



UNIVERSITE MUSTAPHA STAMBOULI DE MASCARA  
FACULTÉ DES SCIENCES ET TECHNOLOGIE

**Polycopié de cours**  
**Bioréacteurs**

**Présenté par : Dr. Atma Wafa**

**Ce Polycopié de cours est destiné aux étudiants de**  
**2<sup>ème</sup> Année Master :**  
**-Génie Pharmaceutique**  
**-Génie des procédés de l'environnement**

**Algérie 2021-2022**

---

**Semestre: 3**

**Unité d'enseignement: UEF 2.1.2**

**Matière 2: Bioréacteurs**

**VHS: 45h00 (Cours: 1h30, TD: 1h30)**

**Crédits: 4**

**Coefficient : 2**

**Objectifs de l'enseignement:**

Introduction des concepts de base nécessaires à la mise en œuvre du design et de l'analyse des bioréacteurs à l'échelle industrielle

**Connaissances préalables recommandées:**

**Contenu de la matière:**

I- Introduction ( 2 semaines)

Rappels des connaissances de base de la microbiologie, la biochimie et la biologie moléculaire nécessaires au calcul des bioréacteurs

II- Modélisation des vitesses de réaction dans les systèmes biologiques (3 semaines)

- Cinétique microbienne : modèle de Monod
- Cinétique des enzymes
- Inhibition des réactions enzymatiques

III- Design et analyse des bioréacteurs (5 semaines)

- Types de bioréacteurs
- Concepts de base
- Bioréacteurs batch
- Cuves agitées continues
- Bioréacteurs piston
- Comparaison bioréacteurs batch et bioréacteurs continus

IV- Stérilisation (2 semaines)

- Stérilisation physique
- Stérilisation chimique

V- Transfert de matière dans les bioréacteurs (3 semaines)

- Aération : transfert de matière gaz-liquide
- Agitation : transfert de matière par convection forcée

**Mode d'évaluation:**

---

Contrôle continu: 40% ; Examen: 60% .

## **AVANT – PROPOS**

Ce cours « Bioréacteurs » s'adresse aux étudiants de Master 2 , génie des procédés de l'environnement et génie pharmaceutique , mais aussi à ceux qui souhaitent acquérir les notions de base des bio-réactions. Cet ouvrage est le fruit de longues années de travail au département de génie des procédés à l'université de Mustapha Stambouli de Mascara.

L'objectif de ce cours est donc de vous initier à la description des processus qui caractérisent le fonctionnement d'un bioréacteur.

Nous nous intéresserons d'abord à la croissance des micro-organismes présents à l'intérieur d'un bioréacteur ; puis nous examinerons les types des bioréacteurs ; enfin, nous nous intéresserons au transfert de matière et de la chaleur que l'on trouve au sein d'un bioréacteur.

Il s'agit alors d'une combinaison de deux composantes principales, l'une biologique (culture vivante), et l'autre artificielle (dispositif commandant les conditions de culture) pour atteindre un objectif de production et/ou de bioconversion préalablement défini.

Ce cours de Bioréacteurs , donné en présentiel, est complété par des travaux dirigés traitant des cas d'application .

---

## **Contenu de la matière:**

### **I. Introduction**

- Rappels des connaissances de base de la microbiologie, la biochimie et la biologie moléculaire nécessaires au calcul des bioréacteurs
- Classification des microorganismes
- Nutrition et croissance des micro-organismes
- La fermentation industrielle

### **2. Modélisation des vitesses de réaction dans les systèmes biologiques**

- Cinétique microbienne : modèle de Monod
- Cinétique des enzymes
- Inhibition des réactions enzymatiques

### **3. Design et analyse des bioréacteurs**

- Types de bioréacteurs
- Concepts de base
- Bioréacteurs batch
- Cuves agitées continues
- Bioréacteurs piston
- Comparaison bioréacteurs batch et bioréacteurs continus

### **4. Stérilisation**

- Stérilisation physique
- Stérilisation chimique

### **5. Transfert de matière dans les bioréacteurs**

- Aération : transfert de matière gaz-liquide
- Agitation : transfert de matière par convection forcée

Annexe 1

---

## 1. Introduction

Les procédés biotechnologiques sont faits dans des bioréacteurs ou fermenteurs, où des molécules sont synthétisées à l'aide de souches de bactéries, de levures et de cellules. Le produit final est utilisé dans de nombreux domaines de notre vie quotidienne, comme pour la fermentation du yaourt et de la bière. Outre les applications dans le domaine des aliments et des boissons, il est également utilisé dans le domaine de la recherche et de la production de médicaments.

En termes simples, un bioréacteur est un récipient dans lequel se produisent des procédés biologiques permettant d'assurer une croissance des micro-organismes et une production optimale dans un environnement dont les paramètres physiques et chimiques de la fermentation sont contrôlés.

Il s'agit alors d'une combinaison de deux composantes principales, l'une biologique (culture vivante), et l'autre artificielle (dispositif commandant les conditions de culture) pour atteindre un objectif de production et/ou de bioconversion préalablement défini.

La majorité des bioréacteurs doivent être alimentés en gaz et en nutriments pour permettre la croissance des bactéries, des levures ou des cellules et pour que la synthèse biologique souhaitée puisse avoir lieu. Ces additifs sont généralement ajoutés en continu sur une période allant de quelques jours à plusieurs semaines.

La campagne d'un procédé contenant des cultures cellulaires peut prendre jusqu'à trois ou quatre semaines avant la récolte, alors qu'une campagne avec des cultures bactériennes ne dure souvent que quelques jours.

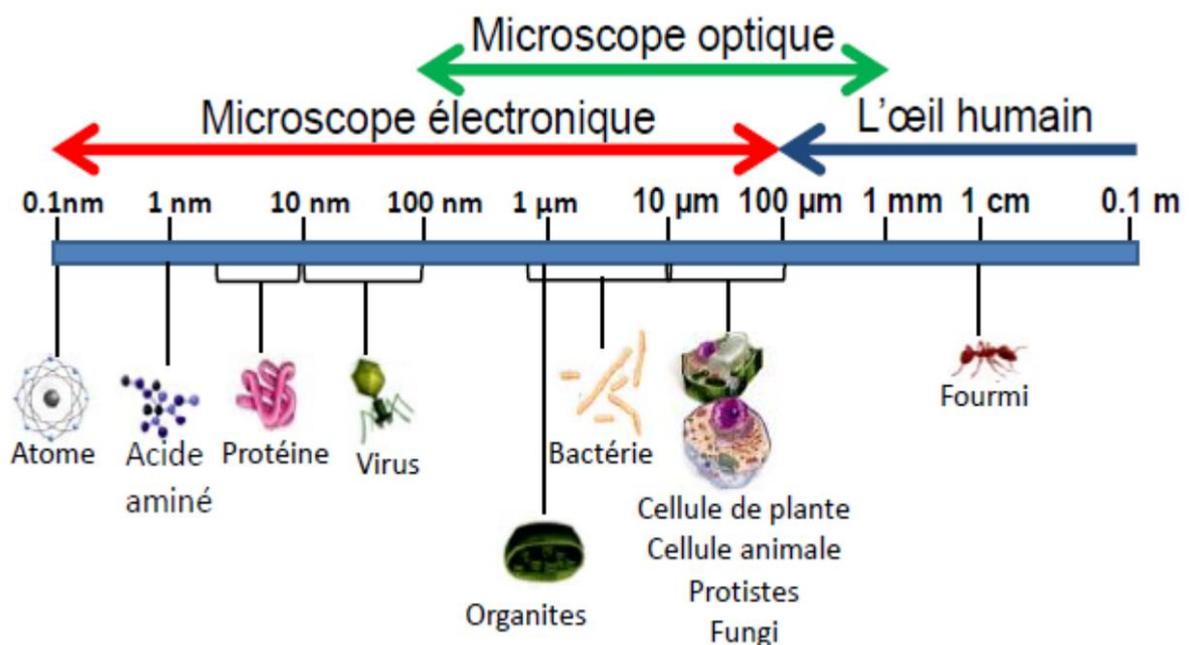
Bien que le terme fermentation soit un abus de langage, car il concerne la respiration anaérobie selon Pasteur, il est, par extension, utilisé par le monde industriel pour désigner l'opération unitaire qui va permettre de réaliser les cultures cellulaires et d'effectuer les réactions de bioconversion, qu'elles soient aérobies ou anaérobies.

*La fermentation est une étape d'un procédé industriel ; elle s'insère dans un ensemble d'opérations unitaires qui aboutiront à la valorisation de la biomasse et/ou de ses composantes et/ou à la valorisation des produits de bioconversion.*

---

## 1.1. Rappels des connaissances de base de la microbiologie, la biochimie et la biologie moléculaire nécessaires au calcul des bioréacteurs

Les micro-organismes (du grec micro, petit et bios, vie) sont des êtres vivants invisibles à l'œil nu, unicellulaires ou pluricellulaires mais, dans ce cas, les cellules ne sont pas différenciées en tissu. Sous ce terme sont regroupés virus, bactéries, protistes, algues et champignons microscopiques. Ce sont des organismes ubiquitaires qui représentent la biomasse la plus importante de la Terre. Leurs tailles sont généralement inférieures à un millimètre : ils doivent être observés au microscope (photonique/optique ou électronique) et cultivés dans des milieux permettant leur croissance et leur isolement.



**Figure 1.1.** Taille des microorganismes

Les micro-organismes sont ubiquitaires (très diversifiés), et retrouvés sur tous les types de surfaces : air, sol, eau, etc. Les microbes sont également présents dans divers phénomènes de notre quotidien : production d'aliments, alicaments, biofilms, croissance des végétaux, digestion des animaux, etc. Certains d'entre eux sont bénéfiques et d'autres sont jugés néfastes (maladies). Les microorganismes ont des propriétés communes : leur taille microscopique, et leur organisation simple. La plupart sont unicellulaires (composés d'une seule cellule : bactéries, protozoaires, levures,

algues unicellulaires), mais si ils sont pluricellulaires (Moisissures, algues pluricellulaires), alors leurs cellules sont équivalentes ou identiques (indifférenciées), sans aucune différence morphologique, physiologique ou fonctionnelle (pas d'organes et de tissus différenciés). Certains microorganismes peuvent même être acellulaires (Ils n'ont pas de cellule : virus). Les microorganismes peuvent se différencier également par la nature du noyau : ils peuvent être acaryotes (sans noyau : virus), procaryotes (noyau primitif ou nucléoïde : bactéries) ou eucaryotes (vrai noyau : protozoaires, algues microscopiques, champignons microscopiques). Ils se composent donc : des bactéries (Bactériologie), des protozoaires (Parasitologie), des champignons (Mycètes) microscopique (Mycologie), des algues (Phycologie), mais également des virus (Virologie), dont l'absence de structure cellulaire, de métabolisme et de croissance fait qu'on ne peut les considérer véritablement comme des êtres-vivants.

### 1.1.1. Classification des microorganismes

Les êtres vivants peuvent être divisés en deux groupes selon la présence ou non de noyau : les organismes : procaryotes et eucaryotes.

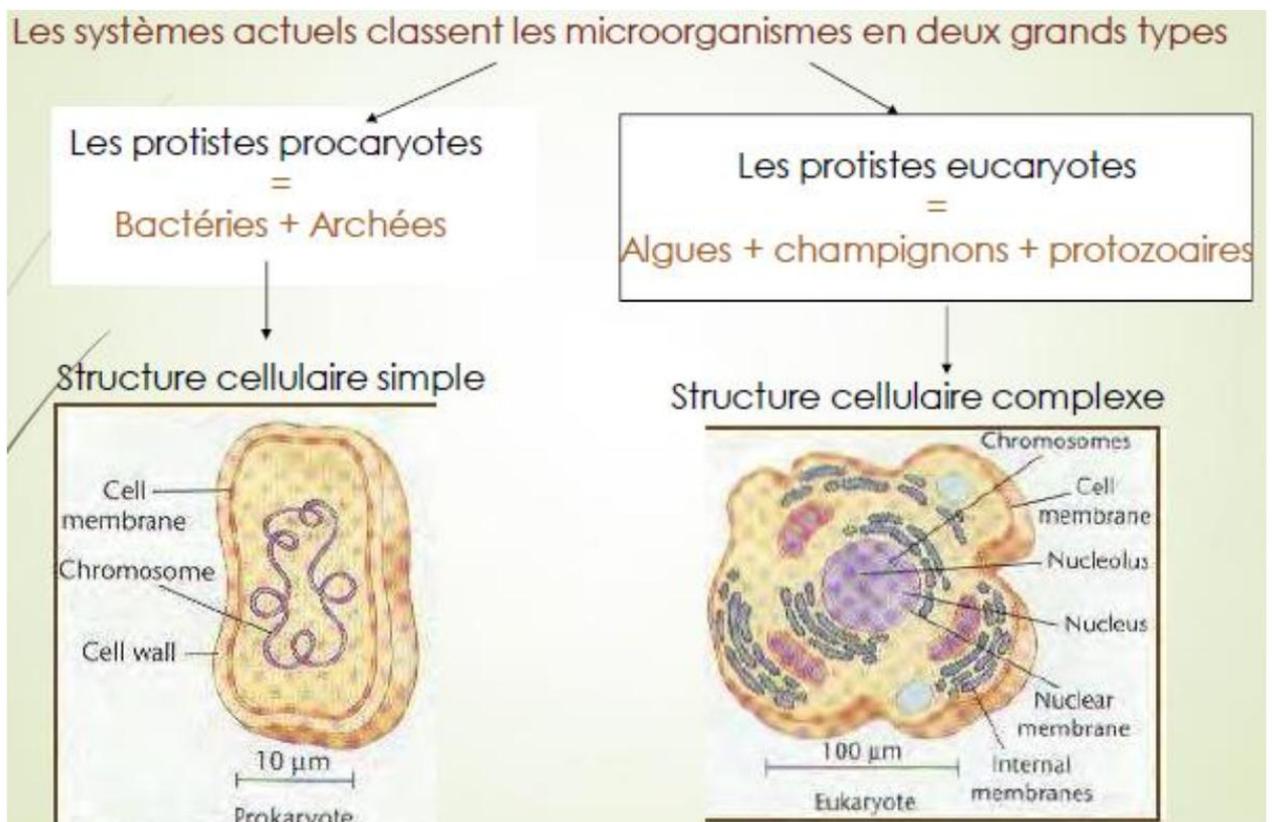


Figure 1.2. Types des Micro-organismes

---

### 1.1.2. Nutrition et croissance des micro-organismes

Pour assurer sa croissance ou sa survie, un micro-organisme doit trouver de quoi satisfaire ses besoins nutritifs dans son environnement : substances énergétiques permettant à la cellule de réaliser la synthèse de ses constituants et substances élémentaires ou matériaux constitutifs de la cellule. Tous les microorganismes ont besoin d'eau, d'une source d'énergie, d'une source de carbone, d'une source d'azote et d'éléments minéraux.

