

L'extrapolation des bioréacteurs : un problème de génie des procédés ou de physiologie microbienne ?

Frank Delvigne[§], Jacqueline Destain, Alison Brognaux, Tambi Kar, Annick Lejeune, Philippe Thonart

Université de Liège, Gembloux Agro-Bio Tech, Unité de Bio-industries/CWBI, Passage des Déportés 2 , 5030 Gembloux, Belgium

[§] Correspondance : Université de Liège, Gembloux Agro-Bio Tech, Unité de Bio-industries/CWBI, Passage des Déportés 2 , 5030 Gembloux, Belgium. Tel : ++32 81 62 23 11, Fax : ++32 81 61 42 22, email : F.Delvigne@ulg.ac.be

Abstract: Bioreactor scale-up: chemical engineering and microbial physiology issues

Bioreactor scale-up often pose a serious issue during the industrial development of a bioprocess considering the numerous physical and biological phenomena occurring in the reacting volume. The basic principles of scale-up coming from the traditional chemical and process engineering approaches will be first reviewed and will be then compared to a new one involving recent development at the level of microbial strain manipulation. This "physiological" approach of scale-up involves directly a biological component of the system (by comparison with the traditional approach for scaling-up involving physical parameters indirectly linked to the physiological phenomena occurring in the bioreactor), i.e. the synthesis of a reporter fluorescent protein when microbial cells are exposed to stress. It will be shown how this principle can be used for a better understanding of the relationship between bioreactor hydrodynamics and microbial stress.

Keywords: scale-up, mixing, microbial stress, reporter gene, flow cytometry

1. Principes de base de l'extrapolation et proposition d'une méthodologie avancée dans le cas des bioprocédés

L'extrapolation d'un bioprocédé est une étape critique qui garantit la viabilité économique du bioproduit visé. Elle consiste à augmenter le volume du bioréacteur afin d'atteindre une productivité suffisante, et ce, en maintenant autant que possible les rendements obtenus lors des tests en laboratoire ou à l'échelle pilote. Pour la plupart des produits biotechnologiques (antibiotiques, alcools, acides organiques, acides aminés, enzymes, probiotiques), un procédé viable n'est atteint que pour des volumes de bioréacteur de quelques centaines de milliers de litres. Ces volumes permettent de satisfaire une demande de marché importante (de 10^2 à 10^7 tonnes/an) pour des produits de faible valeur ajoutée (de 0,5 à 1000 euros/kg). A côté de ces bioproduits de faible valeur ajoutée, les produits biotechnologiques plus fins (vaccins, protéines recombinantes thérapeutiques,...) permettent d'atteindre des valeurs ajoutées significativement plus importantes (de l'ordre de 10^4 à 10^9 euros/kg). Par contre, leur demande mondiale est nettement moindre (de 0,1 à 1000 kg/an) et leur développement ne nécessite donc pas une étape d'extrapolation importante. Ces procédés à haute valeur ajoutée requièrent des volumes de culture industriels plus modestes, de l'ordre de quelques dizaines de mètres cubes et peuvent mettre en œuvre des cultures microbiennes ou des cultures cellulaires (cellules animales, végétales, d'insecte,...) [1]. Dans ce travail, nous développerons plus en

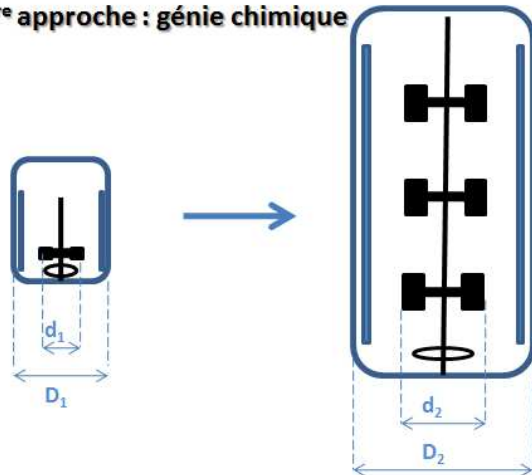
détail les processus d'extrapolation pour des bioproduits d'origine microbienne (c'est-à-dire issus de bactéries, de levures ou de moisissures).

L'extrapolation des bioprocédés peut être abordée de différentes manières comme montré à la figure 1. La première approche est celle du génie chimique (figure 1A) et consiste à calculer la variation de paramètres de l'opération de mélange (comme la puissance dissipée par l'agitateur, le nombre de Reynolds qui caractérise le type d'écoulement qui règne dans la cuve,...) lorsque l'extrapolation du réacteur (de dimension caractéristique D correspondant au diamètre de la cuve) est effectuée en maintenant un ou plusieurs paramètres d'agitation constants. Ce premier niveau d'approche de l'extrapolation est le plus simple et est encore d'application de nos jours. Néanmoins, nous verrons dans la première partie de cet article que cette approche est loin d'être suffisante, d'une part parce qu'elle ne garantit pas un maintien des paramètres de l'opération de mélange lorsque la taille du réacteur augmente (hétérogénéité au sein du volume réactionnel), et d'autre part parce qu'elle ne tient pas compte de la physiologie des micro-organismes.

La seconde approche (Figure 1B) consiste à étudier les relations entre les paramètres de performance (coefficient de transfert d'oxygène K_{La} , temps de mélange t_m ,...) et les rendements de procédé (quantité de biomasse ou de métabolites produite) ou l'évolution des conditions physico-chimiques au sein du réacteur (pH, oxygène dissous, CO_2 , température,...). Cette approche est complémentaire à la première décrite, puisque les paramètres de performance dépendent directement de l'efficacité de l'opération de mélange, cette dernière étant proportionnelle à la quantité d'énergie investie au niveau des mobiles d'agitation [2]. L'avantage de cette approche est qu'elle peut être directement implémentée au niveau du bioréacteur industriel en mettant en place un système de régulation adapté et permet donc de suivre en ligne les demandes de la population microbienne cultivée. Par exemple, le niveau d'oxygène dissous dans le réacteur (condition physico-chimique) peut être maintenu à un niveau constant en augmentant progressivement le K_{La} du réacteur par modulation du débit d'air et/ou la vitesse d'agitation en fonction des besoins du micro-organisme. Les problèmes de cette approche sont de trois types : premièrement, les types de sonde disponibles sont limités et leur mesure est indirecte par rapport à la physiologie du micro-organisme ; deuxièmement, au fur et à mesure de l'augmentation de la taille des bioréacteurs, les conditions physico-chimiques vont être de plus en plus hétérogènes du fait de la baisse de l'efficacité de mélange du réacteur. Une mesure réalisée en un point ne sera donc pas représentative du comportement global du bioréacteur. Troisièmement, la population microbienne présente dans le réacteur est considérée comme homogène. De nombreuses études réalisées avec des outils microbiologiques adaptés (décrits dans le paragraphe 4) ont montré que la population microbienne pouvait être ségréguée au niveau d'une ou plusieurs caractéristiques cellulaires (taille et forme des cellules, viabilité, capacité de synthèse d'une enzyme particulière,...) [3].

