

Communauté française de Belgique

**FACULTE UNIVERSITAIRE DES SCIENCES AGRONOMIQUES DE
GEMBLOUX**

Mise en évidence de l'impact de l'environnement extracellulaire généré au sein des bioréacteurs sur la dynamique des populations microbiennes : cas de la culture *fed-batch* d'*Escherichia coli*

Année académique 2007-2008

Mémoire de fin d'études présenté par :
BROGNAUX Alison

Promoteur : **Prof.Ph.Thonart**

En vue de l'obtention du diplôme de
Bioingénieur en Chimie et Bio-industries

© Toute reproduction du présent document, par quelque procédé que ce soit, ne peut être réalisée qu'avec l'autorisation de l'auteur et de l'autorité académique de la Faculté universitaire des Sciences agronomiques de Gembloux.

Le présent document n'engage que son auteur.

Remerciements

Au terme de ce travail, je tiens à remercier

Monsieur le Professeur Philippe Thonart pour m'avoir accueilli au sein de l'unité de bio-industries et écouté mes projets d'avenir.

Le docteur Frank Delvigne pour le temps qu'il m'a consacré et ses conseils précieux.

De manière générale, l'ensemble du personnel de bio-industries pour la bonne ambiance qu'il y règne. Je tiens tout particulièrement à remercier Pascale pour l'attention qu'elle m'a accordée, Sam et Benoît pour leur aide lors de la réalisation des expériences de fermentations.

Silvain, pour les soirées passées au laboratoire lors des suivis de culture afin d'assurer ma sécurité,... et puis aussi parce que nous formons une bonne équipe...

Mes parents, pour m'avoir apporté un œil extérieur lors de la relecture de ce travail

J'ai également une pensée reconnaissante pour tous les professeurs qui m'ont dispensé leur enseignement au sein de la Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux.

Résumé

Escherichia coli BL21 est un micro-organisme couramment utilisé en industrie pour la production de protéines recombinantes. Les performances obtenues au niveau du laboratoire ne sont pas reproductibles à grande échelle. En effet, l'opération de mélange n'est plus aussi efficace : lors des cultures *fed-batch*, des gradients de glucose et d'oxygène apparaissent. Les effets de ces gradients ont pu être étudiés en utilisant des réacteurs *scale-down*. Ils permettent de représenter les conditions hydrodynamiques des réacteurs industriels. Le système choisi comprend un réacteur parfaitement mélangé et une section non agitée, entre lesquels le débit de recirculation est maintenu constant. Deux types de parties non agitées ont été utilisés pour provoquer des conditions hydrodynamiques différentes : l'une présente un écoulement dispersé tandis que l'autre présente un écoulement piston. La régulation de l'ajout du glucose a été effectuée en fonction du taux en oxygène dissous. Les paramètres suivis sont l'évolution des concentrations en biomasse, en glucose et en acétate, la viabilité cellulaire et la production d'une protéine recombinante. D'autres paramètres sont calculés afin de rendre compte de la dynamique *fed-batch* du processus. Il a ainsi été montré qu'il est possible d'étudier, grâce à un calcul basé sur l'enregistrement du taux en oxygène dissous, le manque en glucose. Celui-ci s'est d'ailleurs révélé déterminant sur la dynamique *fed-batch* du système. Par ailleurs, les effets du seul excès de glucose ont été étudiés sur *Escherichia coli* BL21. Ceux-ci sont une réduction du taux maximal de croissance et un endommagement cellulaire. Une régulation par équation de l'ajout de la solution *fed-batch* est aussi proposée. Elle permet de réduire les gradients de glucose dans la partie non agitée du système. Dans la seconde partie de ce travail, une modélisation des gradients de glucose présents dans les différents types de réacteurs est exposée et mise en relation avec les données expérimentales.

Mots clés : *scale-down*, bioréacteur, modèle stochastique, *Escherichia coli* BL21

Summary

Escherichia coli BL21 is a microorganism widely used in the industry for the production of recombinant proteins. The performances obtained at the laboratory level are not reproducible at a large scale. Actually, the mixing operation is not efficient enough: gradients of glucose and oxygen appear when operating in *fed-batch* mode. The effects of these gradients could be studied by using *scale-down* reactors. They make it possible to show the hydrodynamic conditions of industrial reactors. The chosen system is composed of a perfectly mixed part linked to a non-mixed one with a constant flow. Two kinds of non-mixed parts were used to induce different hydrodynamic conditions: one has a dispersed flow and the other a piston flow. The addition of the glucose is made according to the dissolved oxygen. The observed parameters are the evolution of biomass concentrations, glucose and acetate, cell viability and the production of a recombinant protein. Other parameters are calculated on the base of the *fed-batch* dynamics of the process. It has been proved that it is possible to study the carbon starvation thanks to the recording of the dissolved oxygen. It has been decisive for the dynamic of the system. The behaviour of *Escherichia coli* BL21 is compared with the one of *Escherichia coli* K12. The acetate produced because of the excess of glucose in the non-mixed part of the system has a bigger influence on the dynamic. Moreover, the consequences of the excess of glucose have been studied on *Escherichia coli* BL21. These are a reduction of the maximal rate of growth and a cell damaging. A *fed-batch* control with equation is also proposed. It permit to reduce the gradients of glucose in the non-mixed part of the system. In the second part of this work, a modelling procedure of the gradients of glucose in the reactor is developed and compared with the experimental results.

Keywords: *scale-down*, bioreactor, stochastic model, *Escherichia coli* BL21

Introduction

Introduction	1
--------------------	---

Synthèse bibliographique

1. Le micro-organisme : <i>Escherichia coli</i>	2
1.1 Présentation générale.....	2
1.2 La croissance microbienne.....	3
1.2.1 La courbe de croissance microbienne	3
1.2.2 L'approche classique de la cinétique de croissance microbienne : le modèle de Monod	4
1.3 Deux voies métaboliques importantes.....	5
1.3.1 Le mécanisme surverse.....	5
1.3.2 La fermentation des acides mixtes.....	7
1.4 La réponse au stress.....	8
1.4.1 La réponse générale au stress.....	8
1.4.2 Le stress nutritionnel.....	9
1.5 La production de protéines recombinantes.....	10
2. Les bioréacteurs.....	11
2.1 Le mode de culture <i>fed-batch</i>	11
2.1.1 La production de biomasse en mode <i>fed-batch</i>	11
2.1.2 Les différents modes de régulation d'un réacteur <i>fed-batch</i>	12
2.2 La problématique de l'extrapolation	13
2.3 L'approche traditionnelle de l'extrapolation	18
2.3.1 L'analyse dimensionnelle.....	18
2.3.2 L'approche traditionnelle d'extrapolation : l'analyse des similitudes.....	20
2.4 L'approche avancée d'extrapolation	21
2.4.1 La modélisation par approche stochastique structurée.....	21
2.4.2 Le réacteur <i>scale-down</i>	23
3. Interaction entre l'hétérogénéité du réacteur et le micro-organisme.....	26
3.1 La distribution des temps de circulation	26
3.2 L'influence de l'hétérogénéité du réacteur sur <i>Escherichia coli</i>	27
3.3 La simulation de Monte Carlo et son utilisation	28
3.4 Les approches élaborées de cinétiques microbiennes	29
3.4.1 Une adaptation du modèle de Monod	29
3.4.2 Les modèles ségrégés de croissance microbienne.....	30
3.4.3 Les modèles structurés de croissance microbienne.....	31
4. Objectifs de ce travail.....	32

Matériel et méthodes

1. Conduite des expériences en bioréacteurs de 20l et en réacteurs <i>scale-down</i>	33
1.1 Description des réacteurs utilisés	33
1.1.1 Le bioréacteur de référence	33
1.1.2 Les bioréacteurs <i>scale-down</i>	33
1.2 Conservation des souches.....	34
1.3 Les précultures	35
1.3.1 Matériel	35
1.3.2 Méthode	35
1.4 Le milieu de culture et les conditions de culture	35
1.4.1 Matériel	35
1.5 Régulations de l'ajout de la solution <i>fed-batch</i>	37

1.5.1 En fonction du taux d'oxygène dissous.....	37
1.5.2 Par équation.....	37
1.6 Données récoltées au cours de la culture.....	38
1.6.1 Matériel.....	38
1.6.2 Méthodes	38
1.6.2.1 Données relatives à la régulation	38
1.6.2.2 Suivi de la cinétique	39
1.6.2.3 Suivi de la concentration en glucose et de l'acétate.....	40
1.6.2.4 Suivi de la viabilité cellulaire.....	41
1.6.2.5 Suivi de la synthèse protéique.....	43
1.6.2.6 Etude de la dynamique <i>fed-batch</i> lors de la régulation effectuée en fonction de la concentration en oxygène dissous.	43
2. Les tests de traceurs.....	44
2.1 Matériel.....	44
2.2 Méthode.....	44

Résultats et discussion

1. Conduite des expériences en bioréacteurs de 20l et en réacteurs <i>scale-down</i>	45
1.1 Mise en évidence de l'effet <i>scale-down</i> sur <i>Escherichia coli</i> BL21.....	46
1.1.1. Dynamique du processus <i>fed-batch</i>	46
1.1.2 Courbes de croissance	49
1.1.3 Suivi du glucose et de l'acétate.....	50
1.1.4 Production de protéine recombinante.....	52
1.1.5 La viabilité cellulaire.....	53
1.1.6 Discussion générale concernant la mise en évidence de l'effet <i>scale-down</i>	53
1.2 Comparaison du comportement d' <i>Escherichia coli</i> BL21 et d' <i>Escherichia coli</i> K12... ..	55
1.2.1 Dynamique du processus <i>fed-batch</i>	55
1.2.2 Discussion générale concernant la comparaison du comportement d' <i>Escherichia coli</i> BL21 et K12.	56
1.3. Conséquences de la production d'acétate sur la souche BL21.....	57
1.3.1 Mise en relation de la croissance avec la production d'acétate.....	57
1.3.2 Impact d'une production importante d'acétate sur la viabilité cellulaire.....	58
1.3.3 Conclusion concernant les effets de la production d'acétate sur <i>Escherichia coli</i> BL21.....	58
1.4. Détermination et essai d'une régulation par équation adaptée à la physiologie de la souche BL21.....	59
1.4.1 Détermination d'une régulation par équation.....	59
1.4.2. Suivi de l'oxygène dissous.....	60
1.4.3. Courbes de croissance	61
1.4.4 Suivi du glucose et de l'acétate.....	62
1.4.5 Discussion générale concernant le changement de régulation.	63
2. Modélisation de l'hydrodynamique des différents réacteurs utilisés et mise en relation avec les données expérimentales.....	64
2.1 Structure des modèles choisis.	64
2.1.1 Réacteur de référence.....	65
2.1.2 Réacteur <i>scale-down</i> avec écoulement dispersé.....	65
2.1.3 Réacteur <i>scale-down</i> avec écoulement piston.	67
2.2 Validation des modèles par les tests de traceurs.	68
2.3 Modélisation des gradients de glucose générés dans les différents types de réacteurs..	69

2.3.1 Comparaison des gradients générés en réacteur parfaitement mélangé et en réacteur <i>scale-down</i> avec une régulation de l'ajout du glucose en fonction du taux d'oxygène dissous.....	69
2.3.2 Analyse de sensibilité du modèle vis-à-vis du taux de consommation du glucose.	69
2.3.3 Effet du changement de régulation sur les gradients générés au sein des réacteurs.	71

Conclusions et perspectives

Conclusions	73
Perspectives	74

Références bibliographiques

Références bibliographiques	76
-----------------------------------	----

Annexes

1. Les suivis de culture.....	81
1.1 Culture de référence pour <i>Escherichia coli</i> BL21, régulation en fonction du taux en oxygène dissous.....	81
1.2 Culture <i>scale-down</i> avec écoulement dispersé n°1 pour <i>Escherichia coli</i> BL21, régulation en fonction du taux en oxygène dissous.....	82
1.3. Culture <i>scale-down</i> avec écoulement dispersé n°2 pour <i>Escherichia coli</i> BL21, régulation en fonction du taux en oxygène dissous.....	83
1.4.Culture <i>scale-down</i> avec écoulement dispersé n°3 pour <i>Escherichia coli</i> BL21, régulation fonction du taux en oxygène dissous.	84
1.5 Culture <i>scale-down</i> avec écoulement piston pour <i>Escherichia coli</i> BL21, régulation en fonction du taux en oxygène dissous.....	85
1.6 Culture de référence pour <i>Escherichia coli</i> BL21 où le glucose a été ajouté trop rapidement.....	86
1.7 Culture de référence pour <i>Escherichia coli</i> BL21, régulation par équation.....	87
1.8 Culture <i>scale-down</i> avec écoulement dispersé pour <i>Escherichia coli</i> BL21, régulation par équation.....	88
1.9 Culture <i>scale-down</i> avec écoulement piston pour <i>Escherichia coli</i> BL21, régulation par équation.....	89
1.10 Culture de référence pour <i>Escherichia coli</i> K12, régulation en fonction du taux d'oxygène dissous.	90
1.11 Culture <i>scale-down</i> avec écoulement dispersé pour <i>Escherichia coli</i> K12, régulation fonction du taux en oxygène dissous.....	91
2. Etude de la dynamique <i>fed-batch</i> lors de la régulation de l'ajout de glucose en fonction du taux en oxygène dissous.....	92
2.1 <i>Escherichia coli</i> BL21.....	92
2.2 <i>Escherichia coli</i> K12.....	93
3. Tests de traceurs.....	94

Introduction

Escherichia coli est un micro-organisme essentiellement utilisé en bio-industries pour la production de protéines recombinantes. Celui-ci est alors cultivé dans des cuves mécaniquement agitées. Les protéines hétérologues ont un impact négatif sur la croissance d'*Escherichia coli* : la biomasse est donc produite préalablement à l'induction de la protéine d'intérêt. Une production optimale de protéine peut être obtenue, notamment, en maximisant la production de biomasse.

A l'échelle industrielle, lors des cultures *fed-batch*¹, des pertes de production de biomasse sont constatées suite à une diminution de l'efficacité de l'opération de mélange lorsque le volume du réacteur augmente. Des gradients de concentrations en glucose et en oxygène apparaissent alors. Ceux-ci induisent divers effets sur le métabolisme du micro-organisme, entraînant des pertes de production. Le phénomène le plus étudié est la production d'acétate : le flux de carbone est dévié vers la production d'acétate et rejeté dans le milieu extracellulaire, au lieu d'être intégré directement dans la biomasse. La quantité totale de biomasse produite est donc moindre. L'acétate entrave également la production de protéines recombinantes. Il est donc essentiel de minimiser sa production à l'échelle industrielle.

Les effets des gradients en glucose et en oxygène peuvent être étudiés en réacteurs *scale-down*. Ces systèmes permettent de reproduire à petite échelle les conditions hydrodynamiques rencontrées à l'échelle industrielle. Un type de dispositif a été retenu pour ce travail : celui constitué d'un réacteur parfaitement mélangé connecté à une section non agitée. Deux types de section sont utilisées : l'une présentant un écoulement dispersé et l'autre un écoulement piston. Elles permettent donc de représenter des conditions hydrodynamiques différentes. Des tests de fermentation sont effectués dans ces réacteurs afin d'étudier l'effet *scale-down*. Ces réacteurs permettent également de tester à faible coût de nouvelles régulations d'ajout de la solution *fed-batch* dans des conditions similaires à celles rencontrées au niveau industriel. Pour des industriels, les résultats ainsi obtenus sont plus fiables que ceux obtenus classiquement sur des réacteurs de laboratoire homogènes.

Il est possible de caractériser les conditions d'écoulement régnant dans ces réacteurs *scale-down* grâce à la réalisation de tests de mélange d'une solution colorée de glucose. Ces tests sont plus couramment appelés tests de traceurs. Ils permettent la mise en place de modèles structurés stochastiques qui sont capables de simuler les gradients de glucose générés au sein des réacteurs. Ces résultats peuvent alors être mis en relation avec les données récoltées expérimentalement.

1) Le processus *fed-batch* consiste à alimenter le réacteur en éléments nutritifs, dont le glucose, en cours de culture.

1. Le micro-organisme : *Escherichia coli*

Cette première partie s'intéresse essentiellement au métabolisme d'*Escherichia coli* et à sa croissance. Le but est de mettre en évidence l'impact de gradients en oxygène et en glucose sur la production de biomasse.

1.1 Présentation générale

Les cultures de micro-organismes présentées dans ce travail se réalisent dans un type particulier de bioréacteurs : il s'agit de grandes cuves agitées et préalablement stérilisées dans lesquelles divers paramètres importants pour le bon déroulement de la culture peuvent être contrôlés. De manière générale, les micro-organismes sont cultivés pour leur biomasse ou pour un métabolite. Celui-ci peut être produit naturellement ou suite à des manipulations génétiques.

Escherichia coli est un micro-organisme de choix pour la production de protéines hétérologues. Il ne possède malheureusement pas toute la machinerie cellulaire nécessaire à certaines modifications post-traductionnelles eucaryotes. Cependant, il est utilisé avec succès pour la production d'interférons, d'interleucines, d'hormones de croissance, de la sérum albumine humaine,... La biologie moléculaire permet à l'heure actuelle d'excréter ces protéines afin qu'elles soient plus facilement récupérables. Ces protéines étrangères exercent bien souvent un effet défavorable sur la croissance microbienne. Le micro-organisme est donc produit en grande quantité avant d'induire la synthèse de la protéine d'intérêt (1).

De manière générale, la productivité, c'est-à-dire la quantité de produit formé par unité de volume et par unité de temps, doit être optimisée. Une des voies possibles est de maximaliser la quantité de biomasse présente dans le bioréacteur. Les cultures à haute densité cellulaire d'*Escherichia coli* peuvent atteindre 100 grammes de poids cellulaire sec par litre (2).

Escherichia coli est également utilisé pour la production de produits dits à faible valeur ajoutée tels que le poly-hydroxybutyrate, l'acide succinique, divers composés aromatiques, l'éthanol, l'acétone, l'oxyde de styrène et l'acide octanoïque. Atteindre de hautes densités cellulaires et de hauts rendements volumétriques est alors d'autant plus important. Des mutants mieux adaptés à la culture aux hautes densités cellulaires peuvent-être sélectionnés (2).

Bibliographie

Ce même micro-organisme est également utilisé à l'état sauvage en tant que modèle en bio-industries. En effet, il s'agit d'un micro-organisme dont la physiologie et la génétique ont été amplement étudiés (2).

1.2 La croissance microbienne

1.2.1 La courbe de croissance microbienne

La courbe de croissance microbienne (figure 1) représente l'évolution de la concentration cellulaire en fonction du temps dans des conditions de culture idéales, c'est-à-dire dans un bioréacteur constituant un système fermé, parfaitement mélangé et pour lequel le substrat limitant est la source de carbone (3). De nombreux facteurs de l'environnement influencent la croissance microbienne : la disponibilité en eau, le pH, la température, la concentration en oxygène, la pression, les radiations,...(4). La courbe de croissance se présente de la manière suivante :

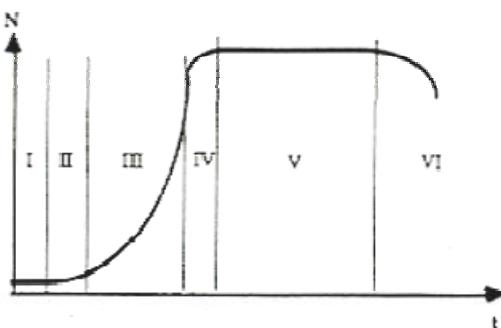


Figure 1 Courbe de croissance microbienne : I = phase de latence, II = phase de départ, III = phase exponentielle, IV = phase de ralentissement, V = phase stationnaire, VI = phase de déclin (3)

Cette courbe peut être subdivisée en six périodes distinctes. La première, appelée phase de latence, suit l'ensemencement de la culture et constitue une période d'adaptation des micro-organismes aux conditions de culture (3). De nouveaux composants cellulaires sont synthétisés. Cette phase peut être très courte si une culture en phase de croissance exponentielle est transférée dans un milieu de composition identique (4). La seconde phase, dite phase de départ, correspond au démarrage de la division cellulaire. Les cellules développent ensuite une phase de croissance exponentielle. Le taux de croissance atteint alors son maximum. Cette phase détermine la quantité de biomasse produite.

Bibliographie

Suite à l'épuisement du substrat limitant, les divisions cellulaires se font plus lentement : les cellules sont en phase de ralentissement. Les cellules passent ensuite en phase stationnaire. Durant cette phase, des changements physiologiques importants se produisent. De plus, des différentiations cellulaires peuvent avoir lieu. La dernière phase correspond à la lyse cellulaire. Il s'agit de la phase de déclin.

Durant la phase de croissance exponentielle, chaque cellule possède la même probabilité de se dupliquer : la vitesse de croissance microbienne est donc proportionnelle à la quantité de biomasse (3).

$$R_x = \frac{dX}{dt} = \mu_x \cdot X \quad (\text{équation 1}) \qquad \Rightarrow \qquad \mu_x = \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt} \quad (\text{équation 2})$$

Avec R_x la vitesse de croissance, X la masse de biomasse (g de matière sèche / l), t le temps (heures) et μ_x la vitesse spécifique de croissance (h^{-1}).

1.2.2 L'approche classique de la cinétique de croissance microbienne : le modèle de Monod

Le modèle de Monod se base sur le modèle de Michaelis-Menten décrivant la cinétique enzymatique (figure 2). En effet la croissance microbienne est une suite de réactions enzymatiques. Dès lors, celle-ci est limitée par l'activité de l'enzyme la plus lente.

Ce modèle est cependant limité car plusieurs hypothèses ont été émises :

- les cellules sont immortelles.
- seule la source principale de carbone est limitante.
- l'oxygène est apporté en excès.
- le réacteur est parfaitement agité.
- l'absence d'élément inhibiteur dans le milieu.

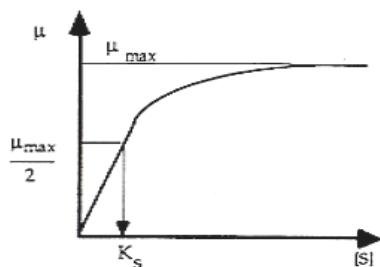


Figure 2 Courbe caractéristique de l'équation de Monod (3)

Bibliographie

Selon ce modèle, le taux de croissance évolue de la manière suivante :

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{S}{S + K_s}$$
 (équation 3)

Avec μ le taux ou la vitesse spécifique de croissance (h^{-1}), μ_{\max} le taux de croissance maximal (h^{-1}), S la concentration en substrat limitant (g/l) et K_s la constante de saturation (g/l)

L'inverse de la constante de saturation K_s représente l'affinité du micro-organisme pour le substrat. Celle-ci est fonction du micro-organisme et du substrat limitant. Cette constante correspond à la concentration en substrat pour lequel le micro-organisme se divise à la moitié de son taux maximal.

Pour de faibles concentrations en substrat, inférieures à K_s , le taux de croissance est directement proportionnel à la concentration en substrat (loi de premier ordre). Cependant, pour de fortes concentrations en substrat, largement supérieures à K_s , le taux de croissance devient indépendant de la concentration en substrat et correspond au taux de croissance maximum (loi d'ordre zéro) (3).

Le modèle de Monod constitue le modèle de croissance microbienne le plus simple : il est à la fois non structuré et non ségrégé. Il est non structuré car il ne considère aucune voie métabolique interne à la cellule. Celle-ci est représentée par une boîte noire. Hors le carbone peut être dévié vers la production de métabolites au lieu d'être utilisé pour la production de biomasse. Il est non ségrégé car il considère que toutes les cellules se trouvent dans le même stade de croissance et dans le même stade physiologique. Aucune sous-population n'est distinguée : celles-ci pourraient pourtant croître à des taux de croissance différents (5).

1.3 Deux voies métaboliques importantes

1.3.1 Le mécanisme surverse

Escherichia coli répond à un excès de glucose en produisant de l'acétate, suite au métabolisme surverse (figure 3). En conditions aérobies, *Escherichia coli* métabolise le glucose grâce à la glycolyse et au cycle de Krebs. Tous deux génèrent un cofacteur réduit, le NADH, dont le taux de formation augmente proportionnellement avec le taux de consommation du glucose. Il est nécessaire qu'il soit réoxydé afin de poursuivre ce métabolisme.

Bibliographie

Lorsque le taux maximum de consommation d'oxygène est atteint, la cellule n'est plus capable de produire suffisamment de NAD^+ , ce qui mène à l'accumulation de NADH. Celui-ci est un inhibiteur allostérique de la citrate synthase, la première enzyme du cycle de Krebs. Il est également impliqué dans l'activation d'un système régulatoire qui inhibe l'expression de divers gènes du cycle de Krebs. *Escherichia coli* dirige alors le carbone vers l'acétate, ce qui génère moins de NADH (6).

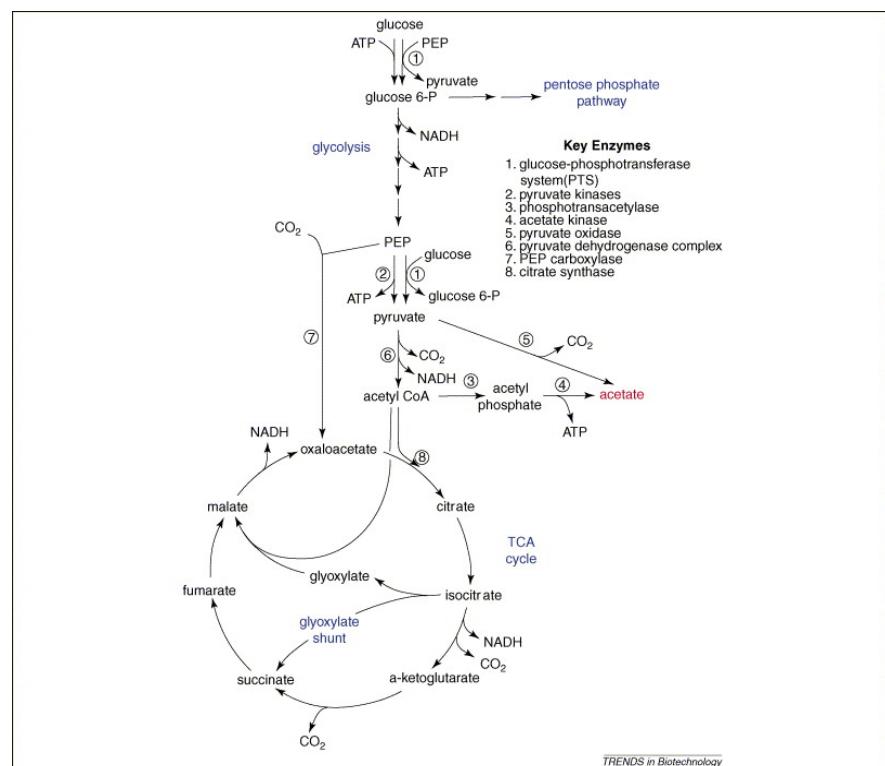


Figure 3. Voies biologiques impliquées dans la consommation aérobique du glucose (7)

L'acétate est donc produit à partir d'un taux bien déterminé de croissance du micro-organisme, correspondant au taux maximal de consommation d'oxygène (7).

L'acétate produit peut être réassimilé lorsque la concentration en glucose est plus faible. Il exerce donc un effet négatif sur le taux de production de biomasse. Il exerce également un impact négatif sur le métabolisme général, ce qui conduit à l'inhibition de la consommation de glucose et d'oxygène. De plus, il entrave la production de protéines. L'acétate possède un impact plus important sur les souches recombinantes que sur les souches sauvages (7,8).

Il est donc important de minimiser la production d'acétate en bioréacteur en veillant à ce qu'*Escherichia coli* ne soit pas exposé à un excès de glucose.

1.3.2 La fermentation des acides mixtes

En conditions anaérobies, le glucose emprunte la voie de la fermentation MAF (*mixed acid fermentation*, figure 4). Trois métabolites principaux sont produits à partir du pyruvate: le lactate, l'acétate et le formate (6).

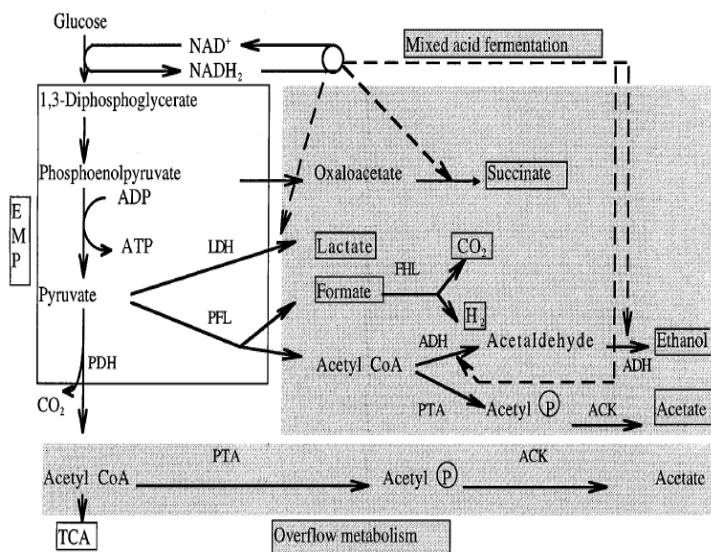


Figure 4. Voie de fermentation des acides mixtes et surverse (8)

Les enzymes impliquées dans la transformation du pyruvate en lactate et en formate sont respectivement la pyruvate lactate déshydrogénase et la pyruvate formate-lyase, toutes deux inhibées par la présence d'oxygène (8).

Ces métabolites peuvent être réassimilés lorsque l'oxygène n'est plus limitant. Ils le sont toutefois à des taux différents : 99% pour le lactate, 97% pour l'acétate et 90 % pour le formate. Ainsi, même si le lactate est l'acide le plus abondamment produit, c'est le formate qui s'accumule. Cette production et réassimilation de métabolites causent donc une perte de production de biomasse (6).

Dans le bioréacteur, ces métabolites sont les indicateurs de l'occurrence de cette voie de fermentation MAF.

1.4 La réponse au stress

1.4.1 La réponse générale au stress

Le stress est défini comme tout changement dans le génome, protéome ou l'environnement qui impose un taux de croissance réduit ou un potentiel de survie. Ces changements doivent être réversibles. Il peut s'agir de stress nutritionnels, de chocs thermiques ou osmotiques (9).

Chaque cellule possède ses propres voies de réponses au stress. Cependant, l'hétérogénéité des populations bactériennes constitue également un mécanisme de survie. Les micro-organismes survivants à un stress rendent compte de cette hétérogénéité (10). En effet, seuls les phénotypes les mieux adaptés survivent. Cependant, le potentiel génétique reste intact. Ainsi, dans un environnement plus favorable, les différents phénotypes seront à nouveau exprimés (9). Cinq à dix sous-populations d'*Escherichia coli* sont distinguées durant les phases stationnaires et exponentielles (10).