Ils absorbent les nutriments par transport passif ou actif ou endocytose

- **L'eau** joue un rôle fondamental en solubilisant les nutriments, en assurant leur transport et en permettant les réactions d'hydrolyse.

- Selon le mécanisme de conversion de **l'énergie** en énergie chimique qu'ils mettent en œuvre, les micro-organismes peuvent être séparés en deux types métaboliques principaux :
  - ceux qui utilisent l'énergie électromagnétique (lumière) comme source d'énergie pour la croissance sont dits **phototrophes** ;

- ceux qui transforment l'énergie par réactions d'oxydoréduction de substrats organiques ou inorganiques, quelle que soit la façon dont est obtenue l'énergie chimique (respiration ou fermentation) sont dits **chimiotrophes**.

Au cours de la chaîne de réactions, la nature du donneur d'hydrogène permet de caractériser les types métaboliques :

- les organismes qui utilisent les composés organiques comme donneurs d'hydrogène sont appelés **organotrophes** ;

- par opposition, **les lithotrophes** utilisent des donneurs d'hydrogène inorganiques.

Au cours de la chaîne de réactions, la nature de l'accepteur final d'électrons permet de distinguer les types respiratoires :

- lorsque l'accepteur final d'électrons est l'oxygène moléculaire, on parle de respiration et les micro-organismes de ce type sont **aérobies** ;

- lorsque l'accepteur est une substance inorganique, un sulfate ou un carbonate, on parle de respiration anaérobie et les organismes de ce type sont **anaérobies** ;

- lorsque l'accepteur final d'électrons est un composé organique, on parle de **fermentation** et les bactéries sont **anaérobies** ou **aéro-anaérobies**.

- **Le carbone** est un élément constitutif abondant chez les microorganismes : les organismes capables de se développer en milieu inorganique contenant le CO<sub>2</sub> comme seule source de carbone

---

sont appelés *autotrophes* ; les autres, exigeant des composés organiques, sont nommés *hétérotrophes*.

- La synthèse des protéines nécessite des substances azotées. La source d'azote peut être l'azote moléculaire, fixé par quelques bactéries vivant en symbiose avec des légumineuses ou des champignons, ou d'autres composés inorganiques (ammoniac, sels d'ammonium, nitrites, nitrates) ou encore des sources organiques (groupements amines des composés organiques).
- Les éléments minéraux sont importants comme éléments constitutifs de molécules ; le soufre est, par exemple, présent dans certains acides aminés (groupement thiol) ; le phosphore fait partie des acides nucléiques, de nombreuses coenzymes et de l'ATP ; sodium, potassium, magnésium et chlore participent à l'équilibre physico-chimique de la cellule.

Dans le domaine des biotechnologies, elle trouve son application dans le développement et la mise en œuvre de procédés industriels de culture microbienne, la fabrication de produits alimentaires, l'obtention de métabolites, enzymes et autres sans oublier la capitalisation de biomasse microbienne.

### 1.1.3. La fermentation industrielle

En microbiologie industrielle, le terme de **fermentation** désigne l'opération unitaire qui permet de produire de la biomasse ou des produits de bioconversion par la culture de micro-organismes.

Ainsi, contrairement au sens biochimique, le terme de **fermentation industrielle** ne se réfère pas au métabolisme du micro-organisme. Ce terme s'applique en industrie pour des métabolismes aérobies et anaérobies.

Le "génie" microbiologique, dans la même acception que le "génie" civil ou le "génie" militaire, correspond à l'ensemble des technologies qui permettent d'exploiter industriellement des microorganismes vivants.

Avec le "génie enzymatique" et le "génie" génétique, le "génie" microbiologique constitue un des éléments du domaine industriel des biotechnologies.

Le génie enzymatique correspond aux techniques utilisant des **enzymes**. Ces dernières sont des molécules organiques de nature protéique dont la fonction biologique est **de catalyser les réactions du métabolisme**.

Leur activité est extrêmement spécifique et permet, dans des conditions très douces (température faible et pression atmosphérique) de réaliser des réactions impossibles sans leur intervention.

Le génie génétique - qualifié également de "biologie moléculaire" – regroupe tous les moyens qui facilitent les actions sur le génome cellulaire.

---

En particulier, c'est en partie grâce aux procédés du génie génétique que l'on est en mesure de modifier l'information génétique d'une cellule. Cela peut s'avérer fort utile pour améliorer les performances d'une biomasse, en génie microbiologique.

Dans ce contexte précis, l'ensemble des éléments constituant une installation de fermentation a pour objectif général soit de favoriser au maximum la production de cellules ou de métabolites cellulaires directement utilisables (**bio-productions**), soit simplement de modifier un substrat par action biologique (**bioconversion**).

Dans le premier cas, l'étape de fermentation proprement dite devra être suivie par des opérations de séparation (**down stream process**) en vue d'isoler, de purifier et de stabiliser les cellules ou les métabolites (ex : filtration d'une bière de type pils, en vue d'en retirer les levures ; distillation de jus de raisins fermenté en vue de produire du cognac, ...).

Par contre on parlera de bioconversion quand aucune séparation n'intervient en aval de la fermentation (ex : fabrication de yogourt ou de fromage blanc, dans lesquels la flore active demeure dans le produit fini).

Quel que soit le type de produit recherché, pour en optimiser la production, il est impératif de fournir à la biomasse un substrat parfaitement adapté, tant dans sa composition que du point de vue des concentrations de ses différents éléments. En outre ce milieu de culture doit, le plus souvent, être stérilisé afin d'éviter tout développement anarchique d'une biomasse non désirée. Il doit en outre être le plus accessible possible et dès lors présenter une interface maximale avec les microorganismes utilisés.

#### ***1.1.3.1. La biomasse :***

Le terme biomasse désigne la partie biologique du processus de bioproduction. Il s'agit donc des cellules cultivées dans le réacteur. Plus particulièrement, on qualifie d'inoculum la biomasse injectée dans le réacteur au début de la production. De même on parle souvent de souche pour désigner le type de biomasse utilisé.

Cette biomasse peut provenir de différents groupes biologiques. Il s'agit dans l'immense majorité des cas d'organismes unicellulaires procaryotes (bactéries et archées) ou eucaryotes (levures [mycètes]), ou de pluricellulaires eucaryotes indifférenciés (moisissures [mycètes]).

La biomasse elle-même doit, en général, être sélectionnée en vue d'obtenir des souches hautement performantes garantissant une productivité élevée.

#### ***Conservation des souches***

---

Les souches mères constituent un des trois éléments - avec le substrat et les régulations - nécessaires pour réaliser une bio-production spécifique et efficace. Elles résultent souvent d'un processus de sélection relativement long et éventuellement coûteux. Elles font dès lors partie du capital de l'entreprise qui les exploite et possèdent une valeur concurrentielle parfois significative.

*N. B. : Le fait qu'une souche-mère fasse partie du capital de l'entreprise se matérialise par le fait qu'il est possible de faire breveter ces organismes vivants (voire leurs dérivés) au même titre qu'une technique de production ou des appareils. L'obtention d'un brevet protège l'entreprise qui le détient contre une concurrence qui tenterait d'employer le même procédé (en l'occurrence, la même souche).*

Ces souches, précieusement conservées, seront préparées en temps utile afin de disposer d'un maximum d'efficacité dès leur mise en production.

Parmi les nombreux produits du génie microbiologique, certains font appel à des microorganismes aérobies exigeant une aération plus ou moins intense du substrat. Les modalités de distribution optimale d'un air, stérile ou non, font aussi l'objet d'études à prendre en considération dans la conception d'un réacteur biologique.

A cette fin diverses technologies peuvent être mise en œuvre :

**Repiquages** : Les techniques de repiquage des souches consistent en fait à renouveler le substrat de croissance en prélevant une partie de la population utile et en la mettant en présence de substrat frais.

**Réfrigération et congélation** Ces deux procédés ont en commun l'utilisation du froid.

En réfrigération les métabolismes ne sont pas arrêtés, mais seulement ralentis vu que les enzymes peuvent rester en solution.

En congélation, la cristallisation de l'eau rend celle-ci indisponible, figeant de ce fait l'activité enzymatique. Les cellules entrent donc dans une sorte de dormance au cours de laquelle le métabolisme est à l'arrêt vu la neutralisation des enzymes.

**Déshydratation** Une autre façon de bloquer les métabolismes consiste à éliminer l'eau du substrat et des cellules.

**Lyophilisation** qui consiste à congeler la suspension microbienne puis à placer le matériel gelé en dépression afin d'éliminer l'eau par sublimation. On obtient ainsi une poudre qui peut se conserver à température ambiante sans difficulté.

### **1.1.3.2. Le substrat :**

En microbiologie industrielle, le substrat désigne la matière sur ou dans laquelle se développe la biomasse. C'est du substrat que celle-ci tire tous les éléments nécessaires à sa croissance et/ou à ses productions.

le substrat doit apporter :

- les éléments majeurs (vitaux) que sont C, H, O, N, P et S ; • des éléments mineurs (nécessaires pour un métabolisme dynamique, mais non vitaux) tels que Ca, Mg, K, ... ;
- des oligoéléments (nécessaires mais en quantité très faible vu leur rapide toxicité en cas d'excès) tels que Fe, Cu, Zn, ... ;

- des substances de croissance (molécules organiques que la biomasse est incapable de synthétiser elle-même) telles que vitamines, enzymes, ...

Tenant compte de ces impératifs relatifs au substrat et à la biomasse, le bioréacteur (ou digesteur ou fermenteur), partie maîtresse de l'installation, consiste en une enceinte plus ou moins vaste (de quelques litres en installation de laboratoire, quelques dizaines de litres en installation pilote ou de préculture, à plusieurs mètres-cubes en production industrielle.) conçue pour optimiser les contacts biomasse-substrat-oxygène en vue de maximiser le rendement de la (des) réaction(s) biochimique(s) recherchée(s).

Ces contacts doivent permettre un transfert idéal, d'une part, des substances nutritives en solution dans le substrat vers le cytoplasme cellulaire, et d'autre part, des produits de l'activité microbienne vers le milieu extra-cellulaire.

Cependant, connaissant le fonctionnement microbien (courbe de croissance, métabolisme primaire et secondaire,...), on s'aperçoit que si l'on n'y prend pas garde, l'environnement de cette biomasse va évoluer au cours de la réaction, entraînant éventuellement une modification du mode de fonctionnement des cellules. D'où l'impérieuse nécessité de disposer de systèmes de régulation destinés à maintenir constantes les conditions de travail. Ceci implique deux contraintes :

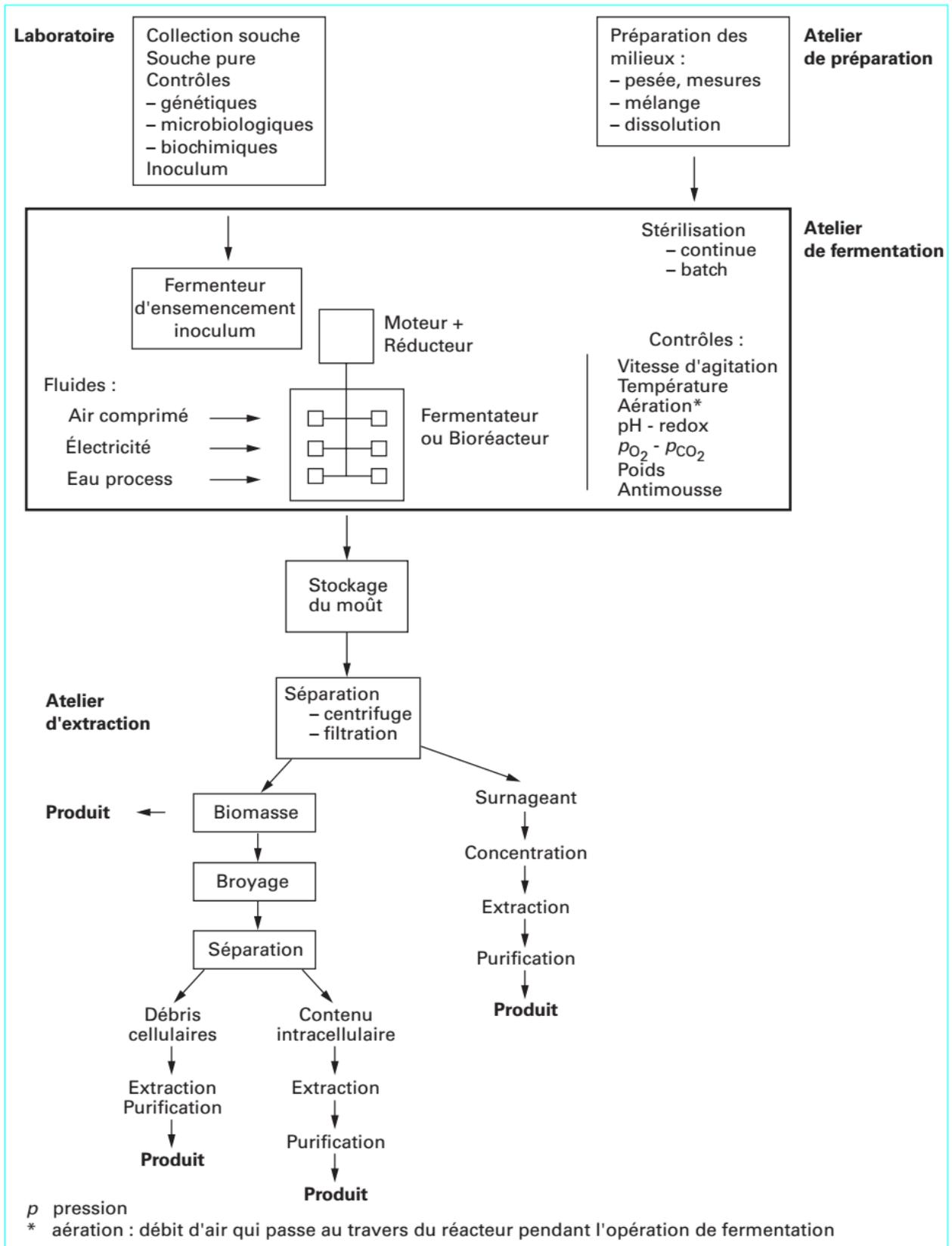
- pouvoir mesurer, si possible en temps réel, la valeur des principales variables ( $T^\circ$ , pH, concentrations, débit d'O<sub>2</sub>, ...) susceptibles d'interférer avec le fonctionnement de la biomasse ;
- disposer d'un moyen de corriger le plus rapidement possible les caractéristiques de la réaction en cours.

