K_\xi^1\right)^{-K_\xi^2}$. Cette constante représente la concentration du nutriment inhibant de moitié le taux de croissance maximum.

L'équation générale du taux spécifique de croissance de la biomasse sèche est donc la suivante :

$$\mu_x = \mu_x * \left(\frac{s}{K_S^x + s}\right)\left(\frac{n_t}{K_{N_t}^x + n_t}\right)\left(\frac{K_{NO_3}^{x1}}{K_{NO_3}^{x1} + no_3^{K_{NO_3}^{x2}}}\right)\left(\frac{K_{PO_{4e}}^{x1}}{K_{PO_{4e}}^{x1} + po_{4e}^{K_{PO_{4e}}^{x2}}}\right)\left(\frac{K_{NH_{4e}}^{x1}}{K_{NH_{4e}}^{x1} + nh_{4e}^{K_{NH_{4e}}^{x2}}}\right) \quad 6.12$$

Cette forme du taux de croissance spécifique est utilisée pour le lissage des données dans cette phase de modélisation.

6.1.4 Évaluation des paramètres non-calculés

Étant donné les travaux expérimentaux réalisés, il n'est pas possible de déterminer expérimentalement les deux constantes de la forme de taux spécifique développée pour chacun des nutriments ainsi que le taux de croissance spécifique maximum. Ce serait toutefois possible au cours d'une étude d'environ 2 ans réacteur^{-1} de manière à obtenir environ 8 points par nutriment. Dans ces conditions, un algorithme mathématique d'ajustement des paramètres est développé.

6.1.5 Simulation du modèle de croissance

Le modèle de croissance est implanté avec deux logiciel permettant de simuler un procédé et d'en optimiser les paramètres, Matlab 4.2c.1© de MathWorks Inc. et Microsoft Excel 5.0©. De manière générale, le logiciel Matlab© est préféré pour ce type de manipulation mathématique. Il permet une très grande fiabilité et représentativité de la réalité lors de l'utilisation d'équations différentielles. Cependant, comme c'est le cas dans cette étude, la simulation de près de 15 cultures à l'intérieur d'un algorithme d'optimisation de la fiabilité devient rapidement fastidieuse. Quelques sessions de travail sont réalisées mais toutefois interrompus après plus d'une semaine de calcul sans qu'il y ait convergence de la fonction d'erreur vers un minimum. Une simulation du procédé sur plusieurs cultures est toutefois réalisable avec ce logiciel et plusieurs autres manipulations peuvent être effectuées avec une grande lassitude. Pour toutes ces raisons, une autre alternative est envisagée.

Le tabulateur Excel© de Microsoft permet de minimiser ou maximiser une fonction par la manipulation de paramètres à l'aide de la macrocommande Solveur©. Cet outil est utilisé pour minimiser la fonction erreur de l'algorithme d'optimisation de la fiabilité du modèle.

Afin de pouvoir utiliser Excel© pour la phase d'optimisation du modèle, quelques modifications doivent être effectuées aux équations du modèle de croissance de la biomasse sèche. En effet, étant donné qu'il s'agît d'un tabulateur, les équation

différentielles doivent être discrétisées de manière à pouvoir être implantées et résolues.

La différentiation du modèle de croissance (éq. 6.4) s'effectue selon la procédure suivante :

1. il y a multiplication de l'équation du modèle par le volume de culture de manière à exprimer une variation nette des variables,

$$\frac{d}{dt}\begin{bmatrix} xV \\ sV \\ no_3V \\ po_{4e}V \\ nh_{4e}V \\ po_{4i}V \\ nh_{4i}V \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 0 & 0 & k_x \\ 0 & 0 & -k_S \\ 0 & 0 & -k_{NO_3} \\ -k_{PO_{4e}} & 0 & 0 \\ 0 & -k_{NH_{4e}} & 0 \\ k^1_{PO_{4i}} & 0 & -k^2_{PO_{4i}} \\ 0 & k^1_{NH_{4i}} & -k^2_{NH_{4i}} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \phi_1 xV & \phi_2 xV & \mu_x xV \end{bmatrix} - D \begin{bmatrix} xV \\ sV \\ no_3V \\ po_{4e}V \\ nh_{4e}V \\ po_{4i}V \\ nh_{4i}V \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} 0 \\ f_S V \\ f_{NO_3} V \\ f_{PO_4} V \\ f_{NH_4} V \\ 0 \\ 0 \end{bmatrix}$$

6.13

considérant le volume comme pseudo-constant,

$$\frac{d}{dt}\begin{bmatrix} X \\ S \\ NO_3 \\ PO_{4e} \\ NH_{4e} \\ PO_{4i} \\ NH_{4i} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 0 & 0 & k_x \\ 0 & 0 & -k_S \\ 0 & 0 & -k_{NO_3} \\ -k_{PO_{4e}} & 0 & 0 \\ 0 & -k_{NH_{4e}} & 0 \\ k^1_{PO_{4i}} & 0 & -k^2_{PO_{4i}} \\ 0 & k^1_{NH_{4i}} & -k^2_{NH_{4i}} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \phi_1 xV & \phi_2 xV & \mu_x xV \end{bmatrix} - D \begin{bmatrix} X \\ S \\ NO_3 \\ PO_{4e} \\ NH_{4e} \\ PO_{4i} \\ NH_{4i} \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} 0 \\ F_S \\ F_{NO_3} \\ F_{PO_4} \\ F_{NH_4} \\ 0 \\ 0 \end{bmatrix}$$

6.14

2. en discrétisant selon Euler,

$$\frac{d\xi}{dt} \approx \frac{\xi_t - \xi_{t-1}}{T} \qquad 6.15$$

où T représente la période d'échantillonnage mathématique, on obtient,

$$T^{-1}\left[\begin{bmatrix} X \\ S \\ NO_3 \\ PO_{4e} \\ NH_{4e} \\ PO_{4i} \\ NH_{4i} \end{bmatrix}_t - \begin{bmatrix} X \\ S \\ NO_3 \\ PO_{4e} \\ NH_{4e} \\ PO_{4i} \\ NH_{4i} \end{bmatrix}_{t-1}\right] = \begin{bmatrix} 0 & 0 & k_x \\ 0 & 0 & -k_S \\ 0 & 0 & -k_{NO_3} \\ -k_{PO_{4e}} & 0 & 0 \\ 0 & -k_{NH_{4e}} & 0 \\ k^1_{PO_{4i}} & 0 & -k^2_{PO_{4i}} \\ 0 & k^1_{NH_{4i}} & -k^2_{NH_{4i}} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \phi_1 xV & \phi_2 xV & \mu_x x V \end{bmatrix}_{t-1}$$

$$-D\begin{bmatrix} X \\ S \\ NO_3 \\ PO_{4e} \\ NH_{4e} \\ PO_{4i} \\ NH_{4i} \end{bmatrix}_{t-1} + \begin{bmatrix} 0 \\ F_S \\ F_{NO_3} \\ F_{PO_4} \\ F_{NH_4} \\ 0 \\ 0 \end{bmatrix}_{t-1} \qquad 6.16$$

3. en terme de concentration, l'équation devient

$$T^{-1}\left[\begin{bmatrix} xV \\ sV \\ no_3V \\ po_{4e}V \\ nh_{4e}V \\ po_{4i}V \\ nh_{4i}V \end{bmatrix}_t - \begin{bmatrix} xV \\ sV \\ no_3V \\ po_{4e}V \\ nh_{4e}V \\ po_{4i}V \\ nh_{4i}V \end{bmatrix}_{t-1}\right] = \begin{bmatrix} 0 & 0 & k_x \\ 0 & 0 & -k_S \\ 0 & 0 & -k_{NO_3} \\ -k_{PO_{4e}} & 0 & 0 \\ 0 & -k_{NH_{4e}} & 0 \\ k^1_{PO_{4i}} & 0 & -k^2_{PO_{4i}} \\ 0 & k^1_{NH_{4i}} & -k^2_{NH_{4i}} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \phi_1 xV & \phi_2 xV & \mu_x xV \end{bmatrix}_{t-1}$$

$$-D\begin{bmatrix} xV \\ sV \\ no_3V \\ po_{4e}V \\ nh_{4e}V \\ po_{4i}V \\ nh_{4i}V \end{bmatrix}_{t-1} + \begin{bmatrix} 0 \\ f_S V \\ f_{NO_3}V \\ f_{PO_4}V \\ f_{NH_4}V \\ 0 \\ 0 \end{bmatrix}_{t-1} \qquad 6.17$$

d'où,

$$\begin{bmatrix} x \\ s \\ no_3 \\ po_{4e} \\ nh_{4e} \\ po_{4i} \\ nh_{4i} \end{bmatrix}_t = \begin{bmatrix} x \\ s \\ no_3 \\ po_{4e} \\ nh_{4e} \\ po_{4i} \\ nh_{4i} \end{bmatrix}_{t-1} \frac{V_{t-1}}{V_t} + T\frac{V_{t-1}}{V_t} \left[\begin{bmatrix} 0 & 0 & k_x \\ 0 & 0 & -k_S \\ 0 & 0 & -k_{NO_3} \\ -k_{PO_{4e}} & 0 & 0 \\ 0 & -k_{NH_{4e}} & 0 \\ k^1_{PO_{4i}} & 0 & -k^2_{PO_{4i}} \\ 0 & k^1_{NH_{4i}} & -k^2_{NH_{4i}} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \phi_1 x & \phi_2 x & \mu_x x \end{bmatrix}_{t-1} \right.$$

$$\left. -D \begin{bmatrix} x \\ s \\ no_3 \\ po_{4e} \\ nh_{4e} \\ po_{4i} \\ nh_{4i} \end{bmatrix}_{t-1} + \begin{bmatrix} 0 \\ f_S \\ f_{NO_3} \\ f_{PO_4} \\ f_{NH_4} \\ 0 \\ 0 \end{bmatrix}_{t-1} \right] \qquad 6.18$$

L'équation 6.18 permet donc d'obtenir une valeur à jour des variables calculées à partir des estimations prédites pour l'échantillonnage mathématique précédent. Le résultat des manipulations effectués prouve l'hypothèse posée selon laquelle le volume peut être considéré comme pseudo-constant. En effet, le quotient de volumes associé aux termes de droite de l'équation 6.18 impose un effet de concentration ce qui se passe réellement sachant que la diminution lente mais constante du volume du système correspond à l'évaporation de l'eau. Le terme comprenant le taux de dilution (D) est utilisé ici pour tenir compte de l'échantillonnage de la culture.

Pour une simulation adéquate du modèle en cuvée alimentée, il doit être remplacé par le volume échantillonné ($V_{éch}$). Pour y parvenir, la manipulation algébrique suivante est réalisée.

$$D = \begin{cases} \dfrac{V_{éch}}{t'V_{t-1}} & \text{si Éch=1} \\ 0 & \text{si Éch=0} \end{cases} \qquad 6.19$$

où t' représente la durée de l'échantillonnage. De manière pratique, ce temps d'échantillonnage qui, en réalité, ne nécessite que quelques minutes, est ici défini comme étant équivalent à la période d'échantillonnage mathématique. De cette manière, l'ensemble de ce terme correspond exactement au volume retiré du milieu de manière instantanée. De plus, comme indiqué dans cette équation, ce terme n'est différent de 0 que lorsqu'il y a échantillonnage du réacteur (Éch=1) et non en tout temps. Il est à noter que ce terme de taux de dilution n'a aucun effet sur la concentration des nutriments et de la biomasse. Cette constatation mathématique est tout à fait logique puisque le fait de retirer une partie uniforme de culture du réacteur n'affecte en rien la concentration des composés mais seulement la quantité totale ainsi que le volume.

Ayant introduit la notation du volume, ce dernier doit aussi être modélisé afin de satisfaire la condition posée précédemment selon laquelle le modèle doit être pleinement autonome. Pour ce faire, un bilan de masse est effectué sur le système :

$$\frac{d(\rho_M V)}{dt} = -\rho_E Q_E - D\rho_M V + \sum F_i \qquad 6.20$$

Considérant la masse volumique de la culture constante et approximativement égale à l'eau, l'équation du volume est directement obtenue :

$$\frac{d(V)}{dt} = -Q_E - DV + \sum \frac{F_i}{n_i} \qquad 6.21$$

ou, après discrétisation,

$$V_t = V_{t-1} - T\left[Q_E + DV_{t-1} - \sum \frac{F_i}{n_i}\right] \qquad 6.22$$

où F_i représente la quantité du nutriment i ajoutée et n_i sa concentration dans la solution d'ajout. Dans cette dernière équation, le taux de dilution est aussi remplacé par l'expression développée à l'équation 6.19. Le modèle de croissance de la biomasse sèche, une fois discrétisé, est donc composé des équations 6.18 et 6.22. Avant de pouvoir l'implanter, le taux d'évaporation (Q_E) et le volume échantillonnage ($V_{éch}$) moyens doivent être déterminés. Considérant que ces paramètres varient principalement en fonction du système utilisé, deux valeurs sont associées à chacun des paramètres; soit une pour le système de culture HRI 5L et une autre pour le HRI 2L. Ces dernières sont déterminées par lissage de l'équation 6.22 sur un ensemble de données provenant de cultures réalisées dans chacun de ces systèmes. La figure 6.1 présente les courbes obtenues alors que le tableau 6.2 en donne les valeurs.

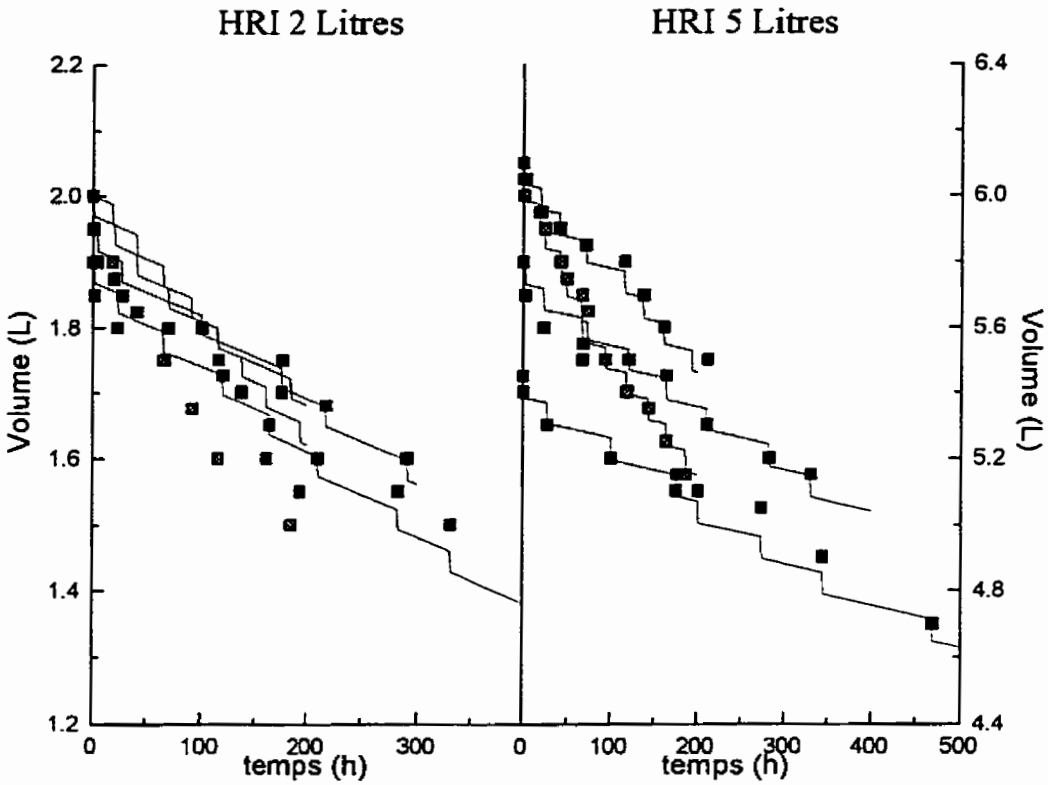


Figure 6.1 : **Modélisation du volume pour les cultures effectuées en bioréacteur de type HRI.**

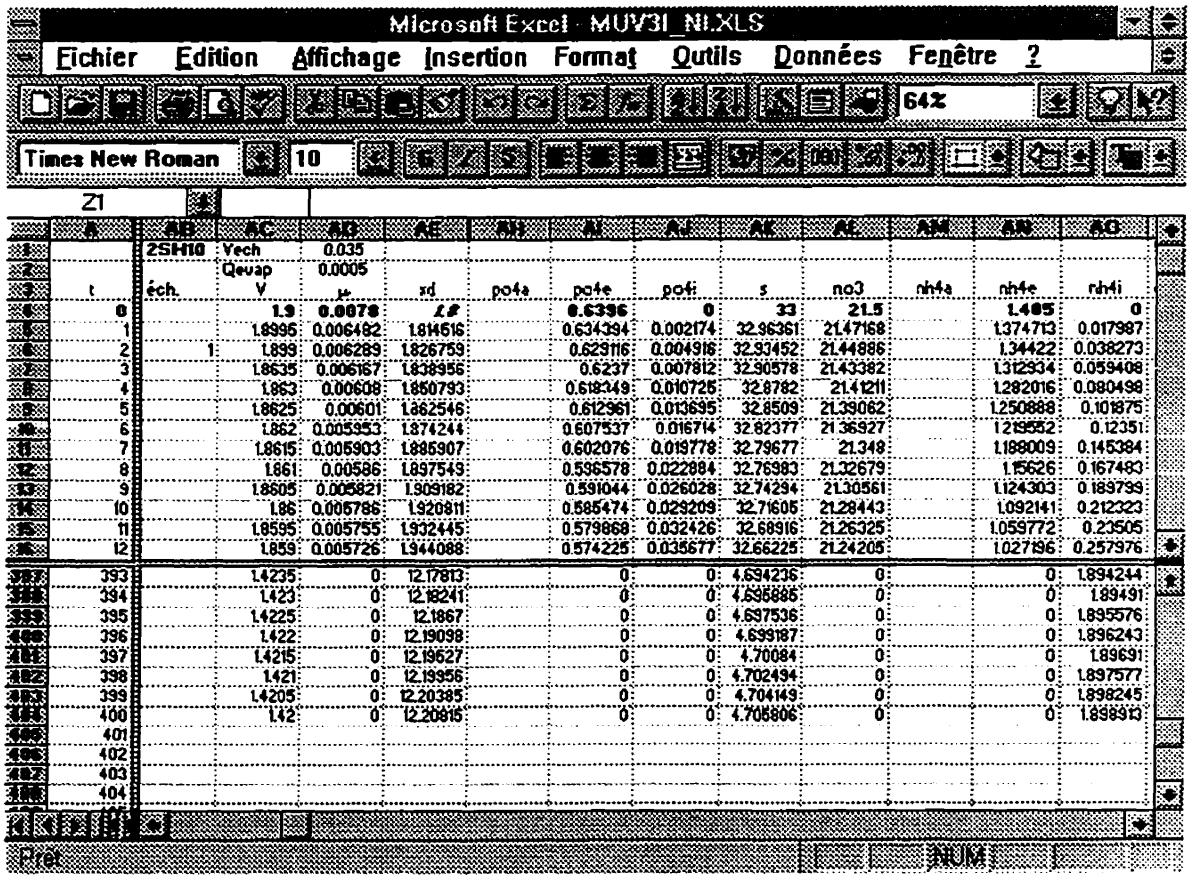
A. Système de culture de 2 L. B. Système de culture de 5 L. ■ volume réel de culture

——modèle du volume pour les différentes cultures.

Tableau 6.2 : **Taux d'évaporation et volume échantillonnage moyens pour les systèmes de cultures HRI**

	Q_E (L h^{-1})	$V_{éch}$ (L)
HRI 2L	0.0007	0.030
HRI 5L	0.0006	0.065

Ayant déterminé tous les paramètres du modèle, à l'exception de ceux du taux de croissance spécifique, il est possible de commencer l'implantation du modèle dans le logiciel. L'équation 6.18 est tout d'abord scindée en 7 afin d'obtenir une équation bien spécifique pour chaque variable et d'éliminer le concept de matrice pour l'implantation dans Excel©. Par la suite, les 9 équations formant le modèle de croissance de la biomasse sèche sont implantées chacune dans une colonne différente, comme le démontre la figure 6.2.



	AB	AC	AD	AE	AH	AI	AJ	AK	AL	AM	AN	AO
1	25H10	Vech	0.035									
2		Qevap	0.0005									
3	éch.	V	μ	xd	po4s	po4e	po4i	s	no3	nh4s	nh4e	nh4i
6		1.9	0.0078	1.8		0.6396	0	33	21.5		1.405	0
5	1	1.8995	0.006482	1.814616		0.634394	0.002174	32.96361	21.47168		1.374713	0.017987
6	2	1.899	0.006289	1.826759		0.629116	0.004916	32.93452	21.44886		1.34422	0.038273
7	3	1.8635	0.006167	1.838956		0.6237	0.007812	32.90578	21.43382		1.312934	0.059408
8	4	1.863	0.00608	1.850793		0.618349	0.010725	32.8782	21.41211		1.282016	0.080498
9	5	1.8625	0.00601	1.862546		0.612961	0.013695	32.8509	21.39062		1.250888	0.101875
10	6	1.862	0.005953	1.874244		0.607537	0.016714	32.82377	21.36927		1.219552	0.12351
11	7	1.8615	0.005903	1.885907		0.602076	0.019778	32.79677	21.348		1.188009	0.145384
12	8	1.861	0.00586	1.897543		0.596578	0.022884	32.76983	21.32679		1.15626	0.167483
13	9	1.8605	0.005821	1.909182		0.591044	0.026028	32.74294	21.30561		1.124303	0.189799
14	10	1.86	0.005786	1.920811		0.585474	0.029209	32.71605	21.28443		1.092141	0.212323
15	11	1.8595	0.005755	1.932445		0.579868	0.032426	32.68916	21.26325		1.059772	0.23505
16	12	1.859	0.005726	1.944088		0.574225	0.035677	32.66225	21.24205		1.027196	0.257976
397	393	1.4235	0	12.17813		0	0	4.694236	0		0	1.894244
398	394	1.423	0	12.18241		0	0	4.696886	0		0	1.89491
399	395	1.4225	0	12.1867		0	0	4.697536	0		0	1.895576
400	396	1.422	0	12.19098		0	0	4.699187	0		0	1.896243
401	397	1.4215	0	12.19627		0	0	4.70084	0		0	1.89691
402	398	1.421	0	12.19956		0	0	4.702494	0		0	1.897577
403	399	1.4205	0	12.20385		0	0	4.704149	0		0	1.898245
404	400	1.42	0	12.20815		0	0	4.705806	0		0	1.898913
405	401											
406	402											
407	403											
408	404											

Figure 6.2 : Représentation de la feuille de calcul Excel© dans laquelle le modèle de croissance de la biomasse sèche est implanté.

6.1.6 Optimisation de la fiabilité du modèle

Dans l'optique d'augmenter la fiabilité du modèle en vue de prédire le comportement des cultures, les paramètres du taux spécifique de croissance sont ajustés mathématiquement par des algorithmes minimisant l'erreur moyenne d'estimation du modèle. Ces techniques de calcul de l'erreur sont celles de l'erreur relative moyenne d'estimation et du coefficient de détermination multiple empirique.

Il est à noter que le modèle développé dans le cadre de cette étude sert à prédire le comportement des cultures de cellules végétales en suspension en bioréacteur ainsi que l'arrêt de croissance dû à une limitation dans le milieu de culture. De ce fait, les échantillons suivant la fin de la période de croissance ne sont pas considérés pour l'optimisation de la fiabilité du modèle.

6.1.6.1 Erreur relative moyenne d'estimation

L'erreur relative moyenne d'estimation est obtenue selon les relations suivantes. Premièrement, l'erreur relative d'estimation est calculée pour chaque culture selon

$$e_y = \frac{\sum_{u=1}^{v} \left| x_u - \bar{x}_u \right|}{\sum_{u=1}^{v} x_u} \qquad 6.23$$

où u représente l'échantillon analysé, v le nombre d'échantillons pour la culture y, x la concentration en biomasse sèche mesurée et $\bar{x}$, l'estimation par le modèle de la concentration en biomasse sèche.

L'erreur relative moyenne d'estimation pour l'ensemble des cultures est obtenu à l'aide de la relation suivante

$$\mathrm{erm}(\%) = 100\frac{\sum_{y=1}^{z} e_y}{z} \qquad 6.24$$

où z représente le nombre de cultures étudiées. L'algorithme utilisé pour l'optimisation de la fiabilité du modèle selon cette méthode de calcul est présenté à la figure 6.3.

Cet algorithme possède plusieurs avantages. Tout d'abord, l'erreur relative d'estimation directement reliée à l'amplitude de la mesure permet d'apprécier l'importance de l'erreur par rapport à la mesure sans être exagérée. De plus, considérant que les cultures de cellules végétales de cette étude ne comportent que peu de points expérimentaux pour le lissage du modèle et que l'erreur sur cette mesure est relativement élevée, cet algorithme n'amplifie pas l'importance d'une erreur résultant d'un mauvais point échantillonnage. C'est pour ces raisons que cette méthode de calcul de l'erreur est retenue.

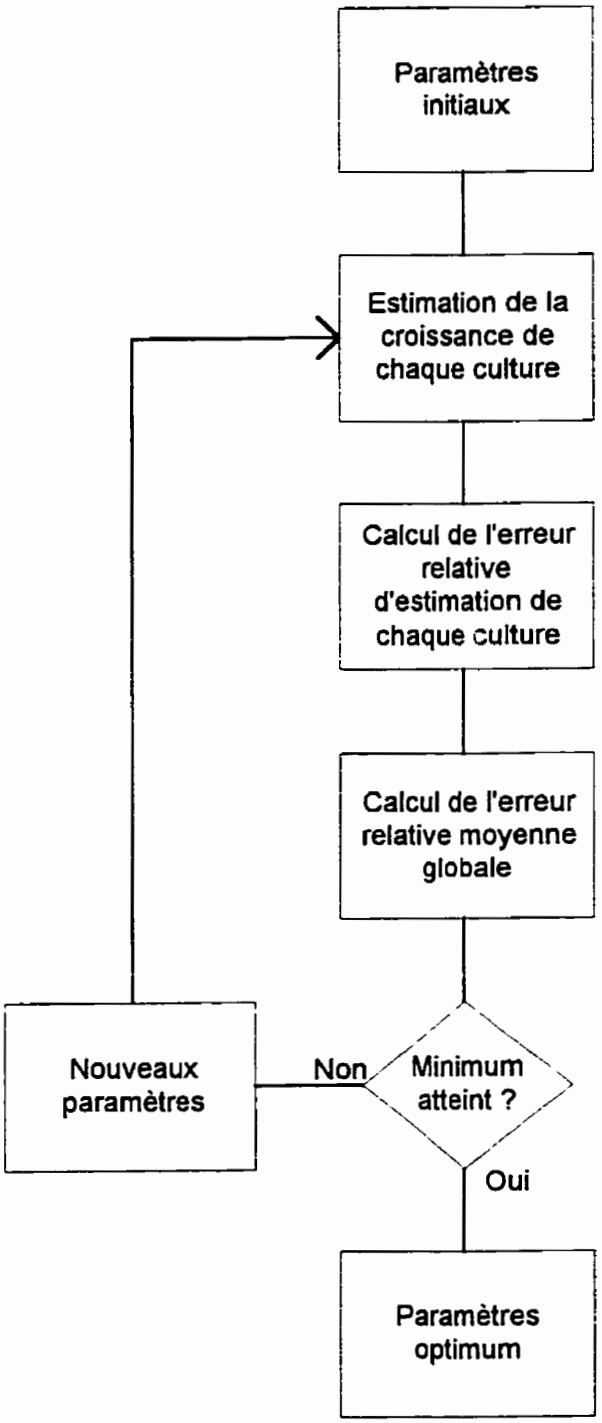


Figure 6.3 : **Algorithme de la stratégie d'optimisation de la fiabilité du modèle de croissance de la biomasse sèche par l'erreur relative d'estimation.**

6.1.6.2 Coefficient de détermination multiple empirique

Le coefficient de détermination multiple empirique ressemble à la technique développée précédemment. Toutefois, plutôt que de ramener l'erreur à l'amplitude de la mesure, celle-ci est ramenée au biais de la mesure par rapport à la moyenne des mesures. Premièrement, la somme des carrés des erreurs est calculée selon l'équation suivante.

$$e_z = \sum_{u=1}^{v} \left(x_u - \bar{x}_u\right)^2 \qquad 6.25$$

ou v représente le nombre total d'échantillons de l'ensemble des cultures.