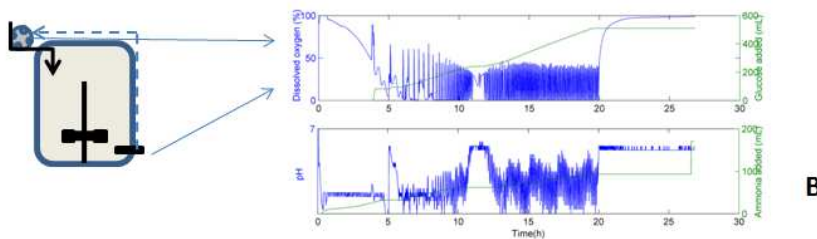
La troisième approche (Figure 1C) est basée sur l'analyse de l'évolution du bioprocédé à l'échelle de la cellule microbienne et tient compte des limitations relevées lors des deux précédentes approches. L'intérêt de cette méthode est qu'elle permet de prendre en compte à la fois l'hétérogénéité de la population microbienne et l'hétérogénéité spatiale du milieu réactionnel.

1^{ère} approche : génie chimique



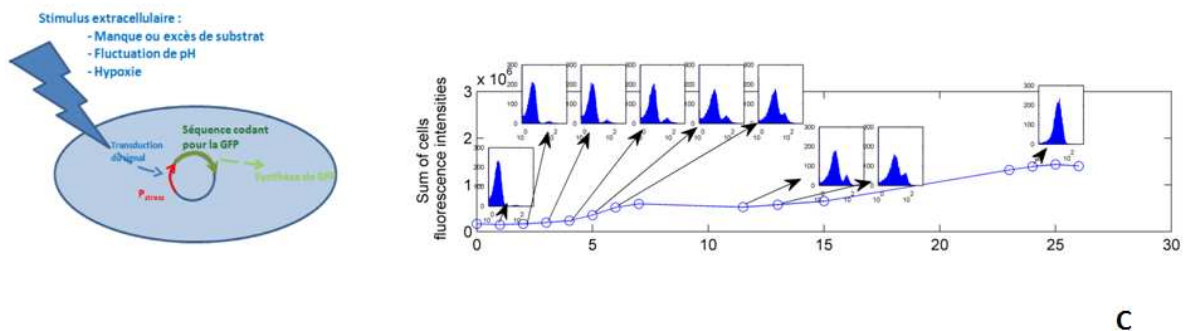
A

2^{ème} approche : étude des paramètres de performance du bioprocédé (paramètres indirects)



B

3^{ème} approche : utilisation de paramètres physiologiques directs



C

Figure 1 : les différentes approches pouvant être mises en œuvre pour l'extrapolation des procédés. A : approche classique du génie chimique permettant de calculer des paramètres hydrodynamiques globaux lors du passage de l'échelle D1 à l'échelle D2. B : approche expérimentale mettant en œuvre l'étude des paramètres de performance indirects du bioprocédé (évolution de l'oxygène dissous, dynamique d'ajout du substrat,...). C : approche expérimentale mettant en œuvre des paramètres physiologiques directs. Dans l'exemple, le schéma représente une cellule microbienne génétiquement modifiée afin de produire une protéine fluorescente lorsqu'elle est soumise à un stress

Il est intéressant de noter que l'évolution dans les approches d'extrapolation des bioréacteurs s'effectue en considérant une échelle spatiale de plus en plus petite, de quelques mètres (échelle caractéristique du procédé industriel D) jusqu'au micron (échelle caractéristique du micro-organisme). Cette multiplicité au niveau des échelles spatiales à considérer est une des clés du succès de l'extrapolation d'un bioprocédé. Nous verrons en effet que différentes

échelles spatiales et temporelles caractérisent le comportement du bioréacteur (système physique à extrapoler) et la réaction de la population microbienne (système biologique qui conditionne le rendement du bioprocédé).

2. Dimensionnement des bioréacteurs à l'échelle industrielle : approche du génie chimique

A l'échelle industrielle, les cultures microbiennes ou cellulaires sont dans la majorité des cas réalisées dans des bioréacteurs (également appelés fermenteurs dans le cas des cultures microbiennes) pouvant être mécaniquement agités (agitation directe par un mobile) ou pneumatique (agitation indirecte effectuée par injection d'air). Notons également à ce niveau le récent intérêt de l'industrie pharmaceutique pour les réacteurs dits "disposables" ou jetables. A l'heure actuelle, ces bioréacteurs en matières plastiques ont des volumes restreints à quelques centaines de litres et sont limités à des applications de type culture cellulaire pour des produits à très haute valeur ajoutée. Les principes de dimensionnement qui seront énoncés dans les paragraphes qui suivent seront donc limités aux bioréacteurs classiques mécaniquement agités qui sont les équipements les plus largement répandus à l'échelle industrielle [4].

D'un point de vue géométrique, l'extrapolation peut être représentée suivant le schéma montré à la figure 1A où le calcul consiste à suivre l'évolution des paramètres de l'opération de mélange lorsque le diamètre du bioréacteur passe de D_1 à D_2 .

Les calculs d'extrapolation requièrent la connaissance de plusieurs variables de l'opération de mélange qui seront brièvement présentées au paragraphe suivant.

2.1. Dimensionnement de base et extrapolation des bioréacteurs mécaniquement agités

La première étape du dimensionnement d'un bioréacteur mécaniquement agité consiste à déterminer le régime d'écoulement du fluide agité : laminaire, transitoire ou turbulent. Il est en effet important, dans la plupart des cas, d'opérer en régime turbulent afin d'intensifier les opérations de transfert (masse, chaleur et quantité de mouvement). Le calcul du régime d'écoulement au sein d'un bioréacteur mécaniquement agité peut être effectué à l'aide d'un nombre de Reynolds adapté :

$$Re = \frac{\rho \cdot N \cdot d^2}{\eta}$$

Avec ρ étant la masse volumique du fluide agité (kg/m^3), N le taux d'agitation (s^{-1}), d le diamètre du mobile d'agitation (m), η la viscosité du fluide (Pa.s).

Dans le cas de l'eau, ρ est de 1000 Kg/m^3 et η est de $0,001 \text{ Pa.s}$. Dans les milieux dont la rhéologie est proche de celle de l'eau, on obtient donc facilement un nombre de Reynolds important. Pour $Re > 10^4$, le milieu agité est considéré comme étant en écoulement turbulent.

Le fait d'opérer en écoulement turbulent permet de simplifier le calcul des paramètres de base de l'opération de mélange, telle que la puissance dissipée au niveau du mobile d'agitation. Cette puissance peut être calculée à l'aide de la relation suivante :

$$P = \rho \cdot N_p \cdot N^3 \cdot d^5$$

N_p correspond au nombre de puissance ou de Newton et est constant en régime d'écoulement turbulent (il ne dépend que du type de mobile d'agitation utilisé et est généralement fourni par le concepteur).