Par ailleurs, lorsque la bior-éaction s'achève, les produits recherchés (cellules ou molécules) se retrouvent en mélange avec des résidus du substrat. Il s'agit donc de concevoir des moyens de séparer le produit intéressant du reste sans l'endommager et en lui assurant une pureté compatible avec son utilisation.

Enfin, il ne faut pas perdre de vue que certains procédés du génie microbiologique exigent l'utilisation d'une biomasse extrêmement spécialisée (souche microbienne fortement sélectionnée et éventuellement protégée commercialement par un brevet) susceptible d'être concurrencée, diluée voire détruite par des infections (souches sauvages, autres espèces, virus,...).

---

La lutte contre les sources d'infection et la protection hygiénique du digesteur sont donc des opérations incontournables dans la gestion d'une installation de fermentation. On distingue cinq étapes importantes dans tout procédé de fermentation (figure 1.3. ) :



**Figure 1.3.** Fermentation et environnement : schéma de principe des procédés fermentaires

---

## 2. Modélisation des vitesses de réaction dans les systèmes biologiques

L'objectif de cette partie est de s'initier à la modélisation au travers de la description des processus qui caractérisent le fonctionnement d'un bioréacteur. Nous nous intéresserons d'abord à la croissance des micro-organismes présents à l'intérieur d'un bioréacteur ; puis nous examinerons la dynamique couplée de ces micro-organismes à celle de la quantité de substrat disponible ; enfin, nous nous intéresserons à la vitesse d'une réaction enzymatique à l'image de celles que l'on trouve au sein d'un bioréacteur.

### **La modélisation des systèmes biologiques :**

La modélisation des systèmes biologiques est une tâche extrêmement délicate car, contrairement à la physique, il n'existe pas de lois admises et reconnues par tous caractérisant l'évolution des phénomènes auxquels on s'intéresse. La modélisation est la démarche scientifique qui permet l'élaboration d'un modèle (Pavé, 2012).

Elle est le plus souvent fondée sur les mathématiques, et même la partie des mathématiques qui traite des variables et paramètres à valeurs dans  $\mathbb{R}$ . Pourtant, d'autres formalismes peuvent parfois s'avérer utiles comme les représentations schématiques dans les modèles de décision. Modéliser, ce n'est pas théoriser. On peut modéliser sans théoriser et inversement. Par contre, un modèle est très souvent un outil précieux dans une démarche théorique. De ce fait, la modélisation intervient dans les grandes fonctions de la recherche scientifique :

- Détecter et énoncer des questions ;
- Transformer en problème et acquérir des données et des connaissances ;
- Définir des actions et étudier leurs conséquences.

Le modélisateur est celui qui modélise ; il est spécialiste d'une stratégie de construction et d'utilisation de modèles : il maîtrise une grande variété de techniques et de méthodes ; il s'inspire du problème biologique pour proposer un modèle (et non l'inverse) ; il s'implique dans la connaissance des aspects biologiques de ce qu'il modélise. Le modélisateur modélise en proposant des modèles.

Un modèle est une représentation symbolique de certains aspects d'un phénomène du monde réel. En aucun cas il ne doit être le prétexte de décisions prises a priori ; un modèle ne peut être qu'un instrument d'aide à la décision (technique ou politique).

Un modèle doit avant tout être opératoire, c'est-à-dire permettre de répondre aux objectifs initiaux, être interprétable en termes biologiques et être traduisible en termes simples et accessibles à tous. L'élaboration d'un modèle doit donc prendre en compte :

- Le phénomène biologique à étudier ;
- Le formalisme choisi ;
- Les objectifs (que veut-on faire du modèle ?) ;
- Les données et les connaissances a priori, disponibles ou accessibles par l'expérience ou l'observation. Une fois le modèle écrit, le travail du modélisateur consiste à :
  - Manipuler le modèle pour étudier ses propriétés ;
  - Établir des relations avec d'autres représentations (graphes, simulations) ;
  - Interpréter et confronter les résultats avec la réalité biologique, le plus souvent vue au travers des données expérimentales.

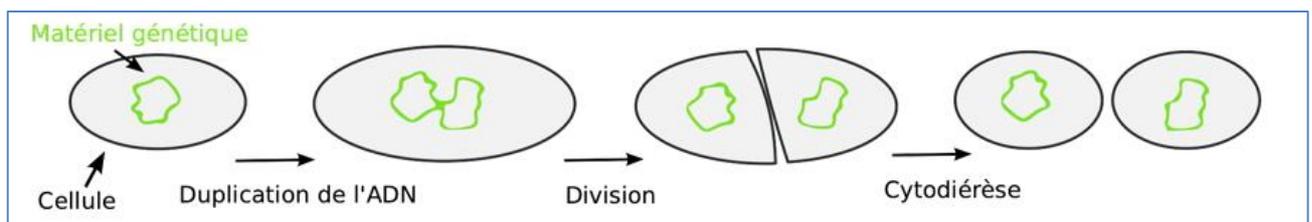
La notion de croissance bactérienne recouvre deux aspects : (1) la croissance de la cellule bactérienne elle-même (taille, poids, volume) ; (2) le phénomène de division cellulaire (croissance de la population bactérienne) auquel nous nous intéresserons exclusivement ici.

## 2.1. Cinétique microbienne : modèle de Monod

### 2.1.1 La croissance bactérienne

#### *La fission binaire*

Les bactéries sont des êtres vivants unicellulaires qui se reproduisent par fission binaire (ou scissiparité) : une cellule mère donne deux cellules filles. Ces deux cellules filles donnent ensuite quatre cellules petite-filles...



**Figure 2.1.** Étapes de la division binaire

#### *La croissance bactérienne*

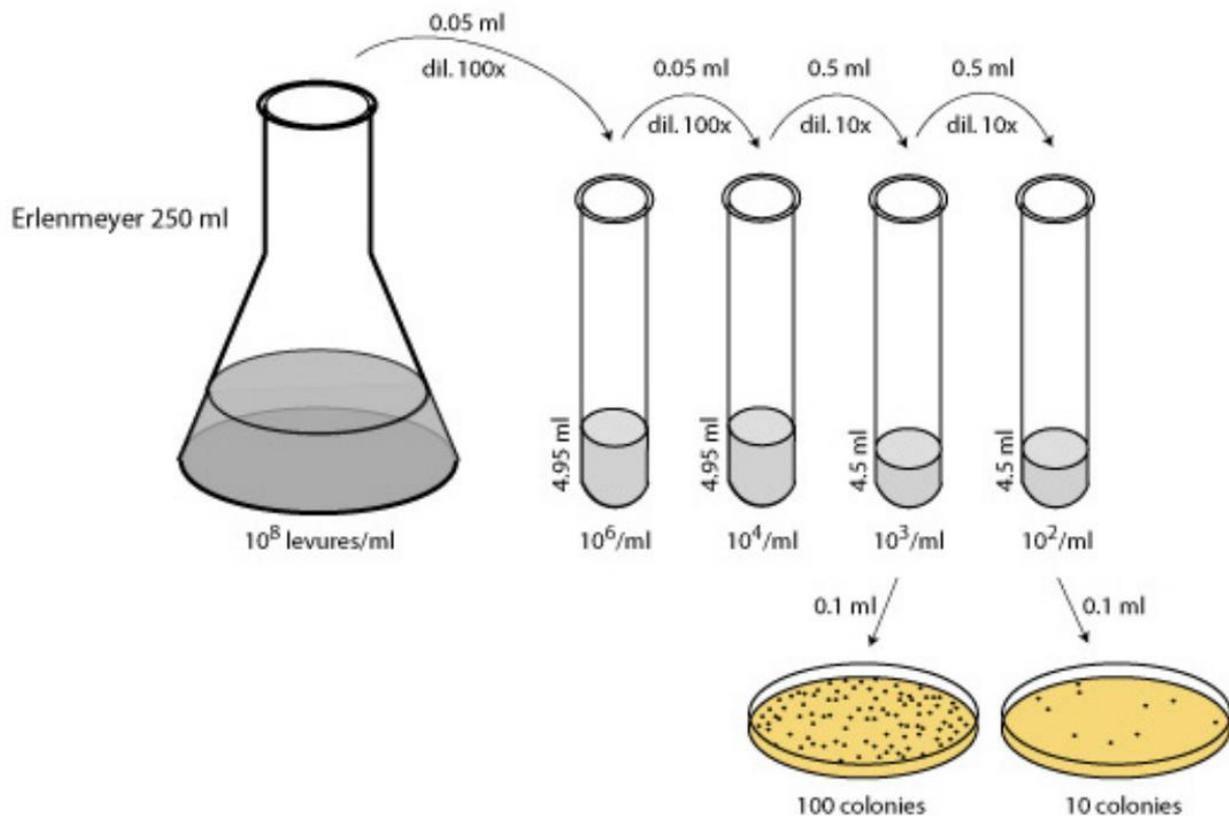
La croissance de la population bactérienne correspond à la répétition du processus de reproduction bactérienne décrit ci-dessus.

#### *Mesure de la croissance bactérienne*

La croissance bactérienne peut se mesurer par deux méthodes :

soit par une mesure de **Densité Optique (DO)** ; au laboratoire, cette mesure de turbidimétrie est la plus pratique et rapide. On choisit en général une longueur d'onde dans le visible, soit 600 nm. La densité optique de la solution croît linéairement avec le nombre de bactéries.  
 soit par un **dénombrement cellulaire** sur boîte de Pétri (voir figure 2.2).

### Principe des dilutions en série



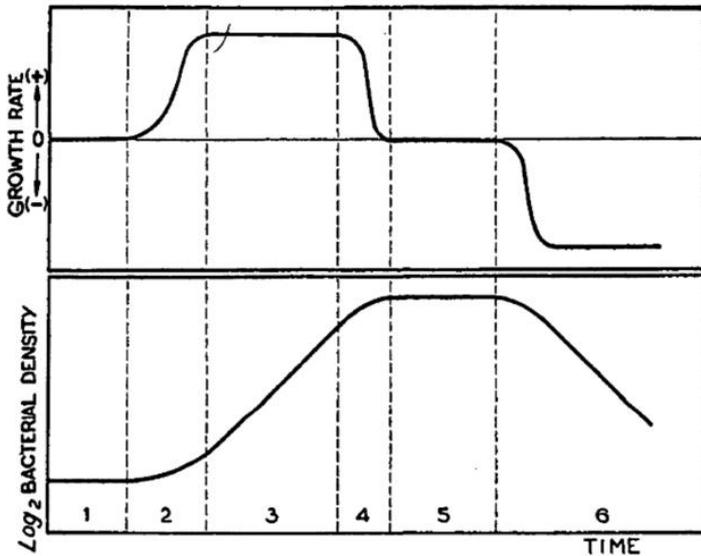
**Figure 2.2.** Méthode de dénombrement cellulaire sur boîte de Pétri

#### 2.1.2. Les différentes phases de la croissance bactérienne

Depuis la première description de Buchanan (1918), il est classique de distinguer plusieurs phases dans la croissance des cultures bactériennes. Ces phases sont caractérisées par certaines valeurs ou variations de la vitesse de multiplication de la culture. Monod, en 1949, caractérisera les six phases en fonction du taux de croissance, comme le montre la figure ci-dessous (Fig. 2.2) :

1. La phase de latence, pendant laquelle le taux de croissance est nul ;
2. La phase d'accélération, pendant laquelle le taux de croissance augmente ;
3. La phase exponentielle, pendant laquelle le taux de croissance est constant et maximum ;

- 
4. La phase de ralentissement, pendant laquelle le taux de croissance diminue ;
  5. La phase stationnaire, pendant laquelle le taux de croissance est redevenu nul ; 6. La phase de déclin, pendant laquelle le taux de croissance est négatif.



**Figure 2.3.** les différentes phase de la croissance bactérienne (Monod, 1949).

### 2.1.3. Le Modèle de Monod

*(Quelques autres modèles non structurés rencontrés dans la littérature en annexe 1)*

On suppose une expérience de fermentation en milieu liquide en bioréacteur supposé parfaitement agité et parfaitement homogène en température.

$t$  désigne le temps. Par convention le temps  $t=0$  correspond à l'inoculation du fermenteur.

$\Delta t$  désigne un intervalle de temps.

On appelle  $[X]$  ou  $[X]_t$  la concentration en biomasse mesurée à l'instant  $t$ .

On appelle  $[S]$  ou  $[S]_t$  la concentration du substrat  $S$  mesurée à l'instant  $t$ .

On appelle  $[P]$  ou  $[P]_t$  la concentration d'une substance  $P$  (production microbienne) mesurée à l'instant  $t$ .

## Vitesse de croissance et vitesse spécifique de croissance

La vitesse de croissance à l'instant  $t$  est :

$$r_X = \frac{d[X]}{dt}$$

(en utilisant la notation mathématique différentielle)

$r_X$  s'exprime en « concentration de biomasse . temps<sup>-1</sup> ». (Par exemple en g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>.)

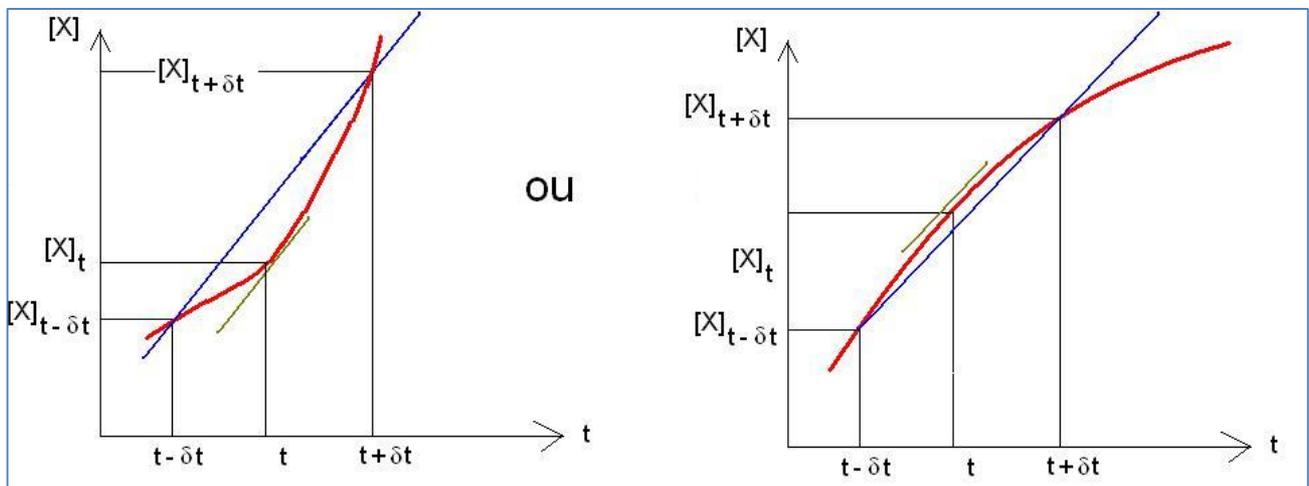
La vitesse spécifique de croissance à l'instant  $t$  est :

$$\mu = \frac{r_X}{[X]} = \frac{d[X]}{dt} \frac{1}{[X]}$$

$\mu$  s'exprime en temps<sup>-1</sup>. (Par exemple en h<sup>-1</sup> ou en min<sup>-1</sup>.)