La ségrégation d'une partie de la population en cellules viables mais non cultivables semble être une stratégie de survie des bactéries non sporulantes lorsqu'elles sont exposées à un stress environnemental. Ces cellules sont toujours capables de produire des protéines recombinantes mais sont incapables de se diviser (11). Cependant, il est possible que des cellules qui ne se divisent pas sur agar soient capables de se dupliquer en bio-réacteur (12). Il existe toujours une controverse sur cet état viable mais non cultivable : s'agit-il d'un état transitoire menant à la mort des cellules ou d'un état stable de survie en conditions stressantes? Cependant, cet état est réversible lorsque les conditions deviennent favorables aux cellules (10).

La cytométrie en flux est une technique qui permet de comptabiliser la totalité des cellules vivantes, contrairement à l'étalement sur boîtes de Pétri qui ne met en évidence que les cellules viables et cultivables. Elle peut donc être utilisée pour prendre en compte ces cellules viables mais non cultivables.

Le marquage différencié des cellules vivantes et des cellules mortes se base sur la présence ou non d'une membrane intacte : l'iode de propydium utilisé pénètre dans la cellule uniquement si elle est perméabilisée par un transport actif défaillant au niveau de sa membrane (11).

Bibliographie

L'activation et l'arrêt successif des voies de réponses au stress causent également une perte de production de biomasse. En effet, les micro-organismes se déplacent dans le bioréacteur. Ils rencontrent ainsi des zones plus ou moins stressantes (point de vue concentration en oxygène et en glucose) et tentent donc continuellement de s'adapter à des situations provisoires (6).

De plus, la production de protéines recombinantes entraîne également un stress particulier chez *Escherichia coli*. Celle-ci provoque une morphologie filamenteuse. Elle est observée en bioréacteur dès que l'induction de la protéine est réalisée (2).

1.4.2 Le stress nutritionnel

Le manque en glucose est un stress particulier. Lors de manques en nutriments tels que le glucose, *Escherichia coli* entre en phase stationnaire. Il se produit alors un changement de morphologie et de physiologie. Les cellules développent en fait une capacité à survivre à des périodes prolongées de manque. Elles deviennent également plus résistantes à de nombreux stress (10,13). Une différenciation d'une partie de la population en cellules viables mais non cultivables peut avoir lieu (10).

Le manque en glucose est détecté par le système PTS (phosphotransferase system), responsable du transport des sucres à travers la membrane cytoplasmique. Cette information est transmise grâce à une cascade de phosphorylation. Celle-ci active l'adénylate cyclase, qui catalyse la synthèse de cAMP à partir d'ATP. Ce petit métabolite se fixe alors sur la protéine CRP (cAMP receptor protein). Le complexe ainsi formé contrôle l'expression de gènes directement impliqués dans la réponse d'adaptation au manque de glucose. Il s'agit par exemple de gènes codant pour des enzymes qui permettent aux cellules de se servir d'autres sources de carbone. Le complexe cAMP.CRP régule également des gènes impliqués dans la morphologie cellulaire et dans la mobilité. Des régulateurs globaux peuvent être également contrôlés (13).

Escherichia coli ne peut être exposé à un excès de glucose sous peine de déclencher le mécanisme surverse. Cependant, l'exposition au manque en glucose dans le bioréacteur n'est pas souhaitable non plus puisqu'il provoque un stress nutritionnel.

1.5 La production de protéines recombinantes

Escherichia coli est utilisé pour la production de protéines qui ne nécessitent pas de glycosylation complexe pour être actives.

Au niveau moléculaire, l'expression de la protéine est influencée par la force du promoteur, par la stabilité du plasmide, par le nombre de plasmides insérés,... Au niveau du *process*, il est important d'obtenir la plus haute densité cellulaire possible. La concentration d'un inducteur chimique possède également un impact sur la production. Les acides aminés sont les précurseurs de la synthèse protéique : le *pool* d'acides aminés doit donc être suffisant. De plus, la récupération de la protéine d'intérêt n'est pas aisée... En effet, *Escherichia coli* exprime rarement des protéines solubles en grande quantité. La plupart des protéines sont donc produites sous forme de corps d'inclusion. Seulement 15 à 20 % de la quantité totale de protéine exprimée peuvent alors être récupérés sous forme active. En général, les corps d'inclusion sont solubilisés grâce à un dénaturant hautement concentré, tel que l'urée ou la guanidine hyperchlорée, couplé à un agent réducteur. Les protéines perdent leur structure secondaire durant cette étape et interagissent entre elles. Il s'agit de la principale raison du faible taux de récupération de protéines actives. Le dénaturant est ensuite enlevé lentement en présence d'un agent oxydant afin de *refolder* la protéine (14).

2. Les bioréacteurs

Dans cette seconde partie, une attention particulière est accordée à l'hétérogénéité induite dans les bioréacteurs lors de leur extrapolation à l'échelle industrielle.

2.1 Le mode de culture fed-batch

2.1.1 La production de biomasse en mode fed-batch

Lors de la culture d'*Escherichia coli*, un excès de glucose influence négativement la production de biomasse. Le microorganisme produit alors de l'acétate, qu'il réassimile par la suite. De plus, l'acétate produit inhibe la consommation de glucose et d'oxygène. Il entrave également la production de protéines. Il est donc nécessaire de maintenir la concentration en glucose inférieure à un certain seuil. De plus, il est essentiel de séparer la période de production de biomasse de celle de production de la protéine exogène. En effet, celle-ci est toxique pour le microorganisme et ne lui permet donc pas de se multiplier correctement.

Le mode de culture utilisé est donc le mode *fed-batch*. La phase *fed-batch* est précédée d'une phase *batch* durant laquelle le microorganisme utilise les nutriments présents dans le milieu de départ. Lorsque le substrat limitant est épuisé, la phase *fed-batch* commence. Durant celle-ci, une solution contenant ce substrat limitant est ajoutée. La synthèse d'une protéine recombinante peut alors être induite.

Durant la première phase *batch*, l'évolution de la concentration en biomasse est décrite par l'équation suivante :

$$r_X = \frac{dX}{dt} = \mu \cdot X \quad (\text{équation 4}) \quad \text{et} \quad r_X = X \cdot \mu_{\max} \cdot \frac{S}{S + K_s} \quad (\text{équation 5})$$

avec X la concentration en cellules (g de cellules/l), t le temps (h), μ le taux de croissance (h^{-1}), μ_{\max} le taux de croissance maximum (h^{-1}), S la concentration en substrat limitant (g/l) et K_s la constante de saturation du substrat (g/l)

Par contre, lors de la phase *fed-batch*, il est nécessaire de prendre en compte la dilution due à l'ajout :

$$\frac{dX}{dt} = r_X - \frac{dV}{dt} \cdot \frac{X}{V} \quad (\text{équation 6})$$

avec V le volume de culture (m^3)

Bibliographie

La production de la protéine, lorsqu'elle a été induite, répond à l'équation ci-dessous :

$$\frac{dP}{dt} = r_p - \frac{dV}{dt} \cdot \frac{P}{V} \quad (\text{équation 7})$$

avec P le produit (g/l), r_p la vitesse de production de celui-ci par les cellules (g/l.h)

La quantité de biomasse reste alors constante dans le bioréacteur (3).

2.1.2 Les différents modes de régulation d'un réacteur *fed-batch*

L'ajout de la solution nutritive du mode *fed-batch* peut être effectuée de diverses manières :

- sans contrôle : l'équation régulant l'ajout est déterminée préalablement au commencement de la culture. L'ajout peut être constant ou exponentiel. Dans ce dernier cas, il est possible de maintenir le taux de croissance *d'Escherichia coli* en dessous du seuil critique de 0,1-0,3 h⁻¹. Ceci permet d'éviter la formation d'acétate.

$$F_m = \left(\frac{\mu}{Y_{X/S}} + m \right) x(t_0) V(t_0) e^{\mu(t-t_0)} \quad (\text{équation 8})$$

avec $F_m(t)$ le taux d'ajout de la source de carbone au temps t (g/h), μ le taux spécifique de croissance (h⁻¹), $Y_{X/S}$ le rendement cellulaire pour la source de carbone (g de poids sec/g), m le coefficient de maintenance (g/g de poids sec.h), t_0 le temps auquel l'ajout démarre, $x(t_0)$ la concentration cellulaire au temps t_0 et $V(t_0)$ le volume de culture au temps t_0 .

- avec un contrôle direct : la concentration du substrat limitant est mesurée en temps réel. L'ajout est alors réalisé afin de maintenir celle-ci constante.
- avec un contrôle indirect : l'ajout est réglé en fonction de paramètres qui dépendent de la concentration de ce substrat limitant.

a) mesure de l'oxygène dissous

Escherichia coli métabolise le glucose via le cycle de Krebs. L'oxygène dissous dans le milieu diminue car ce cycle nécessite de l'oxygène pour régénérer les cofacteurs. Lorsque le glucose est épuisé, le taux en oxygène dissous augmente. L'ajout de la solution de glucose est donc commandé lorsque le taux en oxygène dissous passe au-dessus d'une certaine valeur prédéterminée.

Bibliographie

b) mesure du pH

Lorsque le cycle de Krebs fonctionne, les acides organiques relâchés dans le milieu provoquent une diminution de pH. Après épuisement du glucose, *Escherichia coli* utilise le squelette carboné des acides aminés et relargue leur fonction amine. La pompe d'ajout est alors actionnée.

c) mesure du taux de dioxyde de carbone

La pompe peut également être régulée grâce au taux de dioxyde de carbone. Celui-ci est directement proportionnel au taux de consommation de la source de carbone (2,15).

f) mesure de la chaleur dégagée par le métabolisme

La difficulté réside alors en la présence de flux de chaleur indépendants du processus biologique. En prenant en compte la dérivée par rapport au temps, les changements lents de température ne sont pas pris en considération (16).

2.2 La problématique de l'extrapolation

2.2.1 L'opération de mélange

L'opération de mélange a pour but d'homogénéiser le fluide, mais également de transférer de l'oxygène aux cultures, de mettre en suspension les solides, de disperser les liquides et d'améliorer les transferts thermiques (17).

Deux types de mobiles d'agitation sont utilisés (figure 5):

- les mobiles à débit axial, qui créent un mouvement des fluides dans une direction parallèle à l'axe d'agitation, vers le haut ou vers le bas. Ils sont particulièrement efficaces pour homogénéiser les fluides.
- les mobiles à débit radial qui fournissent un débit perpendiculaire à l'axe d'agitation. Ils permettent de disperser le gaz en fines bulles grâce à la force de cisaillement induite.

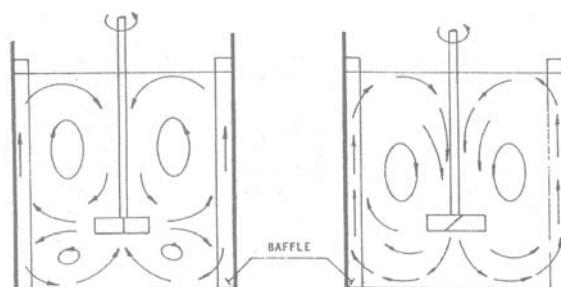


Figure 5 Flux d'écoulements pour un mobile radial (à gauche) et axial (à droite) (18)

Bibliographie

Ces deux types de mobiles sont souvent utilisés de manière combinée, le mobile radial étant placé dans le bas de la cuve, près de l'arrivée d'air et le mobile axial dans le haut de la cuve.

Les paramètres de performance pour l'homogénéisation et le transfert d'oxygène sont respectivement le temps de mélange et le coefficient de transfert d'oxygène (ce deuxième paramètre sera défini par la suite). Il s'agit de paramètres permettant de quantifier l'opération de mélange pour un but précis.

Le temps de mélange est défini comme le temps nécessaire en réacteur *batch* (système fermé) pour atteindre un certain degré d'homogénéité k (19). S'il est trop important, des gradients de concentrations apparaissent. Ceci est particulièrement prononcé en mode *fed-batch* car une solution est ajoutée régulièrement (5).

Il existe différentes méthodes pour évaluer ce temps de mélange :

- méthode colorimétrique : le changement de coloration d'une solution acide-base est observé suite à l'introduction d'un indicateur coloré dans la cuve.
- méthode thermique : une impulsion thermique est appliquée au fluide. Des thermocouples suivent l'évolution de la température.
- méthode à l'aide de traceurs radioactifs : l'homogénéisation de la concentration en traceur est suivie.
- méthode conductimétrique : il s'agit de la méthode la plus couramment utilisée. Un électrolyte fort ou un sel est introduit dans le bioréacteur. La variation de conductivité électrique est enregistrée par diverses sondes

Si un seul point de mesure est utilisé, il doit être situé dans la partie du réacteur la plus difficile à homogénéiser. De manière générale, le temps de mélange est fonction de la technique de mesure, de la taille et de la localisation des sondes, du degré d'homogénéisation, des conditions de travail ainsi que du type de système d'agitation (19).

La solubilité de l'oxygène dans l'eau est de 7 à 8 mg/l à 30°C et à 1 atm. Hors, la demande en oxygène d'une culture présentant une concentration cellulaire de 10 g/l est de 41 g/l.min. Il est donc nécessaire de transférer en permanence de l'oxygène de la phase gazeuse aux microorganismes (3).

L'arrivée d'air est située juste en dessous du mobile d'agitation. L'air est capturé par les tourbillons présents à l'arrière des pales et dispersé en bulles de petites tailles.

Bibliographie

Selon la vitesse d'agitation et le débit d'air, différentes situations sont distinguées (figure 6) :

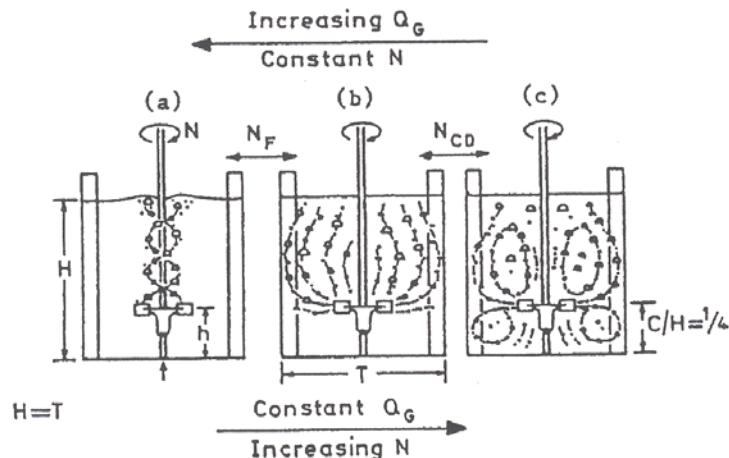


Figure 6.a) état d'engorgement b) état de charge c) dispersion complète (20)

L'état d'engorgement doit être évité : il correspond à une faible dispersion des bulles de gaz. Il est dû à un accroissement de la taille des cavités d'air situées à l'arrière des pales (20).

Lors de l'état de charge, l'air est bien dispersé dans la partie supérieure du bioréacteur. Ces conditions correspondent au rendement énergétique optimal ($\text{kg O}_2 / \text{kWh}$) du système agité (19).

Au niveau des bulles de gaz, le transfert d'oxygène est limité par la résistance du film liquide entourant l'interface liquide-gaz. En effet, le transfert d'oxygène de la bulle de gaz à la cellule microbienne se réalise en plusieurs étapes. Chacune d'entre elles peut être représentée par une résistance (figure 7).

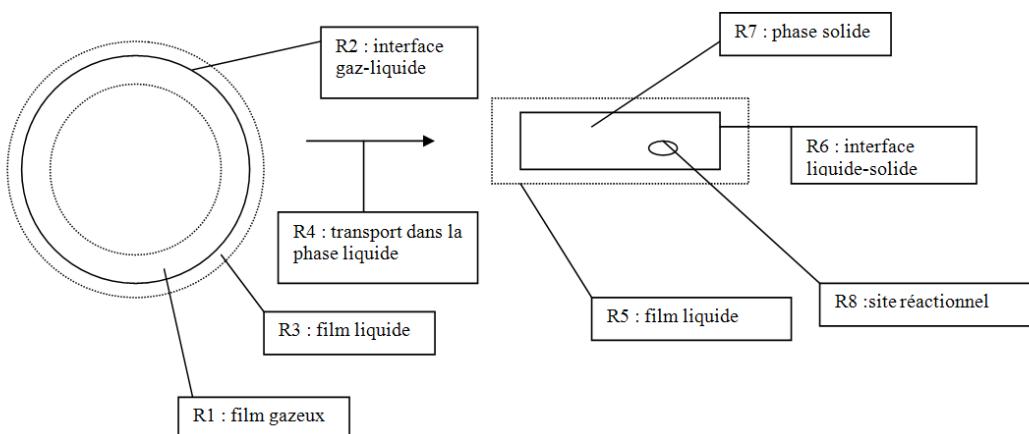


Figure 7. Le transport d'oxygène de la bulle gazeuse au micro-organisme

Bibliographie

La résistance R1 peut être négligée car la diffusivité en phase gazeuse est beaucoup plus élevée qu'en phase liquide. Le transport aux interfaces étant rapide, les résistances 2 et 6 n'entravent pas grandement le transport d'oxygène. Si le réacteur est agité, R4 possède peu d'importance. L'affinité du microorganisme pour l'oxygène est grande : les résistances 7 et 8 peuvent donc être négligées. Il ne reste plus qu'à comparer les résistances 3 et 5. Les bactéries présentent une petite dimension par rapport aux bulles de gaz : dès lors, leur aire interfaciale sera plus importante et la résistance 3 entrave plus le transfert d'oxygène.

Le coefficient k_{LA} est défini grâce au modèle du double film de Withman qui tient uniquement compte de cette étape limitante (3) :

$$\frac{dC_L}{dt} = \frac{q}{V_L} = k_L a (C_L^0 - C_L) \quad (\text{équation 9})$$

Avec C_L la concentration en oxygène dissous dans le milieu à l'équilibre (moles.m^{-3}), t le temps (h^{-1}), q le flux d'oxygène passant de la phase gazeuse à la phase liquide ($\text{moles.s}^{-1}.m^{-3}$), V_L le volume effectif de liquide (m^3), k_L le coefficient de transfert global (m.h^{-1}), a l'aire interfaciale ($\text{m}^2.m^{-3}$) et C_L^0 la concentration maximale dissoluble en oxygène (moles.m^{-3}).

Pour augmenter le transfert d'oxygène, il est possible de modifier le k_{LA} en jouant sur la taille des bulles de gaz. Il existe trois variables caractéristiques : la puissance volumique, la vitesse périphérique et le temps de pompage. Il s'agit de variables qui permettent de modifier le ou les paramètres de performance. La puissance volumique est l'énergie fournie par le mobile d'agitation au fluide. Elle peut être reliée à la moyenne des diamètres des bulles de gaz, mais aussi au coefficient k_L . Elle apparaît souvent dans les corrélations qui permettent de calculer le k_{LA} . La vitesse périphérique influence également le diamètre des bulles de gaz car elle représente le cisaillement. Elle est corrélée au diamètre minimum des bulles. Le temps de pompage est défini comme le temps moyen entre deux passages successifs au niveau de l'agitateur. Il fixe donc la fréquence de passage du système gaz-liquide au niveau du mobile et possède par conséquent un impact sur le phénomène de coalescence. Il est corrélé au diamètre maximum des bulles de gaz.

Cependant, d'autres facteurs influencent également le transfert d'oxygène : le type d'agitateur et ses dimensions, les propriétés physico-chimiques du système gaz-liquide (19),.....

2.2.2 L'hétérogénéité induite dans les bioréacteurs de grande taille

Le *scale-up* consiste en l'augmentation de la taille des réacteurs jusqu'à l'échelle industrielle. Lorsque le volume du réacteur devient trop important, il est alors impossible de conserver la même puissance volumique qu'à petite échelle. Ceci provoque une diminution de l'efficacité de l'opération de mélange. Le temps de mélange augmente et il devient difficile d'homogénéiser rapidement l'ajout de la solution de *fed-batch*. Un gradient de concentration en glucose est donc créé (21). De plus, si le mélange des bulles de gaz se fait plus lentement que le transfert de masse, un gradient vertical en oxygène dissous apparaît. La quantité d'oxygène dissoute est également plus faible lorsque l'on s'éloigne du mobile d'agitation car le cisaillement diminue (22). Bien que d'autres types de gradients, tels que des gradients de température ou de dioxyde de carbone dissous peuvent exister, ce travail s'intéressera uniquement aux gradients de glucose et d'oxygène dissous (21).

Le temps de mélange augmente également lorsque le bioréacteur comprend un étage de mélange radial en plus (figure 8). En effet, les agitateurs radiaux provoquent un effet de barrière. Ainsi, le remplacement d'un agitateur radial par un agitateur axial permet de diminuer le temps de mélange de tout le système (5).

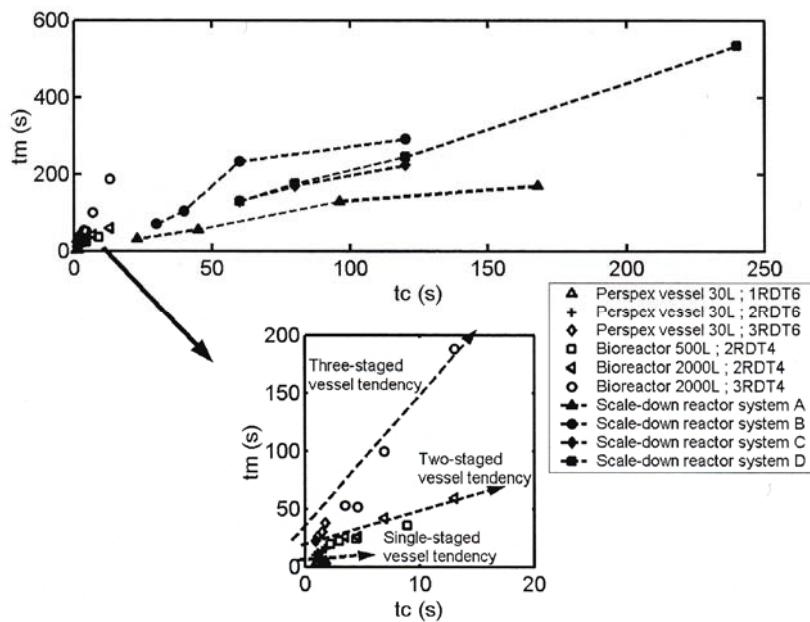


Figure 8. Augmentation du temps de mélange suite au nombre d'étages radiaux (5)

2.3 L'approche traditionnelle de l'extrapolation

2.3.1 L'analyse dimensionnelle

La puissance dissipée est un paramètre caractéristique de l'opération de mélange. Elle correspond à la puissance consommée par l'agitateur et donc à la puissance transmise au fluide, et non à la puissance fournie par le moteur d'entraînement. L'analyse dimensionnelle, grâce au théorème de Vaschy-Buckingham, a permis de mettre au point la relation de calcul de cette puissance en milieu non aéré. Les cuves possèdent une géométrie standard.

Le problème d'agitation comprend 16 variables. Celles-ci peuvent-être réduites à 13 car 3 dimensions sont impliquées, la longueur, la masse et le temps. Parmi ces 13 nombres adimensionnels, seulement 4 sont intéressants (tableau 1).

Tableau 1 Nombres adimensionnels impliqués dans l'opération de mélange

Nombre adimensionnel	Formule	Intérêt
Le nombre de Reynolds	$Re = \frac{\rho N d^2}{\mu}$	Il permet de déterminer le type de régime d'écoulement en présence
le nombre de puissance ou de Newton	$Np = \frac{P}{\rho N^3 d^5}$	Il caractérise l'action des forces d'inertie
le nombre de Weber	$We = \frac{\rho N^2 d^3}{\sigma}$	Il caractérise le rapport des forces de cisaillement sur les forces de tension superficielle
le nombre de Froude :	$Fr = \frac{N^2 d}{g}$	Il caractérise l'action des forces de gravité

Avec ρ la masse volumique du liquide (kg/m^3), N la vitesse d'agitation (s^{-1}), d le diamètre du mobile d'agitation (m), μ la viscosité dynamique (Pa.s), P la puissance dissipée (W), σ les forces de tension superficielle (N/m) et g l'accélération de la pesanteur

En effet, les 9 autres sont des rapports géométriques. Ils peuvent donc ne pas être considérés du fait de la standardisation des cuves.

Il a été démontré qu'il valait mieux choisir Np comme variable indépendante (figure 9). L'équation alors obtenue définit la relation entre le nombre de puissance et le nombre de Reynolds, pour autant que la cuve soit standard et munie de contre pales.

Bibliographie

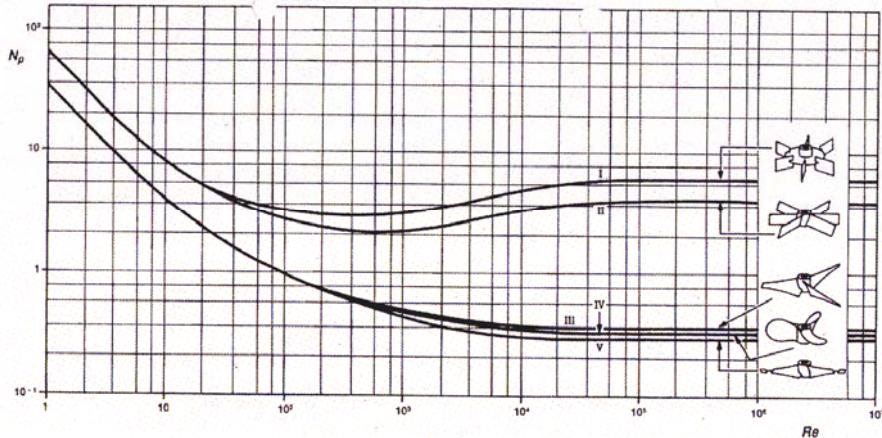


Figure 9. Courbes caractéristiques de puissance $N_p = f(Re)$, pour quelques types de mobiles d'agitation (5)

Le nombre de puissance est indépendant du nombre de Reynolds pour la région de flux turbulent ($Re > 10^4$ ou 10^5). Il ne dépend que du mobile d'agitation utilisé. La puissance dissipée est alors exprimée de la manière suivante : $P = N_p \rho N^3 d^5$. (**équation 10**)

Des raisonnements similaires conduisent à l'obtention des courbes caractéristiques de pompage et de circulation. Les nombres adimensionnels relatifs aux actions de pompage et de circulation sont également indépendants du nombre de Reynolds et sont uniquement fonction du mobile d'agitation employé. Les débits de pompage et de circulation sont alors définis de la manière suivante :

$$Q_p = N_{qp} N d^3 \quad (\text{équation 11})$$

et

$$Q_c = N_{qc} N d^3 \quad (\text{équation 12})$$

Avec N_{qp} et N_{qc} les nombres adimensionnels relatifs aux actions de pompage et de circulation.

Le débit de pompage définit le débit de liquide passant par l'agitateur. Le débit de circulation est la somme du débit de pompage et du débit d'entraînement. Celui-ci est dû à un transfert de quantité de mouvement (5).

D'autres paramètres peuvent également être définis :

- le temps de pompage : $t_p = \frac{V_L}{Q_p}$ (**équation 13**)

- le temps de circulation : $t_c = \frac{V_L}{Q_c}$ (**équation 14**)

- la vitesse périphérique : $v_p = \pi N d$ (**équation 15**)

2.3.2 L'approche traditionnelle d'extrapolation : l'analyse des similitudes

L'approche traditionnelle consiste à choisir un critère d'extrapolation. Il s'agit donc de définir le paramètre exerçant le plus d'influence sur le rendement et la qualité du produit. Cette variable est maintenue constante lors de l'extrapolation des résultats à l'échelle industrielle (23). Les cultures à hautes densités cellulaires *d'Escherichia coli* recombinants n'excèdent souvent pas les 5000 l (24).

$$N_{industriel} = N_{laboratoire} \cdot \left(\frac{D_{laboratoire}}{D_{industriel}} \right)^{b/a} \quad (\text{équation 16})$$

$$F = \frac{D_{industriel}}{D_{laboratoire}} \quad (\text{équation 17})$$

Avec N la vitesse d'agitation, D le diamètre de la cuve, F le facteur d'extrapolation, a et b les exposants résultants de l'analyse des similitudes.

En pratique, la relation entre le critère d'extrapolation et le produit N.D est tout d'abord déterminée. Ceci permet ensuite de définir l'évolution de tout autre paramètre selon le diamètre de la cuve, ou encore selon divers facteurs d'extrapolation (tableau 2).

Tableau 2. Critères d'extrapolation couramment utilisés (d'après 22 et 24)

Critère	Définition	Remarques
Puissance volumique	$\frac{P}{V_L} = \frac{N_p \cdot \rho \cdot N^3 \cdot d^5}{V_L}$	Pour l'utilisation de ce critère d'extrapolation, il existe une limitation due à la taille maximale du moteur.
Vitesse périphérique	$v = \pi \cdot N \cdot d$	La puissance volumique est alors réduite. Il est possible de rajouter des agitateurs afin de conserver celle-ci assez importante. Ce critère est rarement utilisé pour les cultures bactériennes.
Nombre de Reynolds	$Re = \frac{\rho N d^2}{\mu}$	Ce critère d'extrapolation est uniquement intéressant s'il s'agit d'une culture filamentuse induisant une grande viscosité du milieu.
Coefficient de transfert d'O ₂	$k_L a$	Ce critère est celui le plus couramment utilisé.
Taux de transfert d'oxygène	$OUR = k_L a (C_L^0 - C_L)$	Certains le suggèrent en remplacement du $k_L a$.
Temps de mélange	$t_m = f \cdot N^4 d^5$	Il est intéressant d'utiliser ce critère afin de minimiser l'hétérogénéité lors de cultures <i>fed-batch</i> . En effet, si ce paramètre augmente, la solution d'ajout est homogénéisée plus lentement. Tout comme la puissance volumique, il ne peut toutefois être maintenu indéfiniment constant.

Ces paramètres fournissent uniquement des renseignements globaux, mais aucun renseignement concernant l'hétérogénéité locale au sein du bioréacteur (5).

2.4 L'approche avancée d'extrapolation

2.4.1 La modélisation par approche stochastique structurée

Les bioréacteurs de taille importante sont divisés en zones de volume égal et dites homogènes (25). Si le phénomène considéré est asymétrique, la modélisation en trois dimensions s'avère nécessaire. Lorsqu'une solution d'ajout d'un procédé *fed-batch* est additionnée en un endroit différent du centre du réacteur, les gradients de glucose sont asymétriques.

Dans un même plan, ces zones sont assemblées en réseau grâce aux flux de circulation et aux flux turbulents. Les flux de circulation dépendent du mobile d'agitation utilisé (figure 10) (25,26). Les flux tangentiels permettent de connecter les différents plans afin d'obtenir une structure tridimensionnelle (26).

Le nombre de zones considérées influence directement les différences spatiales de concentrations qui peuvent être mises en évidence, c'est-à-dire la résolution spatiale (5).