Le calcul de la puissance dissipée par le système d'agitation est une étape importante lors du dimensionnement d'un bioréacteur. En effet, plus cette puissance est importante et plus l'intensité des opérations de transfert sera grande au sein du fluide agité. Des corrélations directes sont en effet observées entre la puissance dissipée et le temps d'homogénéisation du réacteur, ainsi que du coefficient de transfert d'oxygène [1]. Ces deux paramètres constituent souvent les étapes limitantes de l'extrapolation des bioprocédés. La puissance dissipée est souvent considérée comme un invariant dans les calculs d'extrapolation. Un invariant est un paramètre de l'opération de mélange qui a été identifié comme ayant un impact majeur sur le procédé et qui est maintenu constant lors de l'extrapolation. Il permet de fixer l'évolution de l'échelle temporelle du procédé. Dans les bioprocédés, vu l'impact des phénomènes de transfert, la puissance volumique (en W/m^3) est souvent considérée comme invariant.

A l'heure actuelle, en considérant la puissance des outils informatiques actuels, des outils numériques sont de plus en plus utilisés pour l'extrapolation des équipements. Ces outils numériques sont décrits dans le paragraphe suivant.

2.2. Simulation numérique de l'hydrodynamique des bioréacteurs

L'utilisation de la mécanique des fluides numérique (MFN) est de plus en plus répandue dans le domaine du génie des procédés pour le développement virtuel de toute une série d'équipement. Cette technique repose sur la résolution numérique de l'équation fondamentale de Navier-Stokes sur un maillage représentant la géométrie de l'équipement à simuler. En choisissant une résolution de maillage suffisante et des conditions aux limites réalistes, cette technique permet de simuler avec une grande précision les écoulements dans les réacteurs. Néanmoins, son application pour le dimensionnement des bioréacteurs mécaniquement agités est encore limitée. Par ordre croissant de difficulté, les problèmes liés à l'application de la MFN dans le cas des bioréacteurs sont les suivants :

- les bioréacteurs fonctionnent souvent dans un régime d'écoulement turbulent, ce qui complexifie la résolution des équations
- la présence de mobiles d'agitation en rotation par rapport au référentiel de la cuve
- l'injection d'air nécessaire dans le cas des cultures aérobies complexifie encore la représentation des motifs d'écoulement

Du fait de cette complexité, la MFN n'est pas souvent appliquée pour la simulation de l'évolution d'une réaction microbienne en relation avec l'hydrodynamique du bioréacteur. On lui préfère généralement des techniques plus simples comme l'approche compartimentée qui consiste à délimiter des zones de fluide considérées comme parfaitement agitées au sein du volume réactionnel. Les équations obtenues sont alors de simples équations différentielles permettant de décrire le bilan de masse sur chacune des zones de fluides considérée. La figure 2 montre un exemple de simulation d'un processus *fed-batch* (dans lequel le substrat nécessaire à la croissance du micro-organisme est ajouté progressivement par le haut de la cuve) dans un bioréacteur industriel. Du fait de la simplicité de ce type de modèle, d'autres équations décrivant les phénomènes biologiques peuvent être ajoutées afin d'obtenir une simulation englobant à la fois les processus physiques et biologiques se déroulant dans les bioréacteurs. Cette technique numérique permet par exemple de prédire le gradient en glucose qui va se développer lorsque la taille du bioréacteur augmente. La simulation décrite à la figure 2 montre bien la présence d'une zone significativement plus concentrée en glucose au niveau de la zone d'ajout en mode *fed-batch*. Le gradient qui se développe est susceptible, en

fonction de son intensité, d'entraîner une déviation du métabolisme souhaité des micro-organismes cultivés. La figure 2 montre également que la manière dont le micro-organisme est exposé au gradient de concentration joue également un rôle important. Ce phénomène peut être simulé en considérant le débit de circulation développé par les mobiles d'agitation [5].

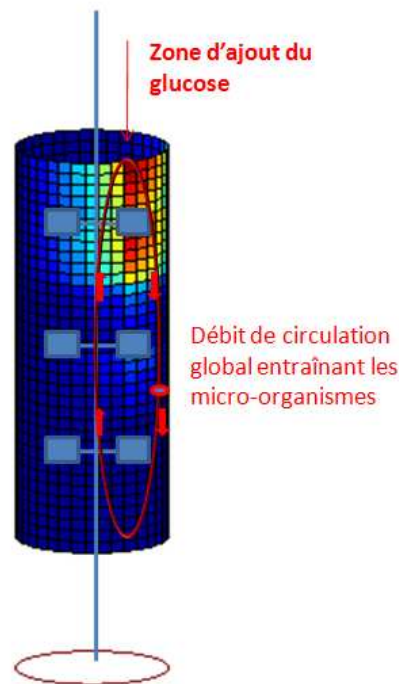


Figure 2 : simulation d'un procédé *fed-batch* dans un bioréacteur industriel à l'aide d'un modèle compartimenté (les compartiments ou zones de fluide sont représentés sur le schéma)

L'inconvénient de l'approche compartimentée est que des connaissances a priori sont nécessaires afin de représenter les flux d'écoulement globaux. Cette méthodologie conduit donc à une grande simplification du profil de vitesse de fluide à l'intérieur du bioréacteur. A l'heure actuelle, des outils de simulation hybrides [6], présentant un compromis entre la précision de la MFN et la facilité de résolution des équations des modèles compartimentés sont de plus en plus considérés pour la simulation de systèmes complexes tels que ceux faisant intervenir des composantes biologiques [7, 8].

3. Utilisation de paramètres de performance indirects lors de l'extrapolation d'un procédé de production de protéines recombinantes par *Escherichia coli*

La bactérie gram négative *Escherichia coli* reste de nos jours l'outil biologique le plus répandu pour l'expression de protéines hétérologues (en d'autres termes, des protéines qui n'entrent pas dans la composition normale d'*E. coli*). Malgré les avancées effectuées au niveau de la maîtrise des cultures de cellules animales, on estime à environ 70% la fraction de protéines recombinantes commerciales encore produites à partir de ce micro-organisme. Ce bioprocédé d'intérêt industriel majeur sera pris comme cas d'étude, car il permet de mettre en évidence la plupart des problèmes classiques rencontrés en extrapolation. Ces différents problèmes opératoires seront abordés dans les paragraphes suivants et les relations directes entre l'environnement réactionnel du bioréacteur et la physiologie microbienne seront mises en évidence.