**Exemple d'application : une méthode pratique pour évaluer  $\mu$  aux différents instants du suivi d'une croissance microbienne"**

Soit un suivi de biomasse :



**Figure 2.4.** Évaluation de  $\mu$  aux différents instants du suivi d'une croissance microbienne"

En rouge l'évolution de la biomasse  $[X]$  en fonction du temps  $t$ .

- En vert-marron la tangente en  $(t, [X]_t)$ .
- En bleu, la droite dont le calcul de détermination approchée de  $r_X$  va calculer la pente.
- On a  $r_X$  à  $t = d[X]/dt$  peu différent de  $([X]_{t+\delta t} - [X]_{t-\delta t})/(2\delta t)$  si  $\delta t$  est suffisamment petit.

• Ainsi en multipliant les mesures expérimentales, on pourra obtenir de bonnes approximations de  $r_x$  tout au long du suivi de culture.

• une approximation de  $\mu$  à chaque instant s'obtiendra alors grâce à  $\mu = r_x / [X]$ .

le tableau ci-dessous a été obtenu en adaptant partiellement la présentation de données figurant dans le chapitre "fermentation modelling" de Sinclair C. G., Cantero D. 1990. In: Fermentation a practical approach. Eds.: McNeil B., Harvey L. M.; IRL PRESS at Oxford University Press, New York, pp. 65-112.

**Tableau 2.1.** un exemple pratique qui montre la conduite des calculs :

Temps t en h	[biomasse] [X] en g de matière sèche /L	valeur approchée de $r_x$ en $gL^{-1}h^{-1}$	valeur approchée de $\mu = r_x/[X]$ en $h^{-1}$	
0	0,100			
1	0,134	$0,040 = (0,180 - 0,100)/(2*1)$	$0,298 = 0,040/0,134$	On remarque que les valeurs de $\mu$ sont quasi constantes et maximales lors de cette période : signe une phase exponentielle de croissance
2	0,180	$0,054 = (0,241 - 0,134)/(2*1)$	$0,300 = 0,054/0,180$	
3	0,241	$0,072 = (0,373 - 0,180)/(2*1)$	$0,299 = 0,072/0,241$	
4	0,373	$0,096 = (0,433 - 0,241)/(2*1)$	$0,297 = 0,096/0,373$	
5	0,433	$0,129 = (0,581 - 0,373)/(2*1)$	$0,298 = 0,129/0,433$	
6	0,581	etc ...	etc ...	
etc ...	etc ...	etc ...	etc ...	
12	3,350	etc ...	etc ...	
13	4,490	$1,325 = (6 - 3,350)/(2*1)$	$0,295 = 1,325/4,490$	
14	6,00	$1,755 = (8,00 - 4,490)/(2*1)$	$0,293 = 1,755/6,00$	
15	8,00	$2,350 = (10,70 - 6,00)/(2*1)$	$0,294 = 2,350/8,00$	On remarque que $\mu$ diminue durant cette période : signe le ralentissement
16	10,70	$3,050 = (14,100 - 8,00)/(2*1)$	$0,285 = 3,050/10,70$	
17	14,100	$3,60 = (17,90 - 10,70)/(2*1)$	$0,255 = 3,60/14,100$	
18	17,900	$2,100 = (18,30 - 14,10)/(2*1)$	$0,117 = 2,100/17,900$	
19	18,300	$0,20 = (18,30 - 17,90)/(2*1)$	$0,01 = 0,2/18,30$	
20	18,300			

---

### *La vitesse spécifique de croissance pendant la phase exponentielle*

Pendant la phase exponentielle de croissance la vitesse spécifique de croissance ( $\mu$ ) est maximale et constante, on l'appelle vitesse spécifique maximale de croissance ou taux exponentiel de croissance. On la désigne généralement par  $\mu_{\max}$  ou  $\mu_{\text{expo}}$ .

En phase exponentielle,  $\mu$  est constant et est maximum =  $\mu_{\max}$

$$\mu = \frac{r_X}{[X]} = \frac{d[X]}{dt} \frac{1}{[X]}$$

qu'on peut intégrer en :  $[X]_{t+\Delta t} = [X]_t e^{\mu_{\max} \Delta t}$  (équation a)

qui donne :  $\text{Ln}([X]_{t+\Delta t}) = \text{Ln}([X]_t) + \mu_{\max} \Delta t$  (équation b)

**Il faut bien avoir en tête que les 3 formules ci-dessus accompagnées de leurs conditions sont équivalentes et signifient donc exactement la même chose.**

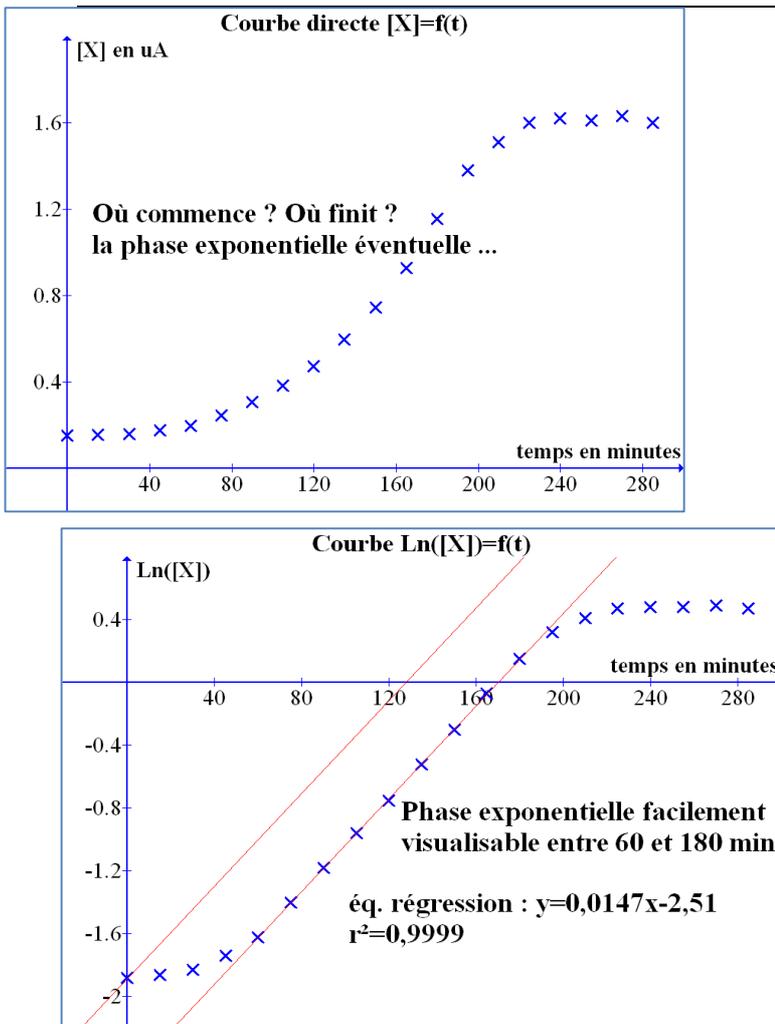
L'équation (b) est très intéressante car elle montre qu'en phase exponentielle de croissance, l'allure de la fonction  $\text{Ln}([X])=f(t)$  est celle d'une droite de coefficient directeur  $\mu_{\max}$ .

Ainsi, les représentations  $\text{Ln}([X])=f(t)$  présentent un double intérêt :

- intérêt visuel : l'oeil humain juge mal l'allure exponentielle mal juge bien l'allure droite ;
- intérêt pour calculer  $\mu_{\max}$  lorsqu'une phase exponentielle est mise en évidence : coefficient directeur de la droite de régression sur les points  $\text{Ln}([X])=f(t)$  si il y a alignement sur une période donnée.

#### *L'intérêt graphique des fonctions $\text{Ln}(X)=f(t)$ et la déterminations de $\mu_{\max}$*

Ci-dessous deux tracés de croissance d'une culture en milieu agité thermostaté non renouvelé : le tracé direct  $[X]=f(t)$  et le tracé  $\text{Ln}[X]=f(t)$ . On voit l'intérêt du tracé  $\text{Ln}[X]=f(t)$



**Figure 2.5.** Croissance d'une culture en milieu agité thermostaté non renouvelé : le tracé direct  $[X]=f(t)$  et le tracé  $\text{Ln}[X]=f(t)$

- Grâce au tracé  $\text{Ln}[X]=f(t)$  on visualise de façon simple la phase exponentielle. On peut dire qu'elle est précédée par une phase de latence-adaptation qui dure environ 45 minutes. La latence-adaptation correspond même exactement à un décalage de 42 minutes à la phase exponentielle si elle avait commencé dès le temps zéro (42 minutes c'est la distance, en temps, qui sépare les 2 droites rouges parallèles sur le graphique).

- Le coefficient directeur de la partie linéaire de  $\text{Ln}[X]=f(t)$  (donc la phase exponentielle) donne  $\mu_{\max}$ . Soit  $\mu_{\max}$   $0,0147 \text{ min}^{-1}$  dans le cas d'espèce. Soit un temps de génération  $G = \text{Ln}(2)/\mu_{\max} = 47 \text{ min}$  pendant la phase exponentielle.

*On aurait pu aussi déterminer G en reportant la durée qui correspond à Ln(2) sur l'axe des ordonnées. Ou on aurait pu aussi déterminer 2G en reportant la durée qui correspond à Ln(4) sur l'axe des ordonnées. Ou on aurait pu aussi déterminer 3G en reportant la durée qui correspond à Ln(8) sur l'axe des ordonnées. Et à partir de la valeur de G, on peut calculer  $\mu_{\max} = \text{Ln}(2)/G$  ...*

Ci-dessous le tableau des valeurs pour l'expérience de croissance présentée.

**Tableau 2.2.** Valeurs pour l'expérience de croissance (figure 2.4.)

temps en min	[biomasse] en u. arbitraires	ln([biomasse])	Estimations de $r_x$	Estimations de $\mu$
0	0,152	-1,88		
15	0,155	-1,86	0,00027	0,0017
30	0,160	-1,83	0,00070	0,0044
45	0,176	-1,74	0,00123	0,0070
60	0,197	-1,62	0,00233	0,0118
75	0,246	-1,40	0,00370	0,0151
90	0,308	-1,18	0,00454	0,0147
105	0,382	-0,96	0,00553	0,0145
120	0,474	-0,75	0,00713	0,0150
135	0,596	-0,52	0,00900	0,0151
150	0,744	-0,30	0,01107	0,0149
165	0,928	-0,07	0,01374	0,0148
180	1,156	0,15	0,0151	0,0131
195	1,381	0,32	0,0118	0,0085
210	1,51	0,41	0,00730	0,0048
225	1,6	0,47	0,00367	0,0023
240	1,62	0,48	0,00033	0,0002
255	1,61	0,48	0,00033	0,0002
270	1,63	0,49	-0,00033	-0,0002
285	1,61	0,48		

*Remarques. On rencontre une phase exponentielle de croissance dans la plupart des cultures en milieu non renouvelé si les concentrations des différents composants sont suffisamment élevées. Dans un procédé de type chémostat (bioréacteur alimenté et prélevé en continu à même débit et en équilibre dynamique stationnaire) la vitesse spécifique de croissance est constante et est égale au "taux de dilution" si le réacteur n'est pas lavé par un débit trop élevé (taux de dilution = débit d'alimentation divisé par volume du fermenteur = débit de prélèvement divisé par volume du fermenteur). La biomasse dans le bioréacteur demeure constante car à l'équilibre dynamique atteint la croissance est égale au prélèvement.*

---

### ***La vitesse spécifique maximale de croissance et les paramètres connexes***

On peut associer à  $\mu_{\max}$  un certain nombre de paramètres connexes : temps de génération, taux horaire de croissance, fréquence (taux) de division par unité de temps. Ils ont l'avantage d'être plus concrets.

- Le temps de génération G, durée pour un doublement de la biomasse pendant la phase exponentielle.

En reprenant l'équation (b) pour un doublement de biomasse, on obtient :

$$G = \frac{\ln(2)}{\mu_{\max}}$$

*Ainsi par exemple à un temps de génération de 20 min = 1/3 d'heure correspond  $\mu_{\max}=0,0347 \text{ min}^{-1}=2,08 \text{ h}^{-1}$ .*

*Ainsi par exemple à un temps de génération de 60 min = 1 heure correspond  $\mu_{\max}=0,0116 \text{ min}^{-1}=0,693 \text{ h}^{-1}$ .*

*Le temps de génération est plus "parlant" pour l'esprit humain.*

- Le taux de croissance horaire THC, facteur relatif d'accroissement de la biomasse pour une durée de 1 heure, en phase exponentielle.