Ce réseau de zones est utilisé pour modéliser les gradients de glucose présents dans les bioréacteurs industriels, mais également pour modéliser la distribution de taille des bulles gazeuses, le transfert de masse gaz-liquide,... (26)

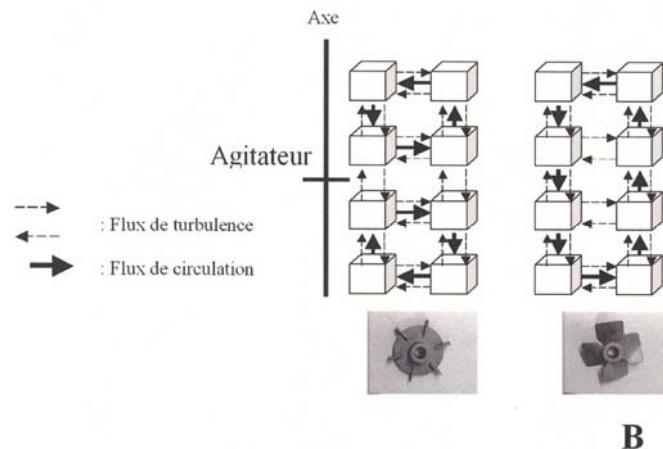


Figure 10. Orientation des flux de circulation et des flux de turbulence en fonction du type d'agitateur choisi (5)

Les chaînes de Markov sont utilisées pour simuler l'homogénéisation du réacteur. Les zones homogènes sont alors appelées états. Les chaînes de Markov constituent un système dans lequel le passage du glucose d'un état à un autre est gouverné par des probabilités.

Bibliographie

La chaîne de Markov est constituée de deux éléments :

- un vecteur d'état qui reprend les diverses concentrations rencontrées pour chaque état
- une matrice de transition qui comprend les probabilités d'aller d'un état à un autre.

Ces probabilités doivent répondre à deux conditions : la somme des valeurs des probabilités d'une même ligne doit être égale à 1 et la valeur de chaque probabilité doit être strictement inférieure à 1, sauf dans le cas d'états absorbants. Ces probabilités sont déterminées sur base des flux de circulation, de turbulence et des flux tangentiels.

Le vecteur d'état est multiplié par la matrice de transition afin d'obtenir un nouveau vecteur d'état. Ceci définit l'évolution temporelle du système (5). Ainsi, le processus de Markov est un processus pour lequel le comportement futur du système ne dépend que du présent et non de l'histoire passée du système. Ce système ne possède donc pas de mémoire : cette propriété est connue sous le nom de propriété de Markov. Tous les états futurs peuvent également être déduits de l'état initial. L'état final dépend donc de l'état initial et du nombre de transitions simulées. Ce système est donc discret à la fois au niveau spatial et au niveau temporel : les différents états sont observés à des temps donnés. Les probabilités choisies sont stationnaires : elles n'évoluent pas avec le temps (27).

Ceci peut être illustré à l'aide d'un exemple simplifié : un bioréacteur comprenant uniquement deux zones de fluide (figure 11) :

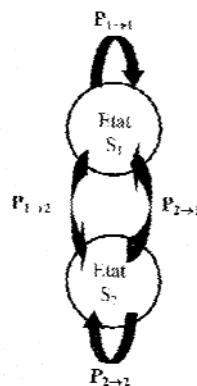


Figure 11. Graphe de transition pour un réacteur comprenant deux zones de fluide (5)

La matrice de transition décrivant ce graphe de transition est la suivante :

$$T = \begin{bmatrix} P_{1\rightarrow 1} & P_{1\rightarrow 2} \\ P_{2\rightarrow 1} & P_{2\rightarrow 2} \end{bmatrix}$$

Avec $P_{i,j}$ la probabilité de rester dans l'état i et $P_{i,j}$ la probabilité de passer de l'état i à l'état j

Bibliographie

L'évolution temporelle de ce système est décrite grâce à la chaîne de Markov ci-dessous :

$$\begin{bmatrix} S_{1,t} \\ S_{2,t} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} P_{1 \rightarrow 1} & P_{1 \rightarrow 2} \\ P_{2 \rightarrow 1} & P_{2 \rightarrow 2} \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} S_{1,t-1} \\ S_{2,t-2} \end{bmatrix}$$

Avec $S_{1,t}$ et $S_{2,t}$ les éléments du vecteur d'états au temps t ; $S_{1,t-1}$ et $S_{2,t-2}$ les éléments du vecteur d'états au temps $t-1$.

Il reste à définir l'intervalle de temps s'écoulant entre chaque transition. Celui-ci est directement affecté par l'extrapolation. En effet, les éléments de fluide doivent parcourir de plus longues distances. Hors la vitesse du fluide ne peut augmenter indéfiniment puisque celle-ci est directement liée à la puissance volumique, qui est limitée par des contraintes techniques.

Cet intervalle de temps est défini de deux façons :

$$\Delta t = \frac{t_m}{k} \quad (\text{équation 18}) \qquad \text{ou} \qquad \Delta t = \frac{t_c}{n.c} \quad (\text{équation 19})$$

Avec t_m le temps de mélange, k le nombre de transitions avant d'atteindre l'homogénéité (il dépend du nombre d'états définis dans le modèle et des systèmes d'agitations utilisés), t_c le temps de circulation, n le nombre de transitions avant que tous les états du modèle soient visités (il ne dépend que des systèmes d'agitations employés) et c le facteur de corrélation.

Ce modèle hydrodynamique est donc bien à la fois structuré et stochastique :

- il est structuré car le bioréacteur n'est plus considéré comme une boîte noire, contrairement à l'approche classique, mais comme un réseau de zones parfaitement mélangées.
- il est stochastique car le passage d'une molécule d'un état à un autre est gouverné par des probabilités. Il possède l'avantage d'impliquer uniquement des multiplications de matrices. Auparavant, les modèles déterministes étaient utilisés. Ils établissaient les bilans de matière des différentes zones sous forme d'équations différentielles : la formulation mathématique était donc plus compliquée (5).

2.4.2 Le réacteur scale-down

Les techniques *scale-down* permettent de simuler à petite échelle les conditions rencontrées dans les grands bioréacteurs. Il est alors possible d'identifier et de résoudre les problèmes rencontrés à l'échelle industrielle à faible coût.

Bibliographie

De plus, les données obtenues grâce à ces essais sont plus fiables que celles récoltées classiquement sur des réacteurs de laboratoire. L'analyse financière est alors beaucoup plus réaliste (24).

Différents systèmes *scale-down* permettent de simuler des gradients d'oxygène dissous, de substrat et de pH présents dans les bioréacteurs de taille industrielle.

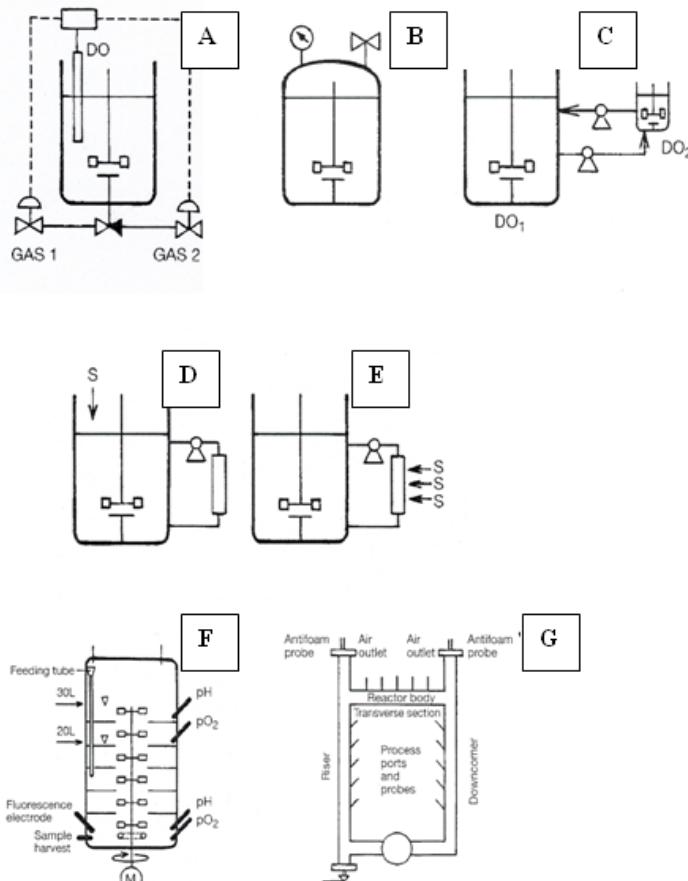


Figure 12. Différents types de systèmes *scale-down* (d'après 21)

a) Simulation des gradients de pH ou d'oxygène dissous (figure 12 A et 12 B)

Le système A permet de provoquer des fluctuations de la pression partielle d'oxygène en utilisant un seul compartiment. Il peut également être employé pour simuler des gradients de pH si le gaz d'intérêt est du CO₂.

Il est également possible de provoquer des changements cycliques de la pression totale du réacteur grâce au système B.

L'amplitude des oscillations correspond alors à l'amplitude du gradient tandis que la période d'oscillation représente le temps de circulation (21).

Bibliographie

b) Simulation des gradients d'oxygène et/ou de glucose et/ou de pH (figure 12 C, D et E)

Le système C est coûteux car il comprend deux réacteurs : l'un présente une faible concentration en oxygène dissous, tandis que l'autre en présente une grande. Le même principe peut être employé avec le glucose, un acide ou une base.

Les schémas D et E représentent un réacteur parfaitement mélangé connecté à une section non mélangée. Ce système permet de simuler à la fois les gradients en glucose, en pH et en oxygène dissous.

Le glucose peut être ajouté avant ou après la section non mélangée. Dans le premier cas (schéma E), un excès en nutriments est simulé dans cette section. Dans le second cas (schéma D), il s'agit d'un manque en nutriments (21).

c) Simulation de gradients de glucose et/ou de pH

Un ajout intermittent d'acide, de base et/ou de glucose est réalisé dans un compartiment unique afin de simuler ces gradients (5).

d) Systèmes originaux proposés (figure 12F et 12G)

Cinq disques sont placés dans le bioréacteur afin d'augmenter le temps de mélange. Il peut simuler simultanément les gradients d'oxygène dissous, de pH et de glucose.

Ce réacteur tubulaire est capable de simuler les trois types de gradients (21).

Un réacteur *scale-down* correspond à un réacteur industriel de géométrie et de taille donnée. Le système retenu lors de ce travail est celui comprenant un réacteur parfaitement mélangé et une section non agitée. La comparaison peut être établie grâce aux constantes de temps relevant de l'hydrodynamique du réacteur : le temps de mélange et le temps de circulation.

Les courbes de temps de mélange représentent l'évolution de la concentration normalisée du traceur au cours du temps. Des courbes représentatives de la grande échelle peuvent être obtenues avec des réacteurs *scale-down*. Il est possible de modifier cette courbe en faisant varier le taux de recirculation et le diamètre de la section non mélangée.

Bibliographie

Le temps de rétention de la section non mélangée est la moyenne de temps prise par une particule entrant dans cette section pour retourner dans la section agitée. Il représente donc le temps écoulé entre deux passages au niveau de l'agitateur. Par conséquent, il est assimilable au temps de circulation rencontré dans les réacteurs industriels.

$$t_r = \frac{V_{nonmélange}}{Q_{recirc}} \quad (\text{équation 20}) \quad \text{et} \quad t_c = \frac{V_L}{N_{qc} \cdot N \cdot d^3} \quad (\text{équation 21})$$

Avec t_r le temps de rétention de la section non mélangée, $V_{non mélange}$ le volume de cette section, Q_{recirc} le débit de recirculation, t_c le temps de circulation, V_L le volume du réacteur industriel, N_{qc} le nombre adimensionnel relatif à l'action de circulation, N la vitesse d'agitation et d le diamètre de l'agitateur.

L'analyse des constantes de temps est toutefois insuffisante pour comparer l'hydrodynamique des deux réacteurs. En fait, il est nécessaire d'utiliser la modélisation. Un outil nécessaire à cette modélisation n'a pas encore été présenté, c'est pourquoi ce point sera détaillé dans la troisième partie.

3. Interaction entre l'hétérogénéité du réacteur et le micro-organisme

Cette troisième partie lie l'hétérogénéité induite au sein des bioréacteurs aux métabolismes enclenchés chez *Escherichia coli*.

3.1 La distribution des temps de circulation

Le temps de circulation correspond au temps nécessaire à un micro-organisme avant de revenir à un endroit déterminé du réacteur. Lorsque le réacteur est de petite taille, ce temps est considéré comme constant. Il est calculé grâce à l'analyse dimensionnelle (voir équation 21). Cependant, cette approximation n'est plus correcte pour un réacteur de grande taille. En effet, le nombre de chemins possibles augmente. Ceux-ci étant de longueurs différentes, il existe alors une distribution des temps de circulation de type log-normale:

$$f(t_c) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma t_c} \exp\left[-\frac{1}{2}\left(\frac{\ln t_c - m}{\sigma}\right)^2\right] \quad (\text{équation 22})$$

Avec t_c le temps de circulation, σ l'écart-type de la distribution et m la moyenne de la distribution

Le scale-up induit une augmentation de la moyenne et de l'écart-type de cette distribution.

Bibliographie

Elle est déterminée expérimentalement grâce à des essais de traceurs : le temps mis par une particule de traceur pour revenir à un endroit donné est déterminé. Elle peut également être simulée grâce à des modèles compartimentés (28,29).

La distribution des temps de circulation définit la fréquence à laquelle les micro-organismes sont soumis aux gradients d'oxygène et de glucose présents à grande échelle (5). Sandoval-Basurto et al. ont étudié l'influence de gradients en oxygène sur des *Escherichia coli* recombinants grâce à un système *scale-down* comprenant deux compartiments. Des temps de circulation compris entre 5 et 180 secondes ont été simulés. Aux plus grands temps de circulation, le taux de croissance est réduit de 30% et la concentration en protéines recombinantes est diminuée de 94% (21).

3.2 L'influence de l'hétérogénéité du réacteur sur *Escherichia coli*

Lors d'une production de protéines par des *Escherichia coli*, le passage d'un réacteur de 3 litres à un réacteur de 9m³ diminue le rendement en biomasse de 20%(6).

En effet, le micro-organisme est alors successivement exposé à de hautes et à de faibles concentrations en glucose lors de son déplacement dans le réacteur. Le mécanisme surverse s'enclenche lorsque la concentration en glucose dépasse à peu près 30 mg/l, le seuil exact dépendant de la souche (30). D'autres auteurs considèrent le seuil d'excès en glucose à 0,1 g/l (pour la souche BL21) (31). La quantité d'acétate produite dépend également de la souche utilisée : *E.coli B* (BL21) en produit moins qu'*E.coli K* (JM109) (2). Le taux de croissance à partir duquel l'acétate est généré est également plus faible pour les souches recombinantes induites. L'acétate retarde la croissance, même à des concentrations aussi faibles que 0,5 g/l (7). De plus, l'augmentation de l'activité respiratoire dans ces zones hautement concentrées en glucose peut créer un manque en oxygène et induire la fermentation des acides mixtes. Les divers acides produits diminuent donc le pH et créent par conséquent des gradients de pH. Ainsi, de nouveaux gradients peuvent être générés (21). Ces co-produits sont réassimilés dans les zones correctement aérées du réacteur. Le rendement en biomasse par glucose est de 0,52 g/g tandis que le rendement en biomasse par acétate est de 0,4 g/g (32).

Bibliographie

Le manque en glucose survient lorsque la concentration en glucose est inférieure à 0,02g/l, c'est-à-dire à la constante de saturation (31).

Les oscillations en glucose exercent également une influence sur la stabilité des plasmides : les oscillations rapides favorisent la stabilité de ceux-ci. Cependant, les hautes concentrations en glucose diminuent la stabilité de ces plasmides (23,33).

Au cours de son trajet dans le réacteur, *Escherichia coli* passe également dans des zones d'anaérobiose. En effet, dans les grands réacteurs, des zones de 0 à 20% d'oxygène dissous peuvent survenir. Hors, des expositions cycliques à l'anaérobiose durant des périodes aussi courtes que 15 secondes peuvent enclencher la fermentation des acides mixtes. De plus, un passage soudain de 80 à 5 % d'oxygène dissous provoque l'instabilité des cellules recombinantes (21). Les fluctuations en oxygène dissous peuvent également causer un stress oxydatif menant à l'oxydation des protéines et à une limitation de la production d'acides aminés. En effet, les enzymes de la glycolyse et du cycle de Krebs sont fortement impliquées dans la synthèse des acides aminés (14).

3.3 La simulation de Monte Carlo et son utilisation

La circulation des micro-organismes dans le bioréacteur est simulée grâce à un processus de Monte Carlo. En effet, celui-ci permet de prendre en compte l'historique des éléments qui se déplacent d'états en états dans le modèle, contrairement au processus de Markov qui ne possède pas de mémoire.

Cet algorithme fonctionne selon le principe suivant :

- un nombre aléatoire est généré à partir d'une distribution normale pour un élément en mouvement dans le réacteur et pour une transition.
- ce nombre est comparé avec les probabilités contenues dans la matrice de transition du modèle. Chaque ligne y représente les possibilités de mouvement d'un micro-organisme se trouvant dans un état donné.
- une décision est prise sur base de cette comparaison.

La distribution de fréquence des moyennes des concentrations en glucose rencontrées par les micro-organismes est donc obtenue en superposant leurs circulations au champ de concentrations correspondant à un degré d'inhomogénéité donné du réacteur.

Bibliographie

Les concentrations cellulaires sont très importantes, de l'ordre de 10^9 cellules/ml. Toutefois, il est impossible de prendre en compte autant de cellules : cela nécessiterait un temps de simulation trop important.

Grâce à cet outil, il est possible de comparer correctement le réacteur *scale-down* à un réacteur industriel de taille donnée. En effet, le critère le plus fiable est l'environnement rencontré par les micro-organismes voyageant dans le réacteur. Les constantes de temps présentées précédemment ne sont pas satisfaisantes : le temps de circulation ne possède pas une valeur unique (il existe une distribution des temps de circulation), le temps de mélange ne prédit ni les flux présents dans les bioréacteurs ni la façon dont les micro-organismes sont exposés à ces gradients (5).

3.4 Les approches élaborées de cinétiques microbiennes

Le modèle de Monod ne décrit pas fidèlement la croissance microbienne car différentes hypothèses ont été prises en considération pour construire celui-ci. En particulier, considérer le bioréacteur comme parfaitement mélangé constitue un biais important dans le cadre de ce travail (5).

3.4.1 Une adaptation du modèle de Monod

Le modèle de Monod ne prend pas en compte la présence d'éléments inhibiteurs dans le milieu. Hors, l'acétate excrété par *Escherichia coli* diminue son taux maximal de croissance. Il peut alors être calculé de la manière suivante :

$$\mu_{\max} = \frac{\mu_{\max/A=0}}{1 + \frac{A}{K_i}} \quad (\text{équation 23})$$

Avec μ_{\max} le taux de croissance maximal (h^{-1}), A la concentration en acétate(g/l) et K_i la constante d'inhibition du métabolite (g/l)

La constante d'inhibition de l'acétate est de 9g d'acétate/l (32).

3.4.2 Les modèles ségrégés de croissance microbienne

L'hétérogénéité du bioréacteur provoque la ségrégation d'une population en plusieurs sous-populations caractérisées par des états physiologiques distincts.

Il est possible de représenter ce phénomène grâce aux modèles ségrégés.

Quirós et al.(12) ont proposé un modèle en considérant le schéma suivant (figure 13) :

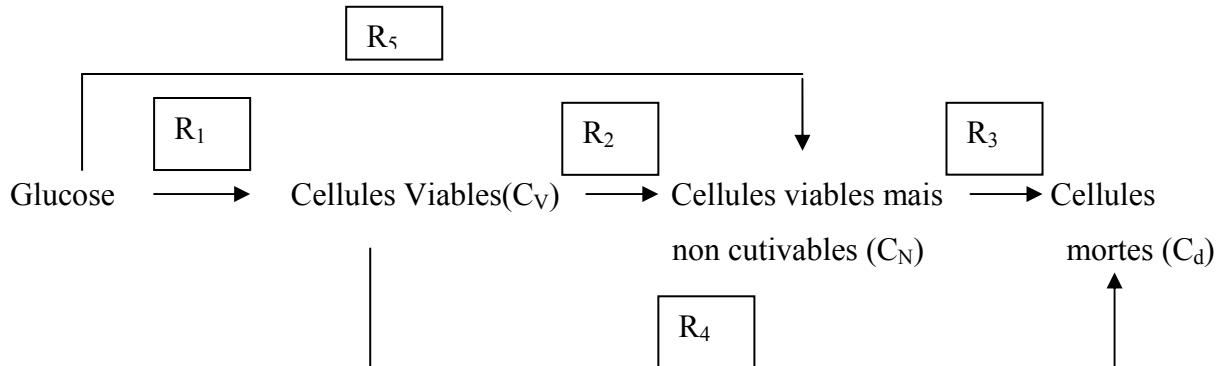


Figure 13. Modèle ségrégué de cinétique microbienne (12)

La biomasse totale est constituée de trois fractions : les cellules viables, les cellules viables mais non cultivables et les cellules mortes. L'état viable mais non cultivable n'est alors pas considéré comme réversible (12).

$$R_1 = k_1 C_V (1 - \tau' C_V) \text{ (équation 24)}$$

$$R_4 = k_4 C_V \text{ (équation 27)}$$

$$R_2 = k_2 C_V \text{ (équation 25)}$$

$$R_5 = k_5 C_N (1 - \tau'' C_N) \text{ (équation 28)}$$

$$R_3 = k_3 C_N \text{ (équation 26)}$$

Avec τ' et τ'' respectivement les inverses des concentrations en cellules viables et en cellules viables mais non cultivables en phase stationnaire, k le paramètre caractéristique (h^{-1}), C_V la concentration en cellules viables (g/l) et C_N la concentration en cellules viables mais non cultivables (g/l).

La validation de ce modèle a été réalisée grâce à la cytométrie en flux (12).

Bibliographie

Un modèle ségrégué et stochastique de croissance microbienne a été mis au point par Delvigne et al. Les temps de génération de chaque cellule d'une population sont déterminés aléatoirement à partir d'une distribution de type log-normale.

Celle-ci possède une forme constante en mode *batch*, tandis qu'en mode *fed-batch* sa moyenne et son écart-type augmentent de façon exponentielle. « Lorsque les contraintes hydrodynamiques deviennent très importantes, cette distribution est remplacée par une probabilité pour chaque cellule de subir un stress hydrodynamique (5) ».

3.4.3 Les modèles structurés de croissance microbienne

Les modèles structurés considèrent les voies métaboliques internes à la cellule. Diverses techniques sont utilisées pour mettre en évidence les flux métaboliques : le marquage moléculaire, les puces à ADN,....(5) Ces modèles sont intéressants dans le cadre de ce travail : en effet, le passage des micro-organismes de faibles concentrations à de fortes concentrations en glucose dévie le flux de carbone vers la production d'acétate au lieu de la production de biomasse.

Les différents intermédiaires des voies du métabolisme central du carbone sont des précurseurs pour la synthèse de monomères. Ceux-ci sont ensuite incorporés dans la biomasse. Les flux sont exprimés en moles/ kg de poids sec.heure.

Un exemple simple est présenté par Holms H. (figure 14) (34). L'oxoglutarate est le précurseur de 4 acides aminés : la glutamine, la proline, l'arginine et l'acide glutamique.

Le contenu d'*E.coli* ML308 en ces acides aminés est respectivement de 0,201 , 0,252 , 0,252 et 0,353 moles/kg de poids sec. Ainsi, 1,058 moles d'oxoglutarate sont nécessaires pour produire 1 kg de biomasse sèche. Si le taux de croissance est égal à 1, le flux d'oxoglutarate vers la biosynthèse est de 1,058 moles/kg de poids sec.heure. Le même principe est appliqué aux autres précurseurs. Les flux d'entrée du glucose et d'excrétion de métabolites tels que l'acétate sont mesurés. Le diagramme de flux est ensuite complété grâce à l'arithmétique (figure 15). Ces diagrammes sont donc établis pour une source de carbone et pour un taux de croissance déterminés (34).

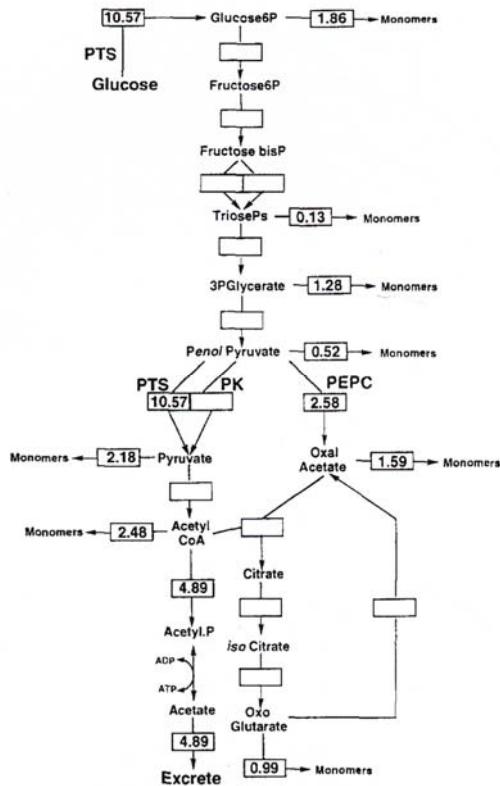


Figure 14. Diagramme de flux de croissance sur le glucose pour *E.coli* ML308,non complété par l'arithmétique(34)

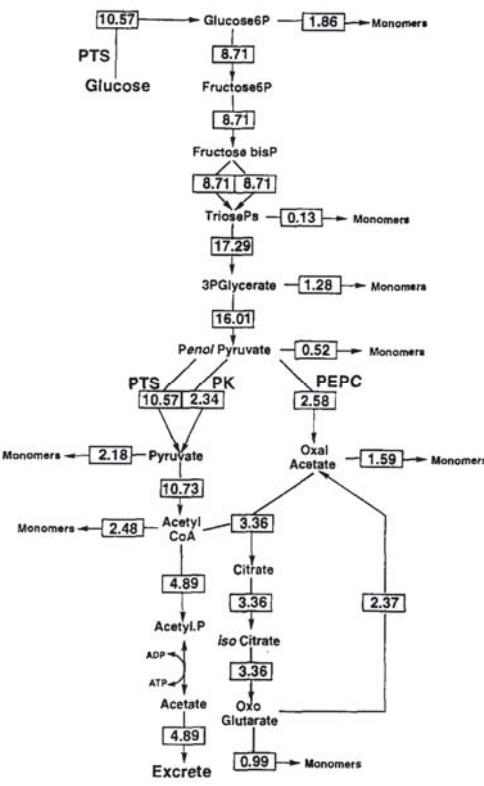


Figure 15. Diagramme de flux complet pour *E.coli* ML308 (34)

4. Objectifs de ce travail

L'objectif de ce travail est de mettre en évidence l'impact de l'hétérogénéité présente au sein de bioréacteurs industriels sur *Escherichia coli*. En effet, lors de cultures *fed-batch* se déroulant à grande échelle, des gradients de concentration en glucose et en oxygène apparaissent. Le système *scale-down* est utilisé afin de reproduire à petite échelle les conditions hydrodynamiques de ces réacteurs industriels. Le système choisi est constitué d'un réacteur parfaitement mélangé et d'une section non agitée. Deux types de section seront testées : l'une présentant un écoulement dispersé et l'autre un écoulement piston. Le comportement de la souche industrielle recombinante BL21 sera comparé avec celui d'une souche sauvage, la K12. Une attention particulière sera également accordée à l'effet de la seule production d'acétate sur *Escherichia coli* BL21.

Par la suite, les données physiologiques obtenues sur ces cultures permettront de recalculer un profil d'ajout de la solution *fed-batch* adapté à la souche BL21.

Les différents comportements observés seront expliqués grâce à la modélisation de l'hydrodynamique des systèmes *scale-down* utilisés.

1. Conduite des expériences en bioréacteurs de 20l et en réacteurs scale-down

1.1 Description des réacteurs utilisés

1.1.1 Le bioréacteur de référence

Les fermentations présentées ont été réalisées dans un fermenteur de marque Biolaffite-France (figure 16) en acier inoxydable de 20l (D=0,22m, volume de travail de 12l). Deux mobiles d'agitations de type TD4 (turbine à disque à 4 pales droites) ont été utilisés. Le système de régulation de la température, de l'oxygène dissous et du pH est de type PLC (ABB-Logiciel Freelance 2000).

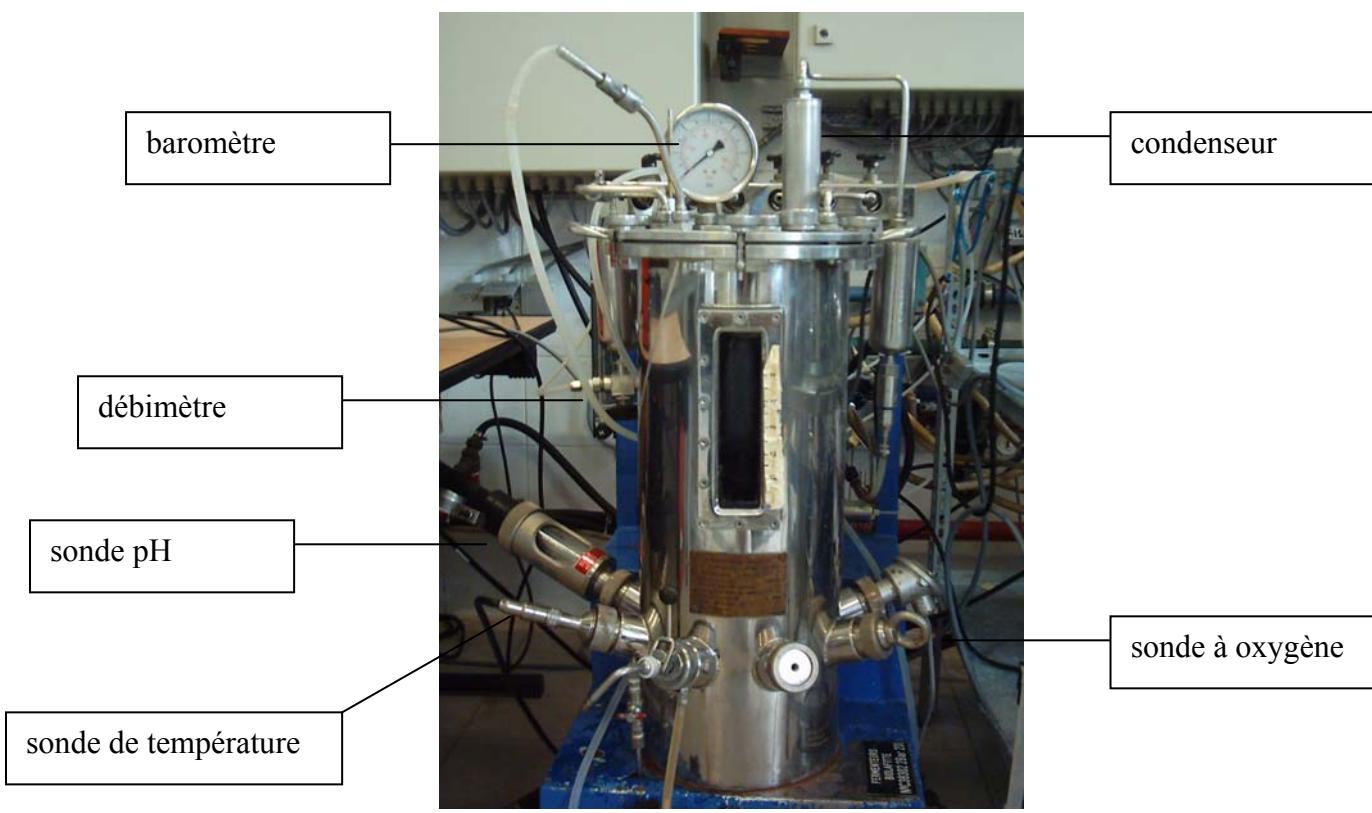


Figure 16. bioréacteur de 20l

1.1.2 Les bioréacteurs scale-down

Le système *scale-down* choisi comprend le réacteur parfaitement agité décrit ci-dessus et une section non mélangée. Deux types de section ont été choisis lors de ce travail. La première est une ampoule de verre de 1l (diamètre interne = 8,5 mm, longueur = 0,25m). La solution *fed-batch* est alors ajoutée à l'entrée de celle-ci. La seconde est un tuyau de verre de 1 m de long et de 5 cm de diamètre interne présentant un écoulement piston. Il est muni d'un mélangeur statique.