3.1. La source principale de problèmes lors de l'extrapolation : la diminution de l'efficacité d'homogénéisation du bioréacteur

Le cisaillement résultant du passage des cellules microbiennes dans les zones de fluide proches des mobiles d'agitation a longtemps été considéré comme la source majeure de stress physiologique dans les bioréacteurs. Néanmoins, les théories de base de la turbulence au sein des milieux agités et l'expérimentation ont montré que les cellules microbiennes étaient peu sensibles au cisaillement. Ceci peut être attribué à la très petite taille des micro-organismes qui est bien en dessous de la taille caractéristique des tourbillons générés par l'opération de mélange [9]. Par contre, il a été démontré que les micro-organismes sont très sensibles à l'apparition de gradients de concentration [10, 11]. Lors de l'extrapolation, on assiste à une augmentation irrémédiable du temps de mélange du bioréacteur et à l'apparition de défauts d'écoulement, tel que des zones mortes ou stagnantes. Ces conditions hydrodynamiques sont propices au développement de gradients de concentration. Les procédés *fed-batch* sont particulièrement sujets à l'apparition de gradients de concentration. Dans ce procédé, le substrat carboné (souvent du glucose dans le cas d'*E. coli*) est ajouté progressivement en cours de culture afin d'éviter son accumulation dans le milieu réactionnel. De nombreux micro-organismes d'intérêt industriel sont en effet très sensibles à l'exposition à des concentrations trop élevées en glucose. Chez *E. coli*, l'excès de glucose entraîne la déviation du métabolisme du carbone vers la production d'acétate. La production d'acétate se fait au détriment de la production de biomasse microbienne et de la protéine d'intérêt (cet acétate peut également entraver la conformation de la protéine recombinante). Les bioréacteurs de grand volume possèdent des performances d'homogénéisation moindres qui entraînent, dans les cas d'un procédé *fed-batch*, l'apparition d'un gradient de concentration en glucose dans le volume réactionnel (ce type de gradient de concentration a été simulé à la figure 2). La souche microbienne est donc ponctuellement exposée à des excès ou des manques en substrat qui peuvent entraîner diverses réponses physiologiques : production d'acétate [12], diminution de la viabilité des micro-organismes [13], expression de gènes de stress [14].

3.2. Autres types de gradients liés aux transferts d'oxygène, de chaleur et à la régulation du pH

Un autre paramètre important dans le cas des bioprocédés aérobies est la disponibilité en oxygène dissous dans le volume réactionnel. En effet, la quantité d'oxygène soluble en milieu aqueux dans les conditions standard de température et de pression avoisine les 8 mg/L. Dans le cas d'un processus intensif de culture d'*E. coli*, les besoins en oxygène peuvent atteindre plusieurs grammes par litre de milieu et par heure. La vitesse de dissolution de l'oxygène est donc le facteur à optimiser afin de garantir une disponibilité suffisante en oxygène pour les micro-organismes, le paramètre utilisé pour rendre compte de cette vitesse de solubilisation de l'oxygène étant le coefficient volumique de transfert d'oxygène noté K_{La} (s^{-1}). Ce K_{La} dépend de la puissance locale dissipée au sein du bioréacteur et n'est donc pas constant en tout point du volume réactionnel pour les réacteurs de grande taille. On assiste donc à la formation de gradients de concentration en oxygène dissous avec des zones locales qui peuvent être totalement épuisées. L'impact de l'hypoxie sur *E. coli* se note par une induction de gènes spécifiques de réponse à ce stress et par la synthèse de sous-produits de la voie des acides mixtes, tels que l'acétate, le formate ou encore le lactate qui sont produits au détriment du rendement du procédé [12]. Au niveau industriel, le maintien d'une concentration limite en oxygène dissous est généralement régulée par le système *fed-batch*. En effet, il est possible en limitant l'ajout de substrat carboné de réduire par la même occasion la demande biologique en

oxygène. Néanmoins, cette approche ne résout pas le problème de l'exposition des micro-organismes au stress de gradient. Cette même problématique peut être appliquée au maintien du pH et de la température pour lesquels la mise en place d'un système de régulation efficace ne permet pas d'éviter la formation de gradient au sein du volume réactionnel [15].

Au terme de ce paragraphe, nous avons mis en évidence l'importance de la réponse physiologique du micro-organisme qui peut entraîner une déviation importante de l'évolution de la réaction visée (dans l'exemple envisagé, la synthèse d'une protéine hétérologue). Ces réactions, dans le cas particulier de la mise en œuvre d'un micro-organisme sont caractérisées par différentes échelles temporelles et peuvent être irréversibles (perte de viabilité des micro-organismes). La figure 3 reprend les temps caractéristiques des processus microbiens impliqués dans la réponse au stress et fait également le lien avec les temps caractéristiques liés aux aspects physico-chimiques du procédé.

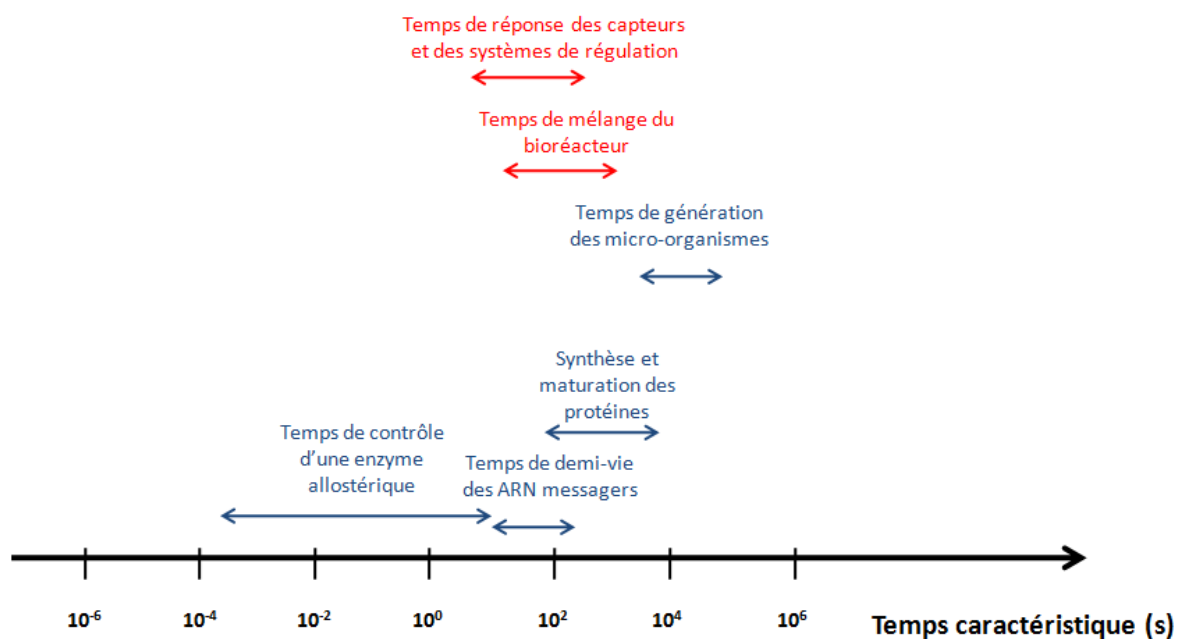


Figure 3 : comparaison des échelles de temps caractéristiques de certains mécanismes physiques (en rouge) et physiologique (en bleu) intervenant au sein d'un bioréacteur