L'équation (a) peut s'écrire donc il vient :

$$\frac{[X]_{t+\Delta t}}{[X]_t} = e^{\mu_{\max} \Delta t}$$

$$THC = e^{\mu_{\max} \Delta t}$$

formule valable avec  $\Delta t = 1$  heure (soit 60 minutes)

*THC est très évocateur. Ainsi pour  $\mu_{\max}=0,0347 \text{ min}^{-1}$  soit  $G=20$  minutes = 1/3 heure on a  $THC = 8$  (en 1 heure la biomasse est multipliée par  $2*2*2=8$ ). En 2 heures de phase exponentielle, la biomasse serait multipliée par  $8*8=64$  ...*

- La fréquence (taux) de division en phase exponentielle,  $k$ , est finalement représentée par :

$$k = \frac{1}{G} \quad \text{et on a la relation } k = \mu_{\max} \text{Ln}(2)$$

*Remarques. On peut utiliser les puissances de 2 pour modéliser la croissance exponentielle. On fait ainsi « référence » au processus de multiplication par la division cellulaire. On obtient alors l'équation de croissance :*

$$[X]_{t+\Delta t} = [X]_t 2^{k \Delta t}$$

en effet,  $2^x = e^{\ln(2)x}$  donc avec  $k = \mu_{\max} \text{Ln}(2)$  on retrouve l'équation (a)

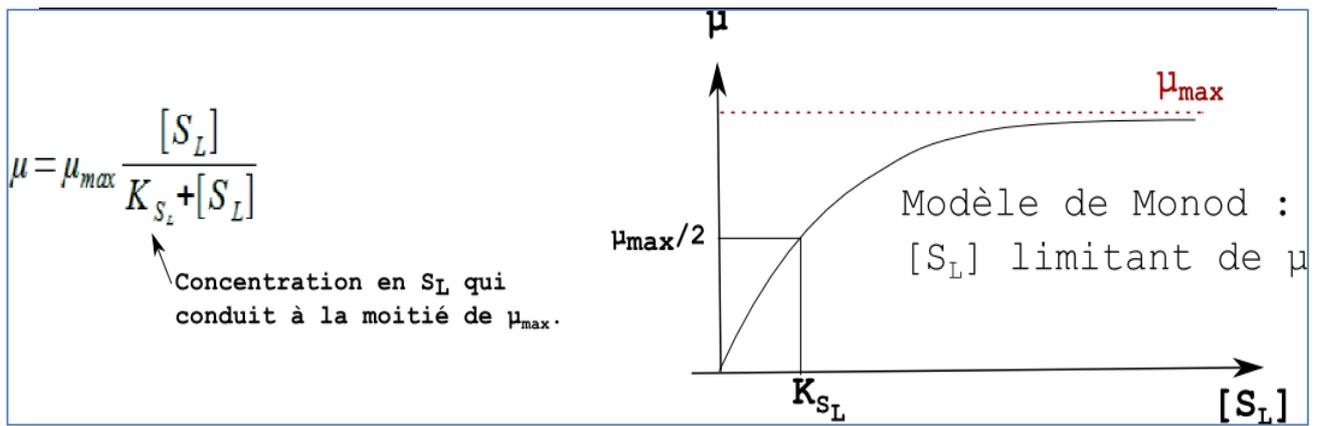
Et un petit tableau d'exemples :

$\mu_{\max}$	G	THC	k
0,0347 min <sup>-1</sup> =2,08 h <sup>-1</sup>	20 min = 1/3 heure	8 = (2*2*2) et e <sup>^(0,0347*60)</sup> =8	(0,05 par min) =3 div. par heure
0,0116 min <sup>-1</sup> =0,693 h <sup>-1</sup>	60 min = 1 heure	2 et e <sup>^(0,0116*60)</sup> =e <sup>^(0,693*1)</sup> =2	(1/60 par min) =1 div. par heure
0,0077 min <sup>-1</sup> = 0,462 h <sup>-1</sup>	90 min = 1,5 heure	e <sup>^(0,0077*60)</sup> = 1,59	(0,011 par min) =0,67 div. par heure

#### 2.1.4. Le modèle de Monod de limitation de la vitesse spécifique de croissance

Un substrat S du milieu - appelons le S<sub>L</sub> peut éventuellement devenir le limitant de la vitesse spécifique de croissance.

Le modèle le plus classique pour cet effet particulier de limitation est le modèle de Monod :

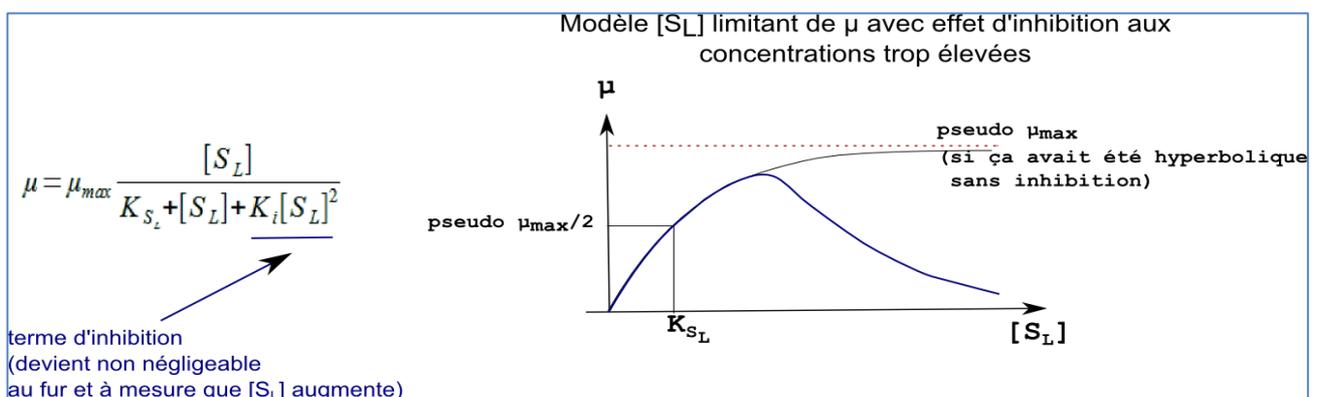


**Figure 2.6.** Le modèle de Monod :

L'analogie avec l'équation de Michaelis-Menten-Henry est évidente.

La cellule est un "gros catalyseur" enzymatique qui utilise des nutriments comme substrats et qui catalyse sa propre création.

De nombreux substrats ont des effets inhibiteurs aux fortes concentrations et une équation classique de limitation de  $\mu$  est alors :



**Figure 2.7.** Effet inhibiteur aux fortes concentrations

### 2.1.4.1. Vitesse de consommation et vitesse spécifique de consommation d'un substrat S

- La vitesse de consommation d'un substrat S à l'instant t est :

$$r_s = \frac{d[S]}{dt} \quad (\text{en utilisant la notation mathématique différentielle})$$

$r_s$  s'exprime en « concentration de S . temps<sup>-1</sup> » (par exemple en g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>).

Pour estimer  $r_s$  aux différents temps analysés d'une culture, on utilise souvent le calcul approché :

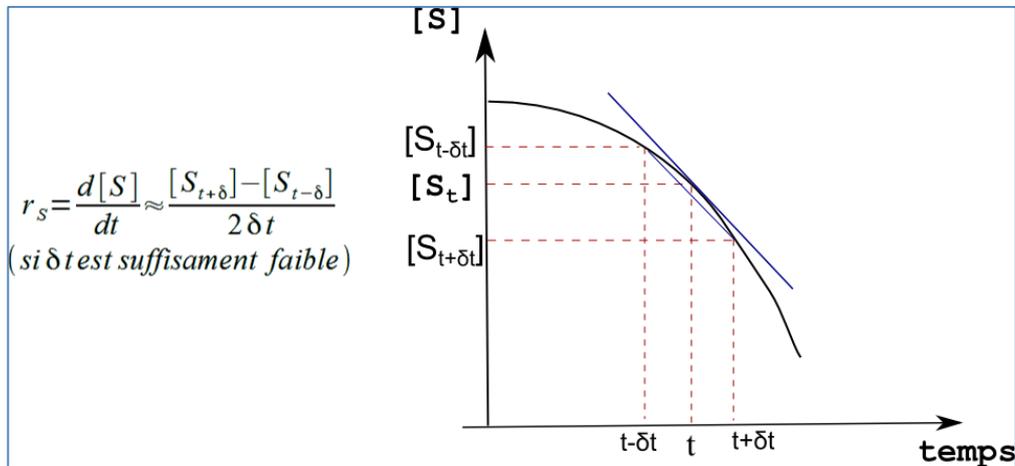


Figure 3.8. Vitesse de consommation

- La vitesse spécifique de consommation de S à l'instant t est :

$$Q_s = \frac{r_s}{[X]} = \frac{d[S]}{dt} \frac{1}{[X]}$$

$Q_s$  s'exprime en « quantité de S . quantité de biomasse<sup>-1</sup> . temps<sup>-1</sup> » (par exemple en g de S par g de biomasse par heure).

$Q_s$  dépend évidemment des conditions physiologiques à savoir phase exponentielle ou phase stationnaire ou ...

#### 2.1.4.2. Rendements de conversion (Y:yield)

- Rendement de conversion d'un substrat S en biomasse X (rendement de croissance)

Appelons  $Y_{X/S}$  le rendement instantané de conversion de S en X (rendement instantané de croissance X/S) :

$$Y_{X/S} = \frac{d(\text{qté de X})}{d(\text{qté de S})} \quad \text{et si volume du bioréacteur constant} : Y_{X/S} = \frac{d(\text{qté de X})}{d(\text{qté de S})} = \frac{d[X]}{d[S]}$$

$$Y_{X/S} = \frac{d[X]}{d[S]} = \frac{d[X]}{dt} \frac{dt}{d[S]} = \frac{r_X}{r_S}$$

$Y_{X/S}$  s'exprime en « quantité de X formé par quantité de S consommé » (par exemple en g de biomasse par g de S).

$Y_{X/S}$  dépend a priori des conditions physiologiques à un instant  $t$  de la culture. Ainsi, si  $S$  est la source de carbone et d'énergie d'un milieu (du glucose par exemple),  $Y_{X/S}$  plus élevé en phase exponentielle ( $S$  est utilisé comme source de carbone et d'énergie pour la croissance et la maintenance) qu'en phase de ralentissement proche de la phase stationnaire ( $S$  est utilisé comme source de carbone et d'énergie pour une maintenance "rallongée" accompagnée de peu d'utilisation vers la croissance). Etc.

• Appelons  $R_{X/S}$  le rendement global de conversion de  $S$  en  $X$  (rendement global de croissance  $X/S$ )

:

$$R_{X/S} = \frac{\Delta(\text{qté de } X)}{\Delta(\text{qté de } S)} \quad \text{sur la période globale de travail}$$

et si volume du bioréacteur constant :  $R_{X/S} = \frac{\Delta(\text{qté de } X)}{\Delta(\text{qté de } S)} = \frac{\Delta[X]}{\Delta[S]} \quad \text{sur période globale de travail}$

$R_{X/S}$  s'exprime en « quantité de  $X$  formé par quantité de  $S$  consommé » (par exemple en g de biomasse par g de  $S$ ).

• Rendement de conversion d'un substrat  $S$  en produit  $P$

Appelons  $Y_{P/S}$  le rendement instantané de conversion de  $S$  en  $P$  :

$$Y_{P/S} = \frac{d(\text{qté de } P)}{d(\text{qté de } S)} \quad \text{et si volume du bioréacteur constant : } Y_{P/S} = \frac{d(\text{qté de } P)}{d(\text{qté de } S)} = \frac{d[P]}{d[S]}$$

$$Y_{P/S} = \frac{d[P]}{d[S]} = \frac{d[P]}{dt} \frac{dt}{d[S]} = \frac{r_P}{r_S}$$

$Y_{P/S}$  s'exprime en « quantité de  $P$  formé par quantité de  $S$  consommé » (par exemple en g de  $P$  par g de  $S$ ).

$Y_{P/S}$  dépend des conditions physiologiques à l'instant  $t$ . Ainsi pour une fermentation alcoolique sur substrat glucose,  $Y_{P/S}$  sera plus important en phase stationnaire (les levures sont en simple maintenance et la quasitotalité du glucose est fermenté pour l'énergie de maintenance, le besoin en glucose source de  $C$  est très faible pour le seul "turn-over") qu'en phase de croissance exponentielle (le glucose est source d'énergie - l'aspect production d'éthanol - mais aussi source de carbone pour la croissance en biomasse !).

- Appelons  $R_{P/S}$  le rendement global de conversion de S en P :

$$R_{P/S} = \frac{\Delta(\text{qté de P})}{\Delta(\text{qté de S})} \quad \text{sur la période globale de travail}$$

et si volume du bioréacteur constant :  $R_{P/S} = \frac{\Delta(\text{qté de P})}{\Delta(\text{qté de S})} = \frac{\Delta[P]}{\Delta[S]}$  sur la période globale de travail

$R_{P/S}$  s'exprime en « quantité de P formé par quantité de S consommé » (par exemple en g de P par g de S).

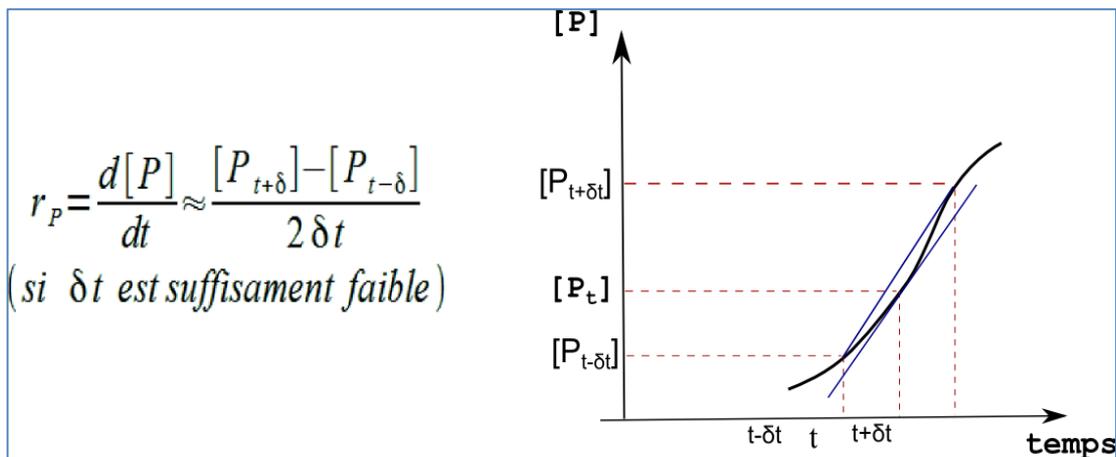
### 2.1.4.3. Vitesse de production et vitesse spécifique de production d'un produit P

- La vitesse de consommation du produit P à l'instant t est :

$$r_p = \frac{d[P]}{dt} \quad (\text{en utilisant la notation mathématique différentielle})$$

$r_p$  s'exprime en « concentration de P . temps<sup>-1</sup> » (Par exemple en g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> .)

Pour estimer  $r_p$  aux différents temps analysés d'une culture, on utilise souvent le calcul approché :



**Figure 2.9.** La vitesse de consommation du produit P

- La vitesse spécifique de consommation de P à l'instant t est :

$$Q_p = \frac{r_p}{[X]} = \frac{d[P]}{dt} \frac{1}{[X]}$$

$Q_p$  s'exprime en « quantité de P . quantité de biomasse<sup>-1</sup> . temps<sup>-1</sup> » (par exemple en g de P par g de biomasse par heure).

$Q_p$  dépend évidemment des conditions physiologiques ...