Par la suite, la somme des carrés totale est calculée.

$$c_z = \sum_{u=1}^{v} \left(x_u - \bar{x}\right)^2 \qquad 6.26$$

Finalement, le coefficient de détermination multiple empirique est obtenu de ces deux valeurs selon l'équation suivante.

$$R^2 = 1 - \frac{e_z}{c_z} \qquad 6.27$$

Ce coefficient analogue au coefficient de régression linéaire fourni de l'information quant à la variation de l'erreur d'estimation. Toutefois, il amplifie une

erreur due à un mauvais point échantillonnage, ce qui diminue sa capacité d'optimisation. Il est tout de même utilisé dans cette étude pour minimiser l'erreur d'estimation et augmenter la fiabilité du modèle de croissance de la biomasse sèche. L'algorithme utilisé pour l'optimisation de la fiabilité du modèle selon cette méthode de calcul est le suivant :

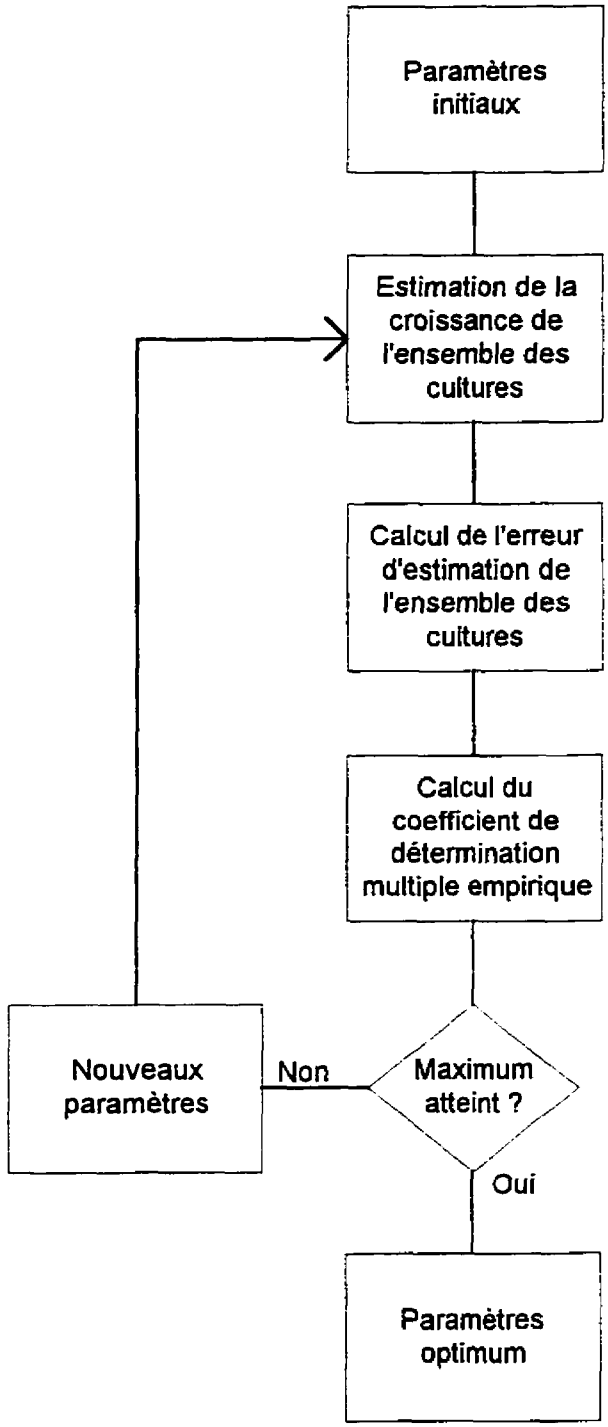


Figure 6.4 : **Algorithme de la stratégie d'optimisation de la fiabilité du modèle de croissance de la biomasse sèche par le coefficient de détermination multiple empirique.**

6.1.6.3 Comparaison des deux techniques et analyse des résultats

Ces deux techniques de calcul de l'erreur d'estimation sont utilisées tour à tour pour minimiser l'erreur d'estimation du modèle de croissance de la biomasse sèche par l'ajustement des constantes de saturation et de toxicité ainsi que le taux spécifique de croissance maximum dans l'équation du taux spécifique de croissance de la biomasse sèche (équation 6.12)

6.1.6.3.1 Minimisation par l'erreur relative moyenne

Pour débuter la phase de calcul de l'optimisation de la fiabilité du modèle de croissance de la biomasse sèche, l'algorithme de minimisation de l'erreur d'estimation par le calcul de l'erreur relative moyenne présenté à la figure 6.3 est implanté où les paramètres déterminés mathématiquement sont les constantes du taux spécifique de croissance de l'équation 6.12. L'erreur relative moyenne ainsi obtenue est de 24.5 % alors que l'erreur minimum, 5.7 %, est associée à la culture 5SH13 et l'erreur maximum, 49.8%, correspond à la culture 5SH9. Les profils résultants associés à chaque ion sont présentés à la figure 6.5 alors que les paramètres obtenus sont présentés au tableau 6.3. Les courbes de croissance correspondantes pour diverses cultures avec cette série de paramètres sont présentées à la figure 6.6.

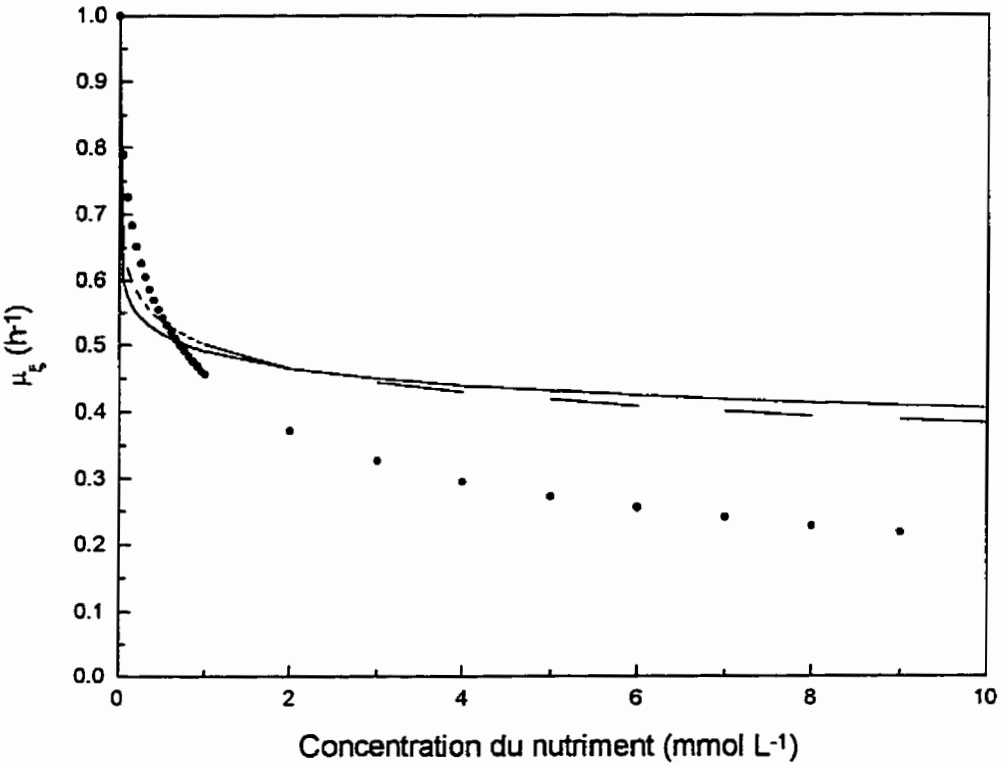


Figure 6.5 : **Profil des taux spécifiques de croissance associé aux ions contenus dans l'équation du taux spécifique de croissance de la biomasse sèche** ····· nitrate, —— ammonium extracellulaire, ---- phosphate extracellulaire

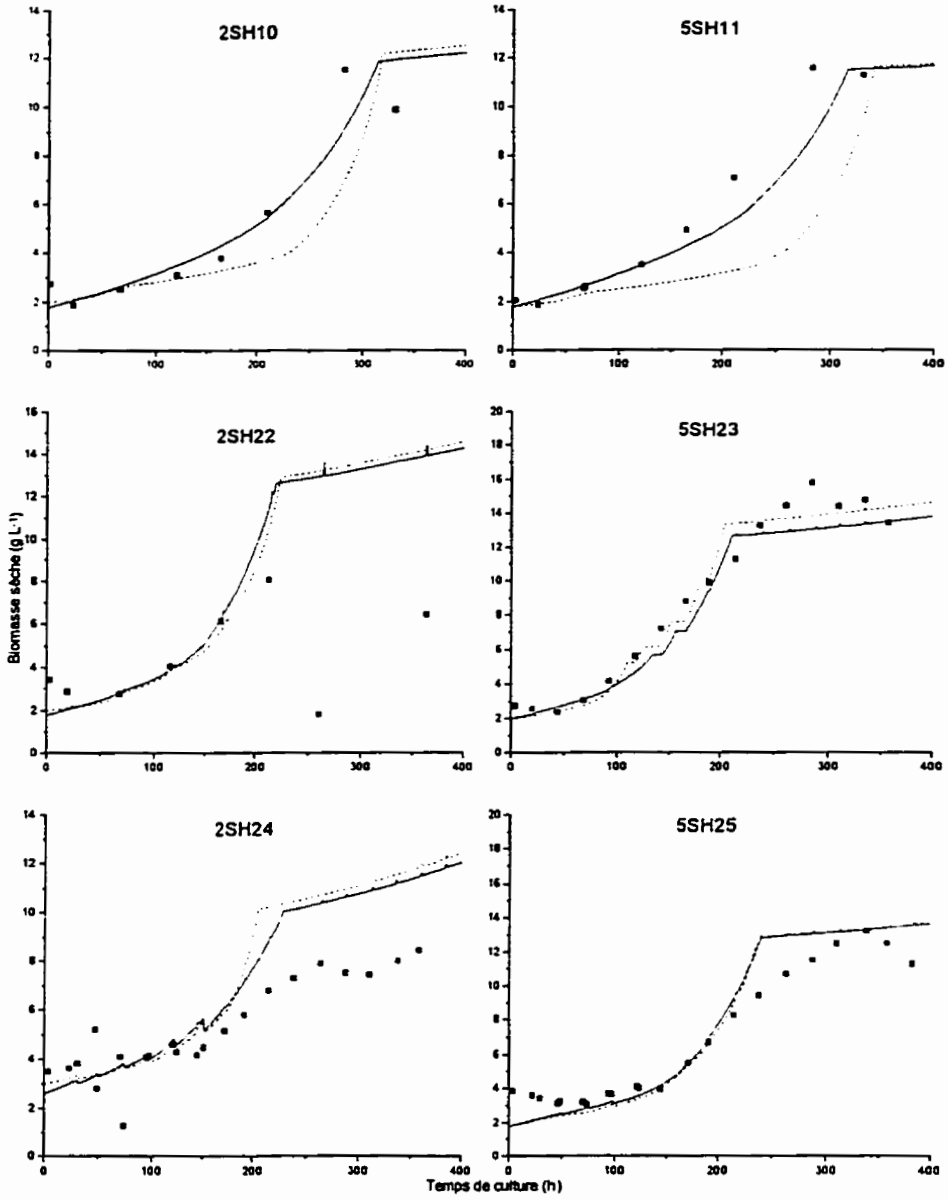


Figure 6.6 **Courbes de croissance de la biomasse sèche prédites par les modèles obtenus des différentes scéances d'optimisation des paramètres.** ------ utilisation de l'ammoniaque extracellulaire, —— utilisation de l'ammoniaque intracellulaire

Tableau 6.3 : Paramètre de l'équation du taux spécifique de croissance de la biomasse sèche obtenu par la technique de minimisation de l'erreur relative moyenne

		s	n_t	no_3	po_{4e}	nh_{4e}
Unité i		g L^{-1}	mmol L^{-1}	mmol L^{-1}	mmol L^{-1}	mmol L^{-1}
μ^* (h^{-1})	0.064					
K_ξ^1 (unités i)		1.000	0.035	0.837	1.002	0.964
K_ξ^2 (--)				0.500	0.208	0.150

La valeur obtenue pour le taux spécifique maximum de croissance, 0.064 h^{-1}, semble trop élevée. Ceci peut toutefois s'expliquer par les profils de croissance associés au phosphate et à l'ammoniaque présentés à la figure 6.5. En effet, les profils de taux spécifiques de croissance associés à ces paramètres, μ_{PO4e} et μ_{NH4e}, présentent une forme s'approchant d'un échelon, signifiant que simplement la présence de ces ions dans le milieu de culture ralentie considérablement la croissance de la biomasse sèche, alors que le maximum lorsque la concentration est de 0 ne se situe pas à 1. Ceci a pour effet d'amplifier le taux spécifique maximum de croissance pour contre-balancer ce résultat.

Dans ce cas, l'erreur minimum et l'erreur maximum correspondent toutes les deux à des cultures où il y a eu un ajout d'ammoniaque et de phosphate 60 heures suivant l'inoculation (figure 5.1). Il apparaît donc une difficulté du modèle à décrire un

même phénomène répété sur quelques cultures avec des quantités d'ajouts différentes. Combiné à une erreur relative moyenne d'estimation élevé (24.5 %), il apparaît que le modèle de croissance développé démontre des faiblesses à décrire les phénomènes de croissance associés aux nutriments utilisés. Il en découle donc que les nutriments utilisés n'ont pas nécessairement l'impact supposé. Une analyse plus détaillée de l'effet des nutriments sur la croissance s'impose donc.

La première hypothèse posée d'un impact nutritionnel négatif concerne le nitrate. En observant les courbes obtenues pour les cultures 5SH23 et 5SH25 (figures 5.3 et 5.4) où l'effet du nitrate est imposé prédominant par l'ajout périodique de ce nutriment, il s'avère que l'estimation de la croissance de la biomasse sèche est assez bien réalisée. Il est donc possible de croire que l'effet du nitrate est bien représenté et réellement néfaste pour la croissance de la biomasse des cultures.

Le second nutriment auquel est associé un impact négatif est le phosphate extracellulaire. En observant la culture 2SH22 (figure 5.2) où l'ajout périodique de phosphate est effectué, il apparaît que l'estimation de la croissance suit bien les points expérimentaux mesurés, à l'exception d'un prolongement de croissance estimé par rapport aux données réelles. Ce prolongement de croissance n'est présent qu'une dixaine d'heures mais considérant la phase exponentielle de croissance à l'intérieure de la quelle il se présente, ceci a pour effet d'obtenir une concentration en biomasse sèche finale supérieure à la réalité. Toutefois, cet effet n'est pas considéré comme majeur

puisque la fin de la période de croissance peut être corrigée par une légère modification de la constante de saturation en hydrates de carbone de l'équation du taux spécifique de croissance de la biomasse sèche (équation 6.12).

Finalement, le dernier nutriment présent dans l'expression du taux spécifique de croissance est l'ammoniaque extracellulaire. Selon les observations faites lors de la phase d'étude de la croissance, il apparaît que l'ammoniaque a un effet négatif sur la croissance de la biomasse sèche. Toutefois cet effet ne semble pas direct et immédiat ce qui se répercute sur le résultat obtenu. En effet, lors d'ajouts de ce nutriment combiné au phosphate (5SH9 à 5SH11), l'effet néfaste est amplifié, ce qui résulte en une estimation faible de la croissance de la biomasse sèche.

Afin de contrer ce problème, deux hypothèses peuvent être posées. Premièrement, il est possible de poser que l'effet néfaste associé à l'ammoniaque soit indirect plutôt qu'un effet direct de concentration. Dans ce cas, l'ammoniaque intracellulaire estimé peut être utilisé pour modéliser ce ralentissement de la croissance de la biomasse sèche. Seconde hypothèse, l'ammoniaque extracellulaire est néfaste à la croissance de la biomasse sèche par un effet indirect dissocié de l'ammoniaque intracellulaire. Par exemple, il est possible que cet effet néfaste soit le résultat d'un abaissement de pH par les cellules lors de l'absorption de l'ammoniaque provoqué par un relargage de protons (H^+). Dans les deux cas, la pseudo-concentration d'ammoniaque intracellulaire peut être utilisée lors de l'élaboration du modèle pour

tenir compte de cet effet de toxicité pour la croissance de la biomasse sèche. L'équation 6.12 est donc reformulée en utilisant l'ammoniaque intracellulaire comme agent toxique plutôt que l'ammoniaque extracellulaire.

$$\mu_x = \mu_x * \left(\frac{s}{K_S^x + s}\right)\left(\frac{n_t}{K_{N_t}^x + n_t}\right)\left(\frac{K_{NO_3}^{x1}}{K_{NO_3}^{x1} + no_3^{K_{NO_3}^{x2}}}\right)\left(\frac{K_{PO_{4e}}^{x1}}{K_{PO_{4e}}^{x1} + po_{4e}^{K_{PO_{4e}}^{x2}}}\right)\left(\frac{K_{NH_{4i}}^{x1}}{K_{NH_{4i}}^{x1} + nh_{4i}^{K_{NH_{4i}}^{x2}}}\right) \quad 6.28$$

L'implantation de cette nouvelle équation dans le modèle de croissance de la biomasse sèche conjugué à l'utilisation de l'algorithme de minimisation de l'erreur d'estimation par le calcul de l'erreur relative moyenne présenté à la figure 6.3 permet d'obtenir un lissage des valeurs expérimentales avec une erreur résiduelle de 15.2 % comme erreur relative moyenne d'estimation. Le coefficient de détermination multiple empirique correspondant est de 0.85. Les courbes d'estimation résultantes pour la croissance de la biomasse sèche et la consommation des nutriments sont présentées aux figures 5.1 à 5.6 du précédent chapître et à la figure 6.6. L'erreur minimale relative est de 1.6 % associée à la culture 5SH13 alors que celle maximale est de 27.1 % pour la culture 2SH24.

Cette dernière est principalement produite par une difficulté du modèle à décrire l'effet associé à l'ammoniaque sur la croissance de la biomasse sèche. En effet, une certaine erreur est introduite dans le modèle par l'utilisation de la pseudo-concentration intracellulaire en ammoniaque définie précédemment qui n'est pas

nécessairement réelle. Ceci explique donc l'erreur maximum obtenue pour l'estimation de la croissance de la culture 2SH24, culture où de l'ammoniaque est y ajoutée périodiquement amplifiant ainsi l'erreur correspondante.

Les paramètres obtenus par cette technique de minimisation de l'erreur relative moyenne sont présentés au tableau 6.4.

Tableau 6.4 : Paramètre de l'équation du taux spécifique de croissance de la biomasse sèche fonction de l'ammoniaque intracellulaire obtenu par la technique de minimisation de l'erreur relative moyenne

		s	n_t	no_3	po_{4e}	nh_{4i}
Unité i		g L^{-1}	mmol L^{-1}	mmol L^{-1}	mmol L^{-1}	mmol L^{-1}
μ^* (h^{-1})	0.029					
K_ξ^i (unité i)		0.852	1×10^{-10}	1.100	1.995	1.985
K_ξ^2 (--)				0.165	0.153	0.225

La valeur obtenue pour le taux spécifique maximum de croissance, 0.029 h^{-1}, semble encore légèrement trop élevée. Ceci peut toutefois s'expliquer par les profils de croissance associés au nitrate, au phosphate et à l'ammoniaque intracellulaire présentés à la figure 6.7. En effet, les profils de taux spécifiques de croissance associés à ces paramètres, μ_{NO3}, μ_{PO4e} et μ_{NH4i}, présentent une forme s'approchant d'un échelon signifiant que simplement la présence de ces ions dans le

milieu de culture (ou dans la cellule dans le cas de l'ammoniaque) ralentie considérablement la croissance de la biomasse sèche.

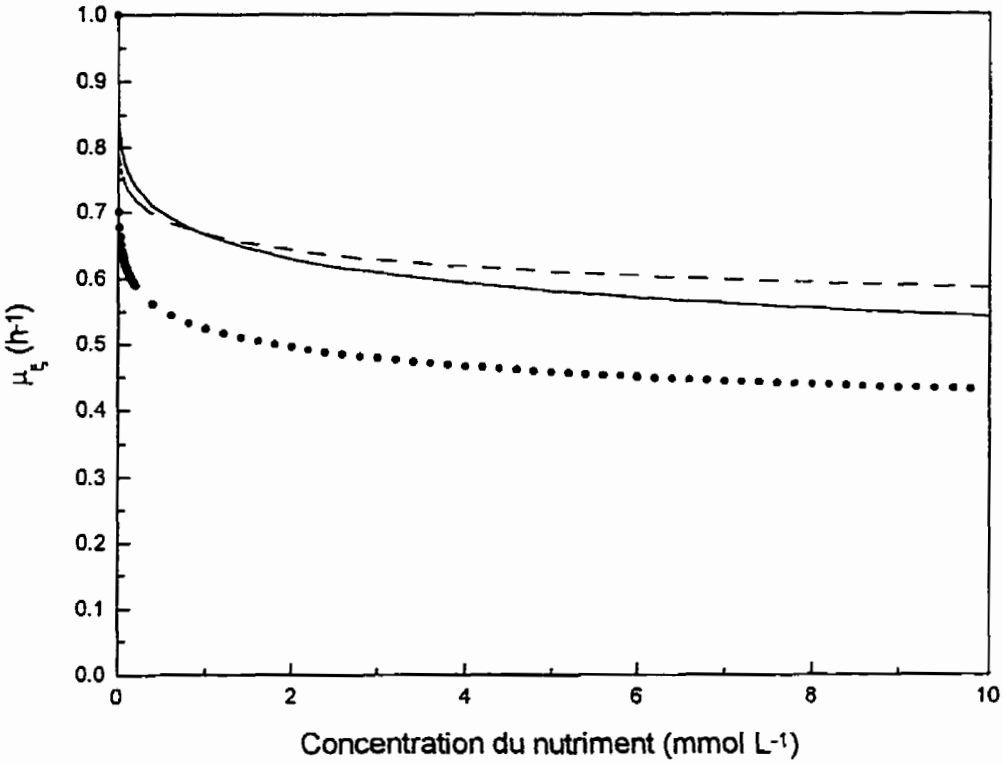


Figure 6.7 : Profil des taux spécifiques de croissance associé aux ions contenus dans l'équation du taux spécifique de croissance de la biomasse sèche fonction de l'ammoniaque intracellulaire ····· nitrate, ---- phosphate extracellulaire, · —— ammonium intracellulaire

L'obtention de tels profils pourrait être expliqué par l'activation des métabolismes d'absorption de ces nutriments lors de leur présence, provoquant ainsi

une limitation de l'énergie disponible à la croissance ou par l'effet pH associé à l'échange protonique survenant lors de la consommation de ces nutriments. Ces hypothèses semblent d'autant plus vraies que l'ion présentant l'effet négatif le plus significatif est le nitrate, ion qui doit être tout d'abord absorbé puis transformé en ion ammonium (Payne et coll., 1991) requérant ainsi un surplus d'énergie. Dans le cas de l'ammonium intracellulaire, il est posé que sa présence stimule des voies métaboliques différentes que celles de production de biomasse. Cette hypothèse est démontrée ultérieurement. Ces échelons résultent donc en un taux maximum plus élevé afin de compenser l'erreur qu'ils produisent par leur augmentation radicale.

6.1.6.3.2 Minimisation par le coefficient de détermination multiple empirique

L'implantation de l'algorithme de maximalisation du coefficient de détermination multiple empirique présenté à la figure 6.4 est ensuite réalisée. Les résultats obtenus avec cette technique sont les mêmes que ceux obtenus avec la technique précédente. Les paramètres résultants sont identiques ainsi que les valeurs du coefficient de détermination multiple empirique (0.85) et de l'erreur relative moyenne (15.2 %).

6.1.6.3.3 Comparaison des deux techniques

Le fait de converger vers la même série de paramètres en utilisant deux techniques différentes de minimisation de l'erreur résiduelle d'estimation, par

minimisation directe ou par maximalisation d'un coefficient, indique que les valeurs obtenues sont les meilleures possibles selon le modèle utilisé et dans les conditions expérimentales de culture.

Afin d'augmenter la précision d'estimation, différentes sources d'erreur doivent être réduites. Tout d'abord, la forme du modèle proposé ne considère pas la phase de latence de début de culture. De manière à contrer ce problème, les conditions de culture à l'inoculation sont volontairement modifiées dans les premières heures de culture de manière à ramener l'estimation du modèle au point de départ de la phase de croissance. Par la suite, le modèle est autonome et n'est nullement corrigé. Une telle déviation des conditions initiales réelles et estimées est aussi appliqué par Bailey et Nicholson (1989), Hooker et Lee (1992) ainsi que van Gulik et coll. (1993) pour l'estimation de la concentration de produits intracellulaires, extracellulaires et l'accumulation des hydrates de carbone respectivement.

En outre, l'utilisation d'une pseudo-concentration intracellulaire en ammoniaque et en phosphate induit une erreur quant à l'estimation de la croissance de la biomasse par le modèle. Dans le cas du phosphate, un protocole pour effectuer cette mesure est en développement. En ce qui a trait à l'ammoniaque, cette mesure apparait plus difficile puisque cet ion n'est pas libre à l'intérieur de la cellule mais fixé à des macromolécules.