4. Nouvelle technique d'extrapolation des bioréacteurs intégrant la réponse physiologique des micro-organismes

A l'heure actuelle, le dimensionnement et le contrôle d'un bioréacteur sont souvent établis sur base de paramètres de performance indirects, c'est-à-dire ayant un lien très diffus par rapport à la physiologie des micro-organismes (par exemple, évolution du pH ou de la quantité de dioxyde de carbone évacuée par les gaz de sortie du réacteur). Généralement, l'état physiologique réel des micro-organismes est estimé hors ligne par prise d'échantillon et analyse au laboratoire (concentration et viabilité de la biomasse, concentration en métabolites intra- ou extracellulaires, activité enzymatique, niveau d'expression d'un gène par RT-qPCR,...). La cause principale de ce décalage entre mesures en- et hors-ligne doit être attribuée au manque de capteurs en ligne adaptés pour la mesure de caractéristiques physiologiques directes. En effet, le panel de capteurs retrouvés classiquement au niveau des bioréacteurs n'est pas très large du fait des contraintes opératoires et sont basés sur des phénomènes physico-chimiques (le panel de capteurs équipant un réacteur est généralement

limité à une sonde température, une sonde pH et une sonde à oxygène dissous, auxquelles viennent s'ajouter les signaux des actuateurs tels que l'action des pompes de régulation ou encore la vitesse d'agitation). Des travaux en cours au sein de notre laboratoire visent à rechercher de nouveaux paramètres directs plus en relation avec la réactivité du système étudié. La difficulté majeure de cette approche réside dans la complexité des techniques d'analyse de la physiologie des micro-organismes qui limite souvent l'implémentation de ces méthodes pour le suivi en ligne des bioréacteurs. En effet, dans le cas particulier des bioréacteurs, par rapport aux réacteurs de l'industrie chimique, le système réactionnel mis en jeu pose un véritable problème d'intégration. Ces problèmes peuvent être mis en relation avec trois types de phénomènes :

- Une grande variété de constantes de temps du système réactionnel du fait de la complexité inhérente à la physiologie microbienne (voir figure 3).
- La mise en jeu de processus aléatoires ou stochastique impliqués dans la réponse microbienne.
- Les conséquences de ces réponses physiologiques qui peuvent induire une perte de viabilité des micro-organismes qui se traduit au niveau réactionnel par une diminution irréversible de la vitesse de réaction.

L'implication de ces trois phénomènes au niveau de la conduite des bioréacteurs sera illustrée en considérant le système biologique décrit à la figure 4. Cette figure décrit le principe de fonctionnement d'un rapporteur transcriptionnel inséré dans une cellule de *E. coli*. En fonction de la nature du promoteur (P_{stress}), celui-ci est susceptible d'être induit dans des conditions environnementales particulières (par exemple, excès de substrat ou encore changement rapide du pH du milieu) liées aux performances hydrodynamiques du bioréacteur. Ce promoteur a été artificiellement lié à une séquence codant pour une protéine fluorescente (GFP pour Green Fluorescent Protein). L'induction du promoteur de stress peut donc être facilement repérée par l'augmentation du niveau de fluorescence des cellules microbiennes (comme le montre la photographie obtenue par microscopie en fluorescence de la figure 4).

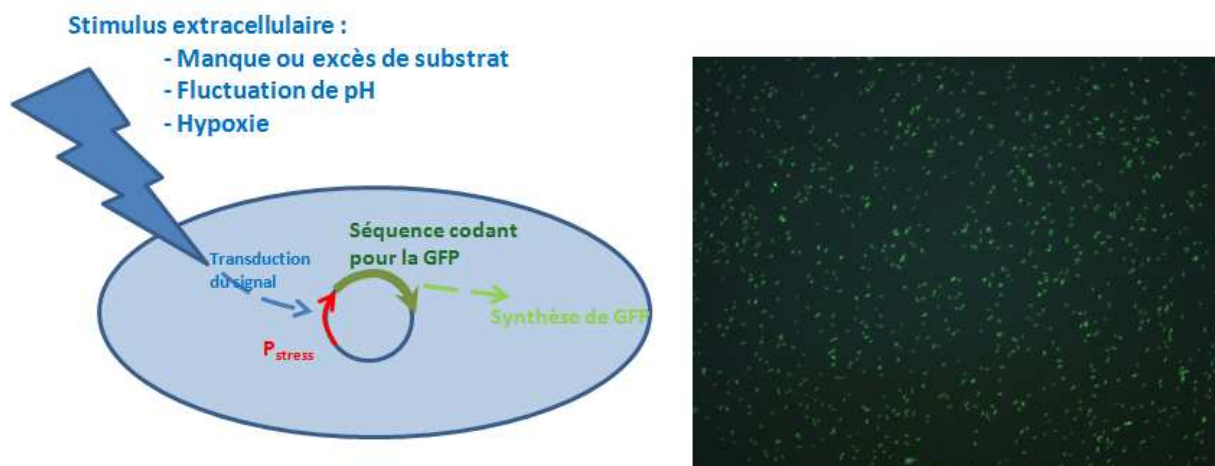


Figure 4: schéma de principe d'un rapporteur transcriptionnel fluorescent inséré dans une cellule microbienne. L'accumulation de la protéine fluorescente à l'intérieur des cellules peut facilement être repérée par épifluorescence comme le montre la photographie

Ce processus biologique de synthèse d'un gène est gouverné par une cascade de réactions qui peuvent être schématisées selon la figure 5. Cette figure montre que le promoteur de stress (P_{stress}) est induit suite à l'interaction avec un facteur de transcription (TA). Dans ce cas, la cascade ou le réseau de régulation qui entraîne la synthèse de ce facteur de transcription a été

ignorée par souci de simplicité. Le complexe TA_DNA formé est responsable de la synthèse des ARN messagers correspondant (processus de transcription). Ces ARN messagers permettent alors la synthèse de la protéine fluorescente GFP (processus de traduction).