L'ajout est effectué en son centre. Le débit de recirculation entre la partie parfaitement mélangée et la section non mélangée est maintenu à 39l/h. Le schéma de ces dispositifs *scale-down* est présenté à la figure 17.

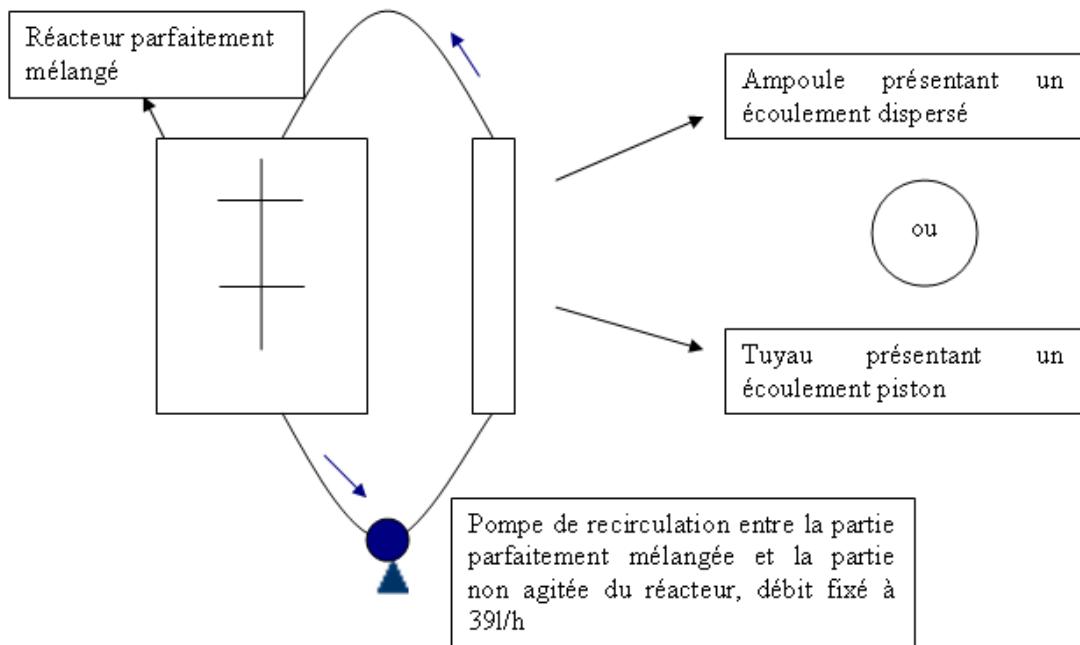


Figure 17. Schéma des dispositifs expérimentaux *scale-down*

1.2 Conservation des souches

Trois souches d'*Escherichia coli* ont été utilisées lors de ce travail. La première est une souche recombinante industrielle : la BL21. La protéine produite est greffée à la GFP (*Green Fluorescent Protein*), ce qui permet sa visualisation au microscope en fluorescence ou son analyse en cytométrie en flux. L'induction observée en cytométrie en flux n'étant pas satisfaisante, une nouvelle souche recombinante a été construite dans l'unité de biologie moléculaire (F.U.S.A.Gx). La dernière souche est une souche sauvage de référence : la K12.

Les souches sont tout d'abord cultivées en préculture de 100 ml avant de réaliser les *working seeds*. 30 ml de cette préculture sont mélangés à 20 ml de glycérol. La solution est alors répartie dans des tubes de 1,5 ml conservés à -80°C. Ces *working seeds* servent à inoculer les précultures.

1.3 Les précultures

1.3.1 Matériel

- Glucose (dextrose monohydraté Roquette)
- Extrait de levure (Organo Technie SA 19512)
- Tryptone (Organo Technie SA)
- MgSO₄.2H₂O (VWR Prolabo)
- NaH₂PO₄.2H₂O (Vel)
- K₂HPO₄ (VWR Prolabo)
- NaCl (VWR Prolabo)
- Ampicilline (Fluka) stérilisée par passage sur filtres de 0,2 µm (VWR Prolabo)
- Erlenmeyer

1.3.2 Méthode

Les précultures sont réalisées en ajoutant le contenu d'une *working seeds* à 500ml de milieu SuperLuria stérile dont la composition est reprise dans le tableau 3 ci-dessous. Après 17h d'incubation à 37°C sous une agitation de 120 rpm, les précultures sont injectées dans le bioréacteur.

Tableau 3. Composition du milieu de préculture

	Fiole de préculture
	Milieu
Volume (l)	1
Glucose (g/l)	5
Extrait de levure (g/l)	20
Tryptone (g/l)	25
MgSO ₄ .2H ₂ O (g/l)	0,24
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O (g/l)	1,6
K ₂ HPO ₄ (g/l)	5,4
NaCl (g/l)	8,5
Ampicilline (g/l)	0,1

1.4 Le milieu de culture et les conditions de culture

1.4.1 Matériel

- Erlenmeyers et durans
- Glucose (dextrose monohydraté Roquette)
- Extrait de levure (Organo Technie SA)
- Tryptone (Organo Technie SA)
- MgSO₄.2H₂O (VWR Prolabo)
- NaH₂PO₄.2H₂O (Vel)
- K₂HPO₄ (VWR Prolabo)
- NaCl (VWR Prolabo)
- Ampicilline (Fluka) stérilisée par passage sur filtres de 0,2 µm (VWR Prolabo)
- Solution de lactose à 0,16 g/l (durant de 600 ml)
- Balance Sartorius BL 1500 S (d=0,01g)
- Pompe d'ajout Watson Marlow 101 U/R
- Pompe Watson Marlow 323 S/D pour la recirculation en réacteur *scale-down*

1.4.2 Méthode

Les cultures sont réalisées en mode *fed-batch*. La première phase est la phase *batch*. Le système est alors fermé : rien n'est ajouté ni soutiré. Le milieu de culture initial utilisé en réacteur est presque identique au milieu de préculture: ceci permet de diminuer la phase de latence (tableau 4). Ce milieu de culture *batch* ne contient cependant pas de glucose, celui-ci est rajouté lors de la phase *fed-batch*.

Les conditions initiales de culture en bioréacteur présentées dans le tableau 5:

Tableau 5. Conditions initiales de culture

Paramètre	Valeur
pH	7
Température	37
vitesse d'agitation	378 rpm
Débit d'air	20 vvm
Surpression	0,1 bar

Lorsque les micro-organismes se retrouvent en limitation d'oxygène, le débit d'air, la vitesse d'agitation et la surpression sont augmentés. Les nouvelles valeurs sont respectivement de 40vvm, 461 rpm et 0,5 bar.

La phase *batch*, en système fermé, est finie lorsque les micro-organismes ont consommé l'entièreté du glucose initialement présent : le taux d'oxygène dissous remonte alors au maximum. En effet, la consommation du glucose nécessite la consommation simultanée d'oxygène. La phase *fed-batch*, durant laquelle le glucose est ajouté, peut alors démarrer. La solution d'ajout *fed-batch* contient non seulement du glucose mais aussi de la tryptone et de l'extrait de levure, dans les proportions reprises ci-dessous dans le tableau 4. La pompe d'ajout est activée par un contrôleur on/off (Knick, Stratos oxy 2402), la vitesse d'ajout est fixée à 7,5 ml/min. Deux types de régulation de l'ajout ont été utilisés : l'un en fonction du taux en oxygène dissous et l'autre par équation. Celles-ci seront décrites au point suivant. L'induction de la protéine est réalisée au moyen de lactose lorsque la fiole d'ajout de la solution *fed-batch* est épuisée.

Tableau 4. Composition des milieux de culture et de l'ajout *fed-batch*

	Bioréacteur de 20l	
	Milieu	Solution <i>fed-batch</i>
Volume (l)	12	2
Glucose (g/l)	0	500
Extrait de levure (g/l)	20	0
Tryptone (g/l)	25	25
MgSO ₄ .2H ₂ O (g/l)	0,8	12
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O (g/l)	1,6	0
K ₂ HPO ₄ (g/l)	5,4	0
NaCl (g/l)	8,5	0
Ampicilline (g/l)	0,1	0

Ces conditions ont été respectées lors de toutes les fermentations afin de pouvoir comparer les différents résultats.

1.5 Régulations de l'ajout de la solution fed-batch

1.5.1 En fonction du taux d'oxygène dissous

La pompe d'ajout de la solution *fed-batch* est activée lorsque le taux d'oxygène dissous dans le milieu est supérieur à 30% (figure 18). Les micro-organismes consomment alors le glucose ajouté, ce qui diminue le taux d'oxygène dissous. La pompe se coupe alors à 30%. Après consommation du glucose, le taux d'oxygène dissous remonte.

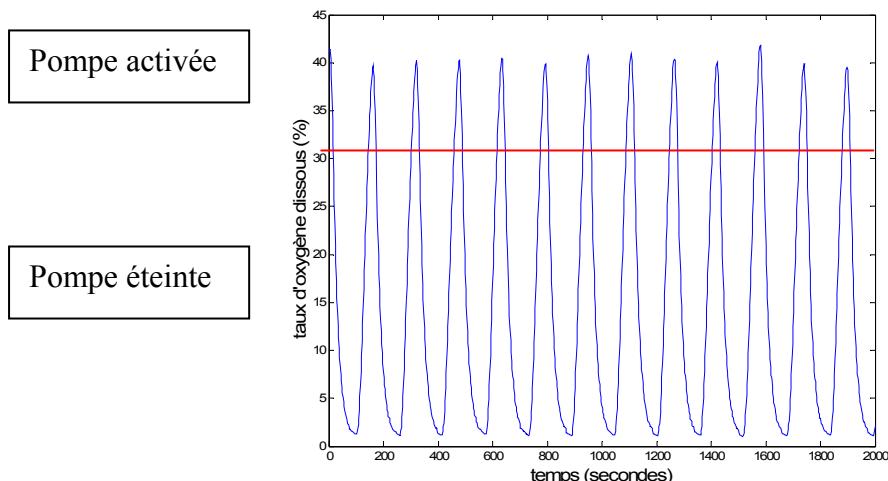


Figure 18. Etat de la pompe en fonction du taux d'oxygène dissous

1.5.2 Par équation

Les données récoltées lors des cultures réalisées avec le premier type de régulation permettent de recalculer un profil d'ajout adapté à la physiologie de la souche. Celui-ci sera explicité plus en détails dans la partie résultats et discussion.

1.6 Données récoltées au cours de la culture

1.6.1 Matériel

- sonde de température
- sonde pH Mettler Toledo (InPro 2000/120/Pt100/9848)
- solutions d'acide (H_3PO_4) et de base (KOH)
- sonde pO_2 Mettler Toledo (InPro 6800 Series O₂ Sensor 25 mm)
- spectrophotomètre de type GENESYS 2 (Thermospectronic)
- cuvettes en verre Hellma
- cuvettes en quartz SUPRASIL® pour spectrométrie UV
- tubes Eppendorf
- système de filtration sous-vide
- filtres :PALL Supor® - 450 (0,45 µm,47 mm)
- balance analytique Mettler AE 200
- étuve à 105°C et à 37°C
- dessicateur
- centrifugeuse MSE
- kit enzymatique Acétate : Boehringer Mannheim/R-Biopharm, EnzymaticBioAnalysis
- YSI MODEL 2700 SELECT
- micropipettes réglables de 100 et 1000 µl avec tips adaptés
- microscope ZEISS AXIOSKOP 2 MOT avec lampe HBO 100W/2
- solutions de rhodamine 123 et de propidium iodé à 1,25 mM
- solution de lactose (100g dans 600 ml d'eau distillée)
- solution de cycloheximide à 3,14 mg/ml

1.6.2 Méthodes

1.6.2.1 Données relatives à la régulation

a) Mesure de la température

La sonde utilisée possède une résistance électrique interne qui dépend de la température. Elle fonctionne donc grâce à un pont de Weastone. Elle permet de suivre la température aussi bien durant la fermentation que durant la stérilisation. Cette sonde est connectée à un régulateur qui commande l'ouverture ou la fermeture des vannes d'eau chaude, d'eau froide et de vapeur.

b) Mesure du pH

Une sonde combinée mesure le pH tout au long de la culture : elle est constituée d'une électrode de référence au KCl saturé et d'une électrode de mesure. Elle est raccordée à un régulateur qui permet de maintenir un pH constant grâce à l'ajout d'acide (H_3PO_4) ou de base (KOH). Cette sonde nécessite un nettoyage et une calibration avant chaque culture.

c) Mesure de la pO₂

La sonde utilisée est une sonde polarographique de type Clark. Celle-ci comprend une anode et une cathode insérées dans une cartouche contenant une solution électrolytique de KCl. L'anode est constituée d'argent. Le fil de platine qui l'enveloppe agit comme une cathode. L'extrémité de la cartouche comprend une membrane de Teflon : seul l'oxygène présent dans la solution est mis en contact avec les électrodes. Celui-ci est réduit en ions hydroxydes à la cathode lorsqu'un potentiel est appliqué. Le chlorure d'argent est quant à lui déposé sur l'anode. La quantité d'oxygène dissous est proportionnelle au courant généré. Ces sondes possèdent un temps de réponse de l'ordre de quelques secondes.

1.6.2.2 Suivi de la cinétique

a) Mesure de la densité optique

Le pourcentage de lumière non transmise est proportionnel à la quantité de biomasse présente dans l'échantillon. Les mesures sont effectuées à 600 nm. La gamme de linéarité s'étend jusque 0,8 : des dilutions de plus en plus importantes doivent donc être réalisées tout au long de la culture. La densité optique est mesurée par rapport à l'air. Ces données seront mises en relation avec les matières sèches grâce à une droite de calibration.

b) Mesure de la matière sèche

Un volume connu d'échantillon est filtré sous vide sur une membrane de 0,45 µm de porosité. Celle-ci a d'abord été séchée à l'étuve durant 24h et à 105°C. Ces filtres secs sont donc pesés. Une seconde mesure est effectuée sur les filtres secs (24h à 105°C à l'étuve) après passage de l'échantillon. La différence entre ces deux mesures permet, par règle de trois, de déterminer la concentration cellulaire. Toutes les pesées sont réalisées après refroidissement des filtres au dessicateur durant une heure.

c) Comptages

L'échantillon est dilué de 10 en 10 dans de l'eau peptonée (tableau 6). Les dilutions 6,7 et 8 sont étalées sur boîtes de Pétri (tableau 6) à trois reprises : en effet, celles-ci permettent d'obtenir des colonies bien isolées. Les boîtes sont placées à l'étuve durant 48h à 37°C. Cette manipulation est réalisée de manière stérile sous le flux laminaire.

Tableau 6. Composition de l'eau peptonée et du milieu solide des boîtes de Pétri

	Eau peptonée	Milieu LB
NaCl (g/l)	5	10
Peptone (g/l)	1	5
Tween 80 (ml)	2	20

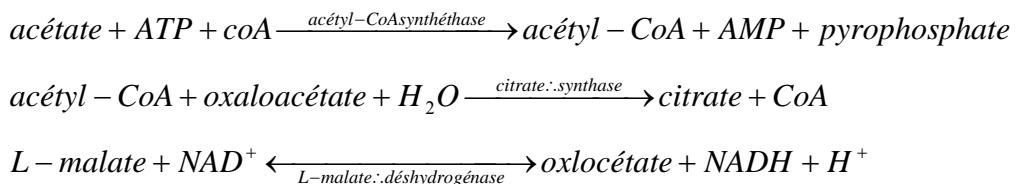
1.6.2.3 Suivi de la concentration en glucose et de l'acétate

a) Mesure de la concentration en glucose

Le YSi (Yellow Spring Instrument) est utilisé pour mesurer la concentration en glucose. L'échantillon est injecté dans une chambre remplie de solution tampon. Il diffuse alors à travers une membrane de polycarbonate qui limite la vitesse de réaction afin d'améliorer la linéarité, la stabilité de la calibration,... La glucose-oxydase immobilisée sur une membrane produit du peroxyde d'hydrogène à partir du glucose. Le peroxyde produit diffuse à travers une membrane d'acétate de cellulose et est ensuite oxydé électrochimiquement par une anode de platine. La membrane d'acétate de cellulose laisse passer l'eau oxygénée tout en empêchant le passage de tout composé chimique dont le poids moléculaire est inférieur à 200. En effet, tous ces composés pourraient interférer à l'électrode. Le signal délivré est proportionnel à la concentration en glucose. La gamme de linéarité de l'appareil s'étend jusqu'à 2,5 g/l.

b) Mesure de la concentration en acétate des échantillons

La concentration en acétate est mesurée grâce au kit enzymatique Boerhinger Mannheim/R-Biopharm. La quantification de l'acétate est basée sur la détection du NADH formé. Celle-ci est rendue possible grâce à des analyses spectrométriques dans l'UV à 340nm. L'acétate est tout d'abord converti en acétyl-CoA par l'acétyl-CoA synthétase. L'acétyl-CoA formé réagit avec l'oxaloacétate en présence de la citrate synthase. La consommation de l'oxaloacétate déséquilibre alors la dernière équation présentée ci-dessous. Au final, en présence d'acétate, du NADH est formé.



Un blanco est réalisé en remplaçant le volume de l'échantillon à analyser par le même volume d'eau distillée. Les différences d'absorbances mesurées après l'ajout des différents réactifs sont converties en concentrations d'acétate en tenant compte du coefficient d'extinction du NADH à 340 nm ($6,3 \text{ nmol}^{-1}$) et des dilutions réalisées afin de rester dans la gamme de linéarité de la méthode.

1.6.2.4 Suivi de la viabilité cellulaire

Afin de déterminer la viabilité cellulaire, un culot bactérien est marqué de manière différenciée grâce à des fluorochromes. En présence de 10 µl de rhodamine 123 et de propidium iodé à 1,25mM, les cellules vivantes apparaissent vertes tandis que les cellules endommagées apparaissent rouge. En effet, la diffusion du propidium iodé (rouge) s'effectue uniquement si le transport actif au niveau de la membrane cellulaire est défaillant.

Les cellules sont lavées trois fois au tampon PBS (tableau 7) et remises en suspension dans de l'eau peptonée avant d'être observées au microscope en fluorescence ou passées en cytométrie en flux. Toutes les centrifugations s'effectuent à 8000 rpm durant 10 minutes.

Matériel et méthodes

Tableau 7. Composition du tampon PBS

	tampon PBS
NaCl (g/l)	8
KCl (g/l)	0,2
K2HPO4	1,44
KH2PO4	0,24

Le principe général de la cytométrie en flux est présenté ci-dessous (figure 19).

Les cellules sont tout d'abord injectées au centre d'un liquide de gaine dont l'écoulement est laminaire. Les deux liquides ne se mélangent donc pas. La veine porteuse créée constraint les cellules à se placer en file indienne. En effet, le cytomètre en flux analyse chaque cellule individuellement. Le flux passe ensuite à travers un faisceau laser. Chaque cellule diffuse alors une partie de la lumière incidente et émet une ou plusieurs lumières de fluorescence en fonction des marqueurs fluorescents qu'elle porte. Les différents signaux doivent être séparés et acheminés vers des systèmes de détection, les photomultiplicateurs. La séparation est effectuée grâce à une succession de miroirs et de filtres. Les miroirs dichroïques réfléchissent certaines longueurs d'onde et transmettent les autres tandis que les filtres transmettent certaines longueurs d'onde et absorbent ou détruisent les autres. La lumière ainsi recueillie est transformée par un photomultiplicateur en signal électrique. Celui-ci est traité par un convertisseur analogique-digital afin de pouvoir être utilisé par un ordinateur.

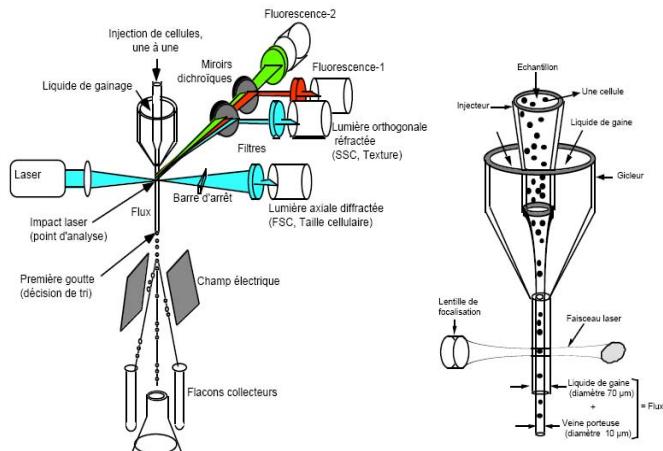


Figure 19. Fonctionnement d'un cytomètre en flux

1.6.2.5 Suivi de la synthèse protéique

La GFP, introduite après le promoteur de la protéine, témoigne de la synthèse protéique. La GFP peut être observée au microscope en fluorescence et analysée en cytométrie en flux. Afin de bloquer la synthèse protéique après le prélèvement des échantillons, 100 µl d'une solution de cycloheximide à 3,14 mg/ml sont additionnés à un culot bactérien remis en suspension. Celui-ci provient initialement de 900 µl d'échantillon.

1.6.2.6 Etude de la dynamique *fed-batch* lors de la régulation effectuée en fonction de la concentration en oxygène dissous

La solution *fed-batch* de glucose est ajoutée lorsque le taux d'oxygène dissous est supérieur à 30%, comme il a été décrit précédemment. Il est possible, à partir de l'enregistrement du taux d'oxygène dissous, de déduire les durées de différentes séquences : séquences d'ajout de glucose, de consommation et de manque en glucose (figure 20). Les séquences d'ajout de glucose correspondent aux parties de la courbe situées au-dessus de 30%. Les séquences de consommation de glucose commencent dès que l'ajout démarre et se finissent lorsque le taux d'oxygène dissous a atteint son minimum. En effet, la consommation du glucose entraîne une diminution de la quantité d'oxygène dissous. Lorsque celui-ci atteint son minimum, tout le glucose a été consommé. Cette séquence est suivie par une période de manque en glucose qui se termine dès que la pompe d'ajout s'enclenche, c'est-à-dire dès que le pourcentage en oxygène dissous dépasse 30%. Le taux de consommation du glucose est la masse de glucose consommée par unité de temps. Il est calculé pour chaque séquence d'ajout du glucose : le temps d'ajout est multiplié par la vitesse d'ajout de la pompe et par la concentration en glucose de la solution *fed-batch* avant d'être divisé par le temps de consommation du glucose de la séquence considérée.

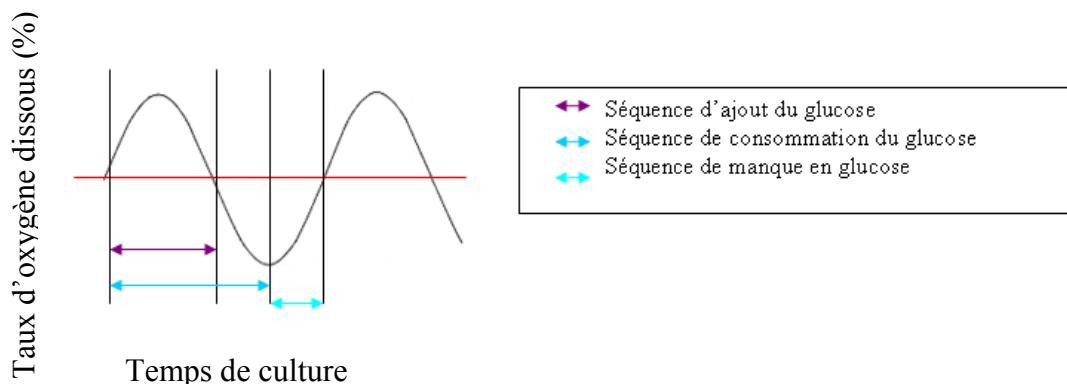


Figure 20.Illustration des différentes séquences

2. Les tests de traceurs

2.1 Matériel

- eau de distribution
- solution de glucose à 500 g/l contenant du bleu de méthylène
- pompe Watson Marlow 101 U/R
- pompe Watson Marlow 323 S/D
- deux types de parties non agitées : ampoule de 1l et section piston de 1m de long
- lampe de 60 W
- caméra Sony
- logiciel Matlab

2.2 Méthode

Le dispositif utilisé pour les tests de traceurs est présenté ci-dessous, figure 21.

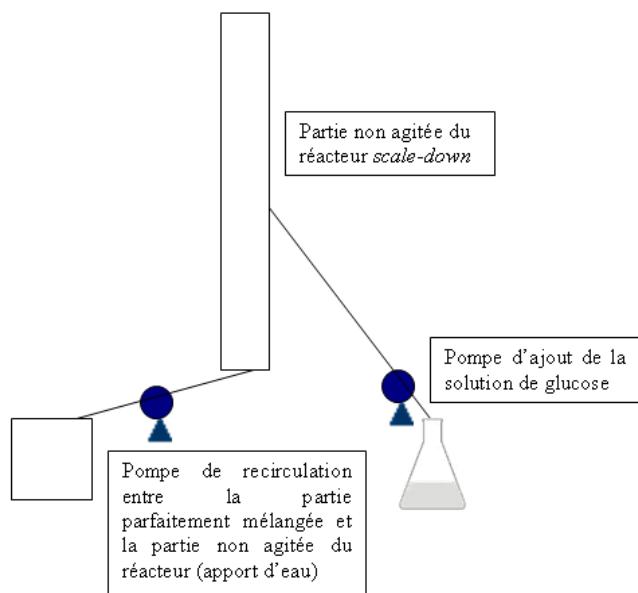


Figure 21. . Schéma du dispositif utilisé pour les tests de traceurs

Ces tests ont pour but de caractériser l'écoulement au sein des parties non agitées des réacteurs *scale-down*.

Les pompes de recirculation et d'ajout du glucose sont réglées au débit choisi lors des cultures en réacteurs *scale-down*. Elles sont donc respectivement fixées à 39l/h et 7,5 ml/min. Le mélange de la solution de glucose colorée au bleu de méthylène dans l'eau est filmé. L'enregistrement est ensuite traité par analyse d'images.

1. Conduite des expériences en bioréacteurs de 20l et en réacteurs *scale-down*

Comme il a déjà été expliqué dans la partie bibliographique, les systèmes *scale-down* permettent de reproduire les conditions hydrodynamiques présentes dans les réacteurs industriels. Grâce à ces systèmes, il est donc possible d'étudier diverses conséquences du changement d'échelle qui sont constatées lorsqu'une culture de laboratoire est extrapolée vers un réacteur industriel de grande taille. Les systèmes *scale-down* choisis sont constitués d'un réacteur parfaitement mélangé de 20l et d'une section non agitée, entre lesquelles le débit de circulation du milieu est maintenu à 39l/h. Deux types de parties non agitées sont utilisées dans ce travail : l'une présentant un écoulement dispersé et l'autre un écoulement piston (voir matériel et méthodes 1.1.2). Elles permettent donc de provoquer des conditions hydrodynamiques différentes. Dans les deux situations, les cellules sont alors soumises à des gradients de glucose et d'oxygène dissous, tout comme dans les réacteurs de taille industrielle (voir partie bibliographique 2.2.2).

Ces résultats sont comparés avec ceux obtenus sur un réacteur de référence, ne comprenant que la partie parfaitement mélangée. Celui-ci est considéré comme idéal du point de vue de l'homogénéité du milieu, le micro-organisme s'y développe donc dans les conditions idéales. Cette comparaison permet alors de mettre en évidence l'impact des gradients en glucose et en oxygène dissous. Différents paramètres sont mesurés afin de permettre la comparaison des réacteurs. Il s'agit de l'évolution des concentrations en biomasse, en glucose et en acétate, de la viabilité cellulaire et de la production de la protéine recombinante.

Cette première partie expérimentale est divisée en plusieurs paragraphes :

- le premier est consacré à l'étude de l'effet *scale-down* sur *Escherichia coli* BL21.
- le second compare les comportements de cette souche à ceux d'une souche de référence : la K12. Les cultures réalisées dans ces deux premiers paragraphes sont effectuées avec une régulation de l'ajout *fed-batch* en fonction du taux d'oxygène dissous. Des paramètres supplémentaires sont alors calculés afin de rendre compte de la dynamique du processus *fed-batch*. Il s'agit de la durée des séquences d'ajout de glucose, de consommation et de manque en glucose, ainsi que du taux de consommation du glucose.

Résultats et discussion

- un paragraphe est ensuite réservé à l'étude du seul effet de la production d'acétate sur *Escherichia coli* BL21.
- le dernier est consacré à la détermination et à l'essai d'une régulation par équation adaptée à la physiologie de la souche BL21.

1.1 Mise en évidence de l'effet scale-down sur *Escherichia coli* BL21

Toutes les cultures réalisées dans cette première partie sont effectuées avec un mode d'ajout de la solution *fed-batch*, contenant le glucose, en fonction du taux en oxygène dissous. Pour rappel, la pompe d'ajout de glucose est activée lorsque le taux d'oxygène dissous dans le milieu est supérieur à 30%. A la suite d'un ajout de glucose, les micro-organismes consomment le glucose, ce qui nécessite également la consommation d'oxygène. Le taux d'oxygène dissous descend alors en dessous de 30% et la pompe d'ajout est désactivée par le système de régulation. Lorsque l'entièreté du glucose présent dans le milieu a été consommé, le taux d'oxygène dissous remonte. La pompe s'enclenche lorsqu'il atteint 30% (voir figure 18 de la partie matériel et méthodes).

Le comportement de la souche industrielle recombinante BL21 lors de l'extrapolation des réacteurs est étudié grâce au suivi des paramètres précités dans le réacteur de référence et les deux types de réacteurs *scale-down*. Les paramètres sont la dynamique du processus *fed-batch*, la concentration en biomasse, en glucose et en acétate, la viabilité cellulaire et la production de la protéine recombinante.

1.1.1. Dynamique du processus *fed-batch*

Le premier paramètre étudié est la dynamique du processus *fed-batch*, grâce au suivi du taux d'oxygène dissous.

Le taux d'oxygène dissous a été enregistré lors de la conduite des différents réacteurs. Il oscille pour chaque culture durant toute la phase *fed-batch*. Un exemple d'enregistrement de l'évolution de l'oxygène dissous est présenté ci-dessous à la figure 22.