---

### 2.1.5. Rendement de conversion d'un substrat S en un produit P

Soit  $Y_{P/S}$  le rendement instantané de conversion de S en P

$$Y_{P/S} = \frac{d(\text{qté de P})}{d(\text{qté de S})} \quad \text{et si volume du bioréacteur constant} : Y_{P/S} = \frac{d(\text{qté de P})}{d(\text{qté de S})} = \frac{d[P]}{d[S]}$$

$$Y_{P/S} = \frac{d[P]}{d[S]} = \frac{d[P]}{dt} \frac{dt}{d[S]} = \frac{r_P}{r_S}$$

$Y_{P/S}$  s'exprime en « quantité de P formé par quantité de S consommé » (par exemple en g de P par g de S).

$Y_{P/S}$  dépend des conditions physiologiques à l'instant t. Ainsi pour une fermentation alcoolique sur substrat glucose,  $Y_{P/S}$  sera plus important en phase stationnaire (les levures sont en simple maintenance et la quasitotalité du glucose est fermenté pour l'énergie de maintenance, le besoin en glucose source de C est très faible pour le seul "turn-over") qu'en phase de croissance exponentielle (le glucose est source d'énergie - l'aspect production d'éthanol - mais aussi source de carbone pour la croissance en biomasse !).

• Soit  $R_{P/S}$  le rendement global de conversion de S en P :

$$R_{P/S} = \frac{\Delta(\text{qté de P})}{\Delta(\text{qté de S})} \quad \text{sur la période globale de travail}$$

$$\text{et si volume du bioréacteur constant} : R_{P/S} = \frac{\Delta(\text{qté de P})}{\Delta(\text{qté de S})} = \frac{\Delta[P]}{\Delta[S]} \quad \text{sur la période globale de travail}$$

$R_{P/S}$  s'exprime en « quantité de P formé par quantité de S consommé » (par exemple en g de P par g de S).

### 2.1.6. Productivité

La signification du terme productivité est la suivante : ratio obtenu en divisant la production par l'un des facteurs de production employé pour l'obtenir.

Ainsi, les rendements exposés ci-dessus correspondent à des productivités : ratios obtenus en divisant la production de P (ce qu'on a cherché à obtenir) par le facteur S (on a utilisé du S pour obtenir P).

Un facteur de production important est le facteur "temps". Ainsi on parlera de productivité horaire. Par exemple, la productivité horaire globale en produit P sera le rapport quantité de P obtenu divisée par durée globale du process (par exemple en kg de P par heure).

En génie fermentaire, certains auteurs calculent un terme de "productivité volumique horaire" lors d'un processus de fermentation en réalisant le rapport concentration en P obtenue dans le milieu divisée par durée du process (par exemple en g de P par litre et par heure).

### 2.1.6. Croissance totale, rendement en biomasse, productivité en biomasse

#### *Croissance totale*

Soit une fermentation en milieu liquide non renouvelé.

Appelons  $[X_{finale}]$  la concentration finale en biomasse obtenue. Appelons  $[X_{initiale}]$  la concentration initiale en biomasse.

On a **croissance totale** =  $\Delta[X] = [X_{finale}] - [X_{initiale}]$

Par exemple pour une culture en milieu non renouvelé (discontinue, "batch"):

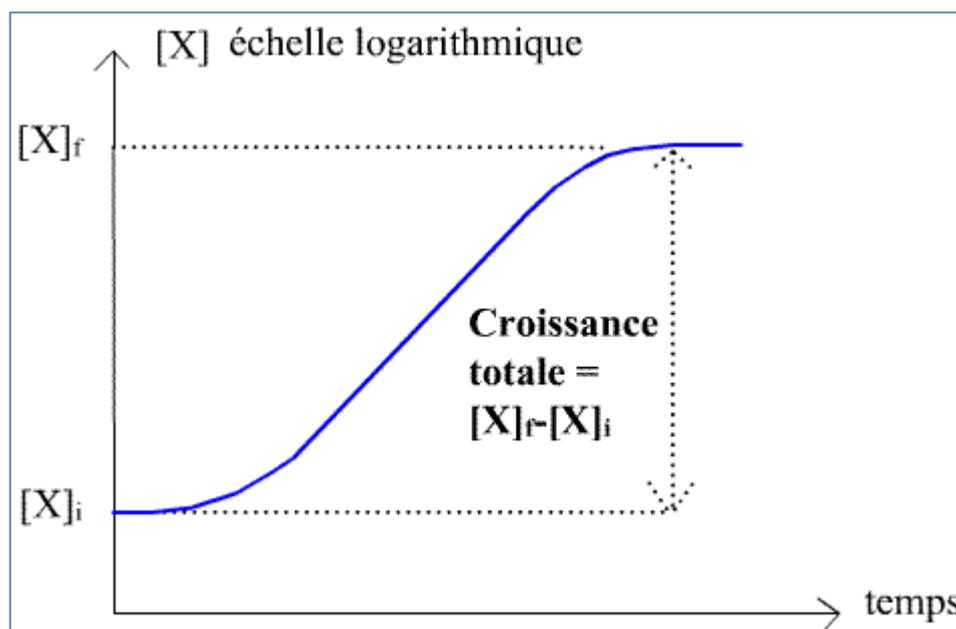


Figure 2.10. Croissance totale

- Et une donnée importante. Si l'arrêt de la croissance est due à l'épuisement d'une source nutritive du milieu ( $S_1$ ) et pas à un autre phénomène du type accumulation de déchets dans le milieu alors la croissance totale est proportionnelle à la concentration de départ en  $S_1$  dans le milieu de culture.  $S_1$

est la source nutritive limitante de la croissance totale (celle qui s'épuise en premier et bloque ainsi toute croissance) et on a :

$$\Delta[X] = \text{coef.} \cdot [S_i]_{\text{initiale}}$$

Ce phénomène est à la base des dosages de substances de type vitamine par méthode microbiologique.

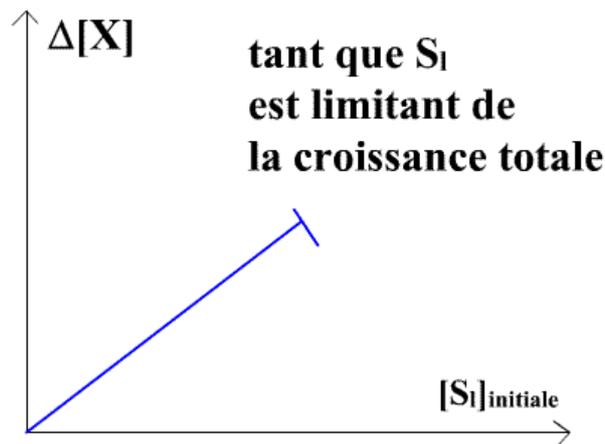


Figure 2.10. l'épuisement d'une source nutritive du milieu ( $S_i$ )

*Et une petite remarque : quand une substance  $S_i$  donnée limite la croissance totale, un apport de  $S_i$  au milieu restaure la croissance !*

### ***Rendement en biomasse, productivité en biomasse***

Rendement de conversion d'un substrat S en biomasse X = rendement de croissance

• Appelons  $Y_{X/S}$  le rendement instantané de croissance (Y pour yield = rendement en anglais):

$$Y_{X/S} = \frac{d(\text{qté de } X)}{d(\text{qté de } S)} \quad \text{et si volume du bioréacteur constant} : Y_{X/S} = \frac{d(\text{qté de } X)}{d(\text{qté de } S)} = \frac{d[X]}{d[S]}$$

$$Y_{X/S} = \frac{d[X]}{d[S]} = \frac{d[X]}{dt} \frac{dt}{d[S]} = \frac{r_X}{r_S}$$

$Y_{X/S}$  s'exprime en « quantité de X formé par quantité de S consommé » (par exemple en g de biomasse par g de S).

$Y_{X/S}$  dépend a priori des conditions physiologiques à un instant  $t$  de la culture. Ainsi, si  $S$  est la source de carbone et d'énergie d'un milieu (du glucose par exemple),  $Y_{X/S}$  plus élevé en phase exponentielle ( $S$  est utilisé comme source de carbone et d'énergie pour la croissance et la maintenance) qu'en phase de ralentissement proche de la phase stationnaire ( $S$  est utilisé comme

source de carbone et d'énergie pour une maintenance "rallongée" accompagnée de peu d'utilisation vers la croissance). Etc.

• Appelons  $R_{X/S}$  le rendement global de conversion de  $S$  en biomasse = rendement global de croissance :

$$R_{X/S} = \frac{\Delta(\text{qté de } X)}{\Delta(\text{qté de } S)} \quad \text{sur la période globale de travail}$$

et si volume du bioréacteur constant :  $R_{X/S} = \frac{\Delta(\text{qté de } X)}{\Delta(\text{qté de } S)} = \frac{\Delta[X]}{\Delta[S]} \quad \text{sur période globale de travail}$

$R_{X/S}$  s'exprime en « quantité de  $X$  formé par quantité de  $S$  consommé » (par exemple en g de biomasse par g de  $S$ ).

### Productivité en biomasse (quand la biomasse est la production recherchée !)

La signification du terme productivité est la suivante : ratio obtenu en divisant la production par l'un des facteurs de production employé pour l'obtenir.

Ainsi, les rendements exposés ci-dessus correspondent à des productivités : ratios obtenus en divisant la biomasse  $X$  obtenue (ce qu'on a cherché à avoir) par le facteur  $S$  (on a utilisé du  $S$  pour obtenir du  $X$ ).

Un facteur de production important est le facteur "temps". Ainsi on pourra calculer des productivités horaires en biomasse :

- Par exemple, la productivité horaire globale en biomasse  $X$  sera le rapport quantité de  $X$  obtenue divisée par durée globale du process (par exemple en kg de  $X$  par heure).
- De la même façon, la productivité volumique horaire globale en biomasse  $X$  sera le rapport croissance totale en concentration divisée par durée globale du process (par exemple en g de  $X$  par litre et par heure). On rappelle que croissance totale en concentration =  $[X_{\text{finale}}] - [X_{\text{initiale}}]$ .
- En compliquant inutilement, on peut même dire que la vitesse de croissance à l'instant  $t$  ( $r_X$ ) n'est autre que la productivité volumique horaire instantanée en biomasse à l'instant  $t$

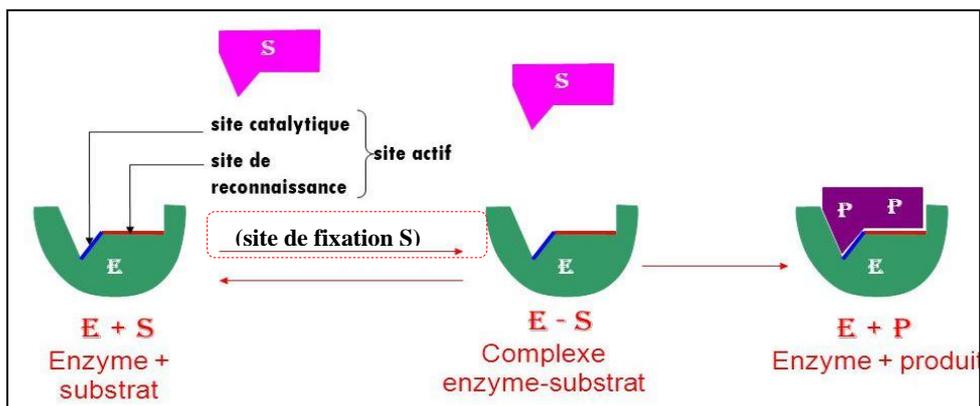
## 2.2. Cinétique des enzymes

La cinétique correspond à l'étude de la vitesse d'une réaction ici enzymatique donc catalysée par une enzyme.

Ce sont des catalyseurs biologiques appartenant à la classe des protéines qui sont des polymères polypeptidiques. Ces macromolécules résultent de la polycondensation d'acide α-aminés du type : NH<sub>2</sub>-CHR-COOH. Dans les réactions enzymatiques le réactif s'appelle le substrat (S).

La présence de ces sites donneur-accepteur dans une substance permet la naissance de centre actif appelé sites actifs et qui sont à la base de beaucoup de réactions chimiques et biochimiques.

La spécificité de la catalyse enzymatique est due à la nécessité, pour le substrat d'avoir une forme convenable pour venir occuper une place bien déterminée dans la protéine (site actif de la protéine), car l'enzyme engage le substrat dans un complexe avant de catalyser toute réaction. La molécule de substrat à transformer reconnaît le site actif et vient s'y fixer par des liaisons plus ou moins fortes. Les sites actifs sont des groupements fonctionnels OH, N=C, etc.



**Etape 1:**

- Association E + S
- Lieu : site actif → entité 3D
- Association ES/liaisons de faibles : L H, interactions hydrophobes, L ioniques.....
- Reconnaissance dynamique : adaptation induite

**Etape 2:**

- Réarrangement interne ES
- Transformation S → P

**Etape 3:**

- Libération P
- Retrouve à l'état initial

**Figure 2.11 :** Les phases de la réaction enzymatique

La réaction enzymatique peut se diviser en trois principales étapes :



E = enzyme (restituée intégralement en fin de réaction);

S = substrat; ES = complexe enzyme-substrat; P1 et P2 = produits de la réaction

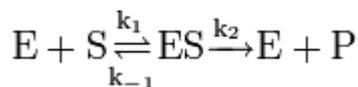
L'association de l'enzyme (E) et du substrat (S) :

- 
- Elle se produit en une région bien précise de l'enzyme appelée (site actif).
  - Cette reconnaissance dynamique est appelée adaptation induite.
  - L'association enzyme-substrat (ES) est stabilisée par des liaisons de faibles énergie :

- a) Liaisons hydrogène, interactions hydrophobes, liaisons ioniques.....
- b) Le complexe ES subit un réarrangement interne qui va permettre la transformation du substrat en produit (P).
- c) L'enzyme libère le produit P de la réaction et retrouve son état initial.  
L'enzyme alors libérée pourra se fixer sur une autre molécule de substrat.

### 2.2.1. Modèles de la cinétique enzymatique : Modèle de Michaëlis-Menten

On part de la réaction



On fait l'hypothèse d'un état quasi-stationnaire (AEQS pour Approximation de l'État Quasi-Stationnaire) sur l'espèce ES : ES étant instable, on suppose qu'elle disparaît aussi vite qu'elle apparaît.