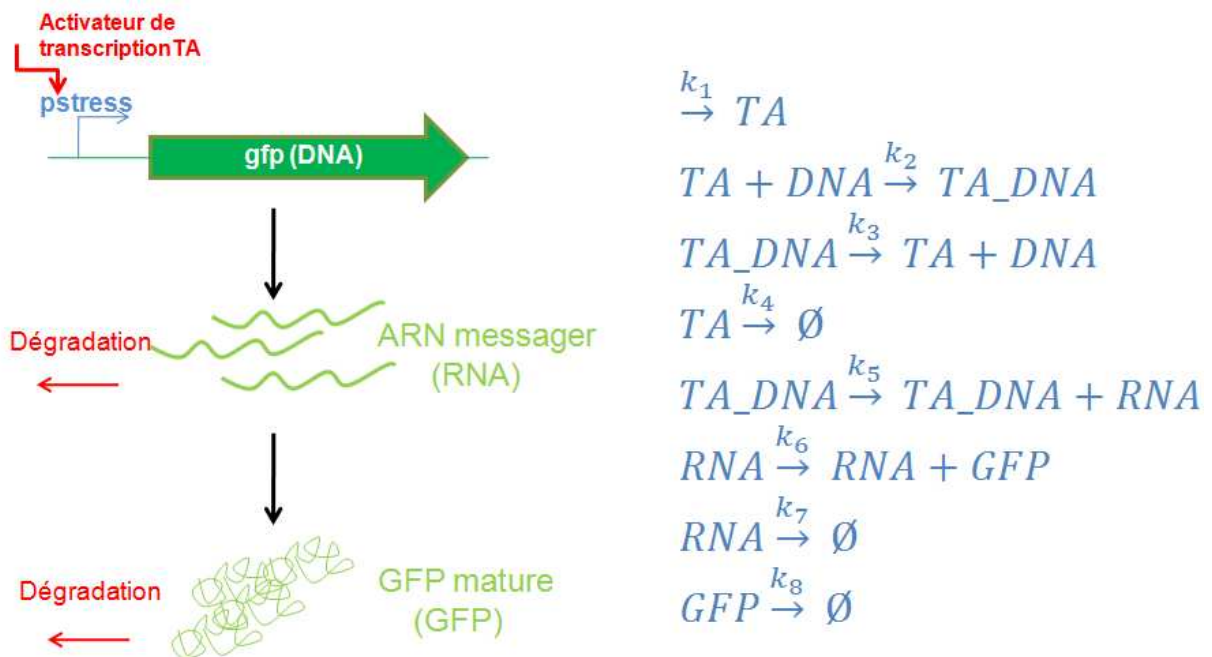


Figure 5: modélisation d'un processus d'induction d'un promoteur de stress qui conduit à la synthèse de GFP à l'intérieur d'une cellule microbienne

Selon ce modèle, la synthèse de la GFP est donc soumise à 8 taux de réactions (k_1 à k_8) représentant la dynamique des 5 espèces biochimiques mises en jeu (TA, DNA, TA_DNA, RNA et GFP). La dynamique de réaction peut donc être représentée mathématiquement par un modèle comprenant 5 équations différentielles ordinaires :

$$\frac{dT_A}{dt} = k_1 - k_2 \cdot TA \cdot DNA - k_4 \cdot TA + k_3 \cdot TA_DNA$$

$$\frac{dT_A_DNA}{dt} = k_2 \cdot TA \cdot DNA - k_5 \cdot TA_DNA - k_3 \cdot TA_DNA$$

$$\frac{dDNA}{dt} = k_3 \cdot TA_DNA - k_2 \cdot TA \cdot DNA$$

$$\frac{dRNA}{dt} = k_5 \cdot TA_DNA - k_6 \cdot RNA - k_7 \cdot RNA$$

$$\frac{dGFP}{dt} = k_6 \cdot RNA - k_8 \cdot GFP$$

Ces équations peuvent être résolues numériquement par un algorithme adapté de manière à donner l'évolution de la concentration des 5 espèces au cours du temps. Néanmoins, il est maintenant évident que les processus biologiques à l'échelle cellulaire sont soumis à des phénomènes aléatoires ou stochastiques. Cette stochasticité peut être attribuée au nombre relativement restreint de molécules mise en jeu dans le volume cellulaire [16, 17]. Dans ce

cas, il est plus réaliste d'envisager un algorithme de résolution des équations différentielles qui prend en compte la partie aléatoire (ou stochasticité) des processus de synthèse. Nous avons utilisé pour cela une version adaptée de l'algorithme de Gillespie [18]. Un exemple de simulation stochastique du modèle décrit à la figure 5 est montré à la figure 6.

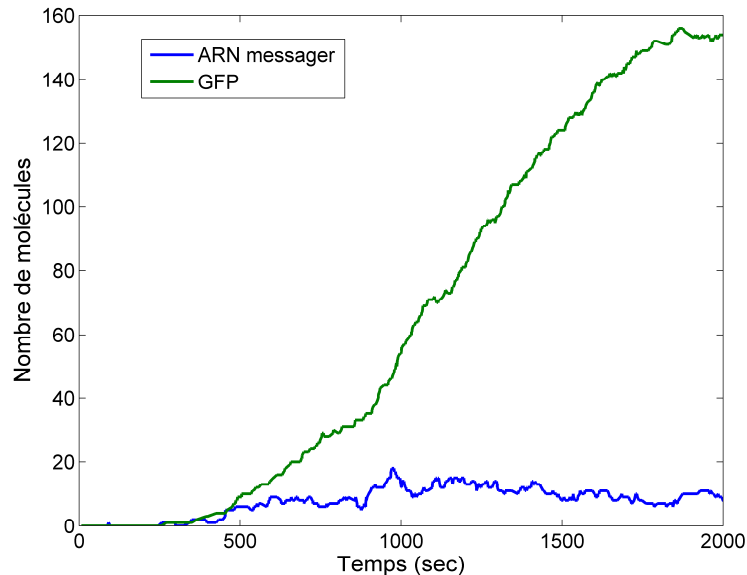


Figure 6: évolution du nombre de molécules d'ARN messager et de GFP au sein d'une cellule microbienne. La simulation a été effectuée en utilisant l'algorithme stochastique de Gillespie

La difficulté à ce niveau est que le bruit associé à la synthèse de la protéine fluorescente est associé non seulement avec les fluctuations encourues au sein du bioréacteur, mais également à des fluctuations intrinsèques liées à des processus biologiques (phase du cycle cellulaire, mutation,...[3]). Une alternative est la mise en place d'un protocole expérimental permettant de déterminer ce bruit au niveau de la synthèse protéique. A l'heure actuelle, la technique de cytométrie en flux est de plus en plus utilisée pour l'analyse des systèmes microbiens [19, 20]. Cette technique permet de séparer les cellules microbiennes d'un échantillon et d'en analyser la forme, la taille et la fluorescence. On peut obtenir de cette manière un aperçu de l'hétérogénéité d'une caractéristique cellulaire au sein d'une même population microbienne et des temps d'analyse très courts (3000 cellules peuvent être analysées à la seconde à partir d'un appareil standard). Un exemple d'application de la technique de cytométrie en flux est donné à la figure 7. Dans cet exemple des cellules d'*E. coli* contenant un système rapporteur de stress (voir figure pour le principe) ont été cultivées dans des bioréacteurs de laboratoire considérés comme homogènes et dans des réacteurs industriels simulés considérés comme hétérogènes du point de vue des principaux paramètres physico-chimiques (substrat, oxygène dissous et pH). Dans le cas des bioréacteurs homogènes, la cytométrie en flux montre que, après 24 h de culture, l'induction du promoteur est telle que la plupart des cellules de la population ont accumulé la GFP (la fluorescence de la GFP est enregistrée par le canal FL1 sur le diagramme, le canal FSC correspondant à la taille des cellules, chaque point sur les diagrammes correspondant à une cellule microbienne qui a été individualisée par le principe de la cytométrie en flux. On notera également la présence d'une sous-population contenant une grande quantité de GFP (encadré en vert) dans le cas des bioréacteurs homogènes. Dans le cas des bioréacteurs hétérogènes sensés reproduire les conditions de culture industrielle, le processus d'induction de la GFP est ralenti et la sous-population "super-induite" n'est pas

observée dans ce cas. Ce type de système rapporteur peut donc être utilisé comme biocapteurs des conditions hétérogènes d'un bioréacteur.