Résultats et discussion

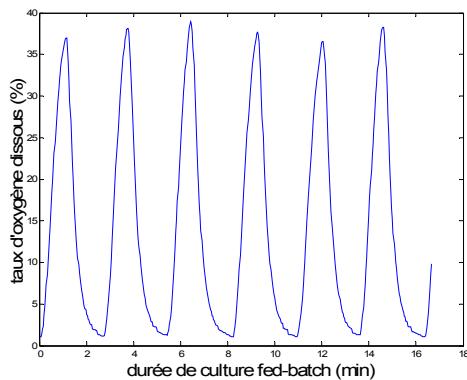


Figure 22. Suivi du taux d'oxygène lors de la phase *fed-batch* de la culture de référence

A partir de ces enregistrements, il est possible de calculer la durée des séquences d'ajout de glucose, de consommation de glucose et de manque en glucose pour la culture de référence et les deux types de cultures *scale-down* (voir matériel et méthodes 1.6.2.6).

Le graphique suivant (figure 23) présente la durée moyenne de ces différentes séquences pour le réacteur de référence et les deux réacteurs *scale-down*. Le nombre de séquences d'ajout du glucose dans ces trois types de réacteurs est également présenté.

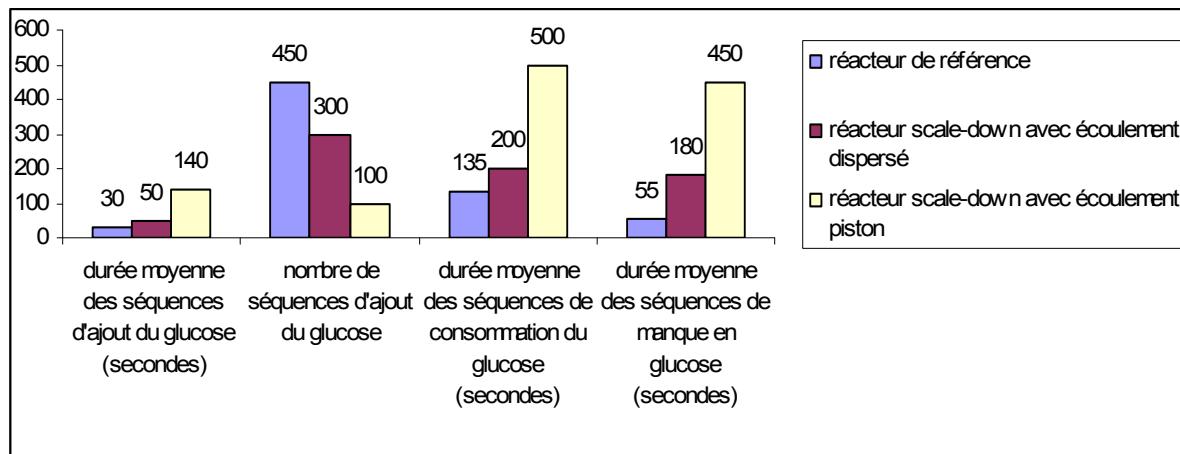


Figure 23. Durée moyenne et nombre de séquences d'ajout de glucose, durée moyenne des séquences de consommation de glucose et de manque en glucose dans le réacteur de référence et dans les deux types de réacteurs *scale-down*

Lors des cultures *scale-down*, les séquences d'ajout de glucose, de manque et de consommation de glucose sont plus longues et moins fréquentes que lors de la culture de référence, homogène.

Ceci est dû à un effet retard au niveau de la régulation d'ajout de glucose en réacteur *scale-down* : le glucose est ajouté à l'entrée de la section non mélangée, or la sonde à oxygène réglant l'ajout de glucose se trouve dans la partie parfaitement mélangée.

Résultats et discussion

L'ajout de glucose dure donc plus longtemps. Par conséquence, la quantité ajoutée est plus importante. De plus, le glucose est ajouté dans la partie non mélangée des systèmes *scale-down*. Il se mélange donc difficilement. La conjonction de ces deux phénomènes (plus grande quantité de glucose et pas d'agitation) soumet *Escherichia coli* BL21 à de hautes concentrations en glucose dans la partie non mélangée du système.

Cet effet retard est plus important dans le système *scale-down* avec écoulement piston. La géométrie de la partie non mélangée du réacteur *scale-down* influence donc la dynamique *fed-batch* du système.

Il est également intéressant d'observer l'évolution des différentes séquences au cours d'une culture *scale-down* (figure 24).

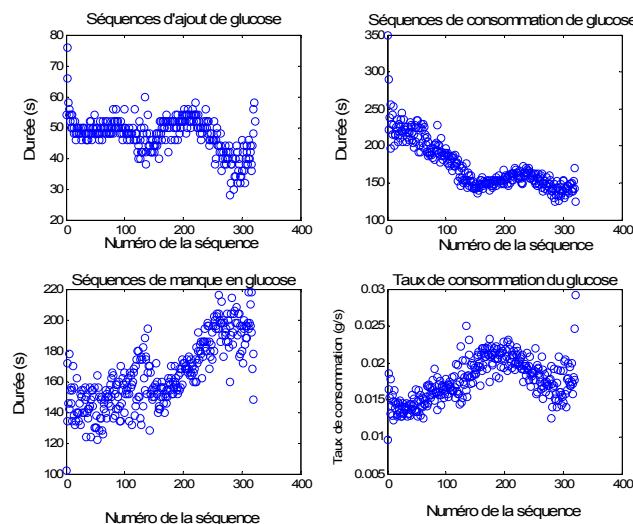


Figure 24. Calcul des séquences d'ajout du glucose, de consommation du glucose, de manque en glucose et du taux de consommation de glucose pour la culture *scale-down* avec écoulement dispersé réalisé avec la souche BL21

Le manque en glucose semble avoir un grand impact sur la dynamique du processus *fed-batch*: les cellules carencées consomment le glucose de plus en plus rapidement, ce qui provoque une diminution de la durée des séquences de consommation du glucose, tandis que les périodes de manque en glucose ne cessent d'augmenter.

Il faut cependant attirer l'attention sur un point important : les séquences d'ajout du glucose, de manque en glucose, de consommation du glucose sont calculées pour la partie parfaitement mélangée du réacteur. En effet, le taux d'oxygène dissous sur lequel se base le calcul est mesuré dans cette partie.

1.1.2 Courbes de croissance

Le deuxième paramètre suivi est l'évolution de la concentration en biomasse lors de la culture de référence et des cultures *scale-down* (figure 25). Le tableau 8 présente les concentrations en matières sèches rencontrées à la fin de la phase *fed-batch* dans les trois types de réacteurs.

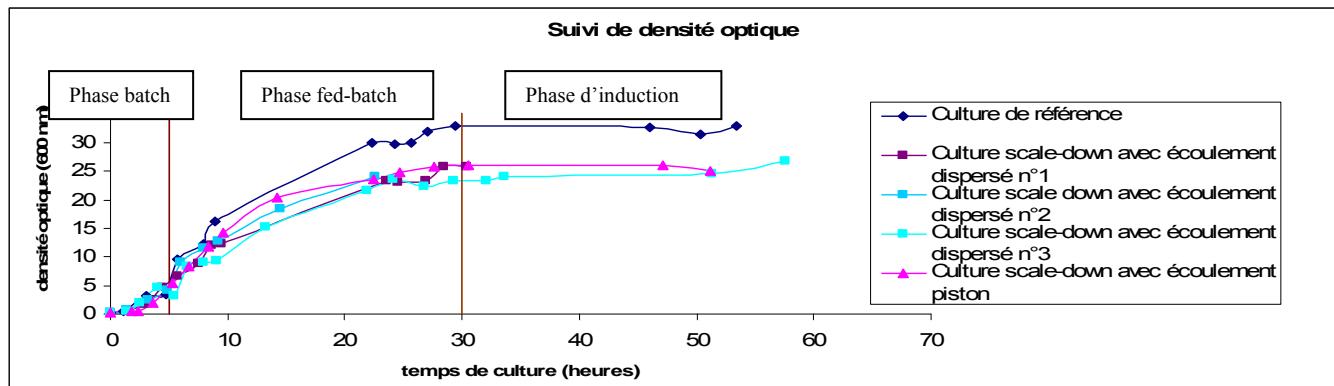


Figure 25. Suivi de densité optique pour la souche BL21

Tableau 8. Tableau récapitulatif des matières sèches obtenues lors des différentes fermentations de la souche BL21

	Matière sèche à la fin de la phase <i>fed-batch</i> (g/l)
Culture de référence	23,8
Culture <i>scale-down</i> avec écoulement dispersé	20,6
Culture <i>scale-down</i> avec écoulement piston	20,2

La concentration finale en biomasse dans les deux systèmes *scale-down* est inférieure à celle obtenue lorsque le milieu extracellulaire est homogène. Pour rappel, le réacteur de référence est homogène. La différence se marque dès la phase *fed-batch*, c'est-à-dire dès que la solution riche en glucose est additionnée. En effet, la recirculation des cellules entre les deux parties du système *scale-down* ne semble pas avoir d'effet sur leur croissance : durant les cinq premières heures de culture *batch*, la concentration cellulaire est identique dans tous les réacteurs.

Aucune différence significative n'est observée entre les deux types de systèmes *scale-down* utilisés.

1.1.3 Suivi du glucose et de l'acétate

Les paramètres étudiés dans cette partie du travail sont l'évolution des concentrations en glucose et en acétate au cours des cultures. La figure 26 montre les résultats obtenus pour l'évolution des concentrations en glucose.

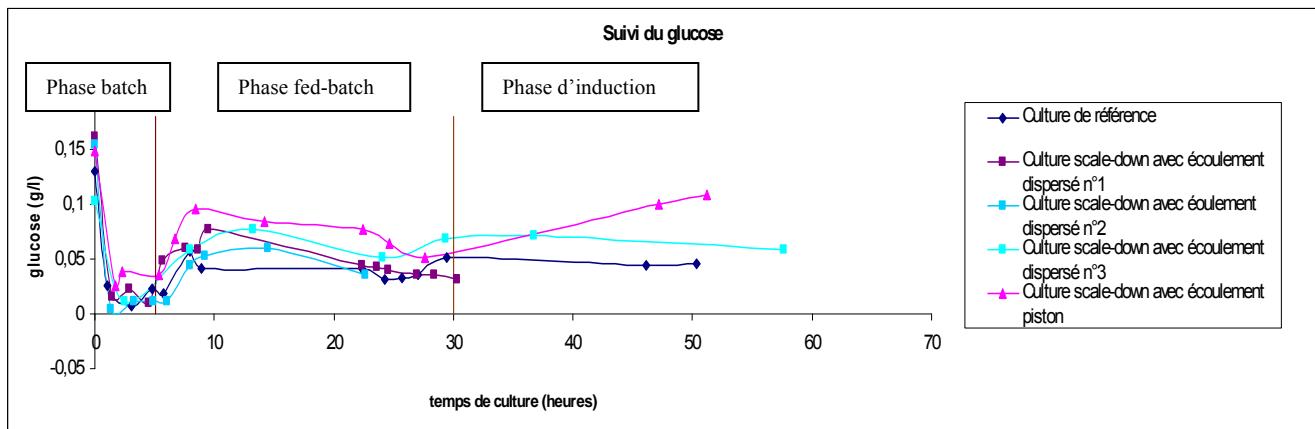


Figure 26. Evolution de la concentration en glucose pour les différents réacteurs réalisés avec la souche BL21

La concentration en glucose est initialement comprise entre 0,103 et 0,161 g/l. Elle diminue ensuite durant la phase *batch* jusqu'à approximativement 0,010 g/l. Les cellules sont alors soumises au manque en glucose puisque la concentration en glucose est inférieure à 0,020 g/l (31). En effet, cette valeur est inférieure à la constante d'affinité des cellules pour le glucose. Durant la phase *fed-batch*, les réacteurs *scale-down* présentent des concentrations en glucose plus importantes que dans le réacteur de référence. Cette différence n'est cependant pas significative.

Les simulations développées par la suite devraient permettre d'obtenir de meilleures estimations des profils en glucose présents dans les deux parties des réacteurs *scale-down*. En effet, les échantillons ont toujours été prélevés dans la partie parfaitement mélangée. De plus, ceux-ci ont été pris à différents moments par rapport à l'ajout du glucose. Lors de chaque prélèvement, la pompe d'ajout du glucose peut effectivement être allumée ou éteinte avec une fréquence importante, ce qui peut modifier sur des intervalles de temps très courts les concentrations en glucose présentes dans le réacteur.

Résultats et discussion

La figure 27 montre l'évolution de la concentration en acétate au cours des cultures.

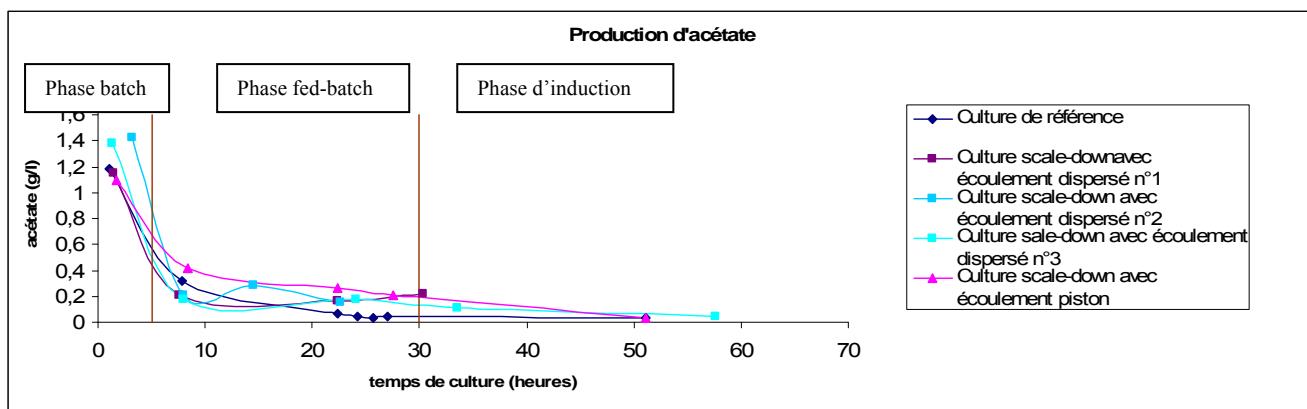


Figure 27. Evolution de la concentration en acétate pour les différents réacteurs réalisés avec la souche BL21

Ci-dessous (figure 28), un schéma récapitulatif des voies de production de l'acétate est présenté.

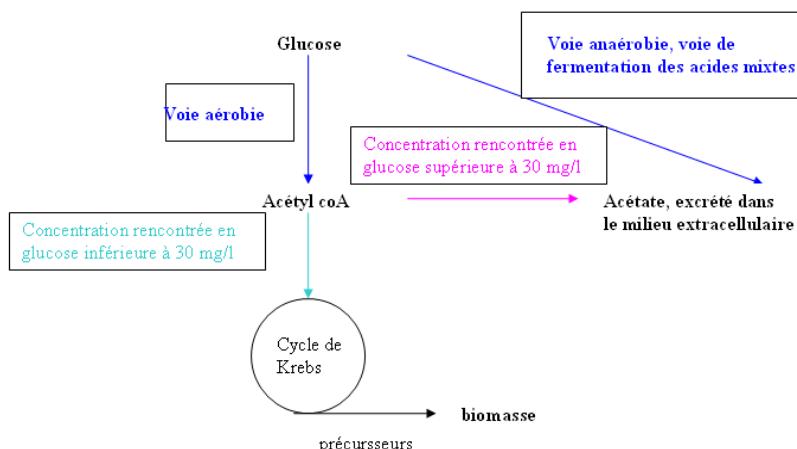


Figure 28. Schéma récapitulatif des voies de production de l'acétate

En résumé, l'acétate est donc produit lorsque la concentration en glucose rencontrée par les micro-organismes est supérieure à 30 mg/l (mécanisme surverse) (7) ou lorsque la concentration en oxygène dissous devient limitante (fermentation des acides mixtes) (6) (voir partie bibliographique 3.2).

L'évolution des concentrations en acétate peut maintenant être observée plus attentivement (figure 27).

Durant la phase *batch*, de l'acétate est produit à raison de 1,1 à 1,4 g/l. Celui-ci est ensuite reconsummé durant la phase *fed-batch*. La concentration en acétate reste cependant plus élevée dans les réacteurs *scale-down*.

Résultats et discussion

Les cellules sont donc bien soumises à des concentrations en glucose plus importantes en réacteur *scale-down*, comme suggéré lors de l'examen de la dynamique *fed-batch* des différents réacteurs (figure 23). Le carbone est dévié vers la production d'acétate et la croissance cellulaire s'en trouve entravée. En effet, il a déjà été constaté une moindre production de biomasse dans ces réacteurs (figure 25). L'acétate peut également être produit via la fermentation des acides mixtes. Effectivement, dans la partie non agitée du réacteur, l'oxygène nécessaire pour consommer cette grande quantité de glucose devient limitant. L'acétate produit est ensuite réincorporé dans la biomasse en fin de culture durant l'induction de la protéine: l'ajout de la solution *fed-batch* étant fini, les cellules ne sont alors plus soumises à de grandes quantités de glucose dans la partie non agitée du système. L'induction est réalisée après environ 30 h de culture.

1.1.4 Production de protéine recombinante

L'avant dernier paramètre est le suivi de la synthèse de la protéine recombinante. Le plasmide inséré dans *Escherichia coli* contient le gène de la protéine recombinante, fusionné au gène de la GFP (*Green fluorescent protein*). La production de cette dernière, fluorescente, peut donc être suivie en cytométrie en flux comme témoin de la synthèse protéique. La comparaison des intensités de fluorescence avant l'induction et après l'induction permet de suivre cette synthèse protéique.

La production de protéine recombinante observée n'est cependant pas satisfaisante. En effet, le déplacement des intensités de fluorescence liée à la présence de la GFP, dans le canal vert, est faible. De plus, le même déplacement est constaté dans le canal rouge. La fluorescence rouge n'est pourtant pas corrélée à la présence de la GFP. Il s'agit alors d'autofluorescence et non de la fluorescence liée à la GFP. Suite à des analyses effectuées au laboratoire de l'INSA (Toulouse), il s'est avéré que la GFP n'avait pas été intégrée dans sa totalité dans le plasmide. D'où l'impossibilité de détecter efficacement l'induction de la protéine par cytométrie en flux.

Une nouvelle souche recombinante a donc été construite dans l'unité de biologie moléculaire. Celle-ci contient seulement la GFP et non la GFP fusionnée à une protéine toxique pour la cellule. Ceci permettra de ne pas favoriser la fluorescence liée aux cellules non induites ou induites faiblement. En effet, dans le cas de la production d'une protéine recombinante, ces cellules ne meurent pas et continuent à croître, contrairement aux cellules correctement induites. Ceci est important si la protéine est induite plus précocement, grâce à de l'IPTG.

Résultats et discussion

Il est alors possible de mieux étudier l'effet *scale-down* sur la production d'une protéine recombinante. Cette nouvelle souche fera partie des perspectives de ce travail.

1.1.5 La viabilité cellulaire

Le dernier paramètre suivi est la viabilité cellulaire grâce à un marquage LIVE/DEAD des cellules (voir matériel et méthodes 1.6.2.4).

La viabilité cellulaire est observée avant et après l'induction de la protéine.

Les diagrammes obtenus par cytométrie en flux (figure 29) présentent des cellules qui se déplacent fortement vers les doubles positifs (grande fluorescence dans le canal rouge FL3 et dans le canal vert FL1), signe d'endommagement cellulaire. En effet, le résultat de la coloration LIVE/DEAD est souvent interprété de manière simplifiée : les cellules vertes sont considérées comme vivantes et les cellules rouges comme mortes. Or, il existe des états intermédiaires. Ce phénomène semble être spécifique des bactéries gram-, du fait de la présence d'une membrane externe (35). L'endommagement des cellules est sans doute dû à un effet combiné de l'induction de la protéine toxique et du manque en glucose. Les résultats obtenus sont similaires dans les trois types de réacteurs.

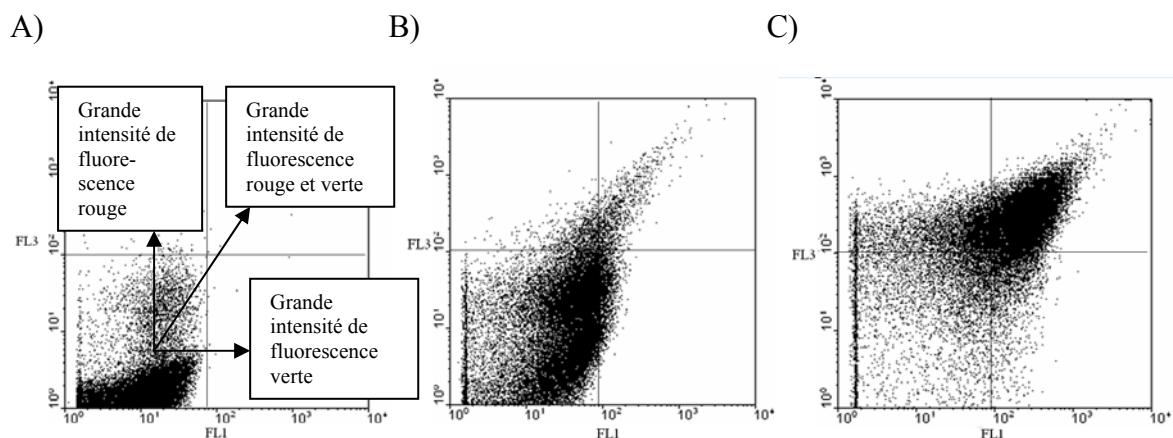


Figure 29. Suivi de la viabilité cellulaire pour le réacteur *scale-down* avec écoulement piston A) avant induction B) 3h après induction C) 24 h après induction (FL1= canal vert, FL3 = canal rouge)

1.1.6 Discussion générale concernant la mise en évidence de l'effet *scale-down*

L'effet *scale-down* a donc été mis en évidence dans tous les tests de fermentation. En effet, la quantité de biomasse diminue, l'acétate est produit en plus grande quantité, les périodes de manque en glucose sont plus importantes,....

Résultats et discussion

Dans un bioréacteur industriel, suite à la présence d'hétérogénéité en glucose et en oxygène, (voir partie bibliographique 2.2.2), les micro-organismes sont successivement exposés au manque en glucose, à l'excès de glucose et au manque d'oxygène au cours de leur déplacement dans le réacteur. Ils tentent donc continuellement de s'adapter à ces situations provisoires. L'activation et l'arrêt successif des voies de réponses au stress cause une perte de production de biomasse. La production et la réassimilation répétée de l'acétate provenant du mécanisme surverse, relatif à un excès de glucose, et des produits de la fermentation des acides mixtes, relatif au manque d'oxygène, provoque également une diminution de la quantité de biomasse produite. L'acétate produit réduit le taux maximal de croissance.

Le système *scale-down* choisi permet donc de recréer différents phénomènes présents dans les réacteurs industriels : manque en glucose, excès de glucose et limitation en oxygène dissous. Il constitue un bon outil pour l'étude de l'extrapolation des bioprocédés. D'autres auteurs, tels que Bylund *et al.* (36) et Enfors *et al.* (6) ont observés l'apparition d'acétate, de formate et une diminution de la production de biomasse dans un réacteur *scale-down* de configuration similaire à ceux utilisés dans ce travail.

Les résultats obtenus lors de ce travail sont tout à fait en accord avec ceux de la littérature. L'aspect relatif au manque en glucose n'est cependant pas traité. En effet, il n'existe pas de métabolite à analyser qui permet de déterminer si les cellules ont été soumises au manque en glucose. L'étude du manque en glucose est donc plus difficile que l'étude de l'excès de glucose ou du manque d'oxygène, pour lesquels il existe des métabolites caractéristiques, tels que l'acétate, à analyser. Dans ce travail, il a été démontré qu'il est possible de traiter l'aspect relatif au manque en glucose grâce à un calcul basé sur l'enregistrement du taux d'oxygène dissous. Il faut pour cela que les cultures soient conduites avec un mode d'ajout de la solution *fed-batch* en fonction du taux en oxygène dissous. Une autre technique pourrait également être utilisée. Le gène de la GFP peut être fusionné à un gène de stress lié au manque en glucose. Le suivi de la GFP en cytométrie en flux peut alors servir de témoin du manque en glucose.

1.2 Comparaison du comportement d'*Escherichia coli* BL21 et d'*Escherichia coli* K12

L'effet *scale-down* a été mis en évidence sur *Escherichia coli* BL21. Son comportement peut alors être comparé avec celui d'une souche sauvage soumise aux mêmes conditions: *Escherichia coli* K12.

1.2.1 Dynamique du processus *fed-batch*

Un paramètre intéressant est la dynamique du processus *fed-batch*. Les résultats des analyses de concentrations en biomasse et en acétate sont directement intégrés dans la discussion.

L'enregistrement du taux d'oxygène dissous lors des cultures *d'Escherichia coli* K12 peut servir, tout comme précédemment pour *Escherichia coli* BL21, à calculer les séquences d'ajout de glucose, de consommation de glucose et de manque en glucose. La durée moyenne des séquences d'ajout et leur nombre sont présentés à la figure suivante 30, à la fois pour le réacteur de référence et un réacteur *scale-down* (avec écoulement dispersé).

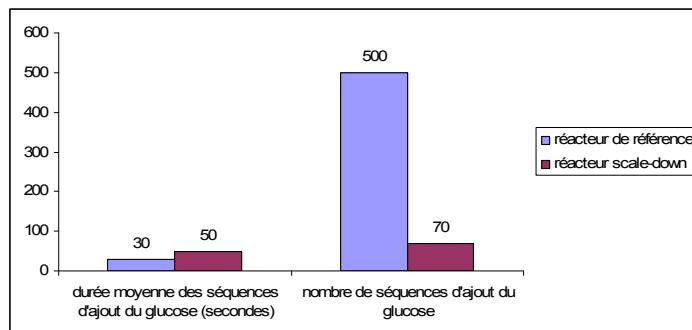


Figure 30. Durée moyenne et nombre de séquences d'ajout de glucose dans le réacteur de référence et dans le réacteur *scale-down* avec écoulement dispersé

L'évolution de la durée moyenne et du nombre de séquences d'ajout lors du passage en réacteur *scale-down* est similaire à celle constatée pour *Escherichia coli* BL21. L'explication est identique, il s'agit d'un effet retard au niveau de la régulation d'ajout du glucose. *Escherichia coli* K12 est donc également soumis à de hautes concentrations en glucose dans la partie non agitée du système, ce qui provoque la production d'acétate.

Lors de la culture *scale-down* conduite avec *Escherichia coli* K12, la concentration en acétate est de 18 g/l en fin de phase *fed-batch*.

Résultats et discussion

Il est également opportun de s'intéresser à l'évolution des différentes séquences au cours de la culture *scale-down* (figure 31).

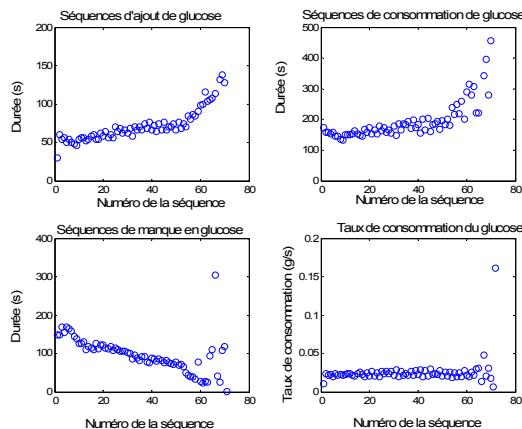


Figure 31. Calcul des séquences d'ajout du glucose, de consommation du glucose, de manque en glucose et du taux de consommation de glucose pour la culture *scale-down* avec écoulement dispersé réalisé avec la souche K12

La production importante d'acétate exerce sûrement un effet négatif sur le métabolisme général et donc sur la consommation de glucose. En effet, la durée des séquences de consommation du glucose augmente au cours du temps, tandis que les séquences de manque en glucose ne cessent de diminuer. Le ralentissement de la consommation du glucose dans des réacteurs où il y a une grande production d'acétate a déjà été constaté par Gigot C. (37).

L'effet le plus important sur la dynamique de ce processus *fed-batch* est donc la production d'acétate et non le manque en glucose, comme pour la souche BL21. Dans les mêmes conditions, la dynamique du processus *fed-batch* est totalement différente selon la souche cultivée.

1.2.2 Discussion générale concernant la comparaison du comportement d'*Escherichia coli* BL21 et K12

Les comportements des deux souches étudiées, *Escherichia coli* BL21 et *Escherichia coli* K12, sont complètement différents. Dans ces conditions, l'effet du manque en glucose dans la partie parfaitement mélangée du réacteur semble déterminant sur la dynamique *fed-batch* lors de la conduite des cultures BL21. La souche K12 semble par contre plus sensible à un excès de glucose et produit beaucoup plus d'acétate : sa croissance s'en trouve fortement entravée. Chez *E.coli* B(BL21), l'acétyl-CoA synthétase et les enzymes de la dérivation du glyoxylate sont constitutivement exprimées. Celles-ci sont réprimées chez *E.coli* K (JM109).

Or, cette dérivation est la principale voie d'utilisation de l'acétate. *E.coli* BL21 est donc capable de reconsumer efficacement l'acétate qu'elle produit, ce qui diminue son accumulation (38). Selon la souche cultivée, l'impact des conditions hydrodynamiques peut donc être totalement différent.

1.3. Conséquences de la production d'acétate sur la souche BL21

Dans les réacteurs précédents, *Escherichia coli* BL21 a été simultanément exposée à l'excès de glucose, au manque en glucose et au manque d'aération. Le facteur dominant la dynamique du processus *fed-batch* était alors le manque en glucose.

L'effet de la production d'acétate sur la souche BL21 a été mis en évidence dans un réacteur parfaitement mélangé où le glucose a été apporté très rapidement. En effet, dans ces conditions, seul l'excès de glucose peut avoir une influence.

1.3.1 Mise en relation de la croissance avec la production d'acétate

Escherichia coli BL21 est souvent considéré comme faible producteur d'acétate (38). Cependant, lorsque le mode d'ajout du glucose est mal adapté, cette souche peut tout de même produire de grandes quantités d'acétate (figure 32). L'acétate produit diminue alors son taux de croissance maximal (tableau 10), ce qui est en accord avec la littérature (32). Lorsque le réacteur n'est plus soumis à un apport de glucose, l'acétate est entièrement reconsumé et intégré dans la biomasse. Le rendement en biomasse par rapport à l'acétate est toutefois inférieur à celui du glucose (32).