Finalement, l'analyse de la concentration des nutriments dans le milieu de culture est aussi une source d'erreur qui est d'autant plus grande que la concentration ionique est faible. Cette erreur est inévitable dans les conditions actuelles d'analyse compte tenu que les concentrations de nutriments sont importantes au début de culture par rapport à la fin. Toutefois, cette erreur peut être contournée par une analyse en deux étapes. Suite à une analyse normale, les échantillons présentant de plus faibles quantités d'ions (< 25 % du maximum) sont réanalysés avec une plus petite dilution, soit une précision supérieure.

6.1.6.3.4 Analyse de sensibilité

Une analyse de sensibilité fourni généralement plusieurs informations pertinentes sur les résultats d'un processus d'analyse. Dans ce cas où certains paramètres du modèle de croissance sont déterminés mathématiquement, cette analyse s'avère un outil d'appréciation des valeurs obtenues fort utile.

La méthode utilisée consiste à faire varier chaque paramètre tour à tour aux environs de sa valeur nominale, soit la valeur retenue lors du processus de minimisation, tout les autres paramètres étant à leur valeur nominale. La figure 6.8 présente l'effet de variations des paramètres sur l'erreur relative moyenne d'estimation de la biomasse sèche alors que la figure 6.9 en présente l'effet sur le coefficient de détermination multiple empirique.

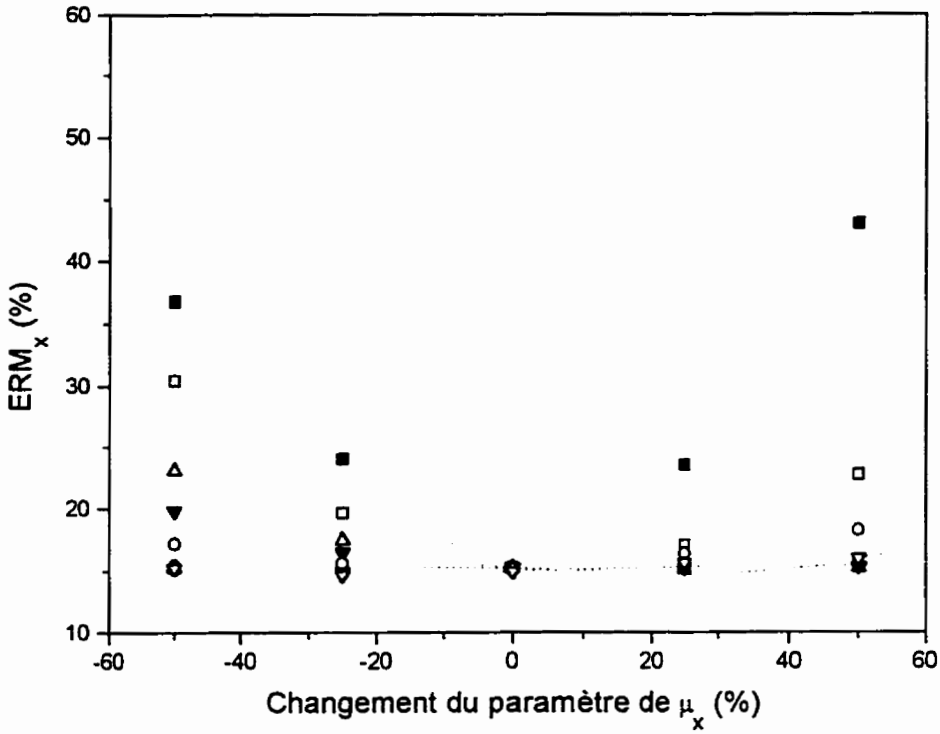


Figure 6.8 : **Effet des variation des paramètres du taux spécifique de croissance de la biomasse sèche sur l'erreur relative moyenne d'estimation de la biomasse sèche**

■ μ^*, ● K_S, ▲ K_{Nt}, ▼ $K^1_{PO_{4e}}$, ◆ $K^2_{PO_{4e}}$, ❑ $K^1_{NO_3}$, ○ $K^2_{NO_3}$, Δ $K^1_{NH_{4e}}$, ∇ $K^2_{NH_{4e}}$.

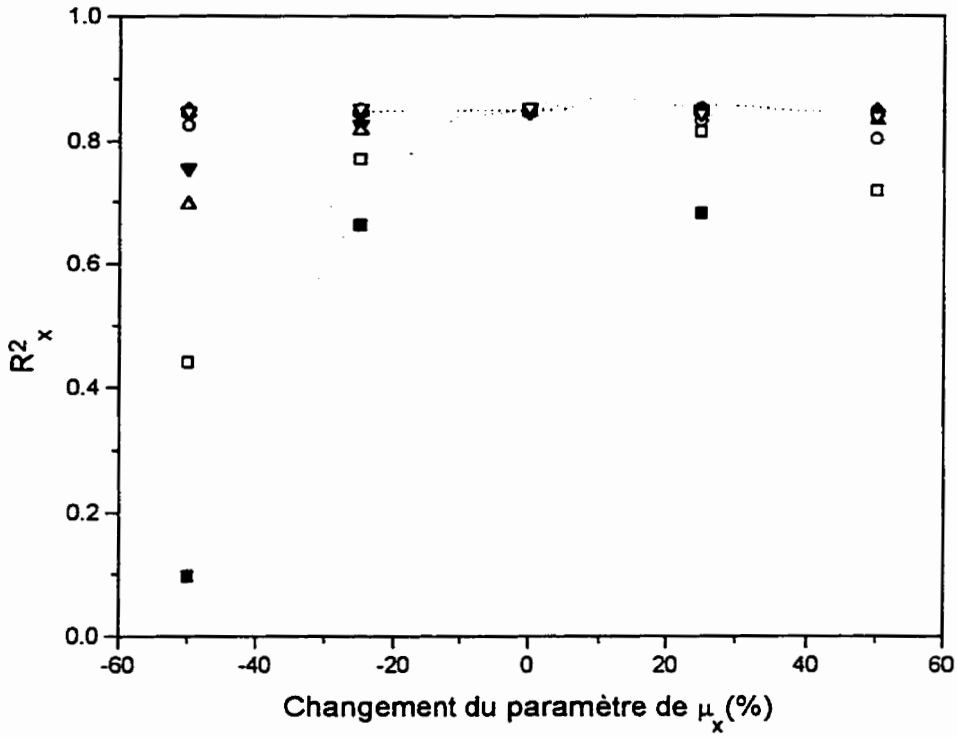


Figure 6.9 : **Effet des variation des paramètres du taux spécifique de croissance de la biomasse sèche sur le coefficient de détermination multiple empirique de la biomasse sèche** ■ μ^*, ● K_S, ▲ K_{Nt}, ▼ $K^1_{PO_{4e}}$, ◆ $K^2_{PO_{4e}}$, ❑ $K^1_{NO_3}$, ○ $K^2_{NO_3}$, Δ $K^1_{NH_{4e}}$, ∇ $K^2_{NH_{4e}}$.

En observant ces deux figures, il apparaît que le paramètre critique à une bonne estimation de la croissance de la biomasse sèche par le modèle est le taux spécifique maximum de croissance μ^*. En effet une variation de moins de 10 % affecte significativement l'erreur d'estimation.. Une attention particulière doit donc y être

apportée. Les trois autres paramètres présentant les plus grandes sensibilités sont les constantes de saturation ajustées du nitrate, de l'ammoniaque intracellulaire et du phosphate extracellulaire respectivement. Ceci s'explique par l'importance de la valeur de ces paramètres sur la forme des courbes de croissance spécifique associées à chacun (figure 6.5). L'influence de variations des autres variables n'est que peu significative sur le taux de croissance spécifique modélisé de la biomasse sèche.

6.2 Prolifération cellulaire

Afin d'être en mesure de modéliser adéquatement la prolifération cellulaire, quelques hypothèses de modélisation doivent être ajoutées à celles émises précédemment.

1. Les cellules d'*Eschscholtzia californica* n'accumulent pas de sucres intracellulaires; ***le taux spécifique de la prolifération cellulaire devient nul lorsque qu'il y a épuisement des hydrates de carbone extracellulaires***,

2. ***le taux spécifique de prolifération cellulaire est négativement affecté par une augmentation des concentrations extracellulaires en nitrate, en phosphate ainsi qu'en ammoniaque***,

3. ***le taux spécifique de prolifération cellulaire est favorablement affecté par une augmentation de la concentration en ammoniaque intracellulaire (NH_{4i})***.

En se basant sur l'ensemble de ces hypothèses, le modèle de croissance de la concentration cellulaire est développé.

6.2.1 Schème réactionnel

Contrairement à l'étape précédente décrivant la modélisation de la biomasse sèche, aucun schème réactionnel n'est posé pour la prolifération cellulaire. Ce choix repose sur l'hypothèse justifiée précédemment selon laquelle les nutriments sont consommés proportionnellement à un accroissement de la biomasse. Dans le cadre de cette étude, la division cellulaire est considérée comme une réorganisation de l'arrangement cellulaire plutôt que d'un accroissement nécessitant la consommation supplémentaire de certains nutriments.

Cependant, ce réarrangement de la biomasse par le processus de division cellulaire est supposé influencé par la présence de certains nutriments ainsi que par leur concentration. Cet effet peut se traduire principalement par la disponibilité de ces nutriments ou par l'activation ou la répression de voies métaboliques associées à la prolifération cellulaire.

Cette prolifération cellulaire est donc modélisée de manière similaire à la croissance de la biomasse sèche selon l'algorithme de résolution proposé par Bastin et Dochain (1990) présenté à la section 6.1.1 en se basant toutefois sur les principes logique de réaction plutôt que sur le schème réactionnel directement. L'équation résultant de ce processus est donc :

$$\frac{d\not{c}}{dt} = k_{\not{c}}\mu_{\not{c}}\not{c} - D\not{c} \qquad 6.29$$

De plus, la même forme de taux spécifique de croissance représentant une inhibition de la croissance associé aux ions (équation 6.12) est utilisée pour modéliser l'effet du nitrate et du phosphate extracellulaire. Effectivement, l'utilisation conjointe d'une constante de saturation et d'une puissance de toxicité confère à la forme du taux de croissance spécifique développée une grande polyvalence quant à l'impact négatif d'un ion sur un phénomène de croissance. Quant à l'impact négatif associé à l'ammoniaque extracellulaire, une fois de plus, il ne semble être ni immédiat ni extrêmement prononcé. Il est donc évident que sa concentration ne peut être utilisée directement pour représenter cet effet comme dans le cas de la biomasse sèche. De manière similaire, son impact négatif est associé à l'ammoniaque intracellulaire.

De cette façon, l'impact négatif de l'ammoniaque extracellulaire ainsi que l'impact positif de l'ammoniaque intracellulaire peuvent à la fois être décrits par le même taux spécifique de croissance associé à un seul ion, l'ammoniaque intracellulaire. De cette manière, le nombre de paramètres à être déterminés mathématiquement est réduit facilitant ainsi l'optimisation de la fiabilité du modèle de croissance. De manière à obtenir un tel résultat, aucune contrainte n'est appliquée à l'estimation des paramètres du taux spécifique de croissance associé à l'ammoniaque intracellulaire. L'effet prédominnant , inhibiteur ou favorable, associé à ce terme ressortira par l'expression positive ou négative du coefficient de toxicité. Un coefficient de toxicité

négatif signifie donc un effet favorable comme démontré par le réarrangement de l'équation d'inhibition.

$$\mu^{\varepsilon}_{NH_{4i}} = \frac{K^{\varepsilon 1}_{NH_{4i}}}{K^{\varepsilon 1}_{NH_{4i}} + nh_{4i}^{-K^{\varepsilon 2}_{NH_{4i}}}} \qquad 6.30$$

$$\mu^{\varepsilon}_{NH_{4i}} = \frac{K^{\varepsilon 1}_{NH_{4i}}}{K^{\varepsilon 1}_{NH_{4i}} + nh_{4i}^{-K^{\varepsilon 2}_{NH_{4i}}}} \times \frac{nh_{4i}^{K^{\varepsilon 2}_{NH_{4i}}}}{nh_{4i}^{K^{\varepsilon 2}_{NH_{4i}}}} \qquad 6.31$$

$$\mu^{\varepsilon}_{NH_{4i}} = \frac{K^{\varepsilon 1}_{NH_{4i}}\, nh_{4i}^{K^{\varepsilon 2}_{NH_{4i}}}}{K^{\varepsilon 1}_{NH_{4i}}\, nh_{4i}^{K^{\varepsilon 2}_{NH_{4i}}} + 1} \qquad 6.32$$

$$\mu^{\varepsilon}_{NH_{4i}} = \frac{K^{\varepsilon 1}_{NH_{4i}}\, nh_{4i}^{K^{\varepsilon 2}_{NH_{4i}}}}{K^{\varepsilon 1}_{NH_{4i}}\left(nh_{4i}^{K^{\varepsilon 2}_{NH_{4i}}} + 1/K^{\varepsilon 1}_{NH_{4i}}\right)} \qquad 6.33$$

$$\mu^{\varepsilon}_{NH_{4i}} = \frac{nh_{4i}^{K^{\varepsilon 2}_{NH_{4i}}}}{nh_{4i}^{K^{\varepsilon 2}_{NH_{4i}}} + 1/K^{\varepsilon 1}_{NH_{4i}}} \qquad 6.34$$

où $K^{\varepsilon}_{NH_{4i}} = \left(1/K^{\varepsilon 1}_{NH_{4i}}\right)^{-K^{\varepsilon 2}_{NH_{4i}}}$ est la constante de saturation de l'ammoniaque. L'équation du taux spécifique de croissance obtenu représente une forme très semblable à celle développée par Monod (1942).

L'équation générale du taux spécifique de prolifération cellulaire est présentée sous la même forme que l'équation de croissance de la biomasse sèche (équation 6.28) indiquant que ces taux de croissance sont affectés par les mêmes nutriments.

$$\mu_{\text{¢}} = \mu_{\text{¢}}^{*}\left(\frac{s}{K_S^{\text{¢}} + s}\right)\left(\frac{K_{NO_3}^{\text{¢}1}}{K_{NO_3}^{\text{¢}1} + no_3^{K_{NO_3}^{\text{¢}2}}}\right)\left(\frac{K_{PO_{4e}}^{\text{¢}1}}{K_{PO_{4e}}^{\text{¢}1} + po_{4e}^{K_{PO_{4e}}^{\text{¢}2}}}\right)\left(\frac{K_{NH_{4i}}^{\text{¢}1}}{K_{NH_{4i}}^{\text{¢}1} + nh_{4i}^{K_{NH_{4i}}^{\text{¢}2}}}\right) \qquad 6.35$$

En utilisant la même forme d'équation fonction des mêmes nutriments pour modéliser ces deux paramètres de croissance, il est possible de vérifier mathématiquement si ces deux expressions de croissance de cultures de cellules végétales sont associées aux mêmes phénomènes.

6.2.2 Taux spécifique de prolifération

Tout comme pour le taux spécifique de croissance de la biomasse sèche, les paramètres contenus dans l'équation du taux spécifique de prolifération cellulaire sont déterminés mathématiquement.

6.2.3 Évaluation des paramètres non-calculés

L'évaluation de ces paramètres est aussi réalisée à l'aide des algorithmes développés précédemment (figures 6.3 et 6.4) par l'utilisation de la fonction Solveur© du logiciel Excel 5.0© de Microsoft. Dans ce cas aussi, l'équation différentielle de

l'évolution de la concentration cellulaire dans le temps doit être manipulée et discrétisée de manière à être implantée dans le logiciel utilisé pour la minimisation de l'erreur résiduelle d'estimation. Une fois ces manipulations effectuées (voir étapes 1 à 3 de la section 6.1.5), l'équation 6.28 devient :

$$\phi_t = \phi_{t-1}\frac{V_{t-1}}{V_t} + T\frac{V_{t-1}}{V_t}\left[k_t\mu_t\phi - D\phi\right]_{t-1} \qquad 6.36$$

Puisque le taux spécifique de prolifération cellulaire dépend des concentration en nutriments, ce modèle (équations 6.35 et 6.36) doit obligatoirement être associé au modèle de croissance de la biomasse sèche de manière à répondre à la condition de pleine autonomie. Le modèle global utilisé est donc le suivant :

$$\begin{bmatrix} ¢ \\ x \\ s \\ no_3 \\ po_{4e} \\ nh_{4e} \\ po_{4i} \\ nh_{4i} \end{bmatrix}_t = \begin{bmatrix} ¢ \\ x \\ s \\ no_3 \\ po_{4e} \\ nh_{4e} \\ po_{4i} \\ nh_{4i} \end{bmatrix}_{t-1} \frac{V_{t-1}}{V_t}$$

$$+T\frac{V_{t-1}}{V_t}\left[\begin{bmatrix} 0 & 0 & 0 & k_¢ \\ 0 & 0 & k_x & 0 \\ 0 & 0 & -k_S & 0 \\ 0 & 0 & -k_{NO_3} & 0 \\ -k_{PO_{4e}} & 0 & 0 & 0 \\ 0 & -k_{NH_{4e}} & 0 & 0 \\ k^1_{PO_{4i}} & 0 & -k^2_{PO_{4i}} & 0 \\ 0 & k^1_{NH_{4i}} & -k^2_{NH_{4i}} & 0 \end{bmatrix}\begin{bmatrix} \phi_1 x & \phi_2 x & \mu_x x & \mu_¢ ¢ \end{bmatrix}_{t-1}\right.$$

$$\left.-\begin{bmatrix} \frac{V_{\square ch}}{t'V_{t-1}}, & \acute{E}ch = 1 \\ 0, & \acute{E}ch = 0 \end{bmatrix}\begin{bmatrix} x \\ s \\ no_3 \\ po_{4e} \\ nh_{4e} \\ po_{4i} \\ nh_{4i} \end{bmatrix}_{t-1} + \begin{bmatrix} 0 \\ f_S \\ f_{NO_3} \\ f_{PO_4} \\ f_{NH_4} \\ 0 \\ 0 \end{bmatrix}_{t-1}\right] \qquad 6.37$$

$$V_t = V_{t-1} - T\left[Q_E + DV_{t-1} - \sum \frac{F_i}{n_i}\right] \qquad 6.38$$

$$\mu_x = \mu_x * \left(\frac{s}{K_S^x + s}\right)\left(\frac{n_t}{K_{N_t}^x + n_t}\right)\left(\frac{K_{NO_3}^{x1}}{K_{NO_3}^{x1} + no_3^{K_{NO_3}^{x2}}}\right)\left(\frac{K_{PO_{4e}}^{x1}}{K_{PO_{4e}}^{x1} + po_{4e}^{K_{PO_{4e}}^{x2}}}\right)\left(\frac{K_{NH_{4i}}^{x1}}{K_{NH_{4i}}^{x1} + nh_{4i}^{K_{NH_{4i}}^{x2}}}\right) \quad 6.28$$

$$\mu_\ell = \mu_\ell * \left(\frac{s}{K_S^\ell + s}\right)\left(\frac{K_{NO_3}^{\ell 1}}{K_{NO_3}^{\ell 1} + no_3^{K_{NO_3}^{\ell 2}}}\right)\left(\frac{K_{PO_{4e}}^{\ell 1}}{K_{PO_{4e}}^{\ell 1} + po_{4e}^{K_{PO_{4e}}^{\ell 2}}}\right)\left(\frac{K_{NH_{4i}}^{\ell 1}}{K_{NH_{4i}}^{\ell 1} + nh_{4i}^{K_{NH_{4i}}^{\ell 2}}}\right) \quad 6.35$$

où les paramètres associés à la croissance de la biomasse sèche, à la consommation des nutriments et à l'évolution du volume de culture sont déterminés. Il ne reste qu'à évaluer mathématiquement les paramètres du taux spécifique de prolifération cellulaire. Dès lors, les 11 équations du modèle de croissance de cellules végétales en réacteurs obtenues en scindant les équations précédentes pour chaque paramètre, sont implantées dans le logiciel.

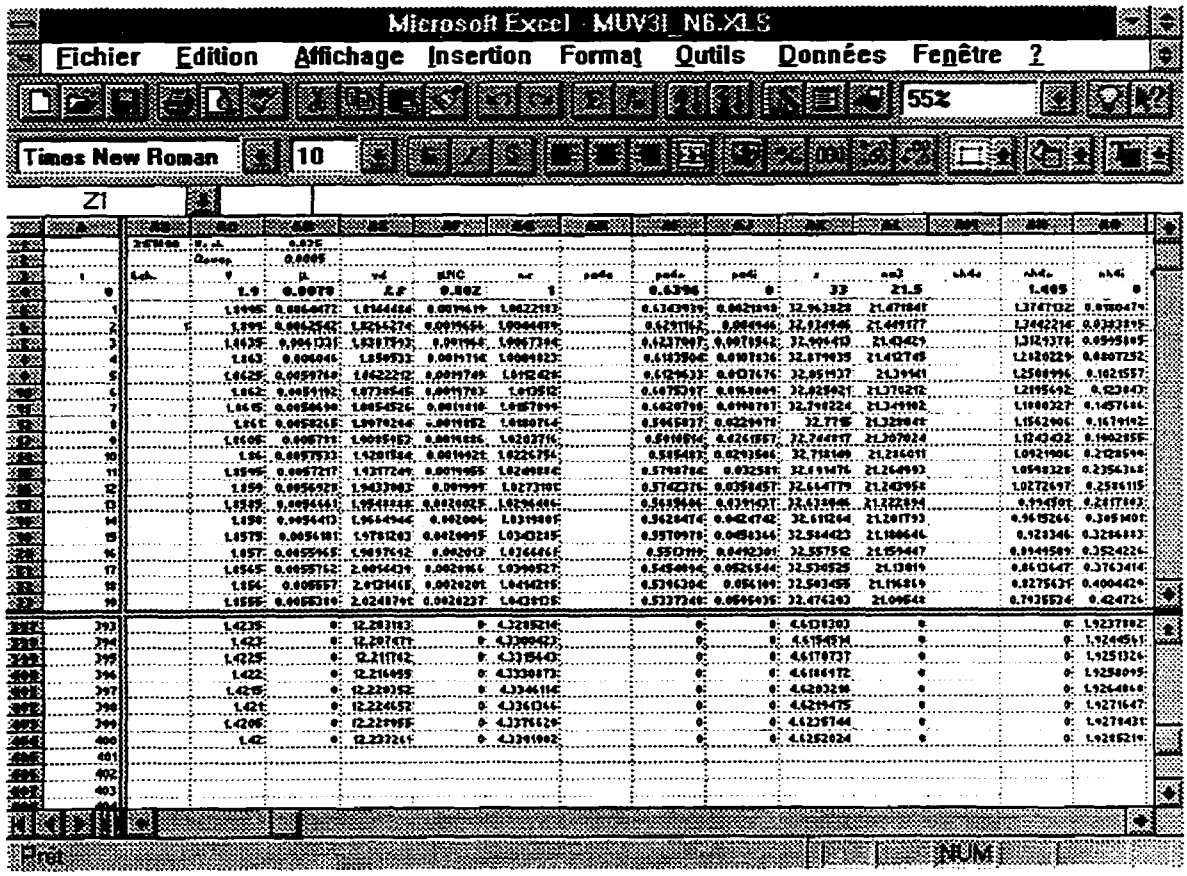


Figure 6.10 : Représentation de la feuille de calcul Excel© du modèle de prolifération de cellules végétales.

6.2.4 Optimisation de la fiabilité du modèle

L'optimisation du modèle d'estimation de la prolifération cellulaire est réalisée par l'ajustement des paramètres du taux spécifique de croissance de manière à minimiser l'erreur résiduelle d'estimation à l'aide des algorithmes présentés aux figures 6.3 et 6.4, adaptés aux présentes conditions.

Deux techniques sont donc utilisées, soit la minimisation de l'erreur relative moyenne d'estimation et la maximalisation du coefficient de détermination multiple empirique. Les mêmes équation employées précédemment (6.23 à 6.27) sont utilisées ici en remplaçant la biomasse sèche (x) par la concentration cellulaire (¢).

6.2.4.1 Minimisation de l'erreur relative moyenne

Une première séance d'optimisation des paramètres est réalisée en utilisant l'erreur relative moyenne comme critère de minimisation. Suite à cette procédure, l'erreur relative moyenne obtenue est de 18.3 % avec un coefficient de détermination multiple empirique correspondant de 0.62. Les courbes de simulation de la prolifération cellulaire réalisées avec les paramètres obtenues sont présentées aux figure 5.1 à 5.6. L'erreur minimum d'estimation de 6.7 % est obtenue pour la culture 5SH9 alors que l'erreur maximale, 24.7 %, correspond à la culture 5SH23.

La culture 5SH23 présentant l'erreur résiduelle maximum est alimentée en NO_3 pendant la période de croissance. L'évolution de la concentration cellulaire estimée suit bien celle mesurée expérimentalement pour les 200 premières heures, moment où la concentration cellulaire a soudainement doublé, quelques heures à peine suivant la fin de la période de croissance prédite par le modèle. En fait, l'erreur principale associée à cette culture vient du doublement soudain de la concentration cellulaire non prédit par le modèle. Il semble qu'à ce moment, il y ait eu division synchronisée des cellules en suspension (figure 5.3 B). Le signal ayant provoqué ce

synchronisme divisionnaire n'est pas identifié. Ce phénomène s'est aussi produit à la fin de la période de prolifération cellulaire lors de la culture 5SH25 aussi alimentée en NO_3 (figure 5.4 B). Il se peut que le signal provoquant la division synchronisée soit associé au nitrate ou au potassium, ion conjugué du nitrate lors des ajouts, ce qui n'est pas confirmé par les résultats de cette étude.

L'hypothèse suivante peut expliquer ce doublement soudain de la concentration cellulaire. Dans les conditions expérimentales de ces deux cultures où le nitrate est alimenté, la concentration en ammoniaque extracellulaire et la pseudo-concentration en ammoniaque intracellulaire deviennent nulles rapidement (figures 5.3 et 5.4). La division cellulaire se poursuit donc basée sur un autre stimuli. Il est alors possible qu'une omniprésence en nitrate accroîsse rapidement la concentration intracellulaire de ce nutriment. Dès lors, en abscence d'ammoniaque, la synthèse des enzymes nitrite-réductase, inhibée ou supprimée par l'ammoniaque (Rose et Martin, 1975), est induite transformant le nitrate en sources ammoniaques. L'ammoniaque ainsi formée induit l'action de la nitrate-réductase (Renner et Beck, 1988) provoquant un accroîssement de la vitesse de réduction du nitrate en ammoniaque. Il s'en suit une augmentation de la vitesse de la prolifération cellulaire, observée en fin de culture, jusqu'à un épuisement des réserves. Le délai observé entre la disparition du pseudo-ammoniaque intracellulaire et le doublement en concentration cellulaire serait la somme des délais d'expression génétique des enzymes et d'utilisation de l'ammoniaque nouvellement disponible.

Les paramètres obtenus par cette technique de minimisation de l'erreur relative moyenne sont présentés au tableau 6.5.