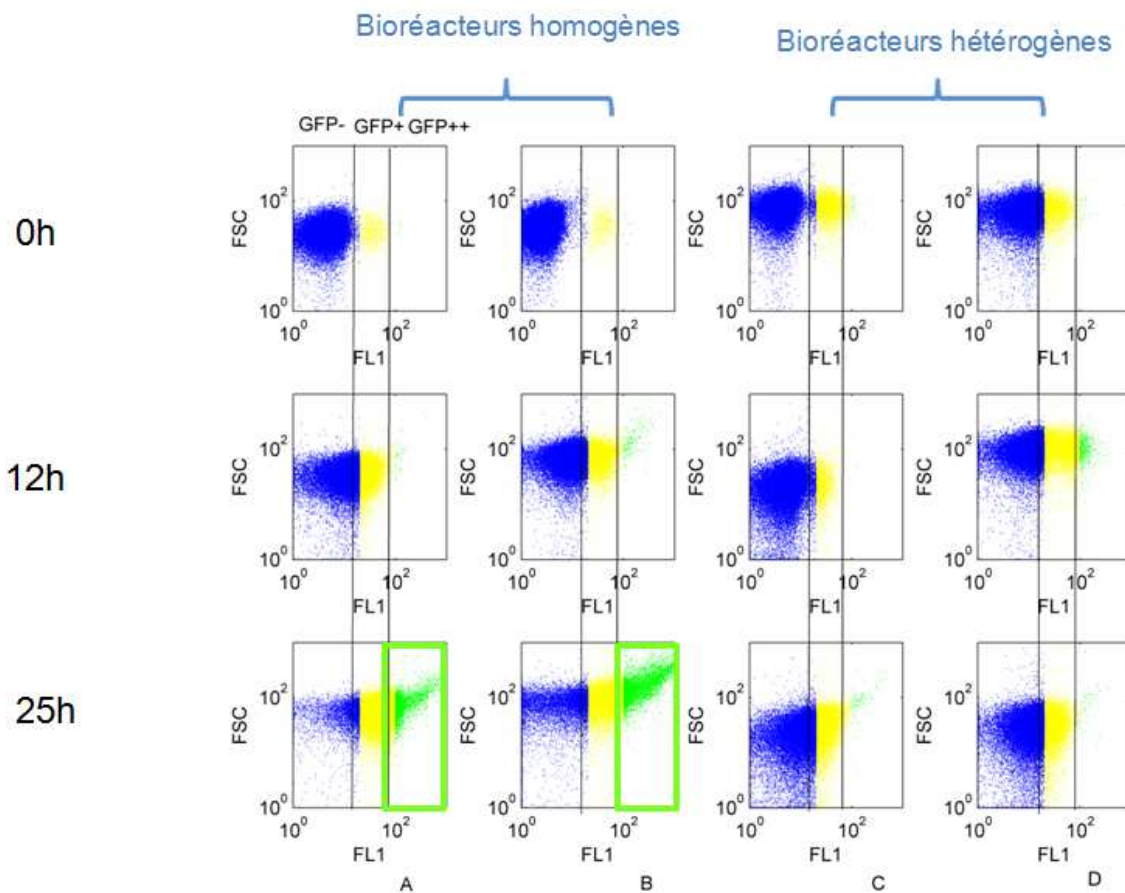


Figure 7: évolution au cours du temps de cytogrammes FL1/FSC obtenus dans des bioréacteurs avec différents degrés d'homogénéité (En bleu : sous-population n'exprimant pas la GFP ; en jaune : sous-population présentant une expression moyenne de la GFP ; en vert : sous-population présentant une expression très importante de la GFP)

Plusieurs applications industrielles ont été dégagées à partir des systèmes rapporteurs de type GFP. En effet, cette technique a été adaptée à certains procédés de production de protéines recombinantes pour lesquels la protéine d'intérêt est fusionnée à la GFP. Un fluorimètre en ligne permet de suivre la synthèse de la protéine et peut être associé à une boucle de régulation afin d'optimiser l'ajout d'un agent inducteur [21]. Ce même principe a été intégré au sein de notre laboratoire pour suivre en ligne le stress encouru par les micro-organismes dans des bioréacteurs présentant des défauts d'écoulement [22, 23].

Les développements théoriques démontrés dans ce paragraphe ont deux applications pratiques pour l'extrapolation et la conduite des bioréacteurs. Premièrement, nous avons démontré qu'un processus physiologique complexe pouvait être suivi en ligne avec une bonne résolution au niveau de la population microbienne, ce qui permet d'envisager de nouveaux systèmes de régulation de bioréacteur en relation directe avec la physiologie des micro-organismes cultivés. La deuxième application qui n'a pas encore été évoquée est basée non plus sur le dimensionnement du bioréacteur, mais plutôt sur la capacité de réponse physiologique du micro-organisme en condition de stress. Il est possible de cette manière d'atténuer la sensibilité des micro-organismes cultivés vis-à-vis de certaines conditions afin d'augmenter le

rendement de production d'un métabolite [24]. Cette voie de l'ingénierie métabolique est en plein essor et présentera des solutions très performantes lorsque les problèmes liés à la biologie des systèmes (une autre discipline émergente considérant les interactions complexes entre les nombreux constituants d'un organisme vivant, tels que les gènes, les protéines ou les métabolites) seront résolus.

5. Intégration de la physiologie microbienne pour l'extrapolation des bioréacteurs : conclusion et perspectives

Nous avons vu au cours de cet article que la réactivité au sein du bioréacteur est contrôlée par les conditions physico-chimiques régnant au sein du volume réactionnel, mais aussi par la réponse physiologique des micro-organismes cultivés. Si les premières conditions sont relativement bien maîtrisées à l'heure actuelle (existence de code de calcul MFN permettant de prédire les caractéristiques des écoulements dans le bioréacteur), il n'en va pas de même pour les secondes. En effet, la réponse microbienne face aux conditions de stress en procédé est complexe et fait intervenir de nombreuses échelles de temps.