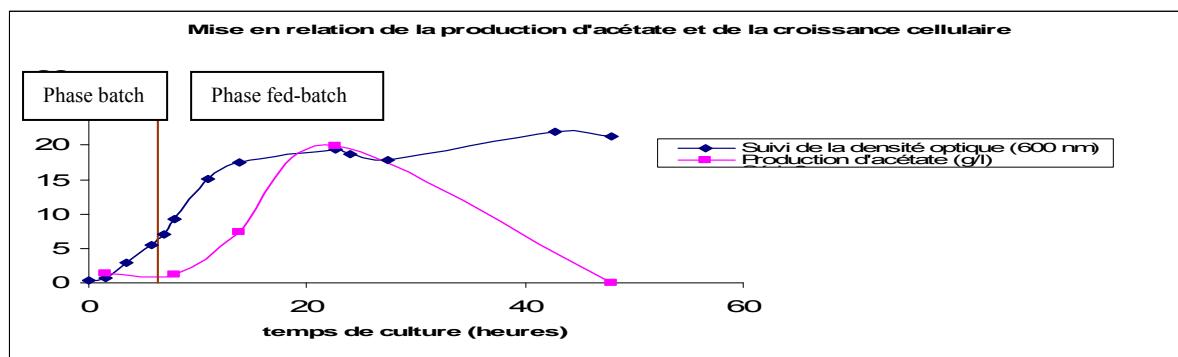


Figure 32. Suivi de la densité optique et de la production d'acétate un réacteur parfaitement mélangé mis en mécanisme surverse

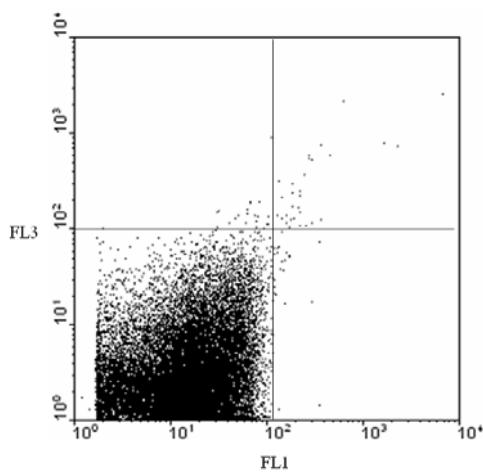
Tableau 10. Comparaison des taux de croissance de cette culture avec la culture de référence

	Culture sans production d'acétate	Culture avec production d'acétate
Taux de croissance maximal (1/h)	0,29	0,23

1.3.2 Impact d'une production importante d'acétate sur la viabilité cellulaire

L'acétate présent en grande quantité à la fin de la phase *fed-batch* semble endommager les cellules (figure 33). En effet, le dernier prélèvement de la phase *fed-batch* a été passé en cytométrie en flux. Le diagramme montre des cellules déplacées vers les doubles positifs (grande fluorescence dans le canal rouge FL3 et dans le canal vert FL1), signe d'endommagement cellulaire.

A)



B)

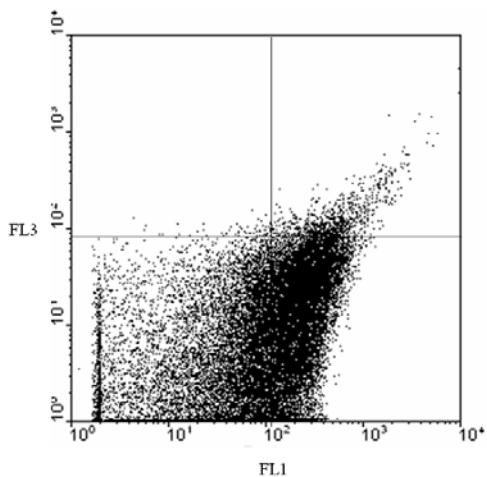


Figure 33. Viabilité cellulaire à la fin de la phase *fed-batch* dans un réacteur parfaitement mélangé A) en présence d'une faible quantité d'acétate B) en présence d'une grande quantité d'acétate (FL1=canal vert, FL3=canal rouge)

1.3.3 Conclusion concernant les effets de la production d'acétate sur *Escherichia coli* BL21

Les effets observés de la production d'acétate sur *Escherichia coli* BL21 sont donc une réduction de son taux maximal de croissance et un endommagement cellulaire. Ces résultats ont été obtenus par comparaison avec un réacteur de référence où la concentration en acétate a été maintenue à une concentration très faible.

1.4. Détermination et essai d'une régulation par équation adaptée à la physiologie de la souche BL21

1.4.1 Détermination d'une régulation par équation

Les premières cultures ont été effectuées avec une régulation d'ajout de la solution *fed-batch* en fonction du pourcentage en oxygène dissous. A partir de l'enregistrement du taux d'oxygène dissous tout au long de la culture, diverses durées de séquences ont été calculées : séquences d'ajout du glucose, de consommation de glucose et de manque en glucose. Celles-ci permettent de déterminer le temps durant lequel la pompe d'ajout du glucose est activée ou désactivée. Le programme Matlab donne directement la durée des séquences d'ajout, c'est-à-dire le temps durant lequel la pompe est activée. La pompe est désactivée durant une partie du temps de consommation du glucose, lorsque le taux d'oxygène dissous est inférieur à 30%, et durant le temps de manque en glucose. La fraction de temps pendant laquelle la pompe est désactivée lors de la séquence de consommation du glucose correspond donc à la durée de cette séquence, diminuée de la durée de la séquence d'ajout du glucose. Ce rapport de temps pompe activée/pompe désactivée est alors conservé. Cependant, les temps d'activation et de désactivation de la pompe sont diminués du même facteur afin de répartir l'ajout du glucose. Le programme imposé à la pompe d'ajout est présenté à la figure 34 :

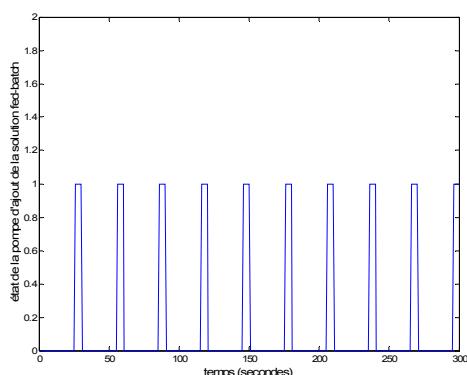


Figure 34. Schéma du temps d'activation et de désactivation de la pompe d'ajout de la solution *fed-batch*

Cette nouvelle régulation est une régulation sans contrôle, contrairement à la première. En effet, l'ajout est déterminé préalablement au commencement de la culture. La pompe doit bien sûr être réglée au même débit dans les deux situations.

Cette nouvelle régulation est testée dans le réacteur de référence et dans les deux types de réacteurs *scale-down* pour *Escherichia coli* BL21.

Résultats et discussion

Les résultats sont comparés avec ceux obtenus lors de la régulation de l'ajout de glucose en fonction du taux en oxygène dissous.

1.4.2. Suivi de l'oxygène dissous

Le premier paramètre suivi au cours de la culture de référence et des deux types de cultures *scale-down* est l'évolution du taux en oxygène dissous

Lors de la culture de référence, le taux moyen d'oxygène dissous reste aux alentours de 30% (figure 35). Les amplitudes des oscillations sont significativement moins importantes avec cette nouvelle régulation. Celles-ci signifient que l'on se trouve à la limite du mécanisme surverse, enclenché lorsque les cellules sont soumises à un excès de glucose.

Le glucose est donc correctement apporté : l'ajout est consommé au cours d'un cycle, composé de 5 secondes d'ajout et de 25 secondes de repos. En effet, le taux d'oxygène dissous diminue tout d'abord, du fait de l'activation du cycle de Krebs. Ensuite, ce taux remonte car l'entièreté du glucose ajouté a été consommé. Cette nouvelle régulation de l'ajout du glucose est donc entièrement satisfaisante à l'échelle du laboratoire.

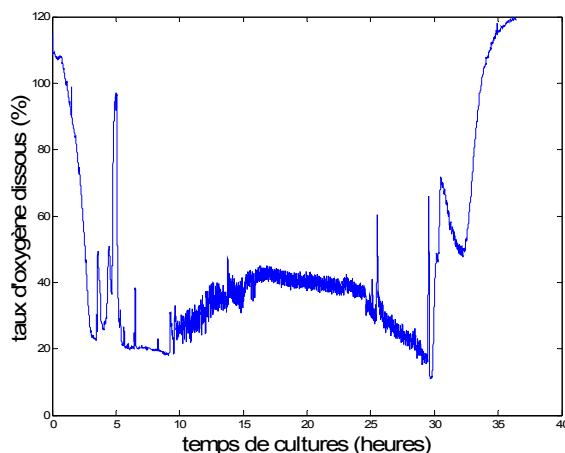
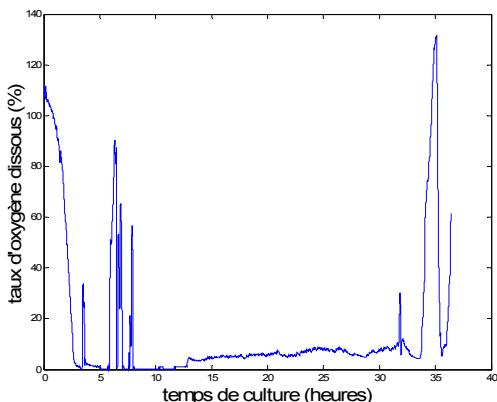


Figure 35. Suivi de l'oxygène dissous lors du réacteur de référence

L'effet de l'extrapolation de cette nouvelle régulation a été étudié dans deux types de réacteurs *scale-down* : l'un présentant un écoulement dispersé (figure 36 A) et l'autre un écoulement piston (figure 36 B). Dans les deux situations, le taux d'oxygène dissous reste faible et pratiquement constant. L'absence d'oscillations signifie que les cellules ne sont pas capables de consommer l'entièreté du glucose au cours d'un cycle. Celles-ci enclenchent leur mécanisme surverse : il y a production d'acétate. Les réacteurs *scale-down* sont donc particulièrement intéressants lors de la mise au point de nouvelles régulations d'ajout de la solution *fed-batch* : ils permettent de tester à moindre coût l'extrapolation du procédé.

Résultats et discussion

A)



B)

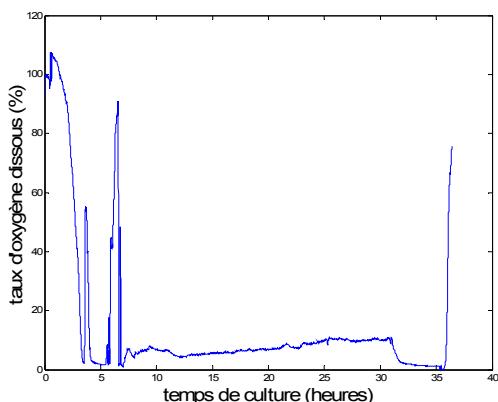


Figure 36. Suivi de l'oxygène dissous lors de la conduite des réacteurs *scale-down* A) *scale-down* avec écoulement dispersé B) *scale-down* avec écoulement piston.

1.4.3. Courbes de croissance

Le second paramètre suivi est l'évolution de la concentration en biomasse lors des trois types de cultures réalisées (figure 37). Le tableau 11 reprend les concentrations en matières sèches rencontrées à la fin de la phase *fed-batch* pour ces différents réacteurs.

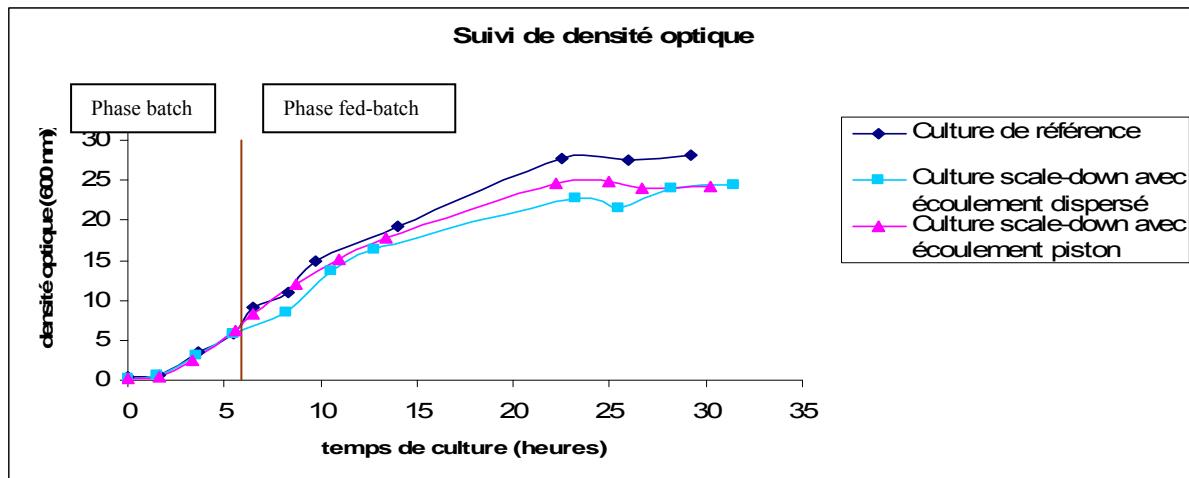


Figure 37. Suivi de la densité optique pour la souche BL21

Tableau 11. Tableau récapitulatif des matières sèches obtenues pour les différents tests de fermentation

	Matière sèche à la fin de la phase <i>fed-batch</i> (g/l)
Culture de référence	22,6
Culture <i>scale-down</i> avec écoulement dispersé	19,9
Culture <i>scale-down</i> avec écoulement piston	20,2

Résultats et discussion

Les trois courbes de croissance (figure 37) sont similaires à celles obtenues précédemment dans les mêmes réacteurs lors des cultures conduites avec le premier mode d'ajout de la solution *fed-batch*. Les matières sèches obtenues en fin de phase *fed-batch* sont, bien sûr, également semblables.

1.4.4 Suivi du glucose et de l'acétate

Les paramètres suivants sont l'évolution de la concentration en glucose et en acétate au cours des cultures. La figure 38 présente les résultats pour la concentration en glucose.

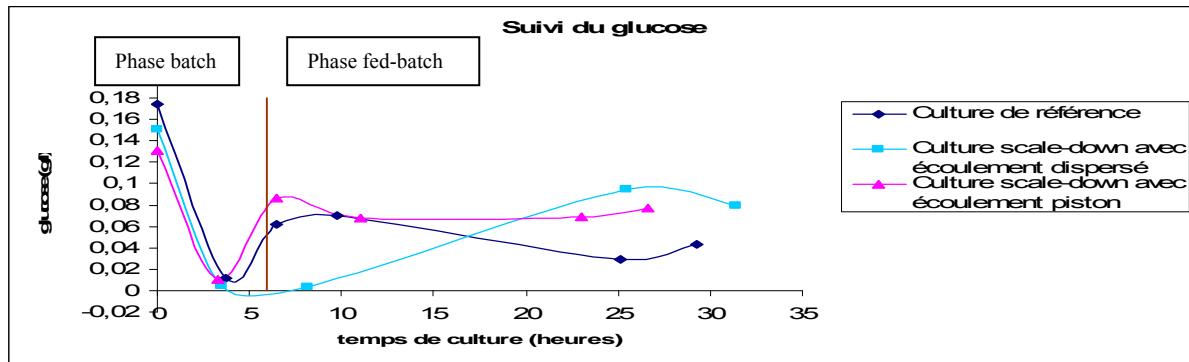


Figure 38. Suivi du glucose pour la souche BL21

L'ajout du glucose a été effectué de la même manière lors de la conduite des différentes cultures. Les faibles différences de concentrations de glucose observées durant la phase *fed-batch* ne sont pas significatives. Les simulations développées dans la seconde partie de ce travail devraient permettre d'obtenir de meilleures estimations des concentrations en glucose présentes dans les différents réacteurs.

La figure 39 montre l'évolution de la concentration en acétate au cours de la culture de référence et des deux cultures *scale-down*.

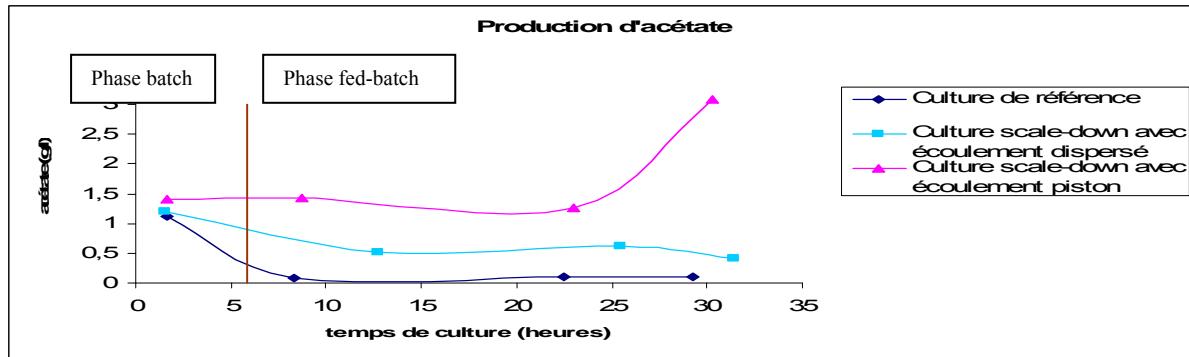


Figure 39. Suivi de l'acétate pour la soucheBL21

Elles sont supérieures à celles rencontrées dans ces mêmes réacteurs avec une régulation de l'ajout de glucose en fonction du taux d'oxygène dissous.

Résultats et discussion

Il est possible que l'ajout de glucose ayant été fractionné, les cellules aient moins de temps entre chaque ajout pour reconsumer l'acétate. En effet, les temps de désactivation de la pompe ont également été réduits.

1.4.5 Discussion générale concernant le changement de régulation

Cette nouvelle régulation a été conçue pour fractionner l'apport de glucose. Les périodes d'ajout de glucose sont alors réduites à 5 secondes. Elles étaient précédemment comprises entre 30 et 140 secondes. Les cellules devraient donc rencontrer des gradients en glucose moins importants.

Cette régulation est entièrement satisfaisante à l'échelle du laboratoire. Elle ne permet cependant pas d'améliorer l'extrapolation du procédé. La différence de gradients de glucose rencontrés par les cellules dans la partie non agitée du réacteur lors des deux types de régulation n'est sans doute pas suffisante pour mener à des productions finales de biomasse distinctes. En effet, cette souche est particulièrement peu sensible à l'excès de glucose, grâce à une reconsommation efficace de l'acétate produit. La diminution de gradients de glucose peut être confirmée grâce à la modélisation. La modélisation et les réacteurs *scale-down* sont complémentaires : en effet, il est difficile de prévoir le comportement d'une souche face à un type de gradients de glucose. L'acétate restant dans le milieu extracellulaire, du fait de la réduction du temps de désactivation de la pompe, est aussi plus important et exerce un effet néfaste sur les cellules.

Bylund *et al.*(36) avancent l'hypothèse suivante : la limitation d'oxygène dans la partie non agitée du réacteur, consécutive à l'excès de glucose, serait un paramètre plus critique que le mécanisme surverse dû à l'excès de glucose. Cette hypothèse est toutefois tout à fait originale, par rapport à la littérature. D'autres paramètres limitants peuvent exister dans ce type de réacteurs *scale-down*. Il a été montré dans des travaux précédents qu'il n'existe pas de différence significative de pH ou de température entre les deux parties des systèmes *scale-down* qui pourraient influencer la croissance (39). Il est cependant possible que le manque en glucose dans la partie parfaitement mélangée du système ne soit pas réduit lors de ce changement de régulation. L'apport en azote constitue sans doute aussi un paramètre limitant. Il l'est toutefois pour toutes les cultures réalisées.

Il reste également à aborder un problème purement technique : l'imprécision de la pompe d'ajout de la solution *fed-batch* lorsqu'elle est utilisée aux faibles débits. Or, elle a été réglée à 7,5 ml/min, c'est-à-dire au débit minimal d'utilisation, tout au long des expériences. Cependant, ce biais se compense sur la durée totale de la culture.

2. Modélisation de l'hydrodynamique des différents réacteurs utilisés et mise en relation avec les données expérimentales

Le passage des cellules dans la partie non agitée des réacteurs *scale-down* cause une perte de production de biomasse, observée dans la première partie de ce travail. Les cellules sont supposées y rencontrer des concentrations élevées et fluctuantes en glucose. Ceci peut être confirmé grâce à la modélisation des gradients en glucose générés au sein des réacteurs. L'hydrodynamique des deux parties non agitées sera donc caractérisée.

Plusieurs questions seront également soulevées :

- La consommation du glucose par les micro-organismes a été intégrée dans les modèles : ils modifient ainsi les concentrations auxquelles ils sont eux-mêmes confrontés. Cependant, le calcul du taux de consommation se base sur le suivi du taux d'oxygène dissous. Or, cette sonde est située dans la partie parfaitement mélangée du système. Ce taux est donc inconnu pour la partie non agitée. Une analyse de sensibilité du modèle vis-à-vis de ce paramètre sera donc réalisée.
- Le changement de régulation avait pour objectif de fractionner l'apport de glucose. Les gradients générés sont-ils effectivement moindres ?

2.1 Structure des modèles choisis

L'approche choisie pour modéliser l'hydrodynamique des différents réacteurs est la modélisation par approche stochastique structurée. Comme expliqué dans la partie bibliographique (2.4.1), le réacteur est divisé en zones de volume égal et dites homogènes, appelées compartiments ou états. Les chaînes de Markov sont alors utilisées pour simuler l'homogénéisation du réacteur.

Celles-ci sont composées de deux éléments : le vecteur d'état et la matrice de transition. Le vecteur d'état comprend les diverses concentrations en glucose rencontrées pour chaque état. La matrice de transition comprend les probabilités d'aller d'un état à un autre. Le vecteur d'état est multiplié par la matrice de transition afin d'obtenir un nouveau vecteur d'état. Ceci définit l'évolution temporelle du système. Le passage du glucose d'un compartiment à un autre est donc gouverné par des probabilités.

2.1.1 Réacteur de référence

Comme ce réacteur est homogène, un seul compartiment (ou état) est utilisé pour le représenter. Un autre état est défini afin de prendre en compte la consommation du glucose par les micro-organismes. La structure du modèle est présentée à la figure 40.

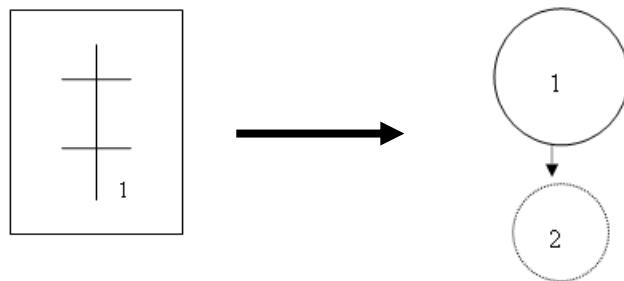


Figure 40. Structure du modèle pour un réacteur parfaitement agité ; compartiment 1= réacteur parfaitement mélangé, compartiment 2 = biomasse NB : = pales d'agitation

La matrice de transition reprenant toutes les transitions possibles entre les différents états s'écrit :

$$T = \begin{bmatrix} P_{11} & P_{12} \\ P_{21} & P_{22} \end{bmatrix}$$

Avec P_{ii} la probabilité de rester dans l'état i et P_{ij} , la probabilité d'aller de l'état i à m l'état j .

P_{12} est égale au taux de consommation du glucose. La première ligne peut être complétée grâce à la propriété suivante : la somme des probabilités d'une même ligne doit être égale à 1. P_{11} est donc égale à $1-P_{12}$. L'état 2 étant un état absorbant, P_{21} est égale à 0 et P_{22} est égale à 1.

2.1.2 Réacteur scale-down avec écoulement dispersé

Quatre états sont définis pour représenter ce réacteur: un pour la partie parfaitement mélangée et trois autres pour la partie non agitée. Un nouvel état de consommation du glucose par les cellules y est ajouté.

Résultats et discussion

Ils sont disposés de la manière suivante (figure 41) :

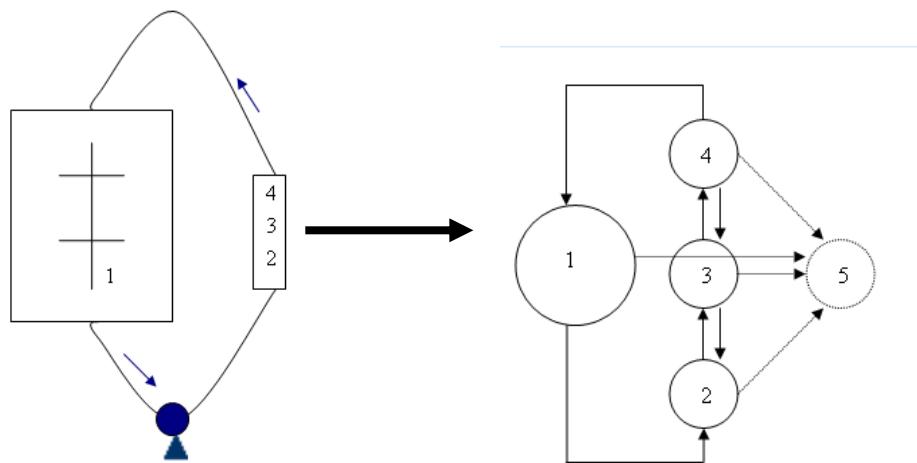


Figure 41. Structure du modèle pour un réacteur *scale-down* avec écoulement dispersé ; compartiment 1 = partie parfaitement mélangée, compartiments 2 = compartiment inférieur de la partie non agitée, compartiment 3 = compartiment intermédiaire de la partie non agitée, compartiment 4 = compartiment supérieur de la partie non agitée, compartiment 5 = biomasse

La matrice de transition du système s'écrit alors :

$$T = \begin{bmatrix} P_{11} & P_{12} & P_{13} & P_{14} & P_{15} \\ P_{21} & P_{22} & P_{23} & P_{24} & P_{25} \\ P_{31} & P_{32} & P_{33} & P_{34} & P_{35} \\ P_{41} & P_{42} & P_{43} & P_{44} & P_{45} \\ P_{51} & P_{52} & P_{53} & P_{54} & P_{55} \end{bmatrix}$$

Avec P_{ii} la probabilité de rester dans l'état i et P_{ij} la probabilité d'aller de l'état i à l'état j .

Elle peut être simplifiée en éliminant les transitions physiquement impossibles et en considérant les propriétés absorbantes de l'état 5.

$$T = \begin{bmatrix} P_{11} & P_{12} & 0 & 0 & P_{15} \\ 0 & P_{22} & P_{23} & 0 & P_{25} \\ 0 & P_{32} & P_{33} & P_{34} & P_{35} \\ P_{41} & 0 & P_{43} & P_{44} & P_{45} \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 1 \end{bmatrix}$$

Les différentes probabilités sont alors définies de la manière suivante :

- P_{12} et P_{41} sont calculées en fonction du débit de recirculation et du volume du compartiment initial.
- P_{23} , P_{34} , P_{43} et P_{32} sont déduites à partir d'expériences de traceurs.
- P_{15} , P_{25} , P_{35} et P_{45} sont égales au taux de consommation du glucose.
- les probabilités restantes sont déduites grâce à la propriété suivante : la somme des valeurs des probabilités d'une même ligne doit être égale à 1.

2.1.3 Réacteur scale-down avec écoulement piston

Il est nécessaire de définir plus de compartiments pour représenter cette partie non agitée. En effet, le glucose s'y propage selon un écoulement piston : il avance par advection sans se disperser dans la partie tubulaire. De plus grandes différences de concentration existent alors dans celle-ci. Dix compartiments sont donc définis. Deux états y sont ajoutés : un pour représenter la partie parfaitement mélangée et un pour la consommation du glucose par les cellules. La structure de modèle choisi est présentée à la figure 42.

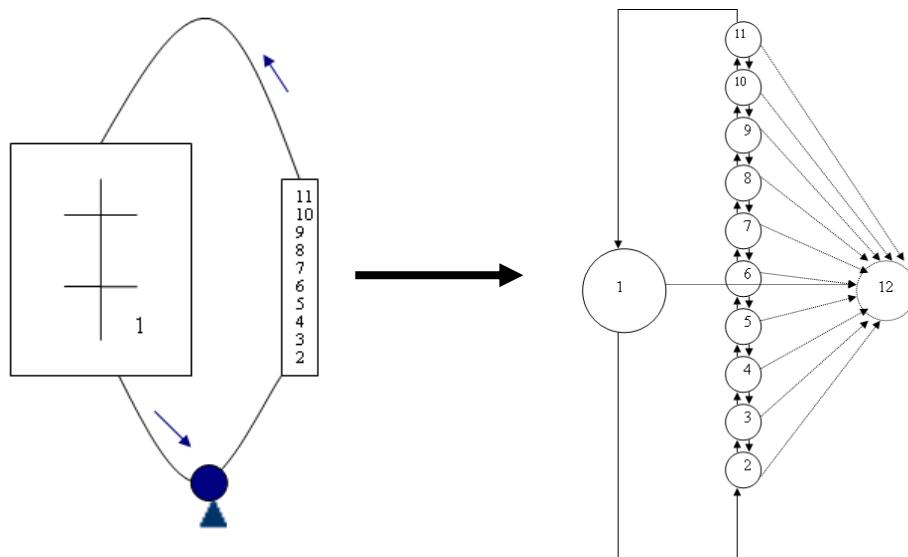


Figure 42. Structure du modèle pour un réacteur *scale-down* avec écoulement piston ; compartiment 1 = partie parfaitement mélangée, compartiments 2 à 11 = compartiments situés dans la partie non mélangée (placés dans l'ordre croissant de bas en haut), compartiment 12 = biomasse

La matrice de transition simplifiée s'écrit :

$$T = \begin{bmatrix} P_{11} & P_{12} & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & P_{22} & P_{23} & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & P_{32} & P_{33} & P_{34} & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & P_{43} & P_{44} & P_{45} & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & P_{54} & P_{55} & P_{56} & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & P_{65} & P_{66} & P_{67} & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & P_{76} & P_{77} & P_{78} & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & P_{87} & P_{88} & P_{89} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & P_{98} & P_{99} & P_{910} & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & P_{109} & P_{1010} & P_{1011} \\ P_{111} & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & P_{1110} & P_{1111} \end{bmatrix}$$

Le principe de définition des probabilités est identique à celui de la section 2.1.2.

2.2 Validation des modèles par les tests de traceurs

Les tests de traceurs ont pour but de caractériser l'écoulement au sein des deux parties non agitées. Ils sont effectués en enregistrant le mélange d'une solution de glucose colorée au bleu de méthylène dans ces deux sections au moyen d'une caméra (voir matériel et méthodes 2.2). Différents temps d'ajout du glucose ont été testés. Ces expériences permettent de définir les probabilités de déplacement du glucose dans ces parties non agitées, qui interviennent dans les modèles structurés stochastiques.

Les enregistrements recueillis sont traités grâce à un programme d'analyse d'images sur Matlab. Chaque image est découpée en différents compartiments représentant ceux utilisés par la suite dans le modèle de simulation. Pour rappel, un compartiment est une zone homogène au point de vue de la concentration en glucose. Ces compartiments sont analysés toutes les secondes afin de définir leur moyenne d'intensité dans le rouge : celle-ci diminue lorsque le bleu de méthylène s'intensifie dans le compartiment (40). La courbe résultante est normalisée et inversée afin d'obtenir une courbe similaire à celle qui serait recueillie pour l'évolution de la concentration en glucose dans les différents états. Ces courbes permettent donc de définir les probabilités d'avancement et de retour en arrière du glucose dans les parties non agitées. Ces probabilités sont correctes lorsque les courbes obtenues avec le programme de simulation des gradients de glucose générés dans les réacteurs *scale-down* sont similaires à ces courbes expérimentales. Pour ces tests, l'état de consommation du glucose par les microorganismes n'est bien sûr pas considéré.