Tableau 6.5 : Paramètre de l'équation du taux spécifique de croissance de la concentration cellulaire obtenu par la technique de minimisation de l'erreur relative moyenne

		s	no_3	po_{4e}	nh_{4i}
Unité i		g L^{-1}	mmol L^{-1}	mmol L^{-1}	mmol L^{-1}
μ^* (h^{-1})	0.013				
K_ξ^1 (unité i)		1×10^{-10}	48.35	73.43	1125
K_ξ^2 (--)			1.71	-0.636	-0.204

Dans ce cas également, le taux spécifique de croissance, 0.013 h^{-1}, peut être légèrement surestimé. Ceci est probablement dû aux profils de croissance associés au phosphate et à l'ammoniaque intracellulaire présentés à la figure 6.11.

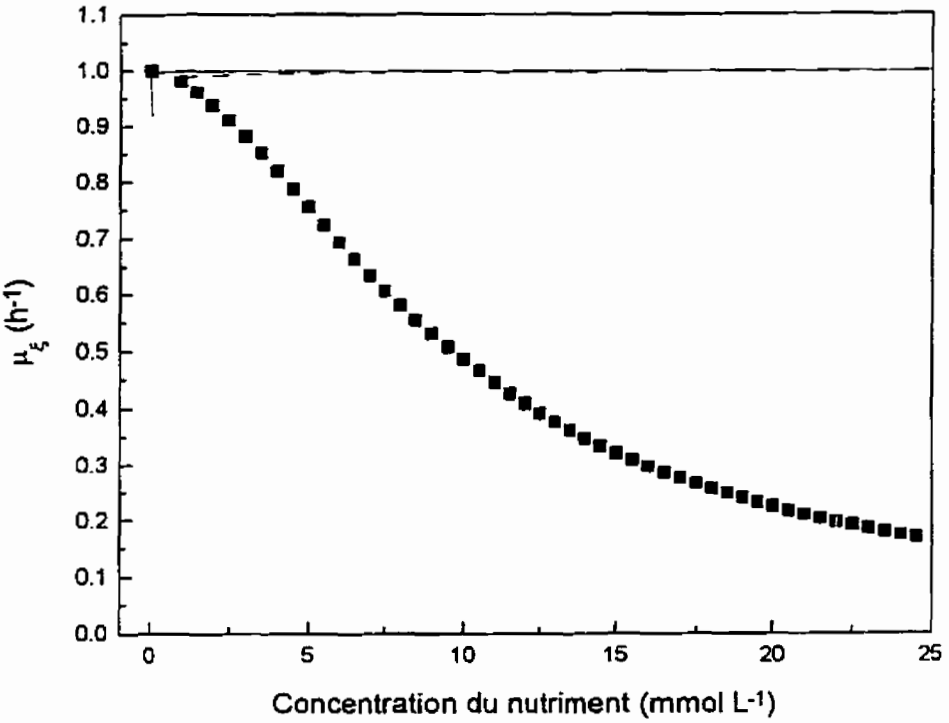


Figure 6.11 : Profil des taux spécifiques de croissance associés aux ions lors de l'utilisation de l'erreur relative moyenne comme critère de minimisation de l'erreur résiduelle d'estimation de la concentration cellulaire ····· nitrate, —— ammonium intracellulaire, ------ phosphate extracellulaire

Le profil obtenu pour le taux de croissance associé au nitrate est traditionnel, représentant une inhibition graduelle avec une augmentation de la concentration dans le milieu de culture. La concentration de ce nutriment a un effet majeur sur le taux de prolifération cellulaire. En fait, c'est le seul nutriment affectant le rythme de division cellulaire selon les paramètres obtenus lors de cette séance d'optimisation. Comme le démontrent les droites associées à l'ammoniaque et au

phosphate, le modèle néglige un quelconque impact de ces nutriments sur la prolifération cellulaire.

En ce qui a trait à l'ammoniaque, cette relation est plausible. Effectivement, il semble que la simple présence de ce nutriment intracellulaire suffit à soutenir la division des cellules. Cependant, dans le cas du phosphate, ce résultat est surprenant. Lors de la culture 2SH22, où du phosphate est ajouté tout au long de la culture, la division cellulaire semble ralentie de manière significative. Afin de confirmer ou d'infirmer ce résultat, une seconde séance d'optimisation par la minimisation de l'erreur relative moyenne est réalisée. Cette fois-ci, la pseudo-concentration intracellulaire du phosphate est utilisée afin de représenter un possible effet étendu de cet ion.

Suite à cette procédure, l'erreur relative moyenne obtenue est encore de 18.3 % mais avec un coefficient de détermination multiple empirique correspondant de 0.64. L'erreur minimum d'estimation de 6.0 % est obtenue pour la culture 5SH9 alors que l'erreur maximale, 24.1 %, correspond encore à la culture 5SH23.

Ces résultats confirmes ceux obtenus précédemment, soit que les concentrations en phosphate et en ammoniaque n'affectent pas significativement le taux de prolifération cellulaire dans les conditions de culture étudiées. Les paramètres obtenus lors de cette séance sont présentés au tableau 6.6 alors que la figure 6.12 présente les profils associés à chaque nutriment.

Tableau 6.6 : Paramètre de l'équation du taux spécifique de croissance de la concentration cellulaire obtenu par la technique de minimisation de l'erreur relative moyenne avec le phosphate intracellulaire

		s	no_3	po_{4i}	nh_{4i}
Unité i		g L^{-1}	mmol L^{-1}	mmol L^{-1}	mmol L^{-1}
μ^* (h^{-1})	0.014				
K_ξ^1 (unité i)		1×10^{-10}	55.53	134.9	1192
K_ξ^2 (--)			1.788	-0.891	-0.200

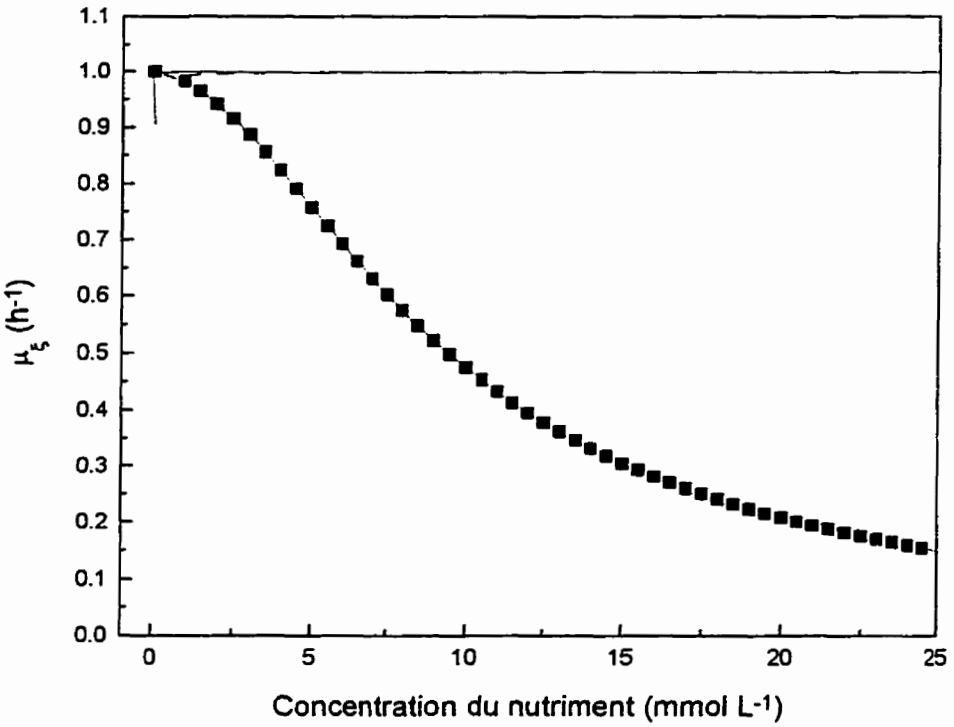


Figure 6.12 : Profil des taux spécifiques de croissance associés aux ions lors de l'utilisation de l'erreur relative moyenne comme critère de minimisation de l'erreur résiduelle d'estimation de la concentration cellulaire avec le phosphate intracellulaire ····· nitrate, —— ammonium intracellulaire, ------ phosphate intracellulaire

6.2.4.2 Minimisation par le coefficient de détermination multiple empirique

La seconde technique employée est celle du coefficient de détermination multiple empirique, utilisé comme critère de minimisation de l'erreur résiduelle par sa maximalisation. Comme précédemment, deux séances d'optimisation du modèle par ajustement des paramètres du taux spécifique de prolifération cellulaire sont réalisées.

Premièrement, il est demandé à la fonction Solveur© de maximiser le coefficient de détermination multiple empirique selon les variations en concentration du nitrate et du phosphate extracellulaire ainsi que de l'ammoniaque intracellulaire. La primauté de l'effet inhibiteur de l'ammoniaque extracellulaire ou favorisateur de l'ammoniaque intracellulaire est mise en évidence mathématiquement. Contrairement aux résultats précédent, cette technique d'optimisation de la fiabilité du modèle met en relief les effets néfastes du phosphate et de l'ammoniaque en plus du nitrate (figure 6.13).

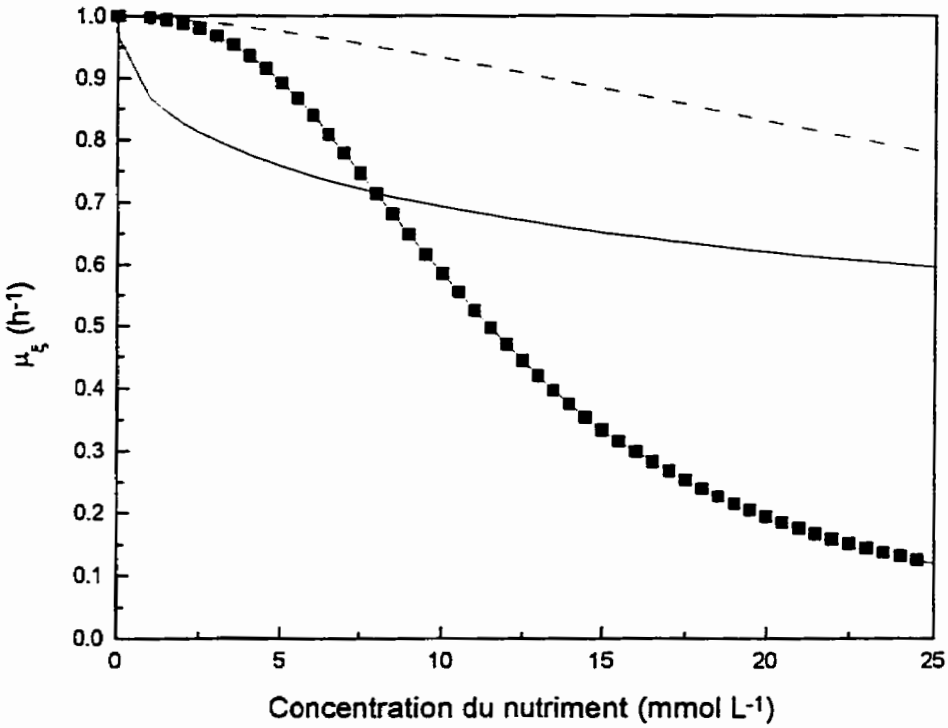


Figure 6.13 : Profil des taux spécifiques de croissance associés aux ions lors de l'utilisation du coefficient de détermination multiple empirique comme critère de minimisation de l'erreur résiduelle d'estimation de la concentration cellulaire ····· nitrate, —— ammonium intracellulaire, ------ phosphate extracellulaire

Le coefficient de détermination multiple empirique obtenu suite à cette analyse est de 0.69, avec une erreur relative moyenne de 20.2 %. Les paramètres obtenus sont présentés au tableau 6.7.

Tableau 6.7 : Paramètre de l'équation du taux spécifique de croissance de la concentration cellulaire obtenu par la technique de maximisation du coefficient de détermination multiple empirique

		s	no_3	po_{4c}	nh_{4i}
Unité i		g L^{-1}	mmol L^{-1}	mmol L^{-1}	mmol L^{-1}
μ^* (h^{-1})	0.014				
K_ξ^1 (unité i)		1×10^{-10}	496.3	432.5	6.560
K_ξ^2 (--)			2.547	1.500	0.464

Ces profils peuvent s'expliquer par un ralentissement du métabolisme de division cellulaire lors de la présence d'ammonium et de phosphate extracellulaires provoqué par l'induction des mécanismes enzymatiques (ex.: glutamate déhydrogénase et glutamate synthétase) et de transport intracellulaire.

Afin de déterminer l'amplitude de l'effet néfaste de l'ammoniaque extracellulaire (réduisant l'effet favorable de l'ammoniaque intracellulaire) et du phosphate extracellulaire, une seconde séance de minimisation de l'erreur résiduelle par le coefficient de détermination multiple empirique est réalisée mais cette fois-ci en utilisant la pseudo-concentration en phosphate intracellulaire dans l'équation du taux spécifique de prolifération.

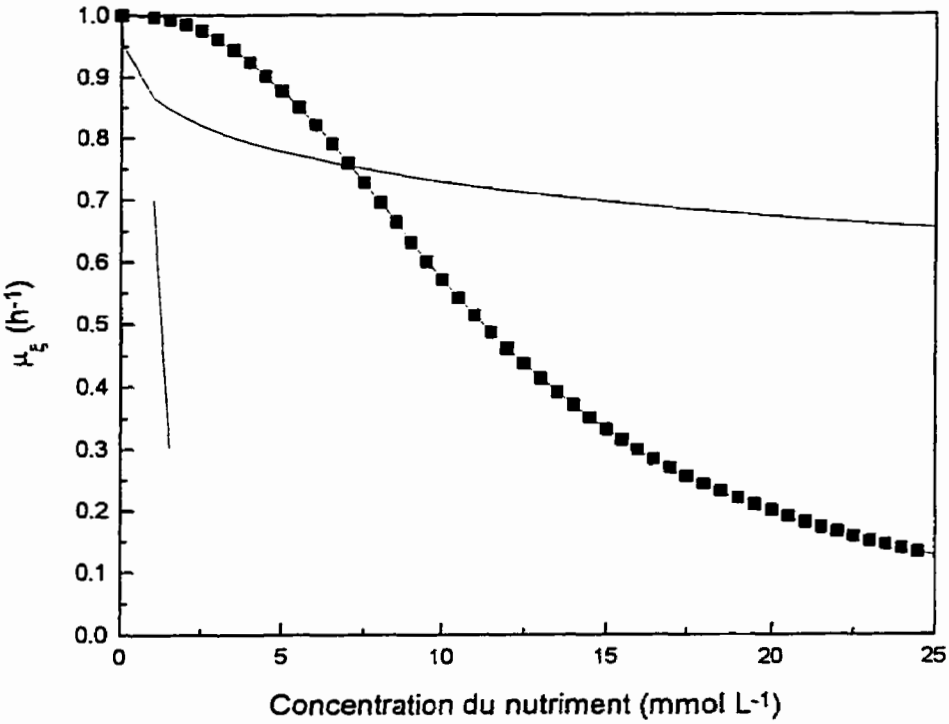


Figure 6.14 : Profil des taux spécifiques de croissance associés aux ions lors de l'utilisation du coefficient de détermination multiple empirique comme critère de minimisation de l'erreur résiduelle d'estimation de la concentration cellulaire avec le phosphate intracellulaire ····· nitrate, —— ammonium intracellulaire, ------ phosphate intracellulaire

Le coefficient de détermination multiple empirique obtenu suite à cette séance d'optimisation des paramètres est de 0.69 alors que l'erreur relative moyenne est de 20.2 %. Les paramètres correspondants à ces résultats sont présentés au tableau 6.8.

Tableau 6.8 : Paramètre de l'équation du taux spécifique de croissance de la concentration cellulaire obtenu par la technique de maximisation du coefficient de détermination multiple empirique avec le phosphate intracellulaire

		s	n_t	no_3	po_{4i}	nh_{4e}
Unité i		g L^{-1}	mmol L^{-1}	mmol L^{-1}	mmol L^{-1}	mmol L^{-1}
μ^* (h^{-1})	0.014					
K_ξ^1 (unité i)		1×10^{-10}	1×10^{-10}	348.8	4×10^{22}	6.456
K_ξ^2 (--)				2.419	181.5	0.381

Les profils obtenus suite à cette séance d'optimisation des paramètres consiste en un effet d'inhibition de l'ammoniaque et du phosphate intracellulaires, le nitrate présentant le même profil que précédemment. Le taux spécifique de prolifération cellulaire est complètement annulé par l'effet associé au phosphate lorsque ce dernier dépasse les 2 mmol L^{-1}. Cet effet d'inhibition plus marqué que précédemment peut s'expliquer par l'utilisation de la pseudo-concentration intracellulaire plus faible que la concentration extracellulaire. Pour avoir sensiblement le même effet, l'impact doit donc être plus grand dans le deuxième cas, en présence de phosphate intracellulaire. Dans le cas de l'ammoniaque, l'effet néfaste obtenu est semblable à celui obtenu précédemment.

6.2.4.3 Comparaison des deux techniques

Contrairement à la phase d'optimisation de la fiabilité du modèle de croissance de la biomasse sèche, l'implantation des algorithmes de minimisation de l'erreur résiduelle donne des résultats différents pour les méthodes de minimisation de l'erreur relative moyenne et celle du coefficient de détermination multiple empirique. En effet, avec la technique de l'erreur relative moyenne, l'erreur résiduelle est obtenue en considérant l'impact des concentrations en ammoniaque et en phosphate négligeable par rapport au taux de prolifération cellulaire. Cependant, l'utilisation du coefficient multiple empirique résulte en l'obtention d'un effet inhibiteur de croissance de la part des trois nutriments; l'ammoniaque, le phosphate et le nitrate. Une comparaison des courbes résultantes s'impose donc.

La figure 6.15 présente les courbes obtenues avec les quatres séries de paramètres présentées pour 6 cultures représentatives des expérimentations effectuées. De manière générale, il est possible d'admettre que l'ensemble des courbes présentent de bonnes estimations des croissances en bioréacteur. En ce qui a trait aux résultats obtenus avec l'utilisation du phosphate intracellulaire, ceux-ci ne font que confirmer les résultats obtenus avec le phosphate extracellulaire pour les deux techniques de minimisation de l'erreur résiduelle. Ils ne sont donc pas retenus pour la suite des travaux.

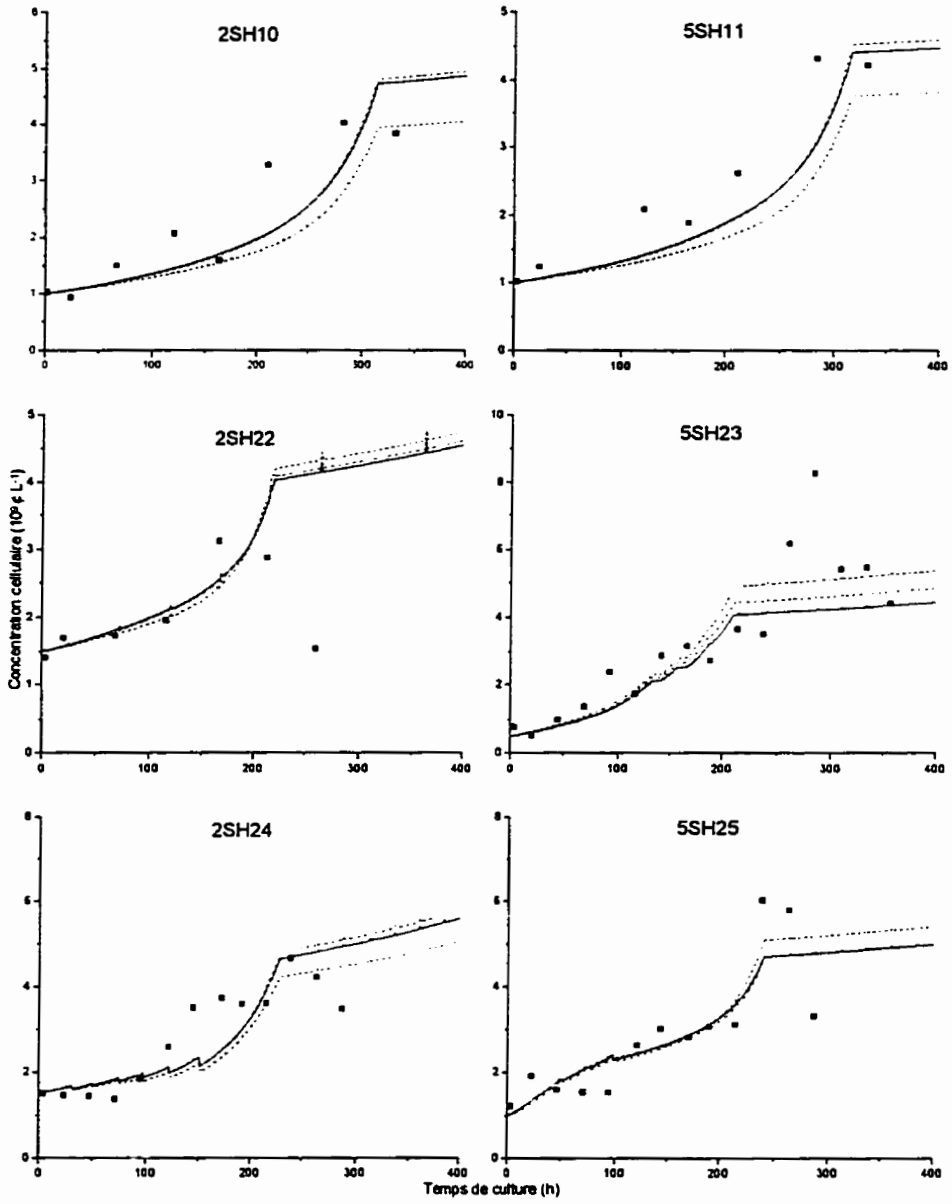


Figure 6.15 **Courbes de prolifération cellulaire prédites par les modèles obtenus des différentes scéances d'optimisation des paramètres.** —— erreur relative moyenne. -·-·-·- erreur relative moyenne (phosphate intracellulaire), ------ coefficient de détermination, ·····coefficient de détermination (phosphate intracellulaire)

En comparant les deux autres courbes (issues de l'erreur relative moyenne et du coefficient de détermination empirique), il est possible d'admettre que celle obtenue par la minimisation de l'erreur relative moyenne fournie une estimation légèrement meilleure que l'autre. Une comparaison des valeurs obtenues avec ces deux méthodes de minimisation de l'erreur résiduelle est faite au tableau 6.9.

Tableau 6.9 : Erreurs résiduelles obtenus des deux séances d'optimisation de la fiabilité du modèle de prolifération cellulaire

Technique de minimisation de l'erreur utilisée	Valeurs des descripteurs obtenues	
	Erreur relative moyenne (%)	Coefficient de détermination multiple empirique
Erreur relative moyenne	**18.3**	0.62
Coefficient de détermination multiple empirique	20.2	**0.69**

Il demeure donc deux formes de croissance, l'une limitant l'utilisation de l'ammoniaque et du phosphate extracellulaire alors que la première ne leur attribue aucun impact. En comparant les courbes résultantes (figure 6.15), il est impossible de rejeter une série par rapport à l'autre. Cette similarité des résultats se reflète aussi dans les erreurs résiduelles obtenues présentées au tableau 6.9.

Certaines hypothèses peuvent être émises quant aux résultats obtenus. Premièrement, le fait qu'une technique associe un impact néfaste à l'ammoniaque et au

phosphate extracellulaire alors que l'autre non, peut être expliqué mathématiquement. En effet, de part leur constitution mathématique, les deux techniques priorisent certains aspects du suivi des valeurs expérimentales. En effet, ces deux techniques sont choisies et développées de manière à faire ressortir ces différents éléments des cultures favorisant ainsi l'obtention d'une plus grande quantité d'information.

Le coefficient de détermination multiple empirique, développé par analogie au coefficient de régression linéaire, met l'emphase sur les erreurs d'estimation les plus importantes par rapport à la moyenne des points expérimentaux, et ce de manière exponentielle. Le modèle ainsi obtenu se rapproche plus de l'ensemble des points expérimentaux. De cette manière, une plus grande importance est octroyée aux cultures présentant un plus grand nombre d'échantillons (dans ce cas-ci, les cuvées alimentées).

En outre, la méthode de l'erreur relative moyenne, développée dans le cadre de cette étude, accorde une importance équivalente à chaque erreur d'estimation (proportionnellement à la mesure expérimentale) et à chaque culture. De cette manière, la présence de faux points issus d'erreurs expérimentales, d'analyses ou autres n'influence pas outre mesure la réponse obtenue. Le modèle se rapproche plus des points suivant un schème de croissance régulier minimisant les erreurs s'étant glissées dans les résultats d'expérimentation. En somme, les deux séries de paramètres obtenues sont significatives et ne doivent pas être négligées.

Par ailleurs, l'ordre de l'erreur d'estimation est légèrement supérieure à celle obtenue pour la croissance de la biomasse sèche. Ceci peut être expliqué par les sources d'erreurs biaisant les résultats obtenus. Ainsi, une importante partie de l'erreur provient du modèle de croissance de la biomasse sèche lui-même. Puisque que la consommation des nutriments est exclusivement basée sur la croissance de la biomasse sèche, l'erreur d'estimation du profil des nutriments engendrée par une erreur d'estimation de la biomasse sèche est partiellement reflétée dans le modèle de prolifération cellulaire. Partiellement car la phase d'optimisation de la fiabilité du modèle de prolifération cellulaire par l'ajustement des paramètre du taux spécifique de croissance corrige indirectement une partie de cette erreur en s'ajustant. Toutefois, lorsque le modèle de croissance de la biomasse sèche prédit une disparition hâtive d'un nutriment indispensable à la division cellulaire par exemple, il est évident que cette erreur est directement reportée sur l'estimation de la concentration cellulaire qui cesse de croître prématurément.

En second lieu, certaines erreurs d'analyses expérimentales affectent le calcul de paramètres du modèle ou la concentration cellulaire expérimentale utilisée pour le développement du modèle de croissance. Ainsi, la mesure de la concentration cellulaire effectuée selon le protocole de compte cellulaire présenté à l'annexe B, contient une erreur non négligeable. Comme présentée sur les graphiques B des figures 5.1 à 5.6, l'erreur associée au compte cellulaire peut atteindre 20 % dans certains cas.

6.2.4.4 Analyse de sensibilité

L'analyse de sensibilité ne mesure pas l'influence de la valeur de chaque paramètre sur la réponse du système étudié mais plutôt l'influence du paramètre lui-même. Pour cette raison, l'analyse de sensibilité des paramètres du taux spécifique de prolifération cellulaire n'est effectuée qu'en utilisant une seule série de paramètres.

La même méthode présentée dans le cas de la croissance de la biomasse sèche (section 6.1.6.3.4) est utilisée ici sur la série de paramètres issue de la minimisation de l'erreur relative moyenne. La figure 6.16 présente l'effet des variations des paramètres effectuées sur l'erreur relative moyenne d'estimation de la concentration cellulaire alors que la figure 6.17 en présente l'effet sur le coefficient de détermination multiple empirique.

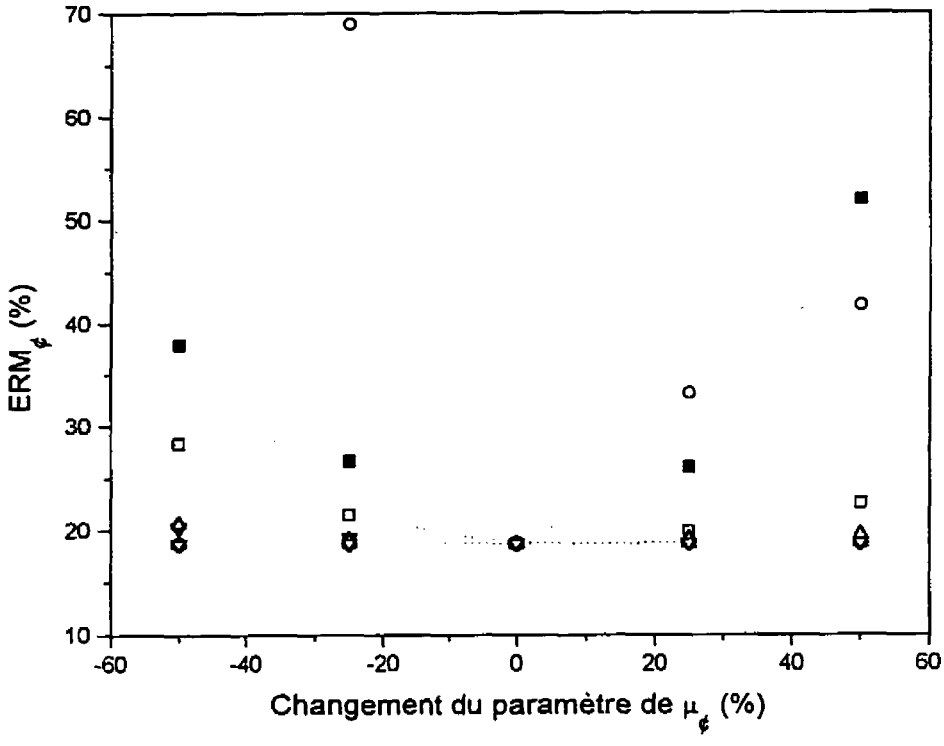


Figure 6.16 : Effet des variation des paramètres du taux spécifique de croissance de la concentration cellulaire sur l'erreur relative moyenne d'estimation de la concentration cellulaire ■ μ^*, ● K_S, ▼ $K^1_{PO_{4e}}$, ◆ $K^2_{PO_{4e}}$, □ $K^1_{NO_3}$, ○ $K^2_{NO_3}$, Δ $K^1_{NH_{4e}}$, ∇ $K^2_{NH_{4e}}$

En observant la figure 6.16, il apparaît que le coefficient ayant l'effet le plus marqué sur l'erreur relative moyenne résultant de l'optimisation des paramètres de l'équation du taux spécifique de prolifération cellulaire est la puissance de toxicité du nitrate. En effet, le taux spécifique de croissance maximum, habituellement celui

présentant l'effet majeur, est classé deuxième face à cet impact. Ce résultat représente donc l'importance d'une bonne description de l'effet inhibiteur du nitrate lors de l'élaboration du modèle. Ce résultat suggère donc une série d'expérimentation portant sur l'influence de ce nutriment sur la croissance cellulaire. D'ailleurs, le paramètre présentant la troisième plus grande influence sur la précision de l'estimation du modèle est la constante de saturation ajustée du nitrate. Ceci vient renforcer l'idée exprimée précédemment sur la précision de la description de l'effet néfaste du nitrate sur la croissance de la concentration cellulaire. Les autres paramètres présentent des variations de l'erreur résiduelle moins significatives.

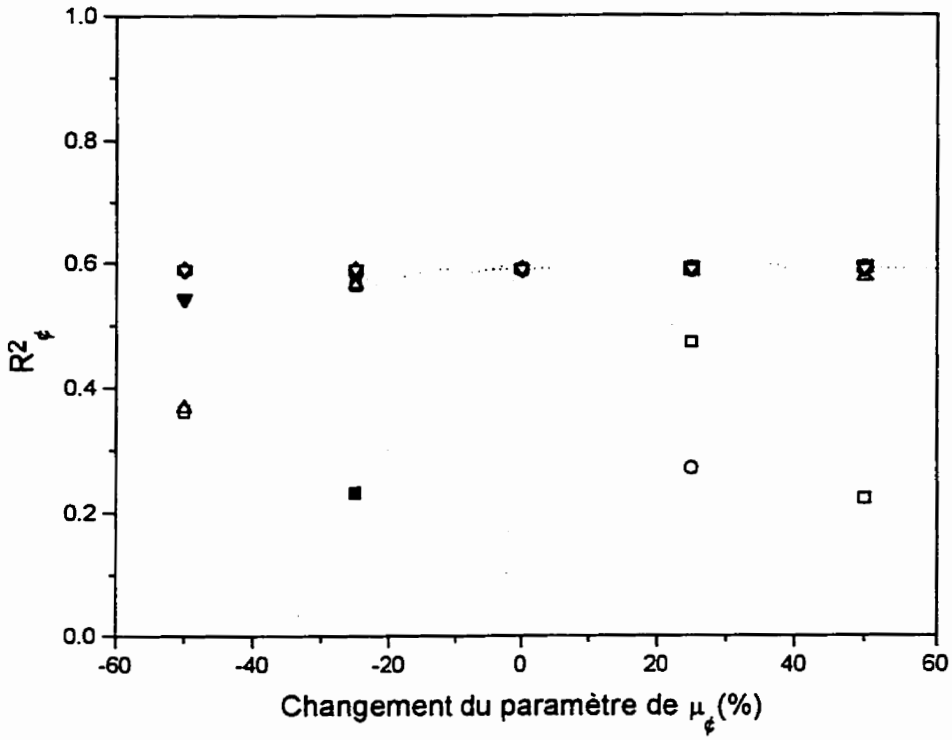


Figure 6.17 : Effet des variation des paramètres du taux spécifique de croissance de la concentration cellulaire sur le coefficient de détermination multiple empirique de la concentration cellulaire ■ μ^*, ● K_S, ▼ $K^1_{PO_4e}$, ◆ $K^2_{PO_4e}$, ❑ $K^1_{NO_3}$, ○ $K^2_{NO_3}$, Δ $K^1_{NH_4e}$, ∇ $K^2_{NH_4e}$

Parallèlement au résultat de l'erreur relative moyenne d'estimation, la puissance de toxicité associée au nitrate a une influence encore plus importante sur le résultat du coefficient de détermination multiple empirique. Un léger changement à sa valeur et la réponse du modèle s'en trouve grandement affectée. Cette fois-ci

cependant, l'effet de changement du taux spécifique de croissance maximum est quasi ex aequo au premier rang. En effet, un faible changement de cette valeur et l'estimation du modèle est aussi grandement faussée. Par la suite, le paramètre d'influence majeure sur l'obtention d'un coefficient de détermination multiple empirique élevé est la constante de saturation ajustée du nitrate.

L'erreur d'estimation de la croissance de la biomasse sèche est induite dans l'estimation de la croissance de la biomasse sèche. Il est donc évident que l'erreur due au changement d'un paramètre dans l'équation du taux spécifique de croissance de la biomasse sèche se répercute indirectement dans l'erreur d'estimation de la prolifération cellulaire. Afin de quantifier cet impact, les variations de l'erreur relative moyenne d'estimation de la concentration cellulaire et du coefficient de détermination multiple empirique sont calculées à partir des variations des paramètres du taux spécifique de croissance de la biomasse sèche réalisées lors de l'étape d'analyse de sensibilité de ces paramètres. Les graphiques 6.18 et 6.19 en présente les résultats.

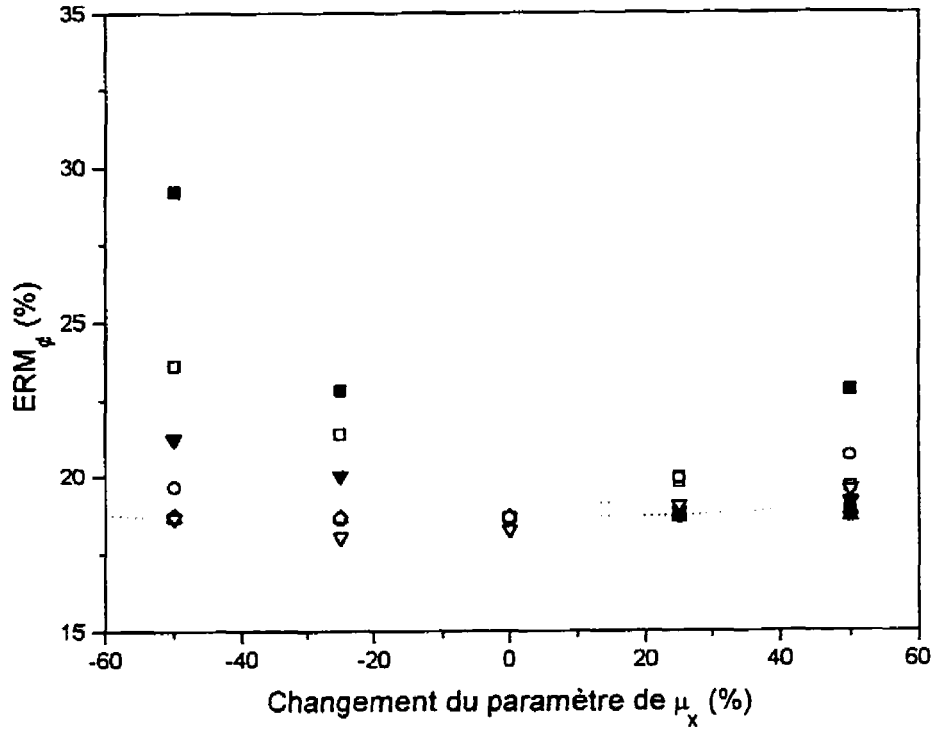


Figure 6.18 : Effet des variation des paramètres du taux spécifique de croissance de la biomasse sèche sur l'erreur relative moyenne d'estimation de la concentration cellulaire ■ μ^*, ● K_S, ▼ $K^1_{PO_4e}$, ◆ $K^2_{PO_4e}$, ❑ $K^1_{NO_3}$, ○ $K^2_{NO_3}$, Δ $K^1_{NH_4e}$, ∇ $K^2_{NH_4e}$

Il apparaît clairement sur cette figure que les paramètres du taux spécifique de croissance de la biomasse ont un impact sur la capacité du modèle à estimer la prolifération cellulaire. Celui ayant le plus d'influence est le taux spécifique de croissance maximum de la biomasse sèche. En second lieu, la constante de saturation

ajustée du nitrate présente un impact non-négligeable suivi de la constante de saturation ajustée du phosphate et de la puissance de toxicité du nitrate. Encore une fois, les paramètres du nitrate s'avèrent être d'une importance majeure sur la capacité d'estimation du modèle.

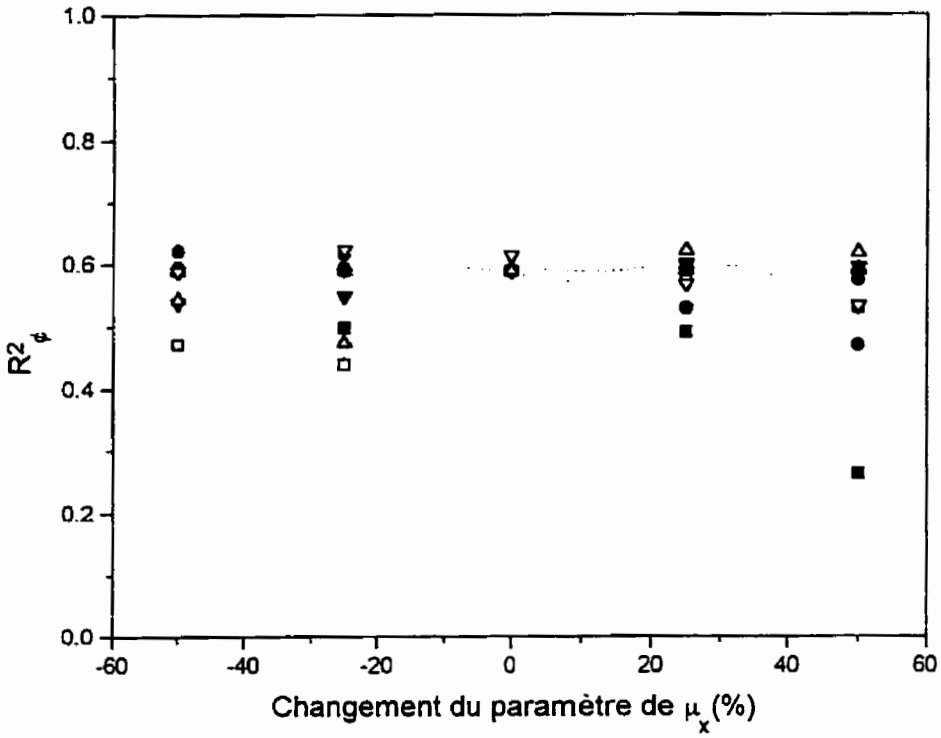


Figure 6.19: **Effet des variation des paramètres du taux spécifique de croissance de la biomasse sèche sur le coefficient de détermination multiple empirique de la concentration cellulaire** ■ μ^*, ● K_S, ▼ $K^1_{PO_{4e}}$, ◆ $K^2_{PO_{4e}}$, □ $K^1_{NO_3}$, ○ $K^2_{NO_3}$, △ $K^1_{NH_{4e}}$, ▽ $K^2_{NH_{4e}}$

En ce qui a trait au coefficient de détermination multiple empirique de la concentration cellulaire, les courbes de changements des paramètres de l'équation du taux spécifique de croissance de la biomasse sèche présentent une allure sinusoïdale plutôt que parabolique comme ce fût le cas jusqu'à maintenant. De plus, l'amplitude de ces oscillations ne sont généralement pas élevées ce qui indique un impact plus ou moins important de certains paramètres. Toutefois, le taux spécifique de croissance de la biomasse sèche a un effet drastique sur le coefficient de détermination. Si le changement appliqué franchis les ± 20 %, la valeur du coefficient chute dramatiquement. Le second paramètre pouvant avoir des répercussions significatives est la constante de saturation ajustée du nitrate. Toutefois, l'impact d'un tel changement est moins important que pour le taux spécifique de croissance maximum de la biomasse sèche.

6.3 Modèle de croissance retenu

Suite aux manipulations mathématiques effectuées, un modèle de croissance de la biomasse sèche et de la prolifération cellulaire satisfaisant est retenu. Ce modèle de croissance est composé des équations 6.37 et 6.38 pour l'estimation de l'évolution des nutriments, de la biomasse, de la concentration cellulaire et du volume ainsi que des équations 6.28 et 6.39 pour l'estimation des taux spécifiques de croissance de la biomasse sèche et de la prolifération cellulaire respectivement.

$$
\begin{bmatrix} \not{c} \\ x \\ s \\ no_3 \\ po_{4e} \\ nh_{4e} \\ po_{4i} \\ nh_{4i} \end{bmatrix}_t
=
\begin{bmatrix} \not{c} \\ x \\ s \\ no_3 \\ po_{4e} \\ nh_{4e} \\ po_{4i} \\ nh_{4i} \end{bmatrix}_{t-1}
\frac{V_{t-1}}{V_t}
$$

$$
+T\frac{V_{t-1}}{V_t}\left[\begin{bmatrix} 0 & 0 & 0 & k_{\not{c}} \\ 0 & 0 & k_x & 0 \\ 0 & 0 & -k_S & 0 \\ 0 & 0 & -k_{NO_3} & 0 \\ -k_{PO_{4e}} & 0 & 0 & 0 \\ 0 & -k_{NH_{4e}} & 0 & 0 \\ k^1_{PO_{4i}} & 0 & -k^2_{PO_{4i}} & 0 \\ 0 & k^1_{NH_{4i}} & -k^2_{NH_{4i}} & 0 \end{bmatrix}\begin{bmatrix} \phi_1 x & \phi_2 x & \mu_x x & \mu_{\not{c}}\not{c} \end{bmatrix}_{t-1}\right.
$$

$$
\left.-\begin{bmatrix} \frac{V_{\square ch}}{t'V_{t-1}}, & \acute{E}ch = 1 \\ 0, & \acute{E}ch = 0 \end{bmatrix}\begin{bmatrix} x \\ s \\ no_3 \\ po_{4e} \\ nh_{4e} \\ po_{4i} \\ nh_{4i} \end{bmatrix}_{t-1} + \begin{bmatrix} 0 \\ f_S \\ f_{NO_3} \\ f_{PO_4} \\ f_{NH_4} \\ 0 \\ 0 \end{bmatrix}_{t-1}\right] \qquad 6.37
$$

$$
V_t = V_{t-1} - T\left[Q_E + DV_{t-1} - \sum \frac{F_i}{n_i}\right] \qquad 6.38
$$

$$\mu_x = \mu_x * \left(\frac{s}{K_S^x + s}\right)\left(\frac{n_t}{K_{N_t}^x + n_t}\right)\left(\frac{K_{NO_3}^{x1}}{K_{NO_3}^{x1} + no_3^{K_{NO_3}^{x2}}}\right)\left(\frac{K_{PO_{4e}}^{x1}}{K_{PO_{4e}}^{x1} + po_{4e}^{K_{PO_{4e}}^{x2}}}\right)\left(\frac{K_{NH_{4i}}^{x1}}{K_{NH_{4i}}^{x1} + nh_{4i}^{K_{NH_{4i}}^{x2}}}\right) \quad 6.28$$

$$\mu_\ell = \mu_\ell * \left(\frac{s}{K_S^\ell + s}\right)\left(\frac{K_{NO_3}^{\ell 1}}{K_{NO_3}^{\ell 1} + no_3^{K_{NO_3}^{\ell 2}}}\right) \quad 6.39$$

Les paramètres de consommation de nutriments et de rendement à la croissance sont ceux calculés au chapitre 5 alors que ceux compris dans l'équation du taux spécifique de croissance de la biomasse sèche sont présentés au tableau 6.4 et résumés au tableau 6.10.

En ce qui a trait aux paramètres de l'équation du taux spécifique de croissance de la concentration cellulaire, un choix doit être effectué. En effet, deux séries de paramètres reflétant deux effet de culture réels sont obtenus. Toutefois, selon la forme d'équation développée, une seule série peut être appliquée à la fois. La série de paramètres présentée au tableau 6.5 (et résumée au tableau 6.10) est retenue alors que la série présentée au tableau 6.7 est conservée pour analyse en parallèle de l'évolution de la croissance prédite par le modèle. Il est à noter que les taux spécifiques de prolifération associés à l'ammoniaque et au phosphate ont été supprimés dans l'équation 6.39 considérant le profil plat obtenu lors de la séance d'optimisation de la fiabilité selon l'erreur relative moyenne.

Tableau 6.10 : Paramètre du modèle de croissance de la biomasse sèche et de la prolifération cellulaire pour les cellules d'*Eschscholtzia californica* en suspension en bioréacteur

		s	n_t	no_3	po_{4e}	nh_{4i}
Unité i		g L^{-1}	mmol L^{-1}	mmol L^{-1}	mmol L^{-1}	mmol L^{-1}
φ_i (unité i (g X $L^{-1})^{-1}$ h^{-1})					0.003	0.016
k_i (unité i (g X $L^{-1})^{-1}$)		3.21		2.42	0.25	0.96
μ_x* (h^{-1})	0.029					
K_ξ^{x1} (unité i)		0.852	1×10^{-10}	1.100	1.995	1.985
K_ξ^{x2} (--)				0.165	0.153	0.225
μ_ℓ* (h^{-1})	0.013					
$K_\xi^{\ell 1}$ (unité i)		1×10^{-10}	1×10^{-10}	48.35		
$K_\xi^{\ell 2}$ (--)				1.71		

7. MAXIMALISATION DE LA CONCENTRATION CELLULAIRE

L'objectif principal de cette étude consiste en l'optimisation de la phase de prolifération cellulaire par l'accroissement de la concentration finale et de son taux spécifique de croissance moyen.

7.1 Simulations du procédé

De manière à parvenir à une maximalisation de la concentration cellulaire, le modèle développé au chapitre précédent est utilisé afin de simuler la réaction du système de culture à différentes interventions. De cette manière, une stratégie d'alimentation des nutriments maximisant la division cellulaire peut être développée.

Le modèle utilisé pour la réalisation de cette étape est celui retenu à la section 6.3 du précédent chapitre. Celui-ci est implanté dans une feuille de calcul Excel© de manière à pouvoir simuler le procédé de croissance. L'utilisation de ce logiciel permet une action directe et rapide sur l'évolution des estimations dans le temps et ce, pour n'importe quel temps d'estimation. Ceci permet d'apporter une modification à l'estimation d'un paramètre, comme par exemple la modification d'une formule ou l'imposition d'une valeur fixe à un temps donné directement et d'en voir le résultat dans les secondes qui suivent. Cet aspect est primordial pour le

développement d'une stratégie d'alimentation des nutriments maximisant la concentration cellulaire.

7.2 Stratégie d'alimentation

Afin d'assurer le succès de cette étape, les effets de chaque nutriment sur les croissances de biomasse et de concentration cellulaire doivent être bien maîtrisés. Dans ce but, les principaux impacts associés à chaque nutriment sur ces deux types de croissance sont résumés au tableau 7.1

Tableau 7.1 : Impacts des nutriments sur les croissances de biomasse sèche et de concentration cellulaire

Nutriment	Impact sur les croissances		Source
	Biomasse sèche	Concentration cellulaire	
S	$\mu_x > 0$ si $s > 0$	$\mu_\ell > 0$ si $s > 0$	Observations
N_t	$\mu_x > 0$ si $n_t > 0$	par très bien défini	Observations
NO_3	$\mu_x < \mu_x^*$ si $no_3 > 0$	$\mu_\ell < \mu_\ell^*$ si $no_3 > 0$	Observations, optimisation du modèle
PO_{4e}	$\mu_x < \mu_x^*$ si $po_{4e} > 0$	$\mu_\ell < \mu_\ell^*$ si $po_{4e} > 0$	Observations, 2e séance d'optimisation du modèle
PO_{4i}	non-significatif	non-significatif	Observations
NH_{4e}	$\mu_x \searrow$ si ajouts de NH_4	$\mu_\ell \searrow$ si ajouts de NH_4 $\phi_\ell \nearrow$ si ajouts de NH_4	Observations, 2e séance d'optimisation du modèle
NH_{4i}	indéterminé	$\mu_\ell \neq 0$ si $nh_{4i} \neq 0$	Observations

Selon les résultats expérimentaux et de modélisation de l'impact nutritionnel rapportés ci-haut, l'alimentation de chacun de ces nutriments est définie dans le but d'accroître la concentration finale de cellules végétales ainsi que le taux spécifique moyen de prolifération cellulaire. Considérant les courbes des profils de

taux spécifiques de croissance associés à chaque nutriment et la faible interaction observée entre chaque nutriment, il n'est pas utile ici d'utiliser des techniques de contrôle optimal pour le développement des stratégies d'alimentation comme l'a fait de Tremblay (1993) par exemple pour la phase de production.

Premièrement, la présence d'hydrates de carbone s'avère essentielle à la croissance de la biomasse sèche et à la prolifération cellulaire. Ceci est tout à fait logique considérant que les sucres sont la seule source de carbone utilisée pour la synthèse de matière organique. Un manque en hydrates de carbone doit donc être évité à tout prix. Cependant, de trop fortes concentrations en hydrates de carbone favorisent la production de mousse dans les premières heures de culture, entraînant ainsi des cellules hors du milieu de culture, restreignant le transfert d'oxygène par la surface et menaçant la stérilité du système de culture par la propagation dans les filtres stériles des gaz de sortie. De manière à en arriver à un compromis, l'alimentation en sucrose est effectuée toutes les 24 heures de manière à maintenir la concentration des hydrates de carbone près de 10 g L^{-1}, sans toutefois descendre sous ce seuil de sécurité.

En ce qui a trait à l'azote total présent dans le milieu de culture ($n_t = no_3 + nh_{4e}$), sa concentration ne doit jamais être nulle de manière à ne pas arrêter la croissance cellulaire. La prolifération cellulaire reliée de cette façon à ce paramètre peut toutefois perdurer dans certaines conditions en l'absence d'azote extracellulaire. Il est probable alors que le processus de division soit basé sur les réserves

intracellulaires d'azote. De façon à assurer une croissance cellulaire, l'azote extracellulaire doit être omniprésent dans le milieu de culture par l'alimentation de nitrate. Quoique l'azote du nitrate soit requis pour la croissance, la présence de ce dernier dans le milieu de culture inhibe à la fois la croissance de la biomasse et de la concentration cellulaire. Dans un objectif de satisfaire toutes ces contraintes, le nitrate est alimenté toutes les 24 heures de manière à maintenir sa concentration le plus bas possible dans le milieu, sans toutefois descendre sous les 2 mmol L^{-1} comme seuil de sécurité.

L'impact du phosphate sur la croissance de la biomasse et de la concentration cellulaire est néfaste. Toutefois, quoique non représentatif sur les courbes de croissance, ce nutriment est essentiel à la formation adéquate de composés cellulaires bien structurés. Dans cet ordre d'idées, le phosphate est alimenté toutes les 24 heures à un taux minimum permettant de maintenir la concentration intracellulaire prédite supérieure à 0.05 mmol L^{-1} en tout temps.

Cette pseudo-concentration qui semble minime à priori n'est pas physiquement significative et n'est fixée que de manière à assurer une alimentation suffisante en phosphate pour la synthèse adéquate des composés cellulaires selon l'ensemble des expérimentations effectuées précédemment.

Suite aux phases d'étude et de modélisation de la croissance, il s'avère que le nutriment clé à la croissance cellulaire est l'ammoniaque. En effet, son rôle est

primordial tant au niveau du taux de prolifération cellulaire que de la période de croissance. Selon les premières observations effectuées, l'ajout de ce nutriment ralentit la croissance de la biomasse ainsi que la prolifération cellulaire alors qu'il permet une augmentation de la concentration cellulaire finale grâce à la poursuite de la période de division cellulaire.

En ce qui a trait au taux de croissance de la biomasse, la simple présence d'ammoniaque intracellulaire diminue la croissance à 63 % de sa capacité maximale et ce peu importe la quantité présente. La quantité désirée à l'intérieur des cellules ne peut donc être déterminée selon ce critère.

Suite à la phase d'optimisation de la fiabilité du modèle de croissance de la concentration cellulaire, il apparaît que la présence d'ammoniaque extracellulaire ralentit le processus de division alors que la présence d'ammoniaque intracellulaire assure le déroulement de ce même processus. Il est évident que pour accroître la concentration de l'ammoniaque intracellulaire, des ajouts d'ammoniaque extracellulaire doivent être effectués. Contrairement à la croissance de la biomasse, le modèle de prolifération cellulaire utilisé avec les paramètres retenus pour simulation ne prédit aucun effet dû à la présence d'ammoniaque intracellulaire. Ce critère ne peut donc pas être uniquement utilisé pour fixer le seuil d'ammoniaque requis.

Pour les raisons énumérées à la fin du chapitre précédent, l'impact de l'ammoniaque prédit par le modèle avec la seconde série de paramètres, non-utilisée

pour la simulation (tableau 6.7), doit être considéré de manière à satisfaire à tous les phénomènes et contraintes physiques. La prédiction effectuée par le modèle de croissance avec ces paramètres, représentée à la figure 6.12, est que la concentration doit être minimum. De manière à permettre une croissance maximum sans trop l'affecter par la présence d'ammoniaque extracellulaire, l'ammoniaque est alimentée toutes les 24 heures de manière à maintenir la concentration en ammoniaque intracellulaire différente de 0.

La stratégie d'alimentation maximisante étant développée, l'expérimentation peut être effectuée en bioréacteur.

7.3 Conditions expérimentales

L'expérience de maximalisation de la concentration cellulaire est réalisée dans un bioréacteur de 5 L tel que décrit au chapitre 3. Les conditions d'opérations sont les mêmes que celles utilisées lors de la phase d'étude de la croissance de cellules végétales.

L'alimentation des nutriments est réalisée manuellement à l'aide de concentrés préparés et stérilisés individuellement. Ces derniers sont alors pompés stérilement dans des réservoirs d'alimentation reliés à un cylindre gradué stérile, ce dernier étant relié au bioréacteur. Il est donc possible d'ajouter avec précision les quantités de nutriments requis par le modèle de croissance.

7.4 Résultats

Les courbes de prédiction et expérimentales résultantes de l'application de la stratégie d'alimentation développée sont présentées à la figure 7.1.

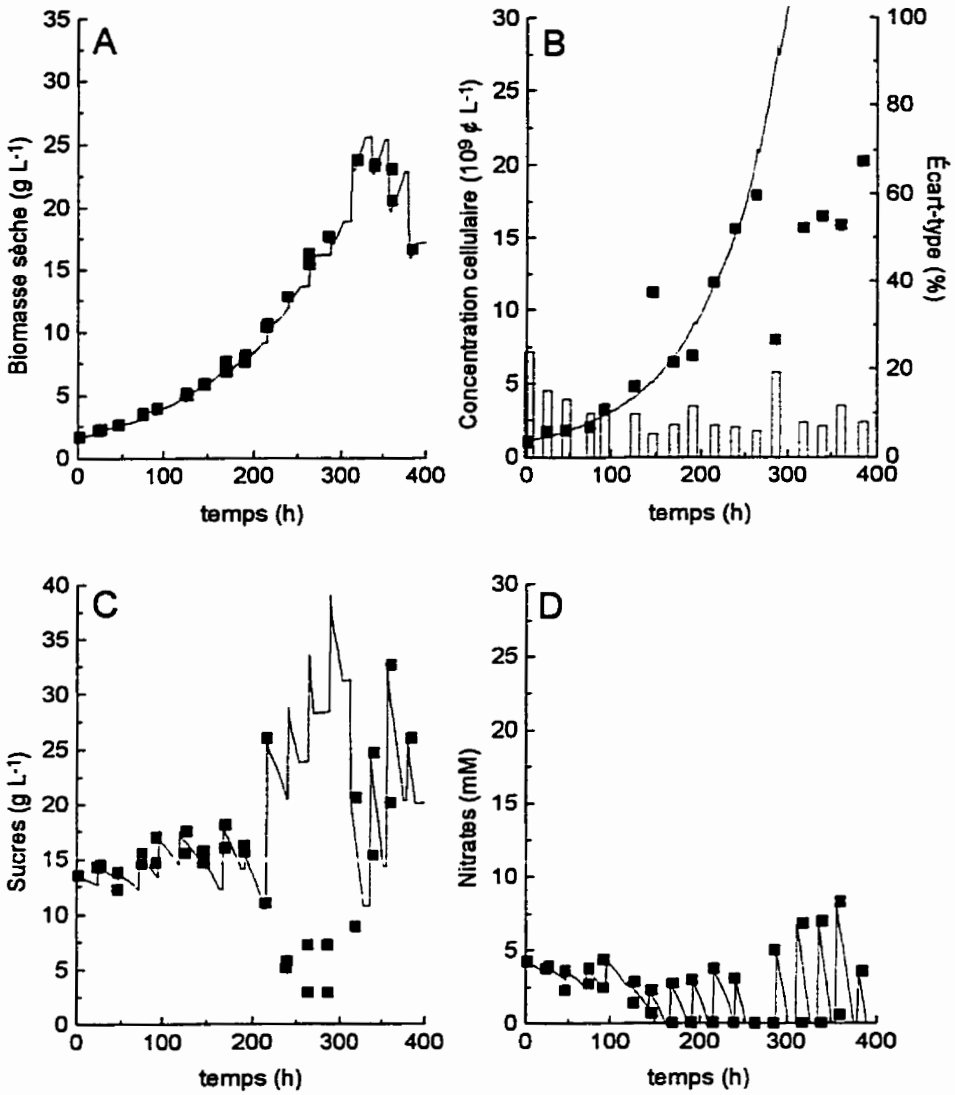


Figure 7.1 : **Courbes de croissance obtenues par l'application de la stratégie d'alimentation maximisant la croissance cellulaire** A. biomasse sèche. B. concentration cellulaire. C. hydrates de carbone. D. nitrates. Courbes estimées par le modèle de croissance.

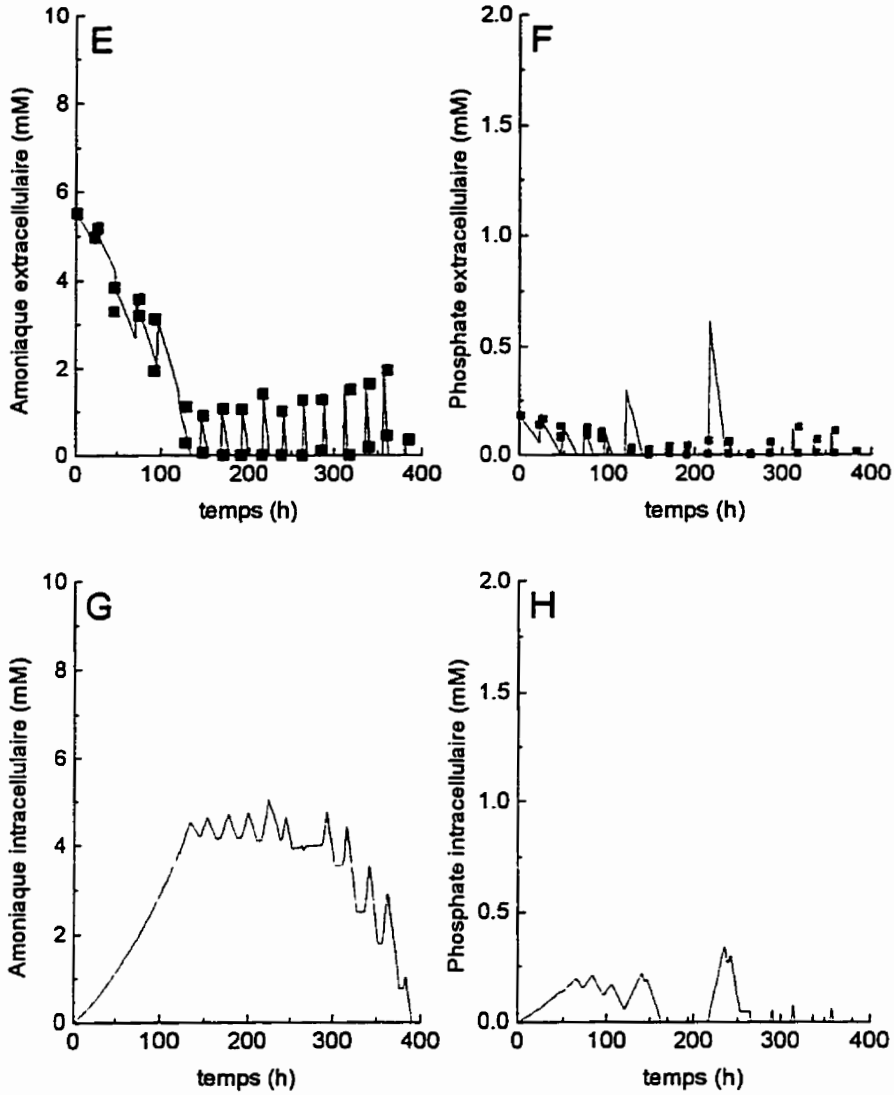


Figure 7.1 : **Courbes de croissance obtenues par l'application de la stratégie d'alimentation maximisant la croissance cellulaire. (suite)** E. ammoniaque extracellulaire. F. phosphate extracellulaire. G. ammoniaque intracellulaire. H. phosphate intracellulaire. Courbes estimées par le modèle de croissance.

Il apparaît que l'application de la stratégie maximisante permet une période de croissance normale de 0 à 300 heures de cultures, moment où un événement néfaste survient. Chaque variable est investiguée à tour de rôle afin de décrire les phénomènes en cause en plus d'identifier l'élément perturbateur.

La biomasse sèche (figure 7.1 A) est passée de 1.65 g L^{-1} à l'inoculation jusqu'à 25 g L^{-1} après 300 heures de culture, moment où la croissance est interrompue, ce qui représente une augmentation de 100 à 200 % des concentrations habituellement obtenues (8.0 à 12.0 g L^{-1}). Ceci s'explique par une disponibilité constante des nutriments nécessaires à la croissance de la biomasse sèche.

La concentration cellulaire (figure 7.1.B) est passée de 1.0 à plus de 20.0 x 10^9 ¢ L^{-1}, ce qui représente un accroissement de l'ordre de 500 à 1 000 % comparativement aux résultats conventionnels (2.0 à 4.0 x 10^9 ¢ L^{-1}). Quoique extrêmement satisfaisant, ce résultat est analysé plus en détails ultérieurement, suite à l'identification du facteur limitant la croissance.

Les concentrations en ammoniaque extracellulaire (figure 7.1 E) et intracellulaire (figure 6.1 G) suivent le profil escompté sans présenter de limitations pouvant restreindre soudainement la croissance vers 300 heures de culture. En effet, la concentration en ammoniaque extracellulaire n'est pas supérieure à celles présentes précédemment de même que la pseudo-concentration intracellulaire estimée qui se situe encore près de 4 mmol L^{-1}, ce qui ne peut interrompre la croissance.

Quant au phosphate, il est démontré que son impact n'est pas majeur, peu importe sa concentration, et qu'aucun arrêt de la croissance en biomasse sèche ou en concentration cellulaire ne peut être associé à de faibles concentrations de ce nutriment. Il n'est donc pas en cause dans le cas présent d'arrêt de croissance.

La concentration en hydrates de carbone totaux présentée à la figure 7.1.C est toujours supérieure à 0 g L^{-1} lors de cette culture les rendant toujours disponibles à la croissance. Il est à noter qu'une erreur s'est glissée lors de l'analyse des échantillons compris entre 230 et 300 h présentant des concentrations inférieures à celles réellement présentes. Pour les nitrates, leur concentration est supérieure à 0 en tout temps à l'exception d'une période de quelques 48 heures à environ 250 heures de culture suite à l'absence d'un ajout. Toutefois, ce nutriment n'est pas responsable de l'arrêt total de croissance puisque son alimentation est reprise après cette lacune.

Suite à ces observations, il est fort probable que cet arrêt drastique de croissance soit le résultat d'une limitation nutritionnelle associée à un nutriment autre que ceux étudiés dans le cadre de ce projet. Dès lors, tous les autres macro-nutriments analysés sont investigués et il apparaît qu'aucun d'entre eux n'est limitant par analogie entre le comportement des autres cultures et de la présente par rapport à ceux-ci. L'évolution de la concentration en oxygène dissous est alors étudiée considérant que ce nutriment est le plus difficile à rendre disponible aux cellules en suspension.

7.4.1 Limites du système de culture

Le profil d'oxygène dissous obtenu lors de cette culture est présenté à la figure 7.2.

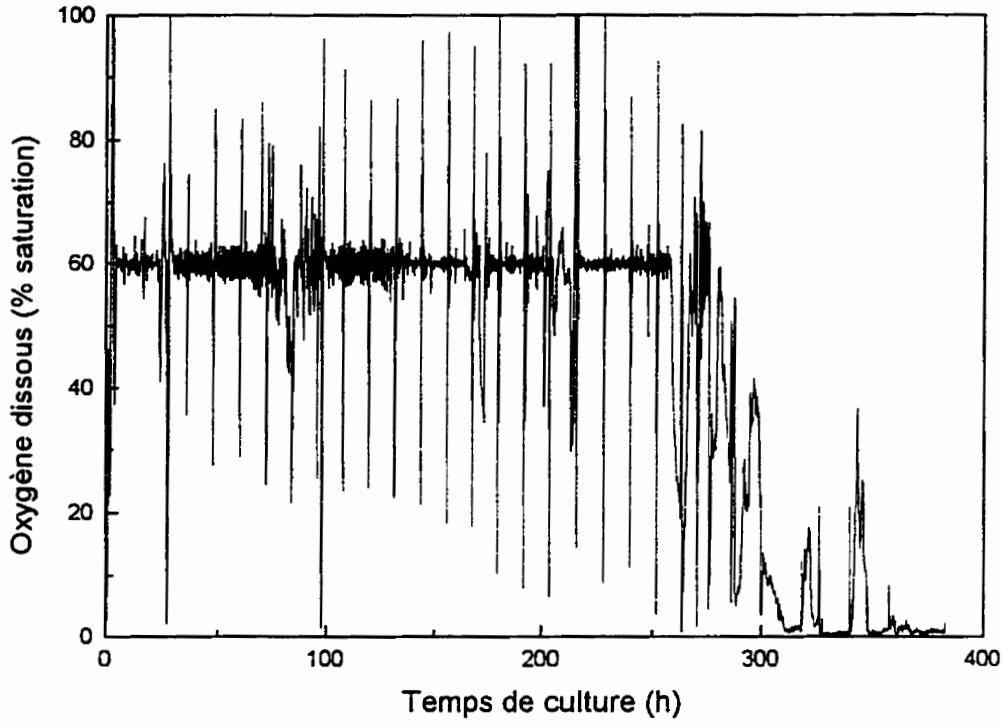


Figure 7.2 : Profil d'oxygène dissous résultant de l'application de la stratégie d'alimentation maximisante

Il est évident qu'à environ 300 heures de culture la concentration d'oxygène dissous devient limitante, provoquant ainsi l'arrêt de croissance en biomasse sèche ainsi qu'en concentration cellulaire. Cette limitation nutritionnelle en oxygène

est occasionnée par l'atteinte de niveaux de respiration jamais obtenus jusqu'à présent comme le démontre la figure 7.3. Ceci signifie donc que du point de vue transfert d'oxygène, la stratégie d'optimisation de la croissance cellulaire développée dans le cadre de cette étude rencontre les limites physiques de transfert d'oxygène du système de culture empêchant ainsi une progression plus marquée des résultats.

Sachant qu'en fin de culture l'alimentation en gaz est réalisée avec de l'oxygène pur (solubilité, C*, d'environ 1 mmol L^{-1}), que le taux de respiration (OUR) maximum atteint est de 5.5 mmol L^{-1} h^{-1} et que la concentration en oxygène dissous demeure nulle ($C \approx 0$ mmol L^{-1}), il est possible d'estimer le coefficient de transfert (k_La) maximum du système de culture dans des conditions réelles d'opération (et non avec de l'eau comme effectué jusqu'à maintenant) selon :

$$\frac{dC}{dt} = k_La(C^*-C) - OUR \qquad 3.1$$

Selon cette équation et les conditions d'opération rapportées, le coefficient de transfert maximum du système pour la culture de telles cellules est d'environ 6.5 h^{-1}.

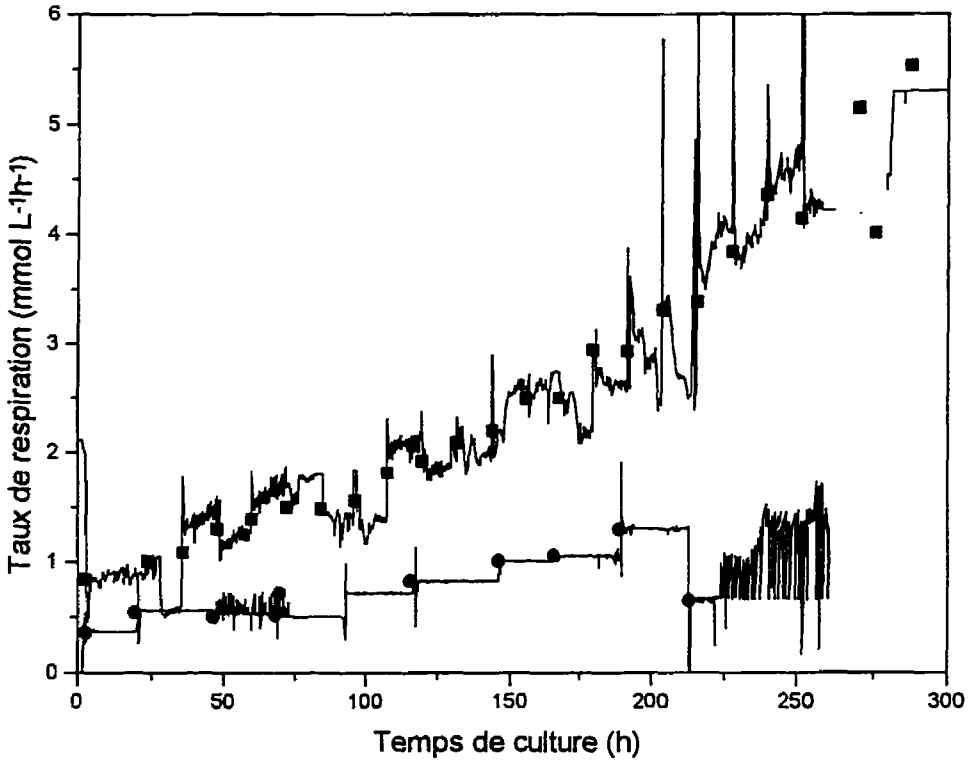


Figure 7.3 : **Profils de respiration obtenus par la méthode statique (Aubry, 1994) pour une culture typique (●) et pour la culture à croissance optimum (■) ainsi que mesuré en continu pour ces deux cultures (——)**

7.4.2 Concentration cellulaire

L'objectif principal de cette étude comporte deux volets, soit la maximalisation du taux spécifique de prolifération cellulaire et l'accroissement de la concentration cellulaire finale atteinte. En ce qui a trait à ce dernier objectif, il est évident qu'il est atteint. En effet, la concentration finale atteinte lors de la culture

optimale est de 20 x 10^9 ¢ L^{-1}, soit une augmentation de 1000 % par rapport aux concentrations normalement atteintes pour des cultures opérées en cuvée.

En outre, la division cellulaire est arrêtée lors de cette croissance dû à l'atteinte des limites physiques de transfert d'oxygène du système de culture. Il est évident que cette concentration cellulaire est alors en pleine phase de croissance exponentielle ce qui permet d'affirmer que cette dernière aurait atteint un seuil beaucoup plus élevé sans cette perturbation externe. Il est même raisonnable d'affirmer qu'advenant la correction de cette limitation nutritionnelle en oxygène, la concentration cellulaire atteindra un seuil où la croissance sera inhibée par un effet logistique.

7.4.3 Taux spécifique moyen de croissance

Dans le cas de la maximalisation du taux de prolifération cellulaire, l'objectif est aussi atteint. En effet, comme le démontre la figure 6.4, le taux spécifique moyen de croissance de la culture est de 0.011 h^{-1} maintenu sur une période de plus de 250 heures. La seule culture réalisée présentant un taux plus élevé est celle alimentée en ammoniaque avec une valeur de 0.013 h^{-1}, mais dans ce cas la période présentant cette caractéristique est de moins de 75 heures. Le taux de croissance global obtenu lors de la culture optimale est donc supérieur à celui obtenu pour l'autre culture. Ce genre de paramètre est d'ailleurs étudié dans la section qui suit.

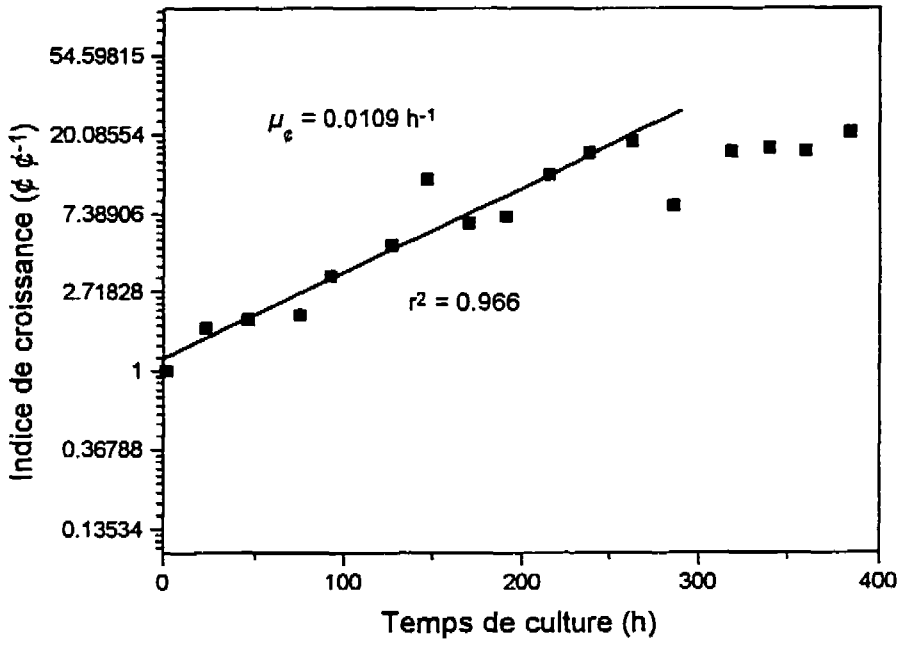


Figure 7.4 **Évolution de l'indice de croissance de la concentration cellulaire lors de la culture 5SH27 en fonction du temps**

7.4.4 Productivité et autre paramètres descriptifs

Afin de comparer les résultats de prolifération cellulaire avec d'autres cultures de manière générale, plusieurs paramètres peuvent être utilisés. La figure 7.5 présente quelques-uns de ceux-ci pour différentes cultures.

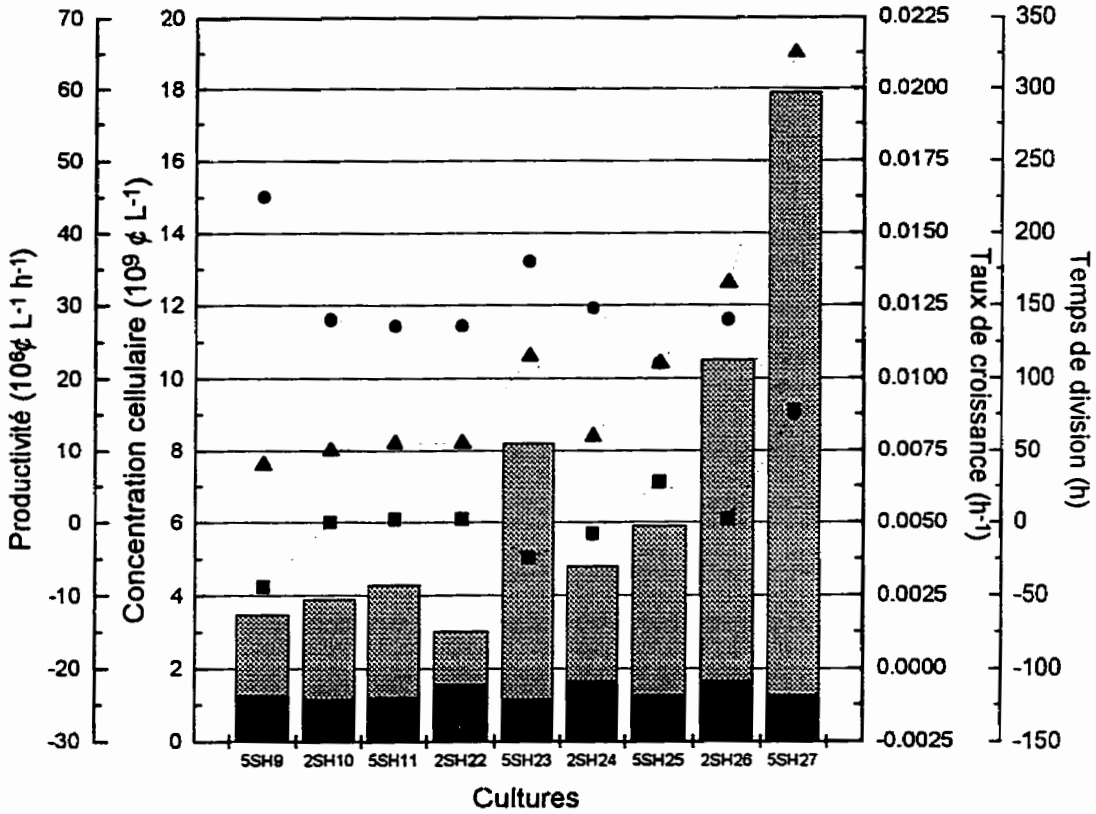


Figure 7.5 : **Comparaison des paramètres d'analyse de la croissance cellulaire pour différentes cultures.** ▲ productivité, ■ taux de croissance moyen, ● temps de division moyen, (barres noires et grises) concentrations initiales et finales

Le ratio $¢_{finale}\ ¢^{-1}_{initiale}$ peut être utilisé à des fins de comparaison. Dès lors, il est possible de voir que le ratio le plus élevé (18.0) est celui de la culture optimale 5SH27 comparativement à un ratio de 6 pour la culture 2SH26 et de 3.5 pour la culture 5SH9, la culture la plus performante et la moins performante respectivement, outre la culture 5SH27. C'est donc la culture 5SH27 qui présente la plus grande augmentation cellulaire.

Le taux de croissance moyen peut aussi être calculé à l'aide de l'équation 7.1 pour des fins de comparaison.

$$\mu_{\phi} = \frac{\ln\left(\phi_{max}/\phi_0\right)}{\left(t_{\phi_{max}} - t_0\right)} \qquad 7.1$$

Le taux de croissance moyen le plus élevé (0.0090 h^{-1}) est obtenu pour la culture optimale 5SH27 alors que cette valeur est de 0.0065 h^{-1} pour la culture 5SH25 et de 0.0030 h^{-1} pour la culture 5SH9. C'est donc la culture 5SH27 qui possède la croissance la plus rapide.

Complément du taux de croissance moyen, le temps de division cellulaire moyen peut aussi être utilisé. Ce dernier est calculé à partir de ce taux de croissance à l'aide de l'équation 7.2.

$$t_d^{\phi} = \frac{\ln(2)}{\mu_{\phi}} \qquad 7.2$$

Le temps de division correspondant à la culture optimale 5SH27 est de 75 heures alors qu'il est de 110 heures pour la culture 5SH25 et de 225 heures pour la culture 5SH9. La division cellulaire se produit donc plus rapidement lors de la culture optimale que lors des autres cultures.

Un autre paramètre représentant le potentiel de la stratégie développée par rapport à celles utilisées précédemment est la productivité cellulaire (10^6 ¢ L^{-1} h^{-1}). Ce paramètre reflète à la fois l'intérêt économique et scientifique d'un bioprocédé de culture par rapport à un autre en mettant l'accent sur la rapidité de production moyenne, dans ce cas-ci, de cellules végétales. Toutefois, considérant que le procédé à l'étude présente une production exponentielle (division cellulaire), ce paramètre ne doit être considéré que comme indicateur moyen comparatif des cultures entre elles sans servir de base à de subséquents calculs. En comparant avec les autres cultures présentées, la culture optimale (5SH27) est de loin la plus productive avec un taux moyen de plus de 60 x 10^6 ¢ L^{-1} h^{-1} comparé à 30 x 10^6 ¢ L^{-1} h^{-1} pour la culture 2SH26 s'en approchant le plus et 10 x 10^6 ¢ L^{-1} h^{-1} pour la culture la moins productive (5SH9). Ceci représente une augmentation de productivité par la stratégie d'alimentation développée de 100 % par rapport à celle utilisée lors de 2SH24 et de plus de 600 % comparé à celle de 5SH9.

8. DISCUSSION ET RECOMMANDATIONS

Les résultats de cette étude soulèvent certains points quant à la procédure développée pour mener à une maximalisation de la croissance cellulaire ainsi qu'aux implications et perspectives d'avenir d'un tel projet.

8.1 Étude de croissance

Les effets sur la croissance cellulaire de quelques variables de procédé dont les nutriments sont étudiés. Il est clair qu'en contrôlant les variables externes de culture, la disponibilité des nutriments devient limitante à la croissance.

Le nutriment principal et le plus difficile à fournir aux suspensions cellulaires, l'oxygène, est aussi contrôlé considérant son rôle primordiale à la croissance cellulaire (figures 7.1 et 7.2). Afin d'assurer de bonnes performances de contrôle, un nouveau contrôleur est conçu; le contrôleur adaptatif basé sur le taux de respiration mesuré. Cette amélioration au système de culture est significative et permet de limiter les effets néfastes des variations de la concentration d'oxygène dissous sur la croissance cellulaire en diminuant le temps hors contrôle de plus de 70 %.

Il serait intéressant, dans un avenir rapproché, de relier la consommation d'oxygène de la suspension cellulaire (figure 7.3) au modèle de croissance. De cette manière, la condition d'estimation des paramètres spécifiant que le nombre d'équations

théoriques doit être égal au nombre de paramètres estimés serait remplie. Ceci permettrait une estimation à la fois du taux de respiration cellulaire et du coefficient de transfert d'oxygène en continu sans perturbation physique. Comme mentionné au chapitre 5, il est évident que ces perturbations entraînent une diminution de la croissance cellulaire, ce qui pourrait être évité.

En ce qui concerne les hydrates de carbone, il est démontré qu'ils n'ont qu'à être présent dans le milieu de culture à une concentration plus ou moins grande pour assurer une croissance. Toutefois, considérant qu'un arrêt de croissance se produit dès leur absence du milieu, il est recommandé de maintenir leur concentration à un peu plus de 10 g L^{-1} tout au long de la culture. Cette concentration permet d'éviter tout problème de mousse se produisant en surface pour des concentrations trop élevées en plus d'assurer une zone de sécurité afin d'éviter l'épuisement de ce nutriment.

L'effet réel du phosphate sur la croissance cellulaire n'est que néfaste à la croissance. Cependant, ce nutriment doit être fourni en quantité suffisante de manière à assurer une formation bien structurée de certains composants cellulaires. De manière à éviter l'addition de ce nutriment dans le milieu de culture, il est recommandé d'ajouter un sel d'ammonium-phosphate ($(NH_4)_2HPO_4$) aux inocula utilisés pour les cultures en bioréacteur 2 à 3 jours avant l'inoculation. De cette manière, ces composés seront absorbés rapidement par les cellules de l'inoculum (sections 5.7 et 5.8). Ce phosphate est alors transféré à la culture en bioréacteur à même l'inoculum, sans être

présent dans le milieu de croissance. L'ajout aux inocula doit être calculé en fonction de la quantité de phosphate nécessaire à la période de croissance escompté en bioréacteur (selon les prédictions du modèle) et de la proportion d'inoculum transféré au bioréacteur. Le moment de l'ajout peut ainsi être calculé considérant la quantité de phosphate à ajouter de même que la période nécessaire à l'absorption de ce nutriment par les cellules de l'inoculum.

Le nitrate est nuisible à la croissance de la biomasse sèche ainsi qu'à la prolifération cellulaire selon les observations effectuées de même que des résultats obtenus par l'optimisation de la fiabilité du modèle de croissance. De plus, la concentration de l'azote extracellulaire doit être supérieure à 0 de manière à assurer la croissance de la biomasse sèche. En ce qui a trait à la prolifération cellulaire, ce lien est plus ou moins observé. En effet, lorsque la concentration intracellulaire en ammoniaque est supérieure à 0, la prolifération perdure même en l'absence d'azote extracellulaire. Ce phénomène observé sur quelques heures laisse croire en la non-nécessité du nitrate pour la prolifération cellulaire en présence d'ammoniaque intracellulaire. Il est recommandé d'effectuer une série d'expérimentations portant sur la nécessité du nitrate à la prolifération de cellules végétales dans le but d'en annuler l'ajout aux cultures en bioréacteur.

L'expérimentation réalisée démontre clairement la nécessité de l'ammoniaque à la prolifération cellulaire. De plus, l'ammoniaque doit être présente à

l'intérieur des cellules, donc disponible à la croissance, plutôt qu'extracellulairement d'où il doit être absorbé. Afin d'augmenter la disponibilité de ce nutriment intracellulairement sans en augmenter la concentration et la présence extracellulaire, l'ajout préconisé du sel d'ammonium-phosphate à l'inoculum décrit précédemment est une fois de plus recommandé. Considérant que la demande cellulaire en ammoniaque est supérieure à celle en phosphate, un sel d'ammonium sulfate $(NH_4)_2SO_4$ ou d'ammonium citrate $(NH_4)_2HC_6H_5O_7$ peut aussi être ajouté en même temps ou à un autre moment tout dépendant de la période d'absorption calculée. L'effet du contrion SO_4 n'est pas significatif à la croissance cellulaire pour les concentrations utilisées (ce sel est utilisé pour les ajouts d'ammoniaque aux cultures 2SH24 et 2SH26) mais peut probablement le devenir si utilisé en plus grande quantité. Par contre, l'utilisation de l'ammonium citrate serait préférable considérant que dans ce cas-ci, que le contrion est un sucre assimilable et utilisable par les cellules.

8.2 Modèle de croissance

Dans l'ensemble, le modèle de croissance développé fournit une très bonne estimation de la croissance en biomasse sèche et en prolifération cellulaire ainsi que de la consommation des nutriments. Il est donc possible d'en déduire que la forme de l'équation du taux spécifique de croissance associé à un nutriment, développée dans le cadre de cette étude et présentée à l'équation 5.12, représente bien la relation s'établissant entre la croissance et la concentration des nutriments.

L'erreur résiduelle d'estimation du modèle se situe autour de 15 % pour la croissance de la biomasse sèche alors qu'il est d'environ 20 % pour la concentration cellulaire. Certaines sources d'erreurs sont à l'origine de ces écarts. Tout d'abord, le modèle ne tient pas compte de la présence d'une phase de latence en début de culture. Il en résulte une augmentation de l'erreur d'estimation du modèle. Toutefois, cette situation n'est pas d'importance majeure puisqu'elle est corrigée manuellement jusqu'au début de la période de croissance.

Afin de corriger cette erreur du profil d'estimation, la biomasse sèche ainsi que la concentration cellulaire devraient être scindées mathématiquement chacune en trois fractions : une fraction vivante mais inerte, une fraction dont le métabolisme de croissance est actif et dans une perspective de production de phytochimiques, une fraction dont le métabolisme de production prédomine. Cette façon de voir le biosystème à l'étude est plus réaliste que de poser que toutes les cellules sont dans le même état physiologique comme le considère implicitement le modèle développé. L'élaboration d'un modèle présentant une telle forme est fastidieuse à prime abord mais plus facilement réalisable suite à ce projet dont les fondements ainsi que les équations et paramètres associés aux nutriments dans le modèle développé sont directement utilisables.

Afin de tenir compte du phénomène d'absorption et de l'utilisation plus lente de certains nutriments, un outil mathématique supplémentaire est développé de

manière à combler l'absence d'outils et de protocoles expérimentaux pour ces mesures. Il s'agit de pseudo-concentrations intracellulaires en ammoniaque et en phosphate. L'utilisation de ces pseudo-concentrations permet de représenter adéquatement l'effet étendu dans le temps de l'ammoniaque sur la prolifération cellulaire. Ce nouvel outil mathématique a donc permis de tenir compte d'un phénomène physique observé en l'absence d'outils de mesure.

Toutefois, ces pseudo-concentrations sont calculées en valeurs rapportées au volume de culture, soit en mmol L^{-1}. L'utilisation de ces valeurs sous cette forme induit probablement une erreur quant à leur seuil de disponibilité. En effet, une fois à l'intérieur d'une cellule, ce nutriment n'est disponible que pour la croissance de cette cellule peut importe s'il y a dilution ou concentration du milieu environnant. Il est alors recommandé d'utiliser ces pseudo-concentrations sous forme de mmol $(10^9\ ¢)^{-1}$ afin de contrer cette source d'erreur. Néanmoins, cette erreur est négligeable dans les présentes conditions d'opération considérant qu'aucun ajout de cellules externe n'est effectué en cours de la culture et que les nutriments absorbés sont répartis aux cellules filles lors de la division cellulaire.

En ce qui a trait à la concentration cellulaire déterminée expérimentalement, une l'erreur de mesure est présente. En effet, comme expliqué à la section 6.2.4.3, la concentration cellulaire résultante de l'analyse selon le protocole expérimental est inférieure à celle réellement présente dans le bioréacteur. La méthode

de digestion enzymatique préconisée dans cette étude présente de meilleurs résultats que par digestion à l'oxyde de chrome (Pépin, 1996) mais peut certainement être améliorée par une modification des manipulations. Une autre avenue devrait aussi être étudiée parallèlement à ces modifications. Il s'agit d'une analyse de la concentration d'acide désoxyribonucléique (ADN) contenue dans la biomasse (Mirjalili et Linden, 1995). De cette manière, la concentration cellulaire pourrait être remplacée ou combinée à ce nouveau paramètre représentant l'aspect métabolique qu'est la division cellulaire. Cependant, la capacité d'estimation du modèle de croissance n'est nullement affectée par cette erreur de mesure qui se retrouve directement dans les données brutes que doit estimer le modèle.

Finalement, il est à noter que la forme du modèle imposée lui confère une versatilité quant à l'espèce de cellules végétales utilisée pour les cultures de cellules en suspension. En effet, afin d'adapter ce modèle à une autre espèce végétale, il s'agit tout d'abord d'identifier les nutriments majeurs. Cette première étape, qui peut paraître ardue à priori, ne devrait pas être longue, considérant que la majeure partie des cellules végétales ont une dépendance accrue envers les mêmes nutriments (voir références sur les nutriments). Par la suite, les taux de consommation ainsi que les rendements peuvent être calculés pour ces nutriments. Finalement, la même forme de taux de croissance spécifique associés aux nutriments peut être utilisée de manière à identifier l'impact de chacun sur la croissance de la culture. Dès lors, une maximalisation de la croissance de cette espèce peut être réalisée.

8.3 Maximalisation de la concentration cellulaire

Les résultats obtenus lors de la phase de maximalisation de la prolifération cellulaire sont extrêmement satisfaisants. D'autant plus que la concentration finale obtenue est limitée par une incapacité du système physique à fournir l'oxygène nécessaire à un accroissement supplémentaire. Il est donc permis de croire que la concentration cellulaire obtenue aurait pu être bien au-delà du résultat obtenu. En fait, selon le profil de croissance obtenu lors de cette expérimentation, la concentration cellulaire pourrait encore être augmentée jusqu'à ce qu'elle soit limitée par le facteur logistique, c'est-à-dire que tout l'espace disponible soit occupé par les cellules (SCV = 100 %).

Selon l'expérience de culture, une fois le problème de transfert d'oxygène outrepassé, la concentration cellulaire finale pourrait encore être doublée et même triplée. Effectivement, une concentration de 60×10^9 ¢ L^{-1} suppose que la taille maximale des cellules devrait être d'au plus 0.032 mm de diamètre alors qu'elles sont d'environ 0.02 à 0.04 mm de diamètre selon les observations faites au microscope (résultats non-présentés). Il est donc fortement recommandé de concentrer les efforts sur l'augmentation de la capacité du système à transférer de l'oxygène à la suspension cellulaire.

8.4 Système de culture

Afin d'augmenter la capacité de transfert d'oxygène du bioréacteur, certaines améliorations doivent être apportées aux systèmes actuels de culture. En effet, en effectuant le même calcul que présenté à la fin de la section 7.4.1 (équation 3.1) avec les mêmes conditions et un taux de respiration 3 fois plus élevé (proportionnel au nombre de cellules), il s'en suit que le coefficient de transfert nécessaire pour supporter une concentration cellulaire de 60 x 10^9 ¢ L^{-1} doit être augmenté à plus de 20 h^{-1}. D'autre part, la conception d'un nouveau réacteur pourrait s'avérer la meilleure solution, à moins que des modifications majeures soit apportées aux systèmes actuel de culture.

Une modification du réacteur de 5 L peut et devrait être envisagée dans le but d'accroître le transfert de masse. À titre d'exemple, des sections supplémentaires de verre devraient être ajoutées et superposées l'une au dessus de l'autre de manière à augmenter le ratio hauteur-diamètre (H/D) entre 5 et 10 alors qu'il n'est présentement que de 1. Cette modification augmenterait considérablement le transfert d'oxygène. En outre, cette amélioration est facilement réalisable par la modification de l'axe d'agitation de manière à pouvoir le fixer à des hauteurs différentes augmentant ainsi l'espace entre la table et l'agitateur situé au-dessus du réacteur.

Quant à l'ajout de sections de verre, celle actuellement en place sur le réacteur est déjà retenue par des brides reliées par des tiges de rétention. Il s'agit de

superposer les sections de verre l'une par-dessus l'autre en les séparant par un joint d'étanchéité ou à remplacer celle présente par une seule section plus longue. Il s'agît alors de changer les tiges de rétention par des tiges plus longues permettant de relier la bride supérieure à celle inférieure avec toutes les sections les unes sur les autres ou celle plus longue.

Finalement, le même type d'hélice peut être utilisé. Il suffit simplement de l'allonger ou, comme pour les sections de verre, la modifier de manière à pouvoir y ajouter de nouvelles sections bout à bout. Par ces modifications réalisables sans trop de main-d'oeuvre et nécessitant relativement peu de temps, le système de culture devient très versatile pour des cultures à taux de transfert variable, de 5 à 50 L. Un changement majeur s'impose toutefois par la même occasion; considérant l'augmentation de volume du réacteur, il ne sera plus possible de le stériliser dans un autoclave comme c'est le cas présentement. Une alimentation en vapeur vive doit donc être prévue près de l'emplacement du réacteur de même que la programmation d'une boucle de stérilisation.

8.5 Production de métabolites secondaires

La présente étude s'inscrit dans le cheminement d'optimisation d'un bioprocédé de production de métabolites secondaires. L'hypothèse principale sur laquelle réside le présent ouvrage consiste en une relation entre la concentration cellulaire et la capacité de production de métabolites secondaires par les cultures de

cellules végétales basé sur les relation entre la concentration cellulaire maximale et le taux de respiration maximum ainsi qu'entre la production de métabolites secondaires et ce même taux de respiration.

En admettant ceci, il est évident que le taux de production maximum atteint jusqu'à ce jour par Aubry (1994) avec cette même espèce et dans le même système de culture peut être grandement augmenté; probablement de l'ordre de l'augmentation de la concentration cellulaire. Cet aspect est scientifiquement et économiquement intéressant. Toutefois, il est clair que de tels taux de production ne pourront être atteints avec la configuration de réacteur actuel.

Quant à la poursuite des travaux, deux avenues se présentent. Tout d'abord, il pourrait être avantageux de modifier le système de culture de manière à augmenter le taux de transfert d'oxygène. Cependant, il serait probablement préférable de passer à l'étude, la modélisation et l'optimisation de la phase de production de métabolites secondaires à une concentration cellulaire moindre (10×10^9 ¢ L^{-1} par exemple) de manière à poursuivre l'avancement des travaux avec les taux de transfert d'oxygène actuels.

9 CONCLUSION

Le principal objectif des présents travaux était l'optimisation de la croissance de cellules d'*Eschscholtzia californica* en bioréacteur. Implicitement, les sous-objectifs en découlant consistaient à l'obtention d'une bonne compréhension des métabolismes de croissance, de la modélisation de ces phénomènes ainsi que de la maximalisation de la prolifération cellulaire.

Selon les résultats rapportés, soit

- l'identification de l'ammoniaque comme nutriment-clé à la division cellulaire,
- une erreur d'estimation de la croissance par le modèle de 15 à 20 % principalement due à la phase de latence
- ainsi qu'un accroissement de la concentration cellulaire d'un ordre de 1 000 %,

il est permis d'affirmer que tous les objectifs d'optimisation de la croissance sont atteints avec d'excellents résultats.

Afin d'assurer la poursuite de tels travaux de recherche soit l'optimisation de la production de métabolites secondaires, une modification du système de culture s'impose. Le transfert d'oxygène doit absolument être augmenté de manière à suffire non seulement à la demande en phase de croissance mais aussi à celle considérablement plus élevée en phase de production.

BIBLIOGRAPHIE

ALBIOL, J., CAMPMAJO, C., CASAS, C. et POCH, M. (1995). Biomass estimation in plant cell cultures: A Neural Network Approach. Biotechnol. Prog., 11, 88-92.

ABORHEY, S. et WILLIAMSON, D. (1977). Modelling of lactic acid production by *Streptococcus cremoris* HP. J. Gen. Appl. Microbiol., 23, 7-21.

AIBA, S., SHODA, M. et NAGATANI, M. (1968). Kinetics of product inhibition in alcohol fermentation. Biotechnol. Bioeng., 10, 845-864.

ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K. et WATSON, J.D. (1992). La croissance et le développement des végétaux sont contrôlés par des médiateurs chimiques. Biologie moléculaire de la cellule deuxième édition, Éditions Flammarion Médecine-Science, Paris, 1180

AMINO, S., FUJIMURA, T. et KOMAMINE, A. (1983). Synchrony induced by double phosphate starvation in a suspension culture of *Catharanthus roseus*. Physiol. Plant., 59, 393-396.

ANDREW, J.F. (1968). A mathematical model for the continuous culture of microorganisms utilizing inhibiting substrates. Biotechnol. Bioeng., 10, 707-723.

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

ASHIHARA, H. et TOKORO, T. (1985). Metabolic fate of inorganic phosphate absorbed by suspension cultured cells of *Catharanthus roseus*. J. Plant Physiol., 118, 227-235.

ASHIHARA, H. et UKAJI, T. (1986). Inorganic phosphate absorption ans its effect on the adenosin 5'-triphosphate level in suspension cultured cells of *Catharanthus roseus*. J. Plant Physiol., 124, 77-85.

AUBRY, D. (1995). Résultats : biocinétique de croissance. Développement et commande d'un bioprocédé de production de sanguinarine à partir de la culture en suspension de cellules de plante, Mémoire de maîtrise, École Polytechnique de Montréal, Canada, 75.

AXELSSON, J.P. et HAGANDER, P. (1984). Control of baker's yeast production based on ethanol measurements. Proc. 3rd European Congress on Biotechnology., Verlag Chemie, Weiheim, 2, 629-636.

BAILEY, C.M. et NICHOLSON, H. (1989). A new structured model for plant cell culture. Biotechnology and Bioengineering, 34, 1331-1336.

BAILEY, C.M. et NICHOLSON, H. (1990). Optimal temperature control for a strutured model of plant cell culture. Biotechnology and Bioengineering, 35, 252-259.

BAILLARGEON, G. (1990). Caractéristiques de tendance centrale et de dispersion. Méthodes statistiques de l'ingénieur, volume 1, Éditions SMG, Trois-Rivières, 47-90

BARFORD, J.P. et HALL, R.J. (1978). An evaluation of the approaches to the mathematical modelling og macrobial growth. Process Biochemistry, 22-29.

BASTIN, G. et DOCHAIN, D. (1990). Adaptive control of bioreactors. On-line Estimation and Adaptive Control of Bioreactors, Éditions Elsevier, New York, 18-31, 259-278

BAZUA, C.D. et WILKE, C.R. (1977). Ethanol effets on the kinetics of a continuous fermentation with *Saccaromyces cerevisiae*. Biotechnol. Bioeng., 10, 845-864.

BECK, E. et RENNER, U. (1989). Ammonium Triggers Upgrade of NO_3^- bt *Chenopodium rubrum* Suspension Culture Cells and Remobilization of their Vacuolar Nitrate Pool. Plant Cell Physiol., 30, 4, 487-495.

BLACKMAN, F. (1905). Optima and limiting factors. Ann. Bot., 19, 281-295.

BRAMBLE, J.L. et GRAVES, D.J. (1991). Calcium and Phosphate Effects on Growth and Alkaloid Production in *Coffea arabica* : Experimental Results and Mathematical Model. Biotechnology and Bioengineering, 37, 859-868.

BRAMBLE, J.L., GRAVES, D.J. et BRODELIUS, P. (1990). Plant cell culture using a novel bioreactor : the mechanically stabilized fluidized bed. Biotechnol. Prog., 6, 452-457.

BRODELIUS, P. et VOGEL, H.G. (1985). A phosphorus-31 nuclear magnetic reasonance study of phosphate uptake and storage in cultured *Catharanthus roseus* and *Daucus carota* plant cells. J. Biol. Chem., 260, 3556-3560.

CHEN, Y.R. et HASHIMOTO, A.G. (1978). Kinetics of methane fermentation. Symp. on Biotech. in Energy Prod. and Cons., Mai.

CRAWFORD, N.M. (1995). Nitrates : Nutrient and signal for plant growth. Plant Cell., 7, 859-568.

CURTIS, W.R., HASEGAWA, P.M. et EMERY, A.H. (1991). Modeling release and variable growth in phosphate limited suspension cultures of *Opium puppy*. Biotechnol. Prog., 38, 371-379.

DIXON, R.A. (1985). Isolation and maintenance of callus and cell suspension cultures, Plant Cell Cultures: A Pratical Approach, Éditions IRL Press, Oxford, 1-20

DO, C.B. et CORMIER, F. (1991). Effects of low nitrate and high sugar concentrations on anthocyanin content and composition of grape (*Vitis vinifera* L) cell suspension. Plant Cell Rep., 9, 500-504.

DOUGALL, D.K. et WEYRAUCH, K.W. (1980). Growth and Anthocyanin Production by Carrot Suspension Cultures Grown under Chemostat Conditions with Phosphate as the Limiting Nutrient. Biotechnology and Bioengineering, 22, 337-352.

DOUGALL, D.K., LaBRAKE, S. et WHITTEN, G.H. (1983). The Effect of Limiting Nutrients, Dilution Rate, Culture pH, and Temperature on the Yeild Constant and Anthocyanin Accumulation of Carrot Cells Grown in Semicontinuous Chemostat Cultures. Biotechnology and Bioengineering, 25, 569-576.

DOURADO, A. et CALVET, J.L. (1983). Static optimization of the ethanol production in a cascade reactor. Modelling and Control of Biotechnical Processes, Pergamon, Oxford, 177-184

DRAPEAU, D., BLANCH, H.W. et WILKE, C.R. (1986). Growth Kinetics of *Discorea deltoidea* and *Catharanthus roseus* in Batch Culture. Biotechnology and Bioengineering, 28, 1555-1563.

DUCOS, J.P. et PAREILLEUX, A. (1986). Effect of aeration rate and influence of pO_2 in large-scale cultures of *Catharanthus roseus*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 25, 101-105.

FENCL, Z. (1966). Theoritical and Methodological Basis of Continuous Culture, I, Éditions I. Málek and Z. Fencl, Académie, New-York, 79-88

FETT-NETO, A.G., ZHANG, W.Y. et DICOSMOS, F. (1994). Kinetics of Taxol Production, Growth, and Nutrient Uptake in Cell Suspensions of *Taxus cuspidata*. Biotechnology and Bioengineering, 44, 205-210.

FRAZIER, G.C. (1989). A Simple Leaky Cell Growth Model Plant Cell Aggregates. Biotechnology and Bioengineering, 33, 313-320.

FUJITA, Y., HARA, Y. et SUGA, C. (1981). Production of shikonin derivatives by cell suspension cultures of *Lithospernum erythrohizon*. 2. A new medium for production of shikonin derivatives. Plant Cell report, 1, 59-63.

GHOSE, T.K. et TYAGI, R.D. (1979). Rapid ethanol fermentation of cellulose hydrolysate : II. Product and substrate inhibition and optimization of fermentor design. Biotechnology and Bioengineering, 21, 1387-1400.

GUARDIOLA, J., IBORRA, J.L., et CÁNOVAS, M. (1995). A Model That Links Growth and Secondary Metabolite Production in Plant Cell Suspension Cultures. Biotechnology and Bioengineering, 46, 291-297.

GOODCHILD, J.A., et GIVAN, C.V. (1990). Influence of Ammonium and extracellular pH on the amino and organic acid suspension culture cells of *Acer pseudoplatanus*. Physiologia plantarium, 78, 29-37.

GRM, B. et MELE, M. (1980). Model of Growth and Ergot Alkaloid Production by *Claviceps purpurea*. Biotechnology and Bioengineering, 22, 225-270.

GUARDIOLA, J., IBORRA, J.L. et CANOVAS, M. (1995). A model that links growth and secondary metabolite production in plant cell suspension cultures. Biotechnology and Bioengineering, 46, 291-297.

HÄGGLUND, T. (1983). Incubation time prediction in yoghurt manufacturing, Modelling and Control of Biotechnological Processes, Permagon, Oxford, 307-311

HALL, R.D. et YEOMAN, M.M. (1986). Factors determining anthocyanin yeild in cell cultures of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. New Physiol., 103, 33-43.

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. Journal of Experimental Botany., 37, 185, 1911-1920.

HENSHAW, G.G., JHA, K.K., MEHTA, A.R., SHAKESHAFT, D.J., et STREET, H.E. (1966). J. Exp. Bot., 17, 362.

HINSHELWOOD, C.M. (1946). Chemical Kinetics of the Bacterial Cell, Oxford University Press, Londre

HIROSE, M., YAMAKAWA, T., KOMADA, T. et KOMAMINE, A. (1990). Accumulation of betacyanin in *Phytolacca americana* cells and of anthocyanin in *Vitis* sp. cells in relation to cell division in suspension cultures. Plant Cell Physiol., 31, 267-271.

HOOKER, B.S. et LEE, J.M. (1992). Application of a new structured model to Tabacco cell cultures. Biotechnology and Bioengineering, 39, 765-774.

HOPPE, G.K. et HANSFORD, G.S. (1983). Ethanol inhibition of continuous anaerobic yeast growth. Biotechnol. Lett., 4, 1, 39-44.

JERUSALIMSKI, N.D. et ENGAMBERDIEV, N.B. (1969). Continious Cultivation of Microorganisms, Academic Press, New-York

JESSUP, W et FOWLER, M.W. (1976). Interrelationships between carbohydrate metabolism and nitrogen assimilation in cultured plant cells. I. Effects of glutamate and nitrate as alternative nitrogen sources on cell growth. Planta, 132, 119-123.

JIN, C.K., CHIANG, H.L. et WANG, S.S. (1981). Steady-state analysis of the enhencement in ethanol productivity of a continuous fermentation process employing a protein-phosphotifind complex as a protecting agent. Enzyme Microbiol., 3, 249-257.

JOLICOEUR, M., CHAVARIE, C., CARREAU, P.J. et ARCHAMBAULT, J. (1992). Development of a Helical-Ribbon Impeller Bioreactor for High-Density Plant Cell Suspension Culture. Biotechnology and Bioengineering, 39, 511-521.

JOST, J.L., DRAKE, J.F., FREDERICKSON, A.G. et TSUCHIYA, H.M. (1973). Interactions of *Tetrahymena pyroformis, Escherichia coli, Azobacter vinelandii* and glucose in a minimal medium. J. Bacteriol., 113, 834-840.

KAMEN, A.A., CHAVARIE, C., ANDRÉ, G. et ARCHAMBAULT, J. (1992). Design parameters and performance of surface baffled helical ribbon impeller bioreactor for the culture of shear sensitive cells. Chemical Engineering Science, 47, 9-11, 2375-2380.

KAO, K.N. (1982). Staining methods for protoplast and cells. Plant tissue culture methods, Second Revised Edition, Éditions L.R. Wetter and F. Constabel, Saskatoon, Saskatchewan, 67-71

KATO, A., FUKASAWA, A., SHIMIZU, Y., SOH, Y. et NAGAI, S. (1977). Requirements of PO_4^{3-}, NO_3^-, SO_4^{2-}, K^+ and Ca^{2+} for the culture of Tobacco Cells in Suspension Culture. J. Ferment. Technol., 55, 3, 207-212.

KATO, A. et NAGAI, S. (1979). Energetics of tobacco cells, *Nicotiana tabacum* L., growing on sucrose medium. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 7, 219-225.

KLEINSMITH, L.J. et KISH, V.M. (1988). The Cell Division Cycle. Principles of Cell Biology, Harper & Row, Publishers, New-York, 513

KNOBLOCH, K.H. et BERLIN, J. (1983). Influence of phosphate on the formation of the indole alkaloids and phenolic compounds in cell suspension cultures of Catharanthus roseus. I. Comparison of enzyme activities and product accumulation. Plant. Cell Tissue Org. Cult., 2, 333-337.

KNOBLOCH, K.H., BEUTNAGEL, G. et BERLIN, J. (1981). Influence of accumulated phosphate on culture growth and formation of cinnamoyl putrescines in medium-induced cell suspension cultures of *Nicotiana tabacum*. Planta, 153, 582-585.

LEE, S.C., HWANG, Y.B., CHANG, H.N. et CHANG, Y.K. (1991). Adaptive Control of Dissolved Oxygen Concentration in a Bioreactor. Biotechnology and Bioenginnering, 37, 597-607.

LEVENSPIEL, O. (1980). The Monod equation : a revised and a generalization to product inhibition situations. Biotechnology and Bioenginnering, 22, 1671-1687.

MacCARTHY, J.J., RATCLIFFE, D. et STREET, H.E. (1980). The Effect of Nutrient Medium Composition on the Growth Cycle of *Catharanthus roseus* G. Don Cells Grown in Batch Culture. Journal of Experimental Botany, 31, 124, 1315-1325.

MANO, T., KIMURA, T., IIJIMA, S., TAKAHASHI, K., TAKEUCHI, H. et KOBAYASHI, T. (1990). Comparison of Oxygen Supply Methods for Cultures of Shear-Stress Sensitive Organisms Including Animal Cell Culture. J. Chem. Tech. Biotechnol., 47, 259-271.

MANTELL, S.H., PEARSON, D.W., HAZELL, L.P. et SMITH, H. (1983). The effect of initial phosphate and succrose levels on nicotine accumulation in batch suspension cultures of *Nicotiana tabacum* L. Plant. Cell. Rep., 2, 73-77.

MARTIN, S.M. et ROSE, D. (1979). Growth of plant cell (Iopomea) suspension cultures at controlled pH levels. Can. J. Bot., 54, 1264-1270.

McLELLAN, W.L.Jr. et LAMPEN, J.O. (1963). Biochim. Biophys. Acta, 67, 324.

MEIJER, J.J., ten HOOPEN, H.J.G., LUYBEN, K.Ch.A.M. et LIBBENGA, K.R. (1993). Effects of hydrodynamics stress on cultured plant cells : A litterature survey. Enzyme Microb. Technol., 15, 234-238.

MING, F., HOWELL, J.A. et CANOVAS-DIAZ, M. (1988). Mathematical simulation of anaerobic stratified biofilm processes, Computer Applications in Fermentation Technology : Modeling and Control of Biotechnological Processes, Éditions Elsevier.

MIRJALILI, N. et LEINDEN, F.C. (1995). Gas phase composition effects on suspension cultures of *Taxus cuspidata*. Biotechnology and Bioengineering, 48, 123-132.

MONOD, J. (1942). Recherches sur la Croissance des Cultures Bactériennes, Éditions Hermann, Paris.

MORARI, M. et ZAFIRIOU, E. (1989). Robust process control, Éditions Prentice-Hall, New York.

MOSER, H. (1958). The dynamics of bacterial populations in the chemostat. Carnegie Inst. Publication, n°614, Washington.

MOULIN, G., BOZE, H. et GALZY, P. (1980). Inhibition of alcoholic fermentation by substrate and ethanol. Biotechnology and Bioengineering, 22, 2375-2381.

NEWELL, J.A. et CURTIS, W.R. (1989). Optimization of secondary metabolites production in plant tissue culture combining nutrient limitation and fungal elicitation. 1989 AEIChE Annual Meeting, San Francisco, CA.

NYHOLM, N. (1976). A mathematical model for macrobial growth under limitation by conservative substrates. Biotechnology and Bioengineering, 18, 1043-1056.

OEGGERLI, A., EYER, K. et HEINZLE, E. (1994). On-Line Gas Analysis in Animal Cell Cultivation: I. Control of Dissolved Oxygen and pH. Biotechnology and Bioengineering, 45, 42-53.

OHMORI, M. (1981). Effect of Ammonia on Dark CO_2 Fixation by *Anabaena* Cells Treated with Methionine Sulfoximine. Plant & Cell Physiol, 22, 4, 709-716.

PANDA, A.K., MISHRA, S. et BISARA, 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 CHAUBET, N. (1980). Growth kinetics of apple plant cell cultures. Biotechnol. Lett., 2, 291-296.

PAREILLEUX, A. et CHAUBET, N. (1981). Mass cultivation of *Medicago sativa* growing on lactose : kinetic aspects. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 11, 222-225.

PAYNE, G.F., BRINGI, V., PRINCE, C. et SHULER, M.L. (1991). Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems.Hanser Publishers, New-York.

PAZOUTOVA, S., VOTRUBA, J. et REHACEK, Z. (1981). A mathematical model of growth and alkaloid production in the sumerged cultur of *Claviceps purpurea*. Biotechnology and Bioengineering, 23, 2837-2849.

PÉPIN, M.F. (1996). Introduction. 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, 33-36.

PAZOUTOVA, S., VOTRUBA, J., et REHACEK, Z. (1981). A Mathematical Model of Growth and Alkaloid Production in the Submerged Culture of *Claviceps purpurea*. Biotechnology and Bioengineering, 23, 2837-2841.

POWELL, E. (1967). Growth rate of microorganisms as a function of substrate consumption. Microbial Physiology and Continuous Culture, 3rd Symp., HMSO, London, 34-56.

QUINLAN, A.V. (1986).A Semicontinuous Culture Model that Links Cell Growth to Extracellular Nutrient Concentration. Biotechnology and Bioengineering, 28, 1455-1461.

RENNER, U. et BECK, E. (1988) Nitrate reductase activity of photoautotrophic suspension culture cells of Chenopodium rubrum is under the hierarchical regime of NO3-, NH4- and light. Plant. Cell. Physiol., 29, 1123-1131

RHO, D. et ANDRÉ, G. (1991). Growth and Stoichiometry of a *Catharanthus roseus* Cell Suspension Culture Grown under Nitrogen-Limiting Conditions. Biotechnology and Bioengineering, 38, 579-587.

ROQUES, H., YUE, S., SAIPANICH, S. et CAPDEVILLE, B. (1982). Is Monod's approach adequate for the modelisation of purification processes using biological treatment. Water Ressources., 16, 839-847.

ROSE, D. et MARTIN, S.M. (1975). Effect of ammonium on growth of plant cells (*pomoea sp.*) in suspension cultures. Can. J. Bot., 53, 1942-1949.

SAKANO, K. (1990). Proton/Phosphate Stoechiometry in Uptake of Inorganic Phosphate by Cultured Cells of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. Plant Physiol., 93, 479-483.

SCHNAPP, S.R., CURTIS, W.R., BRESSAN, R.A. et HASEGAWA, P.M. (1991). Estimation of Growth Yeild and Maintenance Coefficient of Plant Cell Suspensions. Biotechnology and Bioengineering, 38, 1131-1136.

SEBORG, D.E., EDGAR, T.F. et MELLICHAMP, D.A. (1989). Design of Digital Controllers. Process dynamics and control, Éditions John Wiley & Sons, New York, 617

SEVELY, Y. POURCIEL, J.P., RAUZY, G. et BOVÉE, J.P. (1981). Modelling, identification and control of the alcohol fermentation in a cascade reactor. Proc. 8th IFAC World Congress, Kyoto, 22, 177-184.

SHEHATA, E. TALAAT et MARR, A.G. (1971). Effect of nutrient concentration on the growth of *Escherichia coli*. J. Bacteriol, 107, 210-216.

SIROIS, J. (1994). Conception mécanique. Conception d'un bioréacteur de 2 L avec commande adaptative d'oxygène dissous, Université du Québec à Trois-Rivières, Québec, Canada, 9

SISLER, E.C. et WOOD, C. (1988). Interaction of ethylene and CO_2. Physiologia Plantarium, 73, 440-444.

SMITH, J.M. et DAVIDSON, S.W. (1990). Development of a Strategy to Control the Dissolved Concentration of Oxygen and Carbon Dioxide at Constant Shear in a Plant Cell Bioreactor. Biotechnology and Bioengineering, 35, 1088-1101.

SOKOL, W. et HOWELL, J.A. (1981). Kinetics of phenol oxidation by washed cells. Biotechnol. Bioeng., 23, 2039-2049.

SU, W.W. (1995). Bioprocessing Technology for Plant Cell Suspension Cultures. Applied Biochemistry and Biotechnology, 50, 189-230.

TAKAMATSU, T., SHIOYA, S. et KUROME, H. (1983). Dynamics and control of a mixed culture in activated sluge process. Modelling and Control of Biotechnical Processes, Éditions A. Halme, Pergamon, Oxford, 103-110

TATICEK, R.A., MOO-YOUNG, M. et 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.

TESSIER, G. (1942). Croissance des populations bactériennes et quantités d'aliments disponibles. Rev. Sci., Paris, 80-209.

TODA, K. et YABE, I. (1979). Mathematical Model of Cell Growth and Phosphatase Biosunthesis in *Saccharomyces carlsbergensis* under Phosphate Limitation. Biotechnology and Bioengineering, 21, 487-502.

van GULIK, W.M., MEIJER, J.J., ten HOOPEN, H.J.G., LUYBEN, K.Ch.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 (1993). General introduction. Growth and respiration in chemostat cultures of *Petunia hybrida* cell suspensions, Thèse de doctoratUniversité Vrije d'Amsterdam, Hollande, 27.

van GULIK, W.M., ten HOOPEN, H.J.G. et HEIJNEN, J.J. (1992). Kinetics and Stoichiometry of Growth of Plant Cell Cultures of Catharanthus roseus and Nicotiana tabacum 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.

VERPOORTE, R., van der HEIJDEN, R. et SCHRIPSEMA, J. (1993). Plant cell biotechnology for the production of alkaloids : Present status and prodpects. Journal of Natural Products, 56, 2, 186-207.

WESTGATE, P.J., CURTIS, W.R., EMERY, A.H., HASEGAWA, P.M. et HEINSTEIN, P.F. (1991). Approximation of Continuous Growth of *Cephalotaxus harringtonia* Plant Cell Cultures Using Fed-Batch Operation. Biotechnology and Bioengineering, 38, 241-246.

YAMAKAWA, T., KATO, S., ISHIDA, K., KODAMA, T. et MINODA, Y. (1983). Production of anthocyanins by *Vitis* cells in suspension cultures. Agric. Biol. Chem., 47, 2185-2191.

Appendice

Annexe A

Composition du milieu de culture B5 standard

Tableau A.1 : Composition du milieu B5

	Quantité	
Macronutriments	mg L^{-1}	mmol L^{-1}
KNO_3	2 500	25
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	150	1.0
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	250	1.0
$(NH_4)_2SO_4$	134	1.0
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	150	1.1
Micronutriments	mg L^{-1}	mmol L^{-1}
KI	0.75	4.5
H_3BO_3	3.0	50
$MnSO_4 \cdot H_2O$	10	60
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	2.0	7.0
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.25	1.0
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.025	0.1
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.025	0.1

Annexe B

Mesure de la concentration cellulaire

Mesure de la concentration cellulaire

Solution tampon

- 2.1 g acide citrique
- 2 g EDTA ferrique
- 200 ml eau distillée
- 342 g NaCl
- citrate de sodium

Dissoudre l'acide citrique à l'eau distillée tout en agitant. Ajuster le pH à 4.5 avec le citrate de sodium. Ajouter l'EDTA ferrique ainsi que le NaCl à la solution tampon et agiter jusqu'à dissolution complète. Mettre de côté au réfrigérateur.

Solution enzymatique

- 50 ml tampon citrate
- 800 µl pectinase
- 250 mg cellulase

Prélever la partie requise du tampon citrate. Y dissoudre complètement la cellulase et la pectinase en agitant. Mettre de côté au réfrigérateur.

Séparation cellulaire

- 2 ml de suspension cellulaire
- 8 ml de tampon citrate
- ≤ 4 ml de solution enzymatique

Prélever la suspension cellulaire. Laisser sédimenter 30 minutes. Retirer délicatement le surnageant et ajouter vigoureusement 4 ml de tampon citrate de manière à soulever l'ensemble des cellules. Répéter l'étape précédente. Ces deux dernières étapes permettent de rincer la suspension cellulaire afin de la préparer pour la réaction enzymatique. Retirer le surnageant du second rinçage. Ajouter vigoureusement la solution enzymatique aux cellules sédimentées jusqu'à un volume total de 4 ml. Verser dans un bécher de 50 ml. Agiter à 120 rpm pendant 6 heures.

Compte cellulaire

- 100 µl de solution cellulaire enzymatique
- 100 µl de fuschine liquéfiée (Kao, 1982)

Prélever une partie de la solution cellulaire enzymatique. Y ajouter la fuschine liquéfiée. Cette dernière sert à colorer les cellules facilitant ainsi leur compte et l'évaluation de la viabilité. Mélanger par aspiration. Laisser reposer pendant 2 minutes. Mélanger par aspiration. Prélever une goutte de cette suspension et placer sur un émacytomètre. Recouvrir d'une lamelle à microscopie. Compter les cellulles

pour 9 séries (n=9) de carreaux ayant un volume unitaire de 0.1 mm^3 à un grossissement de 100.

La concentration cellulaire moyenne correspondant à l'échantillon (¢) est calculée selon l'équation B.1 en considérant le compte cellulaire (cc), le volume correspondant à chaque compte (V_C) ainsi que la dilution (D) qui est de 4 selon le présent protocole.

$$¢ = cc \times D \times \frac{1}{V_C} \times 1000 \frac{mm^3}{ml} [=] \frac{¢}{ml} [=] 10^3 \frac{¢}{L} \qquad B.1$$

Annexe C

Nouvelles formes du taux spécifique de croissance de la biomasse sèche décrivant l'inhibition de la concentration de nutriments

Hinshelwood (1946)

$$\mu(H) = \mu^* - K_1(PO_{4e} - K_2)$$

Sevely et al. (1981)

$$\mu(S) = \mu^* \left(\frac{S}{K_S + S}\right)\left(\frac{K_P}{K_P + PO_{4e}}\right)\left(1 - \frac{PO_{4e}}{PO_{4L}}\right)$$

Sevely et al. (1981) modifiée 2 termes

$$\mu(S) = \mu^* \left(\frac{S}{K_S + S}\right)\left(\frac{K_P}{K_P + PO_{4e}}\right)$$

Formulations personnelles

$$\frac{d\mu(1)}{dt} = \left(\frac{PO_{4i}}{K_{P1} + PO_{4i}}\right)\left(\frac{S}{K_S}\right) - \left(\frac{PO_{4e}^{K_{P2}}}{K_{P3}}\right)$$

$$\mu(2) = \left(\mu^* - \mu_S\right)\exp\left(-K_P \frac{PO_{4e}}{XD}\right) + \mu_S$$

$$\mu(3) = \mu^* \left(\frac{S}{K_S + S}\right)\left(\frac{N_{tot}}{K_N + N_{tot}}\right)\left(1 - K_P PO_{4e} NO_3\right)$$

$$\mu(4)=\mu^{*}\left(\frac{S}{K_S+S}\right)\left(\frac{N_{tot}}{K_N+N_{tot}}\right)\left(1-\frac{K_{P1}PO_{4e}NO_3}{K_{P2}+PO_{4e}NO_3}\right)$$

$$\mu(5)=\mu^{*}\left(\frac{S}{K_S+S}\right)\left(\frac{N_{tot}}{K_N+N_{tot}}\right)\left(1-\frac{K_{P1}PO_{4e}NO_3^{K_{P3}}}{K_{P2}+PO_{4e}NO_3^{K_{P3}}}\right)$$

$$\mu(6)=\mu^{*}\left(\frac{S}{K_S+S}\right)\left(\frac{N_{tot}}{K_N+N_{tot}}\right)\left(1-\frac{K_{P1}\left(1+PO_{4e}\right)^{K_{P4}}NO_3^{K_{P3}}}{K_{P2}+\left(1+PO_{4e}\right)^{K_{P4}}NO_3^{K_{P3}}}\right)$$

$$\mu(7)=\mu^{*}\left(\frac{S}{K_S+S}\right)\left(\frac{N_{tot}}{K_N+N_{tot}}\right)\left(1-\frac{PO_{4e}+NO_3-NH_{4e}}{K_I}\right)$$

$$\mu(8)=\mu^{*}\left(\frac{S}{K_S+S}\right)\left(\frac{N_{tot}}{K_N+N_{tot}}\right)\left(1-\left(\frac{PO_{4e}}{K_{I1}}+\frac{NO_3}{K_{I2}}-\frac{NH_{4e}}{K_{I3}}\right)\right)$$

$$\mu(9)=\mu^{*}\left(\frac{S}{K_S+S}\right)\left(\frac{N_{tot}}{K_{N_{tot}}+N_{tot}}\right)\left(\frac{1}{1+PO_{4e}^{K_P}}\right)\left(\frac{1}{1+NO_3^{K_N}}\right)$$

$$\mu(10)=\mu^{*}\left(\frac{S}{K_S+S}\right)\left(\frac{N_{tot}}{K_{N_{tot}}+N_{tot}}\right)\left(\frac{1}{1+PO_{4e}^{K_P}}\right)\left(\frac{1}{1+NO_3^{K_N}}\right)\left(\frac{1}{1+NH_{4e}^{K_{NH}}}\right)$$

$$\mu(11) = \mu^{*}\left(\frac{S}{K_S + S}\right)\left(\frac{N_{tot}}{K_{N_{tot}} + N_{tot}}\right)$$

$$\left(\frac{K_{P1}}{K_{P1} + PO_{4e}^{K_{P2}}}\right)\left(\frac{K_{N1}}{K_{N1} + NO_3^{K_{N2}}}\right)\left(\frac{K_{NH1}}{K_{NH1} + NH_{4e}^{K_{NH2}}}\right)$$

Annexe D

Représentation fonctionnelle de la croissance des cellules d'*Eschscholtzia californica* en fonction des principaux nutriments

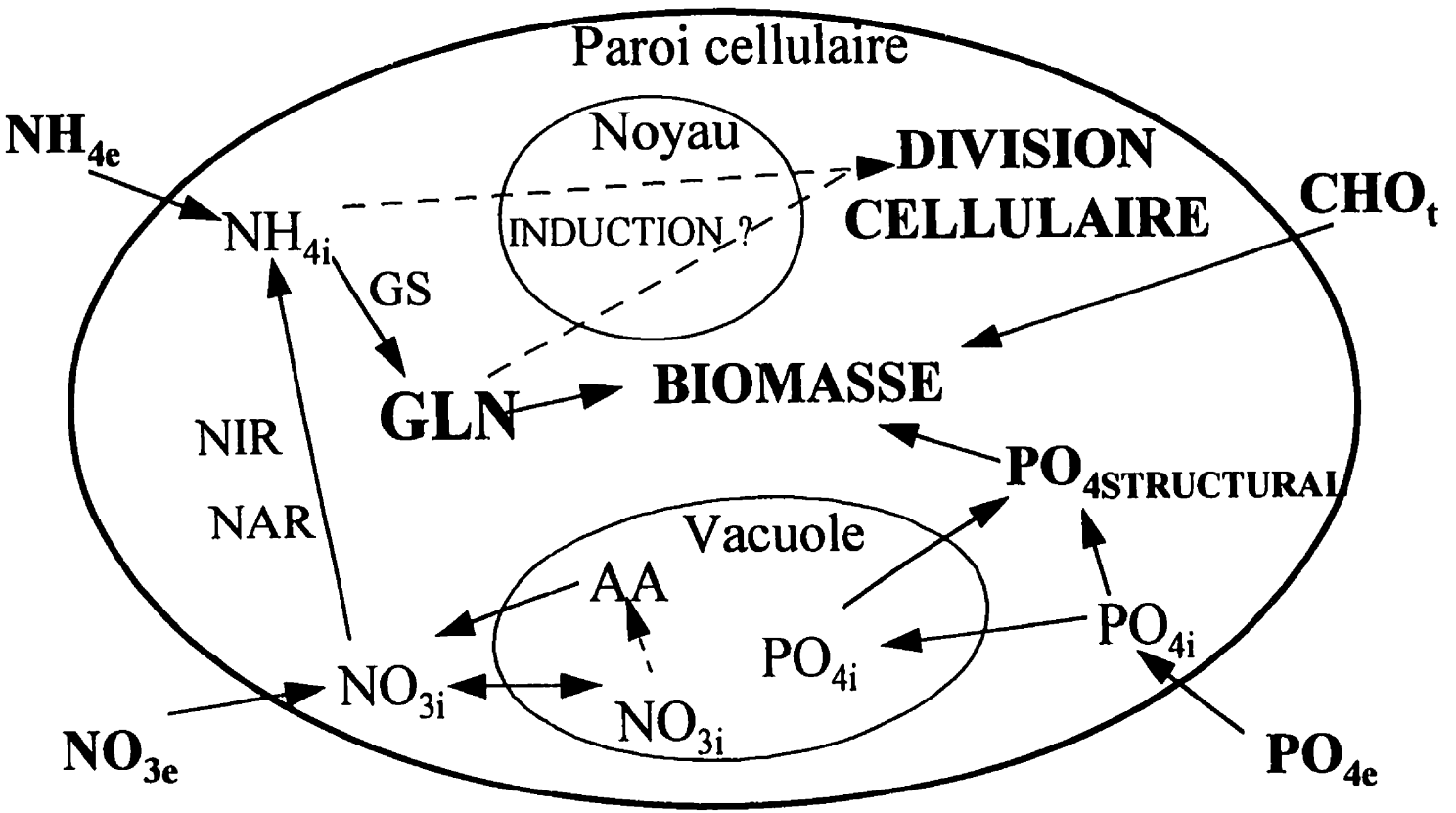
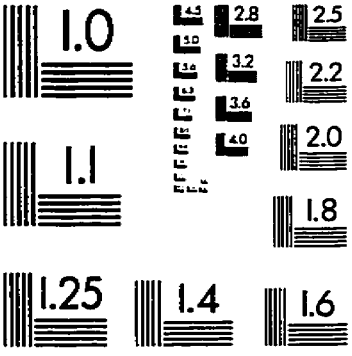
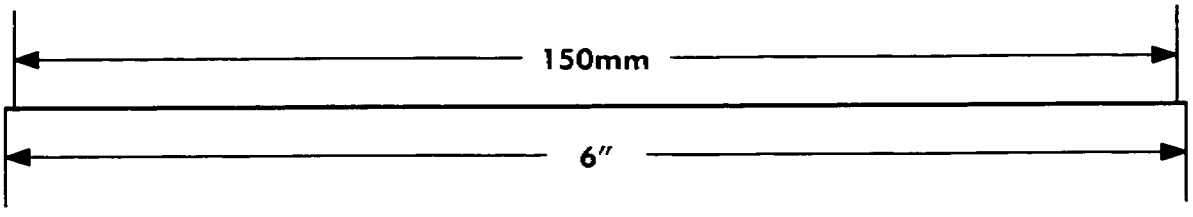

Paroi cellulaire
Noyau
INDUCTION ?
DIVISION CELLULAIRE
NH4e
NH4i
GS
GLN
BIOMASSE
CHOt
NIR
NAR
PO4STRUCTURAL
Vacuole
AA
PO4i
PO4i
NO3i
NO3i
NO3e
PO4e

IMAGE EVALUATION TEST TARGET (QA-3)





APPLIED IMAGE, Inc
1653 East Main Street
Rochester, NY 14609 USA
Phone: 716/482-0300
Fax: 716/288-5989

© 1993, Applied Image, Inc., All Rights Reserved