- La vitesse instantanée est:

La quantité de S disparue par unité de temps

$$V = - ds/dt$$

- ✓ La quantité de P apparue par unité de temps

$$V = dp/dt$$

- ✓ Proportionnelle à la concentration du substrat

$$V = K [S]$$

Si  $v$  est la vitesse de la réaction,

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_2[ES]$$

$$\frac{d[ES]}{dt} = 0 = k_1[E][S] - k_{-1}[ES] - k_2[ES]$$

donc et en remplaçant [ES]

$$[ES] = \frac{k_1}{k_{-1} + k_2} [E][S]$$

$$v = \frac{k_2 k_1}{k_{-1} + k_2} [S][E]$$

Si on fait un bilan de matière sur E

$[E] + [ES] = [E]_0$ , où  $[E]_0$  est la quantité initiale d'enzyme

et en remplaçant E, 
$$v = \frac{k_2[E]_0}{1 + \frac{k_{-1} + k_2}{k_1[S]}}$$

Si on définit  $v_{max} = k_2[E]_0$  et 
$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

$$v = \frac{v_{max}[S]}{[S] + K_m}$$

On a :

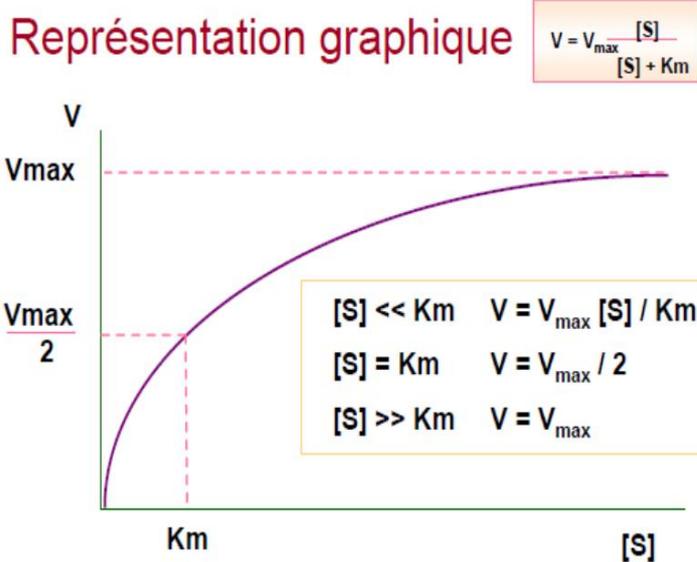
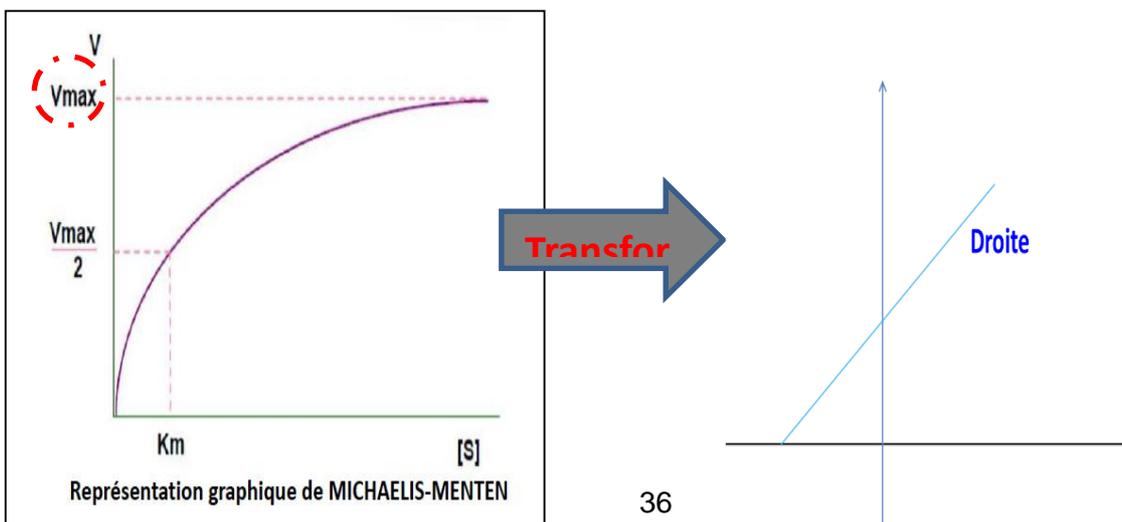


Figure 2.12. Représentation graphique de MICHAELIS- MENTEN

aptes de Représentation de Line Weaver et Burke

1/



La courbe  $V_i=f([S])$

### Equation de MICHAELIS-MENTEN

$$V_i = V_{\max} \frac{[S]}{K_m + [S]}$$

$$V_i = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$

Hyperbole

### Equation de Line Weaver et Burke

$$1/V_i = K_m/[S] + 1/V_{\max}$$

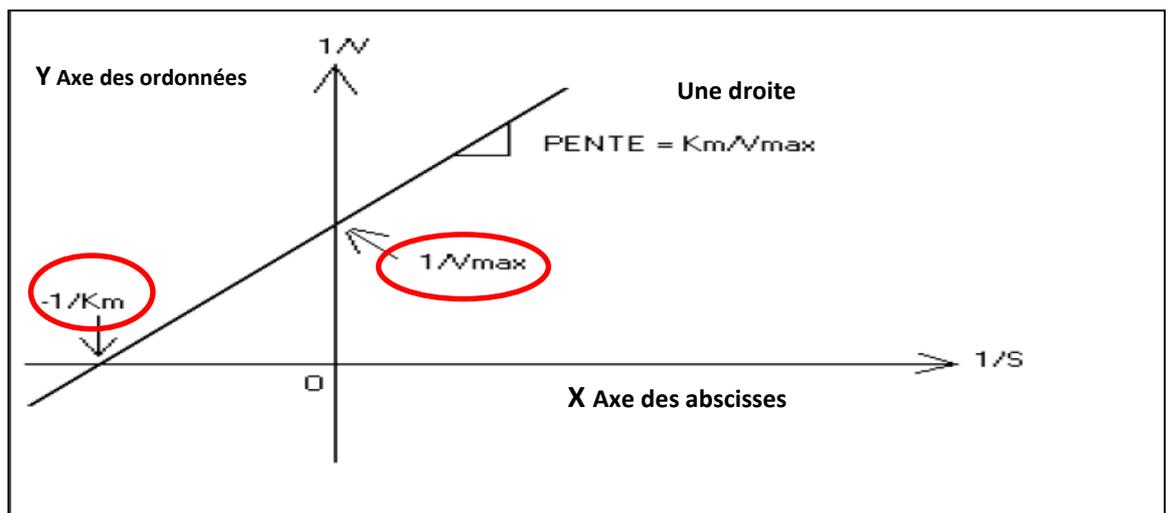
$$\frac{1}{V_i} = \frac{K_m + [S]}{V_{\max} [S]}$$

$$1/V_i = \frac{K_m}{V_{\max} [S]} + \frac{[S]}{V_{\max} [S]}$$

$$1/V = \frac{K_m}{V_{\max}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

$$Y = aX + b$$

Droite  $1/V = f(1/[S])$



- Cette représentation présente l'avantage d'être plus facile à lire.
- En effet, on définit:

$V_{max}$  à partir :  $1/V_{max}$  = le point d'intersection de la droite avec l'axe des ordonnées

$K_m$  à partir :  $-1/K_m$  = le point d'intersection de la droite avec l'axe des abscisses

Certaines conditions modifient l'activité de l'enzyme :

- Le pH du milieu réactionnel.
- La force ionique du milieu réactionnel.
- La présence d'activateurs ou d'inhibiteurs.
- La concentration en substrat.
- La température de réaction. (D'après la loi d'Arrhenius et suivant la température de dénaturation de l'enzyme)

## Exercices d'application :

### Exercice 1 :

On a étudié la constante de Michaelis d'une enzyme à plusieurs substrats de structure voisines

-Les résultats sont les suivant :

1-Donner la définition de la  $K_m$ .

2-Indiquez, dans l'ordre décroissant l'affinité de l'enzyme pour chacun des substrats.

	$K_m$
A	$5 \times 10^{-4}$ M
B	$3 \times 10^{-3}$ M
C	$3,5 \times 10^{-4}$ M
D	$6 \times 10^{-2}$ M
E	$5,5 \times 10^{-2}$ M

### Correction :

1.  $K_M$  : constante de Michaelis-Menten ou constante de dissociation du complexe ES

- **Définition  $K_m$**  : concentration de S qui sature l'E à 1/2
- elle est exprimée en mole/L
- $K_M$  reflète l'affinité de l'E pour son S

$K_M$  faible  $\rightarrow$  l'affinité E pour S  $\uparrow$

$K_M \uparrow \rightarrow$  l'affinité E pour S  $\downarrow$

2. L'E qui a la plus grande affinité a la plus faible  $K_m$

L'ordre décroissant (l'affinité la plus grande à l'affinité la plus petite)

d'affinité de l'enzyme pour chacun des substrats est : C, A, B, E, D

	$K_m$
A	$5 \times 10^{-4}$ M
B	$3 \times 10^{-3}$ M
C	<b><math>3,5 \times 10^{-4}</math> M</b>
D	$6 \times 10^{-2}$ M
E	$5,5 \times 10^{-2}$ M

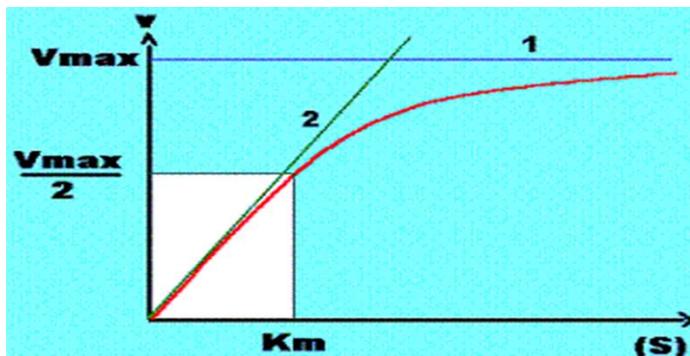
## Exercice 2

- L'étude de la cinétique de la réaction catalysée par une enzyme E montre que pour une concentration de substrat égal à 0.25mM, la vitesse de réaction devient la moitié de la Vmax.
- Est-il possible, à partir de ces seules données, de déterminer la Km et de schématiser la courbe correspondante ? situer les constantes de la cinétique sur ce tracé.

### Correction :

- Oui c'est possible de déterminer la Km car lorsque la vitesse de la réaction est égale à  $V_{max}/2$

$$V = V_{max}/2 \rightarrow k_m = [S] = 0.25 \text{ mM}$$



### Exercice 03/

- une enzyme catalyse la réaction  $S \rightarrow P$  est dosée pour les concentrations initiales suivantes :

1-Déduire  $K_M$  et  $V_{Max}$ .

2-Quelle serait la nouvelle valeur de  $K_M$  si on doublait les concentrations de S.

3-Quelle serait la vitesse initiale si on doublait la concentration en enzyme.

4-Déterminez la concentration de l'enzyme libre pour  $S = 10^{-2} M$ .

[S]M	V mole/min
$1 \cdot 10^{-2}$	75
$1 \cdot 10^{-3}$	74,4
$1 \cdot 10^{-4}$	60
$7,5 \cdot 10^{-5}$	56,25
$6,25 \cdot 10^{-6}$	15,0

### Correction :

1)  $V_{max} = 75 \text{ M/min}$  sachant que  $V_i = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]}$  et  $V_i = 15 \text{ M/min}$   $[S] = 6,25 \cdot 10^{-6} M$  d'où  $K_m$

$$= \frac{V_{max} [S]}{V_i} - [S] = 2,5 \cdot 10^{-5} M$$

2) La  $K_M$  est inchangée quel que soit la concentration du substrat S

3) Si on double la concentration en enzyme, la vitesse initiale :  $V_i$  est doublée

4) Lorsque  $[S] = 10^{-2} M$ ,  $V_i = V_{max}$  L'enzyme est saturée, il n'y a pas d'enzyme libre

[S]M	V mole/min
1.10 <sup>-2</sup>	75
1.10 <sup>-3</sup>	74,4
1.10 <sup>-4</sup>	60
7,5.10 <sup>-5</sup>	56,25
6,25.10 <sup>-6</sup>	15,0

## 2.3. Inhibition des réactions enzymatiques

Un **inhibiteur** est une substance qui n'est ni le catalyseur ni le(S) substrats et qui diminue la vitesse d'une réaction chimique et le processus est appelé **inhibition** . Dans une réaction catalysée par enzyme, si l'effet d'inhibition fait suite à la liaison de l'inhibiteur à l'enzyme, l'inhibiteur est qualifié d'**inhibiteur d'enzyme**.

Un **activateur** est une substance qui n'est ni le catalyseur ni le(s) substrats et qui augmente la vitesse d'une réaction chimique catalysée et le processus est appelé **activation** . Dans une réaction catalysée par enzyme, si l'effet d'activation fait suite à la liaison de l'activateur à l'enzyme, l'activateur est qualifié d'**activateur d'enzyme**.

### 2.3.1. Inhibition compétitive:

Arrive lorsque deux composés (substrat) veulent se lier au même enzyme car ils ont une configuration spatiale partiellement identique et peuvent tous les deux accéder au site catalytique (on peut faire l'analogie avec deux clés semblable qui peuvent ouvrir la même serrure). Exemple: il y a compétition entre méthacholine et acétylcholine car elles ont toutes les deux un groupement choline qui active l'enzyme.

Il en résulte:  $E+S_1+S_2 \rightarrow ES_1+ES_2 \rightarrow E+P_1+P_2$  (les réactions sont réversibles).

Il se peut aussi que le substrat compétitif se lie au site catalytique sans être modifié. Si l'enzyme est saturée par un substrat l'autre (d'affinité moindre= $K_d$  plus élevé) ne sera pas catalysé d'où le terme compétitif. Il pourra par contre le déplacer par action de masse (i.e si sa concentration est beaucoup plus forte il le déplacera même si son  $K_d$  est plus élevé)

### 2.3.2. Inhibition non compétitive:

Arrive lorsqu'un agent non relié au substrat est capable de lier l'enzyme au niveau de son site allostérique. Cela laisse le site catalytique vacant, mais va souvent en modifier sa configuration spatiale cela peut empêcher la liaison enzyme substrat de se faire au niveau du site actif ou entrainer la liaison. Tout dépend de si le changement de configuration au niveau du site catalytique augmente l'affinité du substrat pour le dernier (active l'enzyme) ou la diminue.

### 3. Design et analyse des bioréacteurs

Un bioréacteur est un appareil ou unité technologique favorisant, sous des conditions de culture contrôlée, la multiplication des micro-organismes (levures, bactéries, champignons microscopiques, algues...), de cellules voire d'organismes pluricellulaires pour des fins industrielles (production de métabolites et de tissus cellulaires, ou bioconversion de molécules d'intérêt), en :

- Agroalimentaire (yaourts, boissons alcooliques...),
- Médecine (antibiotiques, vitamines...),
- Traitement des déchets liquides et solides.

#### 3.1. Concepts de base

La partie généralement apparente d'un bioréacteur est le réservoir (Figure 3.1)

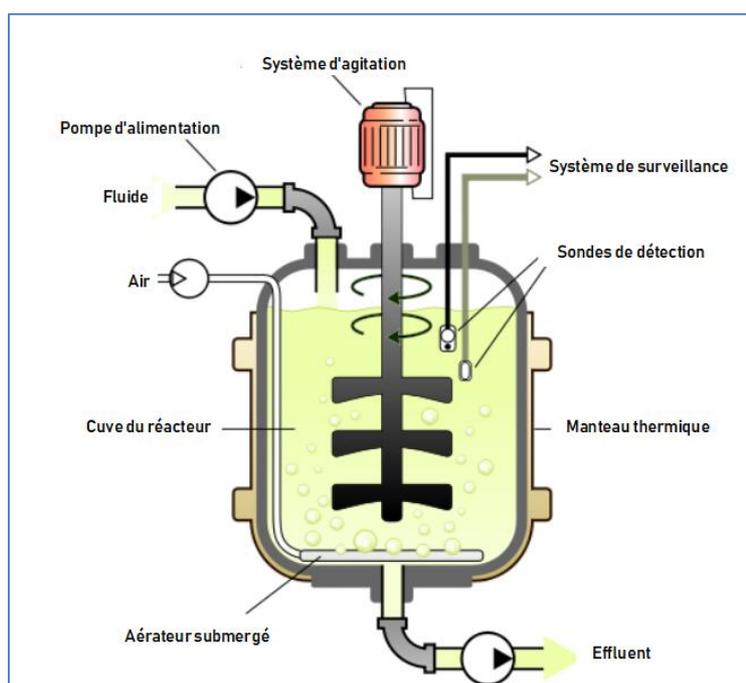


Figure 3.1. Procédé de base d'un bioréacteur.

Au sein du bioréacteur se réalise la transformation du substrat en biomasse et produits (métabolites), selon l'équation : **Substrat + Biomasse = (Biomasse)<sub>n</sub> + Métabolites + Résidus de substrat.**

L'utilisation des nutriments du substrat par la biomasse lui permet de se maintenir en vie et de se multiplier. Cette activité métabolique, comme beaucoup de réactions chimiques, génère cependant,

outre les produits normalement attendus (les éléments constitutifs de la cellule) des sous-produits inutiles que la cellule accumule dans son cytoplasme (endotoxine, endoenzymes,...) ou rejette (exotoxines, exoenzymes, CO<sub>2</sub>, ...).

Ce sont les métabolites (endo et exo métabolites), que l'on qualifie de primaires ou secondaires selon qu'ils dérivent d'un métabolisme primaire (= normal = en conditions optimales) ou secondaire (= anormal = en conditions non optimales [carence en substrat, accumulation de produits, conditions écologiques insatisfaites]).

Pour garantir des conditions de fonctionnement soigneusement surveillées et contrôlées d'un bioréacteur, les fabricants industriels conçoivent des modes de fonctionnement (flux continu ou discontinu...), et des systèmes de contrôle (débitmètres, vannes, capteurs...), d'échangeurs de chaleur (réchauffement/refroidissement ou isolement), d'aération (apport d'O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>...), d'agitation (homogénéisation et oxygénation) ...

Utilisant des moyens mécaniques, l'agitation force le fluide à acquérir un mouvement circulaire à l'intérieur du baffle ou réservoir pour (i) mélanger deux liquides miscibles, (ii) dissoudre des solides dans le liquide, (iii) améliorer le transfert de chaleur (sous-chauffage ou refroidissement), (iv) disperser un gaz dans un liquide, (v) disperser de fines particules dans un liquide, ou (vi) disperser également deux phases non miscibles.

### 3.1.1. Homogénéisation

Le bioréacteur doit favoriser au maximum les bio-productions. Pour ce faire, il s'agit d'assurer un contact parfait entre les différentes phases en présence afin de maximiser les possibilités d'échanges entre elles :

- transfert gaz → liquide : solubilisation de l'oxygène de l'air dans le substrat ;
- transfert liquide → gaz : désorption du substrat (CO<sub>2</sub> et autres gaz dissous) ;
- transfert liquide → solide : assimilation des nutriments et de l'O<sub>2</sub> en solution dans le substrat (liquide) par les cellules (solides) ;
- transfert solide → liquide : dissimulation des exo-métabolites des cellules vers le substrat.

On peut considérer, en effet, que le contenu du réacteur se scinde en trois, voire quatre, parties de natures physiques différentes.

**Une phase liquide** : qui correspond initialement au substrat mais dont la nature chimique, et, partant, les propriétés physico-chimiques (pH, viscosité,...), évoluent au cours du temps.

**Une phase solide** : en suspension dans la partie liquide et qui est constituée principalement par la biomasse (cellules). Celle-ci a spontanément tendance à s'agglomérer (floculation = formation de "flocs") et à sédimenter ou à flotter.

---

**Une phase gazeuse** : qui comprend d'une part les gaz de fermentation si le processus est gazogène (CO<sub>2</sub> en fermentation alcoolique ou en respiration aérobie, biogaz de la méthanisation, ...) et d'autre part l'air ou l'oxygène pur destiné à apporter l'O<sub>2</sub> nécessaire aux micro-organismes aérobies, ou un autre gaz en vue de maintenir la biomasse en suspension si elle est anaérobie stricte.

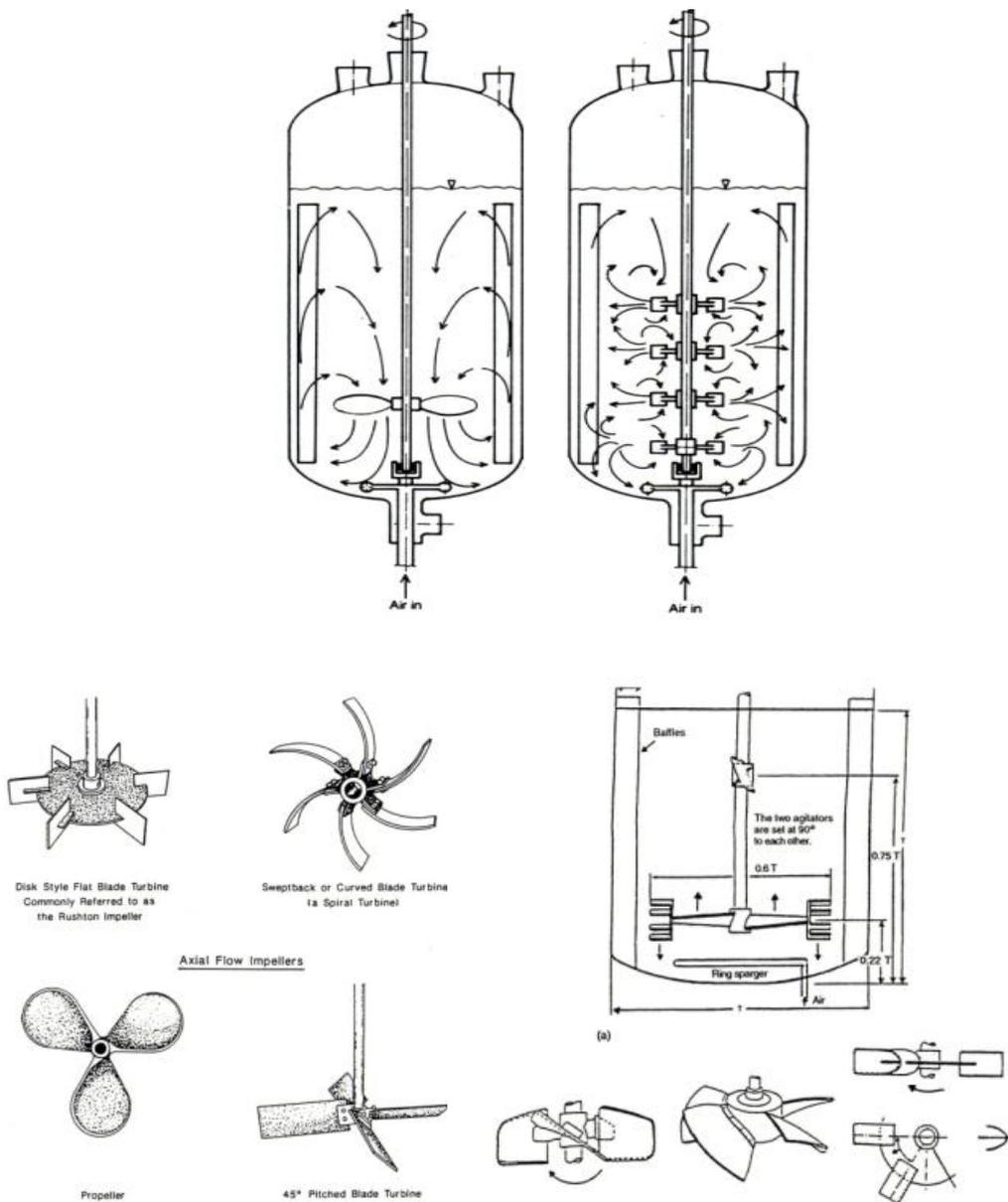
**Le support** : sur ou dans lequel les cellules sont fixées, dans le cas des réacteurs à cellules immobilisées.

L'homogénéisation, en dispersant les cellules et les bulles de gaz dans l'ensemble du volume mis à leur disposition, favorise également les transferts de matière entre les différentes phases. Homogénéiser consiste en fait à provoquer un mouvement entre les trois phases parce que toute inhomogénéité dans la répartition des trois phases (L, S, G) risque d'entraîner localement des carences en substrat ou O<sub>2</sub> et/ou des excès de produits, voire des accumulations de chaleur, tous phénomènes incompatibles avec l'activité microbienne.

#### ***3.1.1.1. Homogénéisation spatiale : agitation***

Ce mouvement relatif entre les trois phases peut être réalisé de diverses manières :

- agitation mécanique à l'aide de pales et contre-pales ou d'hélices



**Figure 3.2.** Mouvement du fluide en fonction du type d'agitation :axial et radial

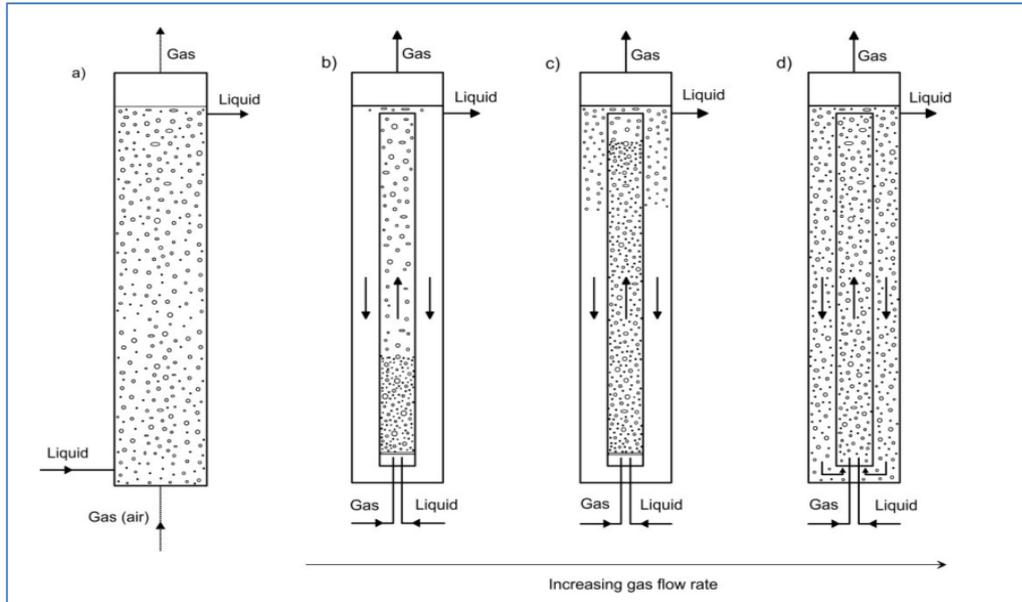
- agitation pneumatique par injection d'air ou de gaz de fermentation (air lift) ;

Dans les réacteurs "pneumatiques", l'agitation résulte exclusivement du déplacement des bulles de gaz dans le fluide.

L'énorme avantage de l'agitation strictement pneumatique provient de l'absence totale de phénomène de cisaillement, générateur de traumatisme pour la biomasse.

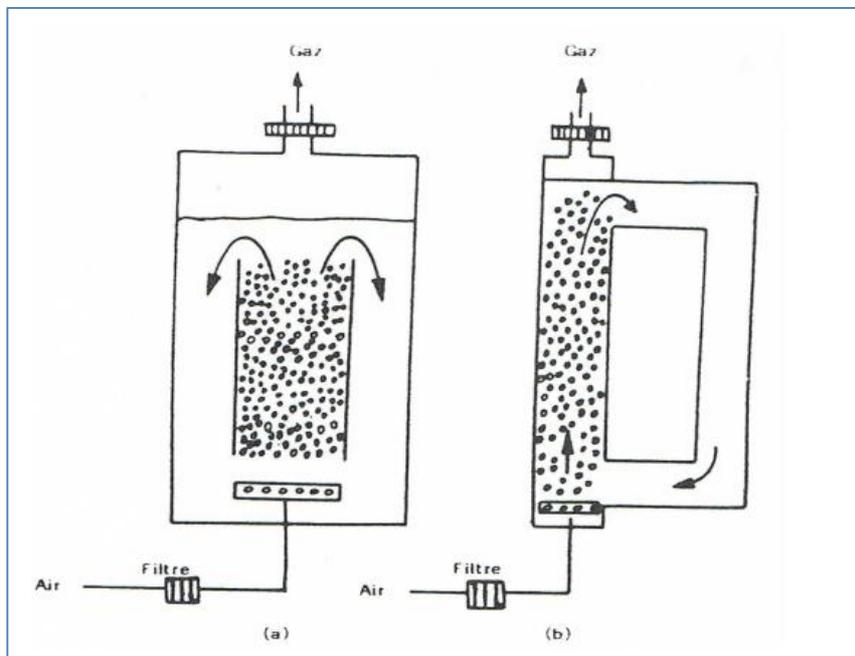
Différentes technologies, plus ou moins sophistiquées, ont été conçues :

### Colonnes à bulles



**Figure 3.3.** les réacteurs "pneumatiques", triphasés a) bioréacteur triphasé à colonne à bulles; b) – d) conditions hydrodynamiques possibles dans un bioréacteur triphasé à air-lift

### Bioréacteurs à boucle