Dans les deux situations, les probabilités de déplacement du glucose choisies sont également en accord avec les observations visuelles. Dans le premier type de partie non agitée, le glucose se disperse. C'est pourquoi elle a été appelée tout au long de ce travail « partie non agitée présentant un écoulement dispersé ».

Par contre, dans l'autre partie non agitée munie d'un mélangeur statique, la perturbation ne se disperse pas ou très peu. C'est pourquoi elle a été appelée « partie non agitée présentant un écoulement piston ».

Des images de différents moments d'enregistrements sont disponibles en annexes.

2.3 Modélisation des gradients de glucose générés dans les différents types de réacteurs

2.3.1 Comparaison des gradients générés en réacteur parfaitement mélangé et en réacteur *scale-down* avec une régulation de l'ajout du glucose en fonction du taux d'oxygène dissous

Grâce aux modèles établis, il est possible de simuler les concentrations en glucose présentes dans le réacteur de référence et dans les différentes parties des réacteurs *scale-down* (figure 43). Les temps d'ajout de glucose à insérer dans le modèle sont ceux déterminés dans la première partie expérimentale au moyen de l'enregistrement du taux d'oxygène dissous.

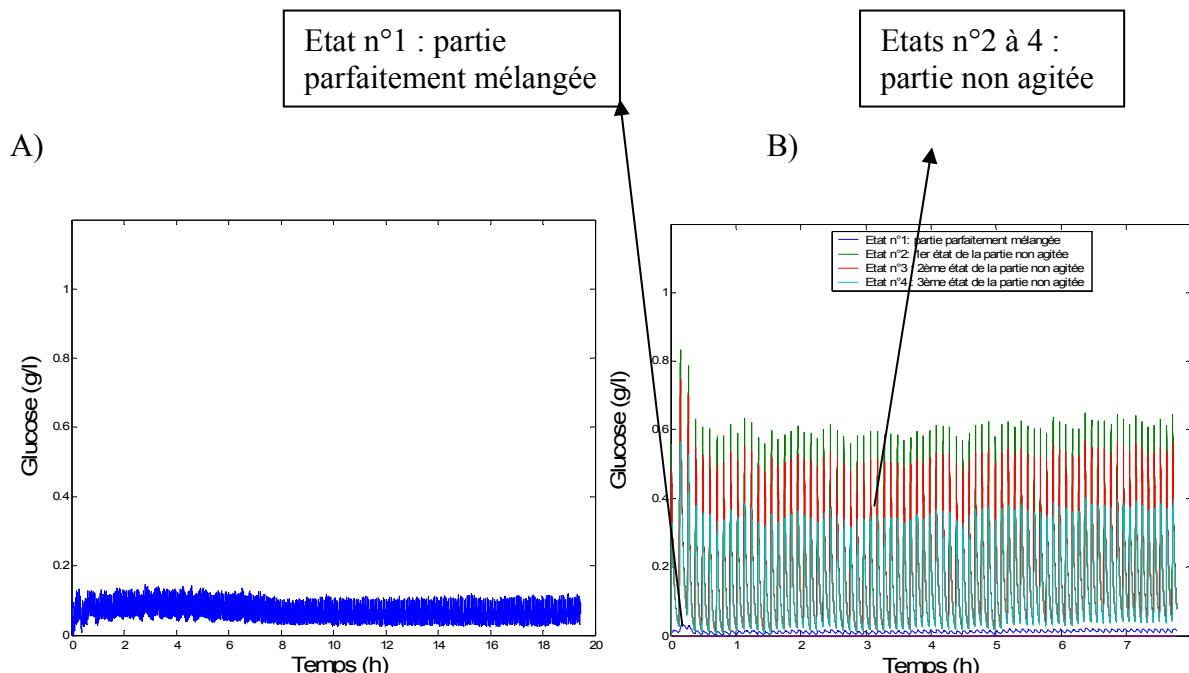


Figure 43. Comparaison des gradients générés au sein d'un réacteur parfaitement mélangé (A) et d'un réacteur *scale-down* avec écoulement dispersé (B) pour la souche BL21 NB : les états de la partie non agitée sont numérotés de bas en haut

Les cellules sont effectivement confrontées à de plus grandes concentrations en glucose dans la partie non agitée du réacteur *scale-down*.

2.3.2 Analyse de sensibilité du modèle vis-à-vis du taux de consommation du glucose.

Comme il a déjà été expliqué, le taux de consommation du glucose qui est utilisé dans les modèles est calculé sur base du suivi du taux d'oxygène dissous (voir matériel et méthodes 1.6.2.6). Or, la sonde à oxygène dissous est située dans la partie parfaitement mélangée du réacteur.

Résultats et discussion

Donc, seul le taux de consommation du glucose de cette partie est connu. Le problème ne se pose donc pas pour le réacteur de référence, constitué uniquement de cette partie parfaitement mélangée. De plus, ce taux varie au cours de la culture : le taux utilisé dans les modèles est donc une moyenne. La simulation présentée ci-dessus a donc été réalisée en considérant un taux de glucose moyen et identique dans les deux parties des réacteurs *scale-down*.

Lapin *et al.*(41) présentent une fonction de densité de probabilité pour le taux de consommation du glucose obtenue par simulation. Cette distribution est bimodale : les deux maximums sont situés à 0,004 g/s et à 0,019 g/s. Ces taux correspondent respectivement à des taux retrouvés dans des réacteurs hétérogènes et dans des réacteurs parfaitement mélangés. Les taux de consommation de glucose mesurés dans la partie parfaitement mélangée sont en accord avec celui simulé par Lapin *et al.*

La valeur de 0,004 g/s peut donc être retenue comme taux de consommation du glucose dans la partie non mélangée des réacteurs *scale-down*. Cette nouvelle simulation est comparée avec celle précédemment obtenue (figure 44).

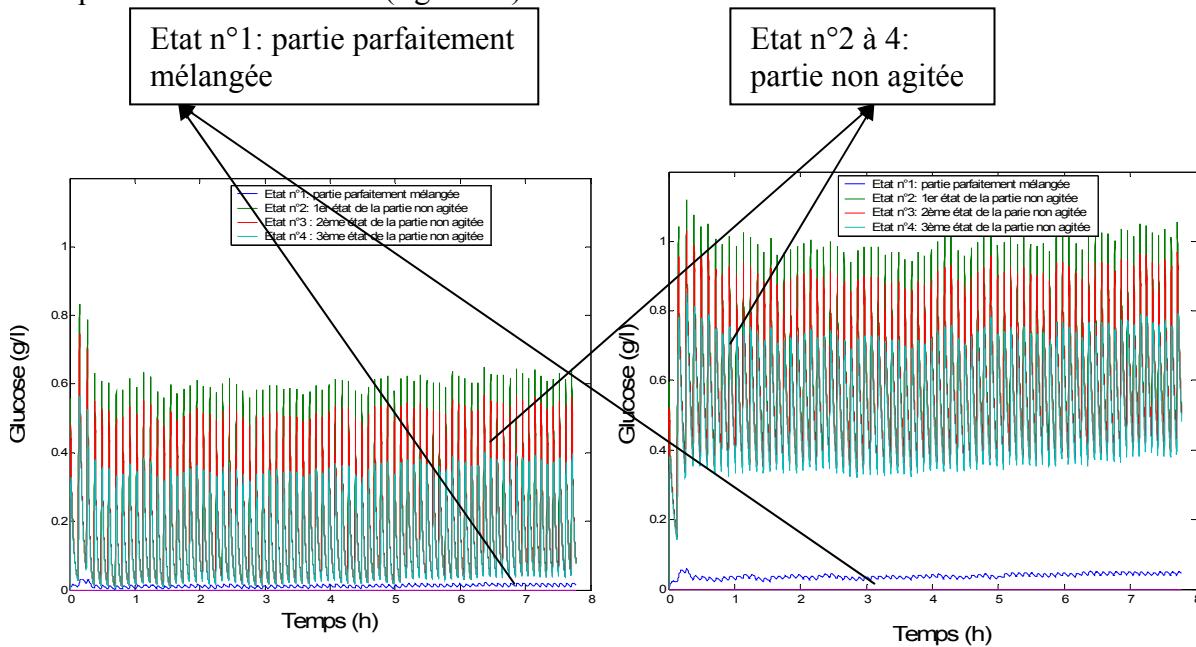


Figure 44. Comparaison des gradients en glucose générés au sein d'un réacteur *scale-down* avec écoulement dispersé (souche BL21) A) lorsque l'on considère un taux de consommation du glucose identique dans les deux parties du réacteur B) lorsque l'on considère un taux de consommation inférieur dans la partie non agitée du réacteur NB : les états de la partie non agitée sont numérotés de bas en haut

Lors de cette nouvelle simulation (figure 44B), les cellules sont exposées à de plus grands gradients de glucose. Ceci était attendu puisqu'il est considéré qu'elles consomment moins vite le glucose dans la partie non agitée.

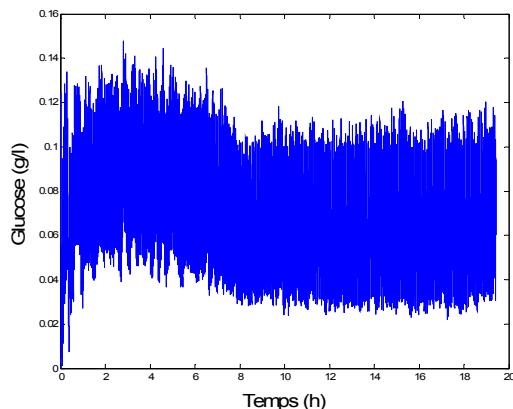
Résultats et discussion

Dans la suite de ce travail, les simulations sont réalisées avec des taux de consommation du glucose différents dans les deux parties des réacteurs *scale-down*: celui de la partie parfaitement mélangée est calculé à partir des données expérimentales (voir matériel et méthodes 1.6.2.6) tandis que celui de la section non agitée est fixé à 0,004 g/s.

2.3.3 Effet du changement de régulation sur les gradients générés au sein des réacteurs

La régulation par équation a été calculée dans le but de diminuer les gradients de glucose générés dans les réacteurs. Les simulations (figures 45, 46 et 47) permettent de vérifier si cet objectif a été atteint. Le temps d'ajout de glucose à utiliser dans le modèle est cette fois constant tout au long de la culture.

A)



B)

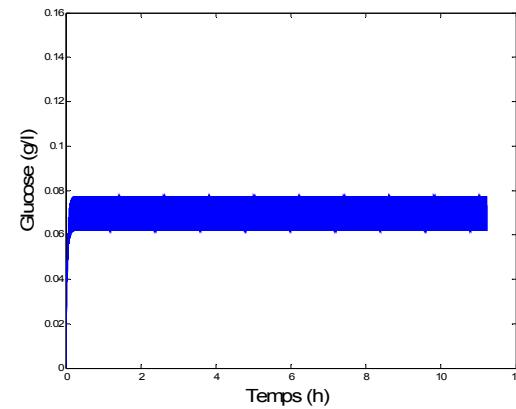
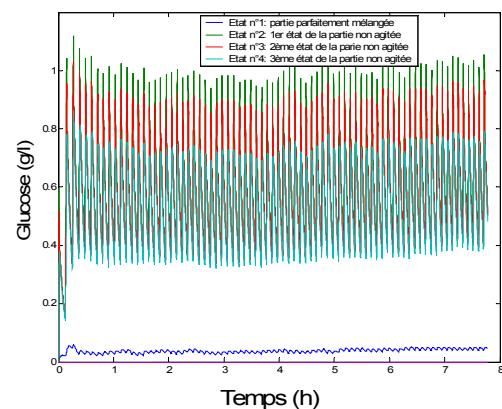


Figure 45. Comparaison des gradients générés avec les deux types de régulation dans un réacteur de référence (souche BL21) A) régulation fonction de la pression en oxygène dissous B) régulation par équation

A)



B)

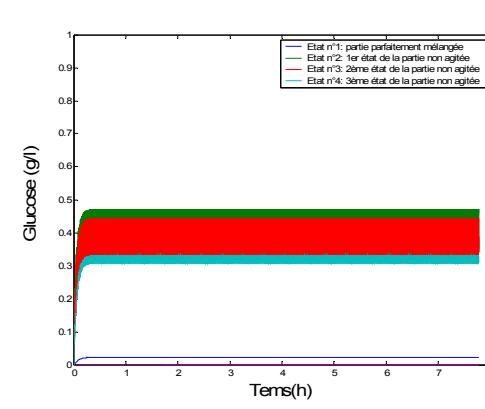


Figure 46. Comparaison des gradients générés avec les deux types de régulation dans un réacteur *scale-down* avec écoulement dispersé (souche BL21) A) régulation fonction du taux d'oxygène dissous B) régulation par équation NB : les états de la partie non agitée sont numérotés de bas en haut

Résultats et discussion

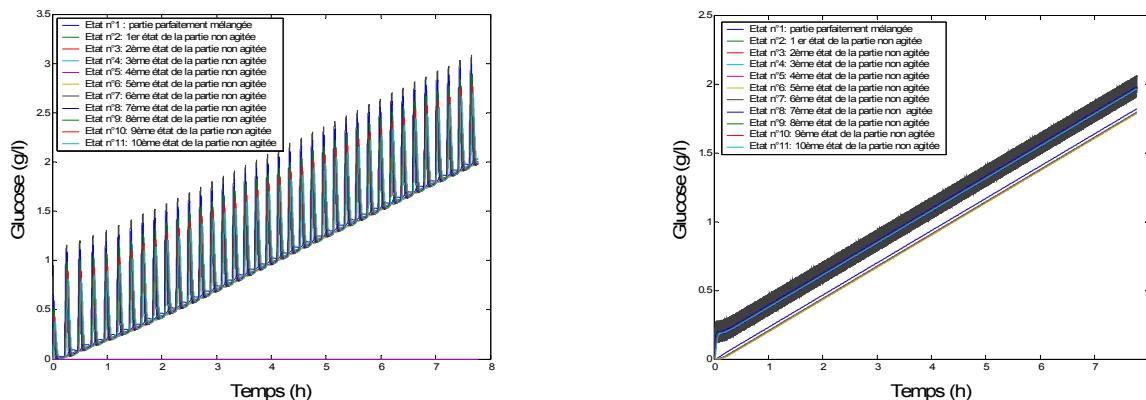


Figure 47. Comparaison des gradients générés avec les deux types de régulation dans un réacteur *scale-down* avec écoulement piston (souche BL21) A) régulation fonction du taux d'oxygène dissous B) régulation par équation NB : les états de la partie non agitée sont numérotés de bas en haut

Dans le réacteur de référence le changement de régulation permet en effet de réduire l'amplitude des concentrations en glucose générées. Il en est de même pour la partie non agitée des réacteurs *scale-down*. Cette nouvelle régulation de l'ajout de glucose répond donc de ce point de vue à nos attentes. La moyenne des concentrations en glucose est également un peu inférieure. Cependant, les résultats expérimentaux ont montré qu'elle ne permet pas d'améliorer la quantité de biomasse produite pour *Escherichia coli* BL21, peu sensible à l'excès de glucose. Comme déjà explicité, d'autres paramètres limitants existent dans ce type de réacteurs *scale-down* : il s'agit du manque en oxygène et en glucose. La simulation de la figure 46 suggère de très faibles concentrations en glucose générées dans la partie parfaitement mélangée, largement inférieures à celles rencontrées dans cette partie lors du réacteur de référence. Celles-ci ne semblent pas supérieures lors du changement de régulation (figure 46B).

La modélisation suggère une accumulation du glucose dans la partie non agitée présentant un écoulement piston. Les quantités de biomasse produites à la fin de la phase *fed-batch* sont identiques dans les deux réacteurs *scale-down* (voir tableau 8). Ceci confirme la faible sensibilité d'*Escherichia coli* BL21 face à l'excès de glucose. La nouvelle régulation par équation, réduisant l'amplitude des concentrations en glucose dans la partie non agitée, ne peut donc être satisfaisante. Cela est sans doute dû à son mécanisme de consommation de l'acétate produit. L'acétate qu'elle produit retarde sa croissance. Il est reconsummé avec un rendement inférieur à celui par glucose : 0,4 g/g au lieu de 0,52 g/g de rendement théorique par glucose. Cette reconsummation empêche cependant une accumulation importante d'acétate, hautement néfaste pour les cellules. Par contre, dans les réacteurs de référence, lors des deux types de régulation, on se situe à chaque fois à la limite du mécanisme surverse.

Conclusions

Au terme de ce travail,

- Les réacteurs *scale-down* ont été utilisés pour soumettre *Escherichia coli* BL21 à des gradients de glucose et d'oxygène dissous, tels qu'il en existe dans les réacteurs industriels. La régulation de l'ajout du glucose a été effectuée en fonction du taux d'oxygène dissous. Les résultats des tests de fermentation ont été comparés à ceux obtenus sur un réacteur de référence, parfaitement mélangé. Le milieu extracellulaire est, par conséquence, homogène. Une plus faible production de biomasse, une plus grande quantité d'acétate et un manque en glucose accru ont été observés dans les réacteurs *scale-down*. Il a été montré qu'il est possible de traiter l'aspect relatif au manque en glucose grâce à un calcul basé sur l'enregistrement du taux d'oxygène dissous. Le manque en glucose s'est avéré déterminant sur la dynamique *fed-batch* du système. Le comportement d'*Escherichia coli* BL21 a ensuite été comparé avec celui d'*Escherichia coli* K12. La dynamique *fed-batch* du système est cette fois influencée par la grande quantité d'acétate produite par cette souche. Elle est en effet incapable de reconsommer l'acétate qu'elle produit, ce qui conduit à son accumulation dans le milieu. Par ailleurs, les effets de la seule production d'acétate sur *Escherichia coli* BL21 ont été étudiés dans un réacteur parfaitement mélangé dans lequel le glucose a été apporté trop rapidement durant la phase *fed-batch*. Ces effets sont une réduction du taux maximal de croissance et un endommagement cellulaire.
- Les conditions hydrodynamiques régnant dans chaque type de réacteur ont été caractérisées grâce aux tests de traceurs. Ainsi, deux types d'écoulement peuvent être rencontrés dans la partie non agitée du système : l'écoulement dispersé et l'écoulement piston. Il a également été démontré par modélisation que les micro-organismes influencent eux-mêmes les concentrations de glucose auxquelles ils sont soumis, via la consommation du glucose.
- La modélisation s'est avérée complémentaire à la réalisation des cultures en bioréacteurs. Elle ne peut toutefois les remplacer. Il est en effet difficile de prévoir le comportement d'un micro-organisme face à un type de gradients de glucose rencontré. La régulation de l'ajout de glucose par équation mise au point dans ce travail est efficace à petite échelle. Elle permet de réduire l'amplitude des concentrations présentes dans la partie non agitée du système du système *scale-down*. L'extrapolation

Conclusions et perspectives

du procédé, étudiée dans ces réacteurs *scale-down*, n'est cependant pas améliorée pour *Escherichia coli* BL21 par rapport aux résultats obtenus avec une régulation de l'ajout de glucose en fonction du taux en oxygène dissous. Il est toutefois possible que ce type de régulation soit efficace lors de la conduite de cultures d'autres micro-organismes, plus sensibles à l'excès de glucose. En effet, il a été montré dans un précédent travail que l'amplitude des concentrations rencontrées par les micro-organismes dans la partie non agitée du système pouvait être déterminante sur les pertes de production (39). Il s'agit toujours d'effectuer une première culture du micro-organisme choisi en utilisant une régulation de l'ajout du glucose en fonction du taux en oxygène dissous. Puis grâce aux données récoltées, de recalculer les temps d'activation et de désactivation de la pompe de cette régulation par équation afin de répartir l'ajout de glucose.

Perspectives

Plusieurs points restent à aborder :

- La nouvelle souche recombinante construite dans l'unité de biologie moléculaire permettra d'étudier l'effet de l'extrapolation du procédé sur la production d'une protéine recombinante. L'induction de la protéine réalisée dans les réacteurs *scale-down* sera comparée à celle réalisée dans un réacteur de référence. Le graphique ci-dessous présente le suivi de la synthèse protéique lors d'un réacteur de référence. Les analyses ont été effectuées par cytométrie en flux.

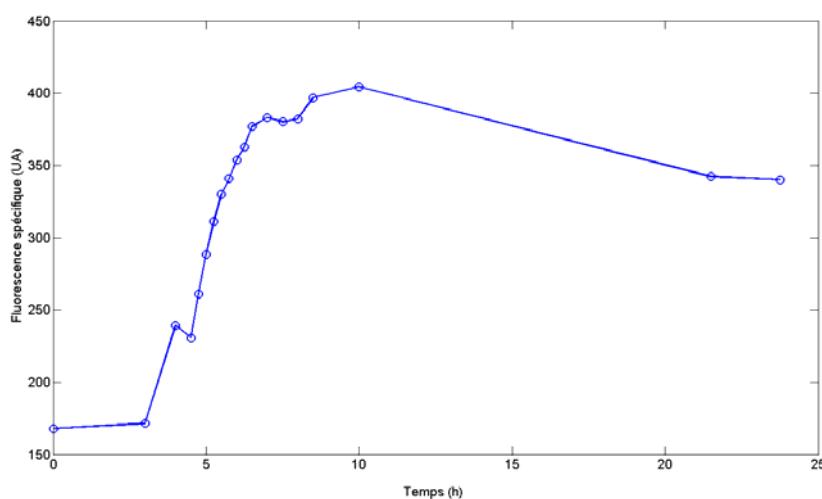


Figure 48. Suivi de la fluorescence moyenne par cellule au cours du temps lors d'un réacteur de référence avec une régulation de l'ajout de glucose par équation, induction à l'IPTG.

Conclusions et perspectives

- Dans le cadre de l'étude de la synthèse protéique, la GFP(*Green fluorescent protein*), fusionnée à la protéine d'intérêt, pourrait être suivie par une autre méthode que la cytométrie en flux. En effet, il existe des sondes optiques qui permettent de suivre *on-line* la synthèse protéique (42,43). Les données sont disponibles continuellement et sans avoir recours à un échantillonnage invasif. Il serait alors possible de déterminer en temps réel la durée durant laquelle la protéine est produite, et donc le moment auquel le réacteur peut être arrêté.
- La GFP peut aussi être utilisée pour l'étude d'autres paramètres que la synthèse protéique. Par exemple, pour l'étude de stress tel que le manque en glucose (44). La GFP doit alors être fusionnée au gène de stress pour servir d'indicateur de stress. Il existe plusieurs GFP mutantes qui ont des spectres distincts d'excitation et d'émission(45). Il serait donc possible de suivre simultanément l'expression de plusieurs gènes de stress dans le réacteur grâce à des sondes optiques multi-longueurs d'ondes.
- Un réacteur *scale-down* permet de simuler les conditions hydrodynamiques présentes dans un réacteur industriel de taille donnée. Grâce aux modèles stochastiques structurés, il serait possible d'établir un lien entre un réacteur *scale-down* et la taille du réacteur industriel qu'il permet de représenter. Le meilleur moyen de faire le parallélisme entre eux est l'étude des concentrations de glucose rencontrées par les cellules lors de leur déplacement dans chaque réacteur. La circulation des micro-organismes peut être simulée par la procédure de Monté carlo (voir partie bibliographique 3.3). La matrice de transition utilisée dans cette procédure est identique à celle utilisée pour simuler les concentrations en glucose. Cependant, il est nécessaire de définir un grand nombre de compartiments pour représenter les réacteurs industriels. Il devient rapidement difficile de construire manuellement les matrices de transition correspondantes. Un programme est actuellement en cours d'élaboration pour générer automatiquement les matrices de transition à partir du nombre d'étages d'agitation présents dans le réacteur et du nombre de compartiments souhaités par étage d'agitation.

Références bibliographiques

1. Lee S.Y., (1996). High cell-density culture of *Escherichia coli*. *Tibtech* **14**, 98-105.
2. Shiloach J., Fass R., (2005). Growing *E.coli* to high cell density- A historical perspective on method development. *Biotechnology advances* **23**, 345-357.
3. Thonart P., (2006-2007). *Industries d'extraction et de fermentation : 1^{ère} partie*.
4. Prescott L.M., Harley J.P., Keein D.A., (1995). *Microbiologie*.2ed. Bruxelles: De Boeck Université, 1014.
5. Delvigne F., (2006).*Etude de l'impact des conditions hydrodynamiques du bio-réacteur sur la conduite et l'extrapolation des bioprocédés*, in *Unité de bio-industries*. Faculté universitaire des sciences agronomiques de Gembloux, 236.
6. Enfors S.O., Jahic M., Rozkov A., Xu B., Hecker M., Jürgen B., Krüer E., Schweder T., Hamer G., O’Beirne D., Noisommit-Rizzi N., Reuss M., Boone L., Hewitt C., McFarlane C., Nienow A., Kovacs T., Trägardh C., Fuchs L., Revstedt J., Friberg P.C., Hjertager B., Blomsten G., Skogman H., Hjort S., Hoeks F., Lin H.Y., Neubauer P., Van der Lans R., Luyben K., Vrabel P., Manelius A., (2000). Physiological responses to mixing in large scale bioreactors. *Journal of biotechnology* **85**, 175-185.
7. Eiteman M., Altman E., (2006). Overcoming acetate in *Escherichia coli* recombinant protein fermentations. *Trends in biotechnology* **24**(11), 530-536.
8. Xu B., Jahic M., Blomsten G., Enfors S.O., (1999). Glucose overflow metabolism and mixed-acid fermentation in aerobic large-scale *fed-batch* processes with *Escherichia coli*. *Applied microbiology and biotechnology* **51**, 564-571.
9. Booth I.R., (2002). Stress and the single cell: Intrapopulation diversity is a mechanism to ensure survival upon exposure to stress. *International journal of food microbiology* **78**, 19-30.

Références bibliographiques

10. Aersten A., Michiels C., (2004). Stress and how bacteria cope with death and survival. *Critical reviews in microbiology* **30**, 263-273.
11. Sundstöm H., Wallberg F., Ledung E., Hewitt C., (2004). Segregation to non-dividing cells in recombinant *Escherichia coli* fed-batch fermentation processes. *Biotechnology letters* **26**, 1533-1539.
12. Quirós C., Herrero M., Díaz M., (2007). Application of flow cytometry to segregated kinetic modelling based on the physiological states of microorganisms. *Applied and environmental microbiology* **73**(12), 3993-4000.
- 13 Ropers D., Jong H., Page M., Schneider D., Geiselmann J., (2005). Qualitative simulation of the carbon starvation response in *Escherichia coli*. *Biosystems* **84**, 124-152.
14. Panda A.K., (2003). Bioprocessing of therapeutic proteins from the inclusion bodies of *Escherichia coli*. *Advances in biochemical engineering/biotechnology* **85**, 43-93.
15. Lee J., Lee S., Park S., Middelberg A., (1999). Control of fed-batch fermentations. *Biotechnology advances* **17**, 29-48.
16. Van Kleeff B.H.A., Kuenen J.G., Honderd G., Heijnen J.J., (1998). Using heat-flow measurements for the feed control of a fed-batch fermentation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Thermochimica acta* **309**, 175-180.
17. Bruxel mane Delvosalle C., (1986). *Mixing in biological treatment systems*. 4ed. CRC Press, 138.
18. Thonart P.(2005-2006), *Génie industriel alimentaire et ingénierie agro-alimentaire : 1^{ère} partie*.
19. Wise D.L, (1987). *Global bioconversions (volume IV)*. Floride:CRC Press, 137.
20. Nienow A.W, (1998). Hydrodynamics of stirred bioreactors. *Applied mechanics review* **51**(1), 3-32.

Références bibliographiques

21. Lara A., Galindo E., Ramirez O., Palomares L., (2006).Living with heterogeneities in bioreactors. *Molecular biotechnology* **34**, 355-381.
22. Junker B., (2004).Scale-up methodologies for *Escherichia coli* and yeast fermentation processes. *Journal of bioscience and bioengineering* **97**(6), 347-364.
23. Schmidt F.R., (2005). Optimization and scale up of industrial fermentation processes. *Applied microbiology and biotechnology* **68**, 425-435.
24. Kwannim J.J, (1989). *Scale-down* techniques for fermentation. *Biopharmacy*, 30-39.
25. Zahradník J., Mann R., Fialová M., Vlaev D., Vlaev S.D., Lossev ., Seichter P., (2001). A networks-of-zones analysis of mixing and mass transfer in three industrial bioreactors. *Chemical engineering science* **56**, 485-492.
26. Hristov H., Mann R., Lossev V., Vlaev S.D., Seichter P., (2001). A 3-D analysis of gas-liquid mixing, mass transfer and bioreaction in a stirred bio-reactor.*Transactions of the institution of chemical engineers* **79**, 232-241.
27. Berthiaux H., Dodds J., (1999). Modeling classifier networks by Markov chains.*Powder technology* **105**, 266-273.
- 28.Claudel S., Fonteix C., Leclerc J.P., Lintz H.G., (2003). Application of the possibility theory to the compartment modelling of flow pattern in industrial processes. *Chemical engineering science* **58**, 4005-4016.
29. De Andrade Lima L.R.P., Hodouin D., (2004). Residence time distribution of an industrial mechanically agitated cyanidation tank. *Minerals engineering* **18**, 613-621.
30. Vrábel P., Van der Lans R., Van der Schot F., Luyben K., Xu B., Enfors S., (2000). CMA: integration of fluid dynamics and microbial kinetics in modelling of large-scale fermentations. *Chemical engineering journal* **84**, 463-474.

Références bibliographiques

31. Delvigne F., Destain J., Thonart P.. Characterization of the environmental conditions experienced by *Escherichia coli* in a controlled *fed-batch* process: incorporation of stochastic events associated with bioreactor hydrodynamic imperfections. *soumis*
32. Xu B., Jahic M., Enfors S., (1999). Modeling of overflow metabolism in *batch* and *fed-batch* cultures of *Escherichia coli*. *Biotechnology progress*. **15**, 81-90.
- 33 Lin H.Y., Neubauer P., (2000). Influence of controlled glucose oscillations on a *fed-batch* process of recombinant *Escherichia coli*. *Journal of biotechnology* **79**, 27-37.
34. Holms H., (1996). Flux analysis and control of the central metabolic pathways in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology reviews* **19**, 85-116.
35. Berney M., Hammes F., Bosshard F., Weilenmann H-U, Egli T., (2007). Assessment and interpretation of bacterial viability by using the live/dead backlight kit in combination with flow cytometry. *Applied and environmental microbiology* **73** (10), 3283-3290.
36. Bylund F., Castan A., Mikkola R., Veide A., Larsson G., (2000). Influence of scale-up on the quality of recombinant human growth hormone. *Biotechnology and bioengineering* **69** (2), 119-128.
37. Gigot C., (2005). *Etude de l'extrapolation des bioréacteurs agités par une approche structurée et mise au point d'un réacteur de type scale-down in Unité de bio-industries*. Faculté universitaire des sciences agronomiques de Gembloux, 76.
38. Phue Je-Nie, Shiloach J., (2004). Transcription levels of key metabolic genes are the cause for different glucose utilization pathways in *E.coli* B (BL21) and *E.coli* K (JM109). *Journal of biotechnology* **109** , 21-30.
39. Annick L.,(2006). *Etude de l'effet scale-down sur la production de saccharomyces cerevisiae (boulardii)*, in *unité de bio-industries*. Faculté universitaire des sciences agronomiques de Gembloux, 75.

Références bibliographiques

40. Blood P.J., Denyer J.P., Azzopardi B.J., Poliakoff M., Lester E., (2004). A versatile flow visualisation technique for quantifying mixing in a binary system: application to a continuous supercritical water hydrothermal synthesis (SWHS). *Chemical engineering science* **59**, 2853-2861.
41. Lapin A., Schmid J., Reuss M., (2006). Modeling the dynamics of *E.coli* populations in the three-dimensional turbulent field of a stirred-tank bioreactor- A structured-segregated approach. *Chemical engineering science* **61**, 4783-4797.
42. DeLisa M.P., Chae H.J., Weigand W.A., Valdes J.J., Rao G., Bentley W.E.,(2001). Generic model control of induced protein expression in high cell density cultivation of *Escherichia coli* using on-line GFP-fusion monitoring. *Bioprocess and biosystems engineering* **24**, 83-91.
43. DeLisa M.P., Jincai L., Rao G., Weigand W.A., Bentley W.E., (1999). Monitoring GFP-operon fusion protein expression during high cell density cultivation of *Escherichia coli* using an on-line optical sensor. *Biotechnology and bioengineering* **65** (1), 54-64.
44. March J.C., Rao G., Bentley W.E., (2003). Biotechnological applications of green fluorescent protein. *Applied microbiology and biotechnology* **62**, 303-315.
45. Jones Jo J., Bridges A.M., Fosberry A.P., Gardner S., Lowers R.R., Newby R.R., James P.J, Hall R.M., Jenkins O., (2004). Potential of real-time measurement of GFP-fusion proteins. *Journal of biotechnology* **109**, 201-211.

1. Les suivis de culture

1.1 Culture de référence pour *Escherichia coli* BL21, régulation en fonction du taux en oxygène dissous

Echantillon	Heure	DO (600 nm)	N (rpm)	G (vvm)	Surpression (bar)	Comptage	Viabilité	Protéines	Glucose (g/l)	Acétate (g/l)
P	10h15	2,200				Non	non	Non		
1	10h15	0,305	378	20	0,1	Non	non	Non	0,13	
2	11h20	0,469	378	20	0,1	Non	non	Non	0,025	1,18
3	13h20	3,225	461	40	0,5	Non	non	Non	0,007	
4	15h	3,410	461	40	0,5	Non	non	Non	0,023	
5	16h	9,460	461	40	0,5	Oui	non	Non	0,019	
6	18h10	12,180	461	40	0,5	Non	non	Non	0,057	0,315
7	19h10	16,200	461	40	0,5	Oui	non	Non	0,041	
8	8h35	30,000	461	40	0,5	Non	non	Non	0,042	0,063
9	10h30	29,700	461	40	0,5	Oui	non	non	0,032	0,042
10	11h55	30,000	461	40	0,5	Non	non	non	0,033	0,033
11	13h15	32,000	461	40	0,5	Non	oui	oui	0,035	0,047
12	16h40	33,000	461	40	0,5	Non	non	oui	0,052	
13	9h	32,700	461	40	0,5	Non	oui	oui	0,045	
14	13h15	31,300	461	40	0,5	Non	oui	oui	0,046	
15	16h20	32,800	461	40	0,5	Non	oui	oui	0,049	0,033

Augmentation du débit d'air, de la vitesse d'agitation et de la pression à 13h15.

Lancement du *fed-batch* à 14h50.

Induction de la protéine à 13h20 le lendemain

Annexes

1.2 Culture scale-down avec écoulement dispersé n°1 pour *Escherichia coli* BL21, régulation en fonction du taux en oxygène dissous

Echantillon	Heure	DO (600 nm)	N (rpm)	G (vvm)	surpression (bar)	Comptage	Viabilité	Glucose (g/l)	Acéate (g/l)
P	10h25	1,940				non	Non		
1	10h25	0,265	378	20	0,1 bar	non	Non	0,161	
2	11h50	0,545	378	20	0,1 bar	non	Non	0,016	1,148
3	13h20	1,780	378	20	0,1 bar	non	Non	0,023	
4	14h55	4,550	461	40	0,5 bar	non	Non	0,01	
5	16h05	6,700	461	40	0,5 bar	oui	Oui	0,048	
6	18h	8,920	461	40	0,5 bar	non	Non	0,06	0,205
7	19h	12,000	461	40	0,5 bar	oui	Oui	0,059	
8	19h55	12,350	461	40	0,5 bar	non	Non	0,077	
9	8h45	16,600	461	40	0,5 bar	non	Non	0,044	0,17
10	10h	23,200	461	40	0,5 bar	non	Non	0,043	
11	11h	23,100	461	40	0,5 bar	oui	Oui	0,04	
12	13h20	23,200	461	40	0,5 bar	non	Non	0,036	
13	14h50	25,750	461	40	0,5 bar	oui	Oui	0,035	
14	16h45	25,800	461	40	0,5 bar	non	Non	0,032	0,219

Augmentation du débit d'air, de la vitesse d'agitation et de la pression à 13h50
 Lancement du *fed-batch* à 16 h

Annexes

1.3. Culture scale-down avec écoulement dispersé n°2 pour *Escherichia coli* BL21, régulation en fonction du taux en oxygène dissous

Echantillon	Heure	DO 600 (nm)	N (rpm)	G (vvm)	Surpression(bar)	Comptage	Viabilité	Protéines	Glucose (g/l)	Acétate (g/l)
P	10h	1,500				non	non	Non		
1	10h	0,323	378	20	0,1 bar	non	non	Non	0,155	
2	11h20	0,617	378	20	0,1 bar	non	non	Non	0,004	
3	13h15	2,445	378	20	0,1 bar	non	non	Non	0,011	1,425
4	14h55	4,200	461	40	0,5 bar	non	non	Non	0,012	
5	16h	9,160	461	40	0,5 bar	oui	non	Non	0,012	
6	18h	11,600	461	40	0,5 bar	non	non	Non	0,045	0,207
7	19h10	12,750	461	40	0,5 bar	oui	non	Non	0,053	
8	00h30	18,300	461	40	0,5 bar	non	non	Non	0,06	0,281
9	8h35	24,000	461	40	0,5 bar	non	non	Non	0,035	0,153

Augmentation du débit d'air, de la vitesse d'agitation et de la pression à 13h30

Lancement du *fed-batch* à 15h20

1.4. Culture scale-down avec écoulement dispersé n°3 pour *Escherichia coli* BL21, régulation en fonction du taux en oxygène dissous

Echantillon	Heure	DO (600 nm)	N (rpm)	G (vvm)	surpression (bar)	Comptage	Viabilité	Protéine	Glucose (g/l)	Acéate (g/l)
P	10h45	1,560				non	Non	non		
1	10h45	0,233	378	20	0,1	non	Non	non	0,103	
2	12h05	0,525	378	20	0,1	non	Non	non		1,379
3	13h15	1,890	461	40	0,5	non	Non	non	0,012	
4	14h45	4,680	461	40	0,5	non	Non	non		
5	16h15	6,460	461	40	0,5	non	Non	non		
6	17h15	8,300	461	40	0,5	oui	Non	non		
7	18h45	9,040	461	40	0,5	non	Non	non	0,058	0,177
8	19h45	9,320	461	40	0,5	oui	Non	non		
9	00h00	15,250	461	40	0,5	non	Non	non	0,077	
10	8h40	21,600	461	40	0,5	non	Non	non		
11	10h50	23,600	461	40	0,5	oui	Non	non	0,052	0,174
12	13h30	22,350	461	40	0,5	non	Non	non		
13	16h05	23,250	461	40	0,5	non	Non	non	0,068	
14	18h50	23,350	461	40	0,5	non	Non	non		
15	20h20	24,100	461	40	0,5	oui	Oui	oui		0,115
16	23h30		461	40	0,5	non	Non	oui	0,071	
17	14h	24,500	461	40	0,5	non	Oui	oui		
18	20h20	26,850	461	40	0,5	oui	Oui	oui	0,059	0,040

Augmentation du débit d'air, de la vitesse d'agitation et de la pression A 13h10

Lancement du *fed-batch* à 16h05

Induction de la protéine à 20h20 le lendemain

1.5 Culture scale-down avec écoulement piston pour *Escherichia coli* BL21, régulation en fonction du taux en oxygène dissous

Echantillon	Heure	DO (600 nm)	N (rpm)	G (vvm)	surpression (bar)	Comptage	Viabilité	Protéines	Glucose (g/l)	Acétate (g/l)
P	10h30	1,74				non	Non	Non		
1	10h30	0,241	378	20	0,1	non	Non	Non	0,148	
2	11h45	0,405	378	20	0,1	non	Non	Non	0,025	1,098
3	12h20	0,564	378	20	0,1	non	Non	Non	0,038	
4	13h40	1,93	378	20	0,1	non	Non	Non		
5	15h20	5,4	461	40	0,5	non	Non	Non	0,036	
6	16h45	8,42	461	40	0,5	oui	Non	Non	0,069	
7	18h25	11,68	461	40	0,5	non	Non	Non	0,095	0,418
8	19h35	14,25	461	40	0,5	oui	Non	Non		
9	00h10	20,25	461	40	0,5	non	Non	Non	0,084	
10	8h25	23,65	461	40	0,5	non	Non	Non	0,077	0,266
11	10h40	24,8	461	40	0,5	oui	Oui	Oui	0,065	
12	13h35	25,85	461	40	0,5	oui	Non	Oui	0,052	0,211
13	16h35	26,05	461	40	0,5	non	Oui	Oui		
14	9h10	26	461	40	0,5	non	Oui	Oui	0,1	
15	13h10	24,95	461	40	0,5	oui	Oui	Oui	0,109	0,028

Augmentation du débit d'air, de la vitesse d'agitation et de la pression à 14h05

Lancement du *fed-batch* à 16h05

Induction de la protéine à 14h le lendemain

Annexes

1.6 Culture de référence pour *Escherichia coli* BL21 où le glucose a été ajouté trop rapidement

Echantillon	Heure	DO (600nm)	N (rpm)	G (vvm)	surpression (bar)	Comptages	Viabilité	Acétate (g/l)
P	10h10	1,560				Non	non	
1	10h10	0,322	378	20	0,1	Non	non	
2	11h45	0,706	378	20	0,1	Non	non	1,31
3	13h40	2,855	461	40	0,5	Non	non	
4	15h50	5,430	461	40	0,5	Non	non	
5	17h	7,040	461	40	0,5	Non	non	
6	18h	9,240	461	40	0,5	Oui	non	1,27
7	21h10	15,050	461	40	0,5	Non	non	
8	00h	17,500	461	40	0,5	Non	non	7,39
9	8h50	19,350	461	40	0,5	Non	non	19,95
10	10h10	18,700	461	40	0,5	Oui	oui	
11	13h30	17,800	461	40	0,5	Non	non	
12	6h	22,000	461	40	0,5	Non	oui	
13	11h	21,250	461	40	0,5	Oui	oui	0,034

Augmentation du débit d'air, de la vitesse d'agitation et de la pression à 13h40

Lancement du *fed-batch* à 16h40

Induction de la protéine le lendemain à 10h15

Annexes

1.7 Culture de référence pour *Escherichia coli* BL21, régulation par équation

Echantillon	Heure	DO (600 nm)	N (rpm)	G (vvm)	surpression (bar)	Comptage	Viabilité	Glucose (g/l)	Acétate (g/l)
P	10h	1,88				non	non		
1	10h	0,338	378	20	0,1	non	non	0,174	
2	11h40	0,606	378	20	0,1	non	non		1,12
3	13h40	3,42	461	40	0,5	non	non	0,012	
4	15h30	5,89	461	40	0,5	non	non		
5	16h30	9,08	461	40	0,5	oui	non	0,062	
6	18h20	10,98	461	40	0,5	non	non		0,087
7	19h45	14,95	461	40	0,5	oui	non	0,07	
8	00h	19,3	461	40	0,5	non	non		
9	8h30	27,7	461	40	0,5	non	non		0,109
10	11h10	25,5	461	40	0,5	non	non	0,029	
11	12h	27,6	461	40	0,5	non	non		
12	15h15	28,25	461	40	0,5	oui	oui	0,043	0,107

Augmentation du débit d'air, de la vitesse d'agitation et de la pression à 13h40
 Lancement du *fed-batch* à 15h15

Annexes

1.8 Culture scale-down avec écoulement dispersé pour *Escherichia coli* BL21, régulation par équation

Echantillon	Heure	DO (600 nm)	N (rpm)	G (vvm)	surpression (bar)	Comptages	Viabilité	Glucose (g/l)	Acétate (g/l)
P	10h15	1,770				non	Non		
1	10h15	0,266	378	20	0,1	non	Non	0,151	
2	11h45	0,571	378	20	0,1	non	Non		1,2
3	13h45	3,025	461	40	0,5	non	Non	0,004	
4	15h45	5,895	461	40	0,5	non	Non		
5	18h25	8,593	461	40	0,5	oui	Non	0,003	
6	20h45	13,567	461	40	0,5	oui	Non		
7	23h	16,300	461	40	0,5	non	Non	2,53	0,515
8	9h30	22,689	461	40	0,5	non	Non		
9	11h45	21,525	461	40	0,5	non	Non	0,095	0,616
10	14h30	24,117	461	40	0,5	non	Non		
11	17h40	24,500	461	40	0,5	oui	Oui	0,08	0,416

Augmentation du débit d'air, de la vitesse d'agitation et de la pression à 13h40

Lancement du *fed-batch* à 16h50

1.9 Culture scale-down avec écoulement piston pour *Escherichia coli* BL21, régulation par équation

Echantillon	Heure	DO (600 nm)	N (rpm)	G (vvm)	Surpression (bar)	Comptages	Viabilité	Glucose (g/l)	Acétate (g/l)
P	10h30	1,830				non	Non		
1	10h30	0,250	378	20	0,1	non	Non	0,131	
2	12h10	0,514	378	20	0,1	non	Non		1,4
3	13h50	2,445	461	40	0,5	non	Non	0,011	
4	16h05	6,240	461	40	0,5	non	Non		
5	17h	8,240	461	40	0,5	non	Non	0,087	
6	19h15	12,100	461	40	0,5	oui	Non		1,42
7	21h30	15,200	461	40	0,5	oui	Non	0,068	
8	23h55	17,850	461	40	0,5	non	Non		
9	8h40	24,700	461	40	0,5	non	Non		
10	9h30		461	40	0,5	non	Non	0,069	1,27
11	11h30	24,820	461	40	0,5	non	Non		
12	13h10	23,930	461	40	0,5	oui	Non	0,077	
13	16h45	24,170	461	40	0,5	oui	Oui		3,09

Augmentation du débit d'air, de la vitesse d'agitation et de la pression à 13h40

Lancement du *fed-batch* à 16h50

1.10 Culture de référence pour *Escherichia coli* K12, régulation en fonction du taux d'oxygène dissous

Ech	Heure	DO (600 nm)	N (rpm)	G (vvm)	surpression (bar)	Comptage	Viabilité	Glucose (g/l)	Acéate (g/l)
P	10h	2,620				non	non		
1	10h	0,346	378	20	0,1	non	non	0,129	
2	11h10	0,620	378	20	0,1	non	non	0,007	1,48
3	12h	1,215	378	20	0,1	non	non	0,009	
4	13h20	3,830	461	40	0,5	non	non	0,023	
5	15h15	7,600	461	40	0,5	non	non	2,25	
6	16h10	9,320	461	40	0,5	oui	oui	0,028	0,595
7	18h10	11,500	461	40	0,5	non	non	0,071	
8	19h05	14,600	461	40	0,5	oui	oui	0,079	0,573
9	8h40	22,500	461	40	0,5	non	non	0,032	0,534
10	11h15	24,450	461	40	0,5	oui	oui	0,027	
11	13h20	25,150	461	40	0,5	non	non	0,01	
12	15h15	25,450	461	40	0,5	oui	oui	0,013	
13	16h45	26,000	461	40	0,5	non	non	0,01	0,629

Augmentation du débit d'air, de la vitesse d'agitation et de la pression à 13h15

Lancement du *fed-batch* à 15h10

1.11 Culture scale-down avec écoulement dispersé pour *Escherichia coli* K12, régulation fonction du taux en oxygène dissous

Ech	Heure	DO (600 nm)	N (rpm)	G (vvm)	surpression (bar)	Comptage	Viabilité	Glucose (g/l)	Acétate (g/l)
P	10h10	3,15				Non	non		
1	10h10	0,323	378	20	0,1	Non	non	0,133	
2	11h15	0,692	378	20	0,1	Non	non	0,14	2,18
3	12h05	1,465	378	20	0,1	Non	non	0,019	
4	14h	5,04	461	40	0,5	Non	non	0,017	1,1
5	15h15	7,68	461	40	0,5	Oui	oui	0,822	
6	17h	10,64	461	40	0,5	Non	non	0,008	1,07
7	18h55	16	461	40	0,5	oui	oui	0,018	2,26
8	8h45	17,75	461	40	0,5	oui	oui	0,05	18

Augmentation du débit d'air, de la vitesse d'agitation et de la pression à 13h25

Lancement du *fed-batch* à 15h15

2. Etude de la dynamique *fed-batch* lors de la régulation de l'ajout de glucose en fonction du taux en oxygène dissous

2.1 *Escherichia coli* BL21

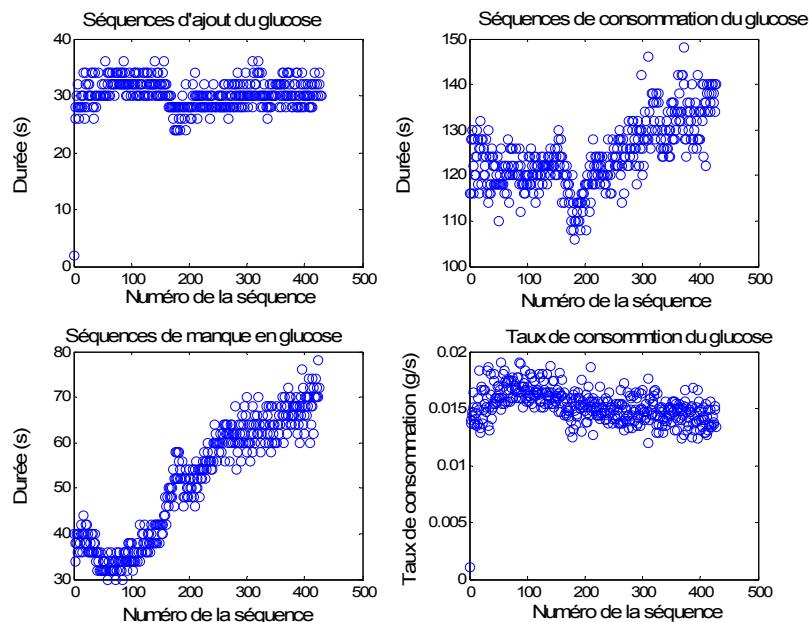


Figure 1. Calcul des séquences d'ajout du glucose, de consommation du glucose, de manque en glucose et du taux de consommation de glucose pour la culture de référence réalisée avec la souche BL21

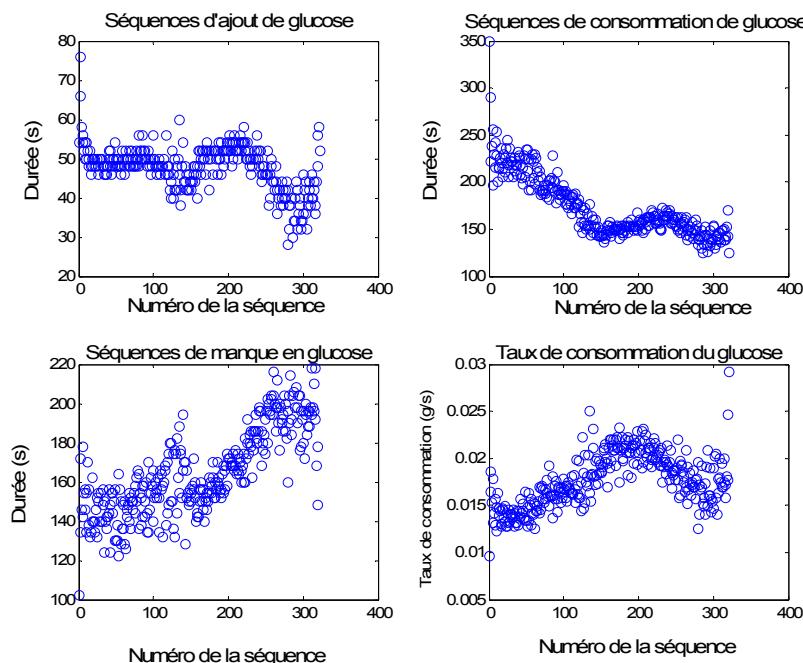


Figure 2. Calcul des séquences d'ajout du glucose, de consommation du glucose, de manque en glucose et du taux de consommation de glucose pour la culture *scale-down* avec écoulement dispersé réalisé avec la souche BL21

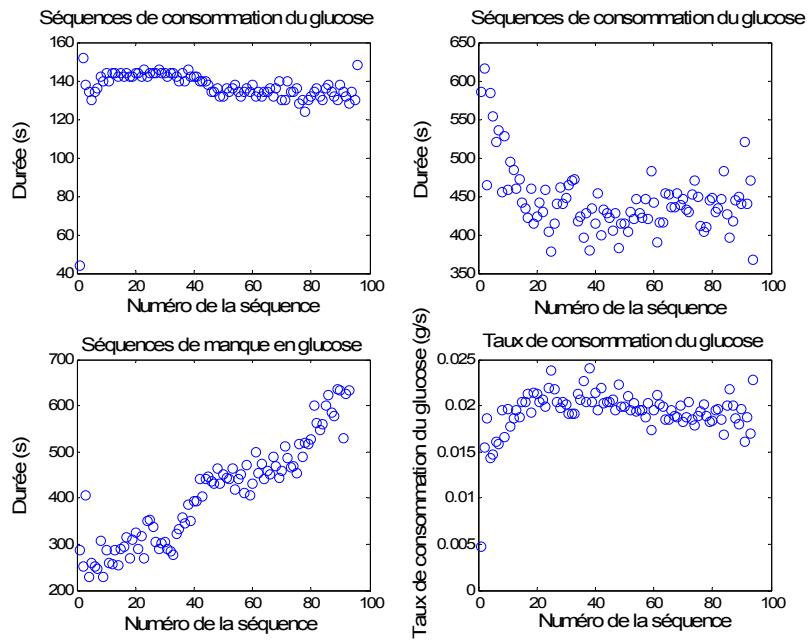


Figure 3.Calcul des séquences d'ajout du glucose, de consommation du glucose, de manque en glucose et du taux de consommation de glucose pour la culture *scale-down* avec écoulement piston réalisée avec la souche BL21

2.2 *Escherichia coli K12*.

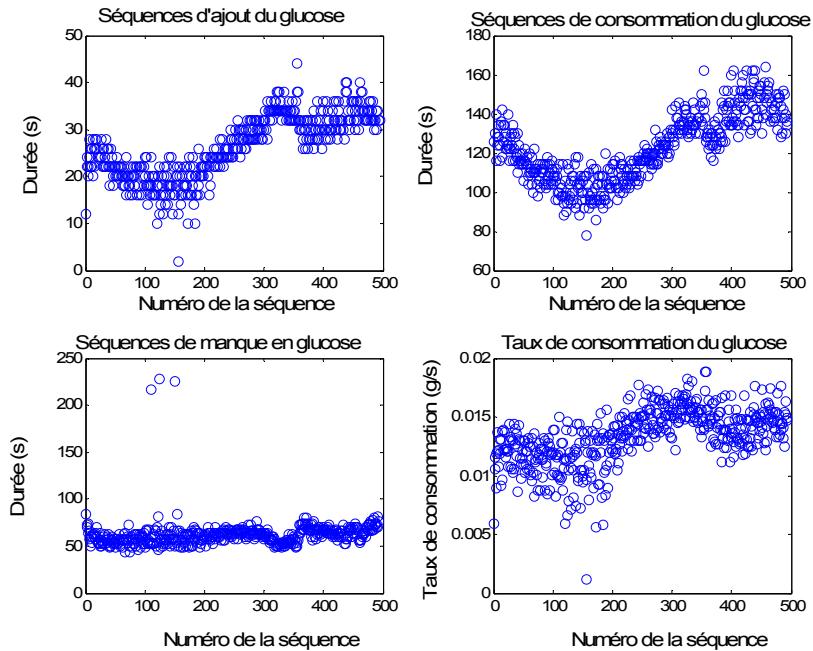


Figure 4.Calcul des séquences d'ajout du glucose, de consommation du glucose, de manque en glucose et du taux de consommation de glucose pour la culture de référence réalisée avec la souche K12

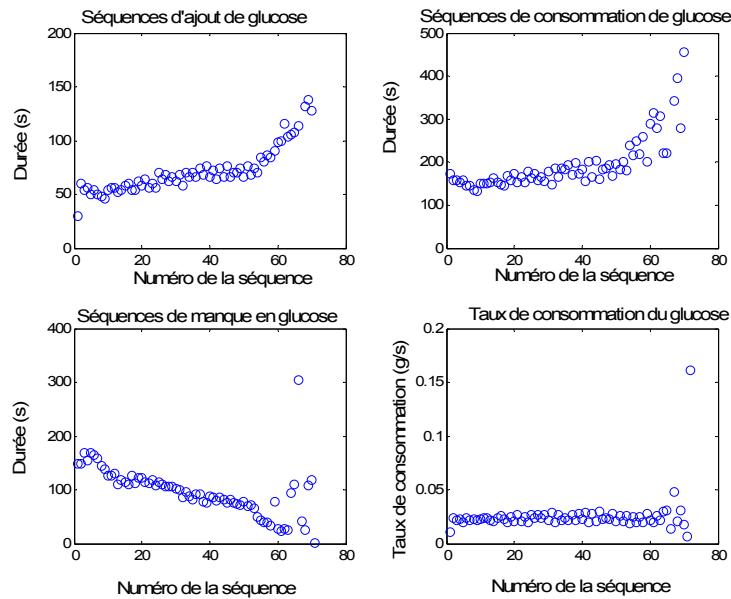


Figure 5. Calcul des séquences d'ajout du glucose, de consommation du glucose, de manque en glucose et du taux de consommation de glucose pour la culture *scale-down* avec écoulement dispersé réalisé avec la souche K12

3. Tests de traceurs

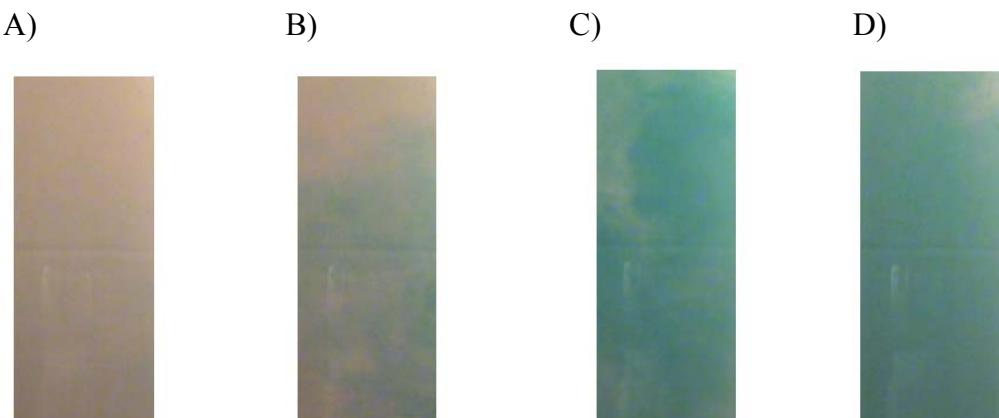


Figure 6. Enregistrement du mélange de la solution de glucose colorée au bleu de méthylène dans la partie non agitée avec écoulement dispersé (ajout de 10 secondes). A) au temps 0 B) après 3 secondes C) après 11 secondes D) après 21 secondes

Annexes

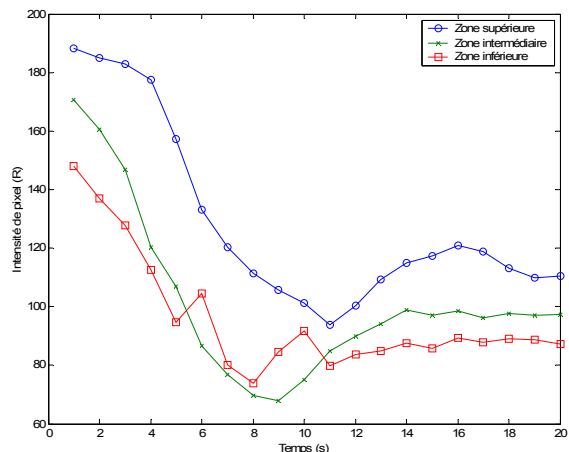


Figure 7. Exemple de traitement d'image brut pour le réacteur *scale-down* avec écoulement dispersé (courbe ni inversée ni normalisée)

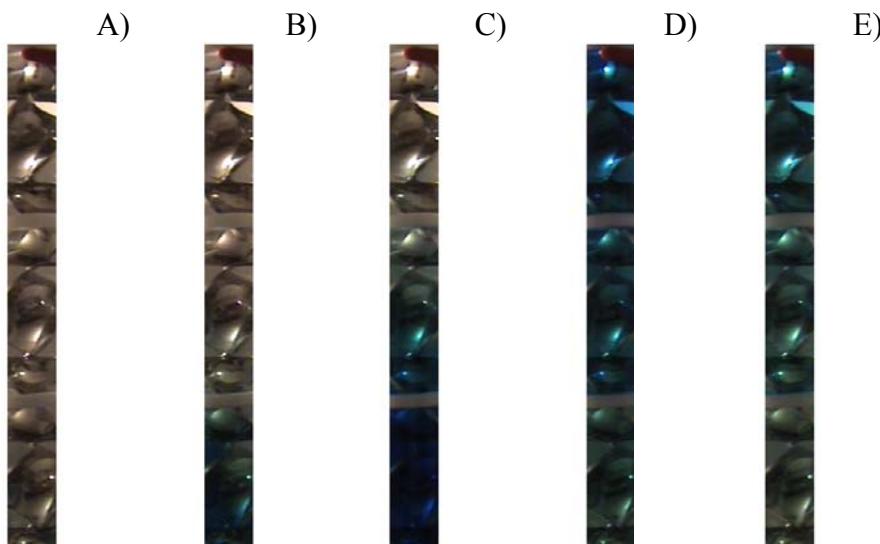


Figure 8. Enregistrement du mélange de la solution de glucose colorée au bleu de méthylène dans la partie non agitée avec écoulement piston (ajout de 20 secondes). A) au temps 0 B) après 13 secondes C) après 33 secondes D) après 113 secondes E) après 153 secondes