Afin d'effectuer une opération d'extrapolation, il est donc important de prendre en compte à la fois les paramètres du génie chimique pour le dimensionnement du bioréacteur, mais également de tenir compte des réponses physiologiques potentielles des micro-organismes cultivés. A ce jour, de nombreux efforts ont été effectués pour comprendre et maîtriser la réponse microbienne face aux conditions de procédé. Nous en sommes maintenant à considérer des modifications génétiques visant à diminuer la sensibilité des micro-organismes aux conditions de culture (certains micro-organismes, tel que *E. coli*, ont même été "reconstruits" avec des simplifications conséquentes de leur génome afin d'éliminer leurs mécanismes de réponse au stress). Il est néanmoins curieux de noter que, malgré les progrès effectués au niveau de la compréhension des mécanismes biologiques, rien n'a été encore envisagé au niveau de la modification de la géométrie globale et des systèmes de régulation des bioréacteurs afin de mieux répondre aux contraintes imposées par la biologie des micro-organismes.

Références

1. Palomares LA, Ramirez, O.T.,: **Geometric considerations for bioreactor scale-up.** In: *Encyclopedia of industrial biotechnology : bioprocess, bioseparation and cell technology.* Edited by Wiley; 2010.
2. Nienow A.W.: **Hydrodynamics of stirred bioreactors.** *Applied mechanics review* 1998, **51**(1):3-32.
3. Müller S, Harms, H., Bley, T.,: **Origin and analysis of microbial population heterogeneity in bioprocesses.** *Current opinion in biotechnology* 2010, **21**:100-113.
4. Charles M, Wilson, J., : **Fermenter design.** In: *Encyclopedia of industrial biotechnology : bioprocess, bioseparation and cell technology.* Edited by Wiley, vol. 7; 2010.
5. Delvigne F, Lejeune, A., Destain, J., Thonart, P.,: **Stochastic models to study the impact of mixing on a fed-batch culture of *Saccharomyces cerevisiae*.** *Biotechnology progress* 2006, **22**:259-269.
6. Bezzo F, Macchietto, S., Pantelides, C.C.,: **Computational issues in hybrid multizonal/computational fluid dynamics models.** *AIChE journal* 2005, **51**(4):1169-1177.
7. Le Moullec Y, Gentric, C., Potier, O., Leclerc, J.P.,: **Comparison of systemic, compartmental and CFD modelling approaches : application to the simulation of a biological reactor of wastewater treatment.** *Chemical engineering science* 2010, **65**:343-350.

8. Laakkonen M, Moilanen, P., Alopaeus, V., Aittamaa, J.,: **Dynamic modeling of local reaction conditions in an agitated aerobic fermenter.** *AIChE journal* 2006, **52**(5):1673-1689.
9. Hewitt CJ, Nienow, A.W.,: **The scale-up of microbial batch and fed-batch fermentation processes.** In: *Advances in applied microbiology*. Vol. 62; 2007: 105-135.
10. Hewitt CJ, Nebe-Von Caron, G., Axelsson, B., Mc Farlane, C.M., Nienow, A.W.,: **Studies related to the scale-up of high-cell-density E. coli fed-batch fermentations using multiparameter flow cytometry : effect of a changing microenvironment with respect to glucose and dissolved oxygen concentration.** *Biotechnology and bioengineering* 2000, **70**(4):381-390.
11. Enfors SO, Jahic, M., Rozkov, A., Xu, B., Hecker, M., Jürgen, B., Krüger, E., Schweder, T., Hamer, G., O'Beirne, D., Noisommit-Rizzi, N., Reuss, M., Boone, L., Hewitt ,C., McFarlane, C., Nienow, A., Kovacs, T., Trägårdh, 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.: **Physiological responses to mixing in large scale bioreactors.** *Journal of biotechnology* 2001, **85**:175-185.
12. Hewitt CJ, Onyeaka, H., Lewis, G., Taylor, I.W., Nienow, A.W.,: **A Comparison of High Cell Density Fed-Batch Fermentations Involving Both Induced and Non-Induced Recombinant Escherichia coli Under Well-Mixed Small-Scale and Simulated Poorly Mixed Large-Scale Conditions.** *Biotechnology and bioengineering* 2007, **96**(3):495-505.
13. Hewitt CJ, Nebe-Von Caron, G., Nienow, A.W., Mc Farlane, C.M.,: **Use of multi-staining flow cytometry to characterise the physiological state of Escherichia coli W3110 in high cell density fed-batch cultures.** *Biotechnology and bioengineering* 1999, **63**(6):705-711.
14. Schweder T, Hecker, M.,: **Monitoring of stress responses.** *Advances in biochemical engineering/Biotechnology* 2004, **89**:47-71.
15. Amanullah A. MFCM, Emery A.N., Nienow A.W.: **Scale-down model to simulate spatial pH variations in large-scale bioreactors.** *Biotechnology and bioengineering* 2001, **73**(5):390-399.
16. Patnaik P.R.: **External, extrinsic and intrinsic noise in cellular systems : analogies and implications for protein synthesis.** *Biotechnology and molecular biology review* 2006, **1**(4):121-127.
17. MacAdams H.H. AA: **It's a noisy business. Genetic regulation at the nanomolar scale.** *Trends in genetics* 1999, **15**(2):65-69.
18. Gillespie D.T.: **Approximate accelerated stochastic simulation of chemically reacting systems.** *Journal of chemical physics* 2001, **115**(4):1716-1733.
19. Tracy BP, Gaida, S.M., Papoutsakis, E.T.,: **Flow cytometry for bacteria : enabling metabolic engineering, synthetic biology and the elucidation of complex phenotypes.** *Current opinion in biotechnology* 2010, **21**:85-99.
20. Diaz M, Herrero, M., Garcia, L.A., Quiros, C.,: **Application of flow cytometry to industrial microbial bioprocesses.** *Biochemical engineering journal* 2010, **48**:385-407.
21. DeLisa MP, Li, J., Rao, G., Weigand, W.A., Bentley, W.E.,: **Monitoring GFP operon fusion protein expression during high cell density cultivation of Escherichia coli using an on-line optical sensor** *Biotechnology and bioengineering* 1999, **65**(1):54-64.
22. Delvigne F, Boxus, M., Ingels, S., Thonart, P.,: **Bioreactor mixing efficiency modulates the activity of a prpoS::GFP reporter gene in E. coli.** *Microbial cell factories* 2009, **8**:15.
23. Delvigne F, Ingels, S., Thonart, P.,: **Evaluation of a set of E. coli reporter strains as physiological tracer for estimating bioreactor hydrodynamic efficiency.** *Process biochemistry* 2010, **in press**.
24. Lara AR, Vazquez-Limon, C., Gosset, G., Bolivar, F., Lopez-Munguia, A., Ramirez, O.T.,: **Engineering Escherichia coli to improve culture performance and reduce formation of by-products during recombinant protein production under transient intermittent anaerobic conditions.** *Biotechnology and bioengineering* 2006, **94**(6):1164-1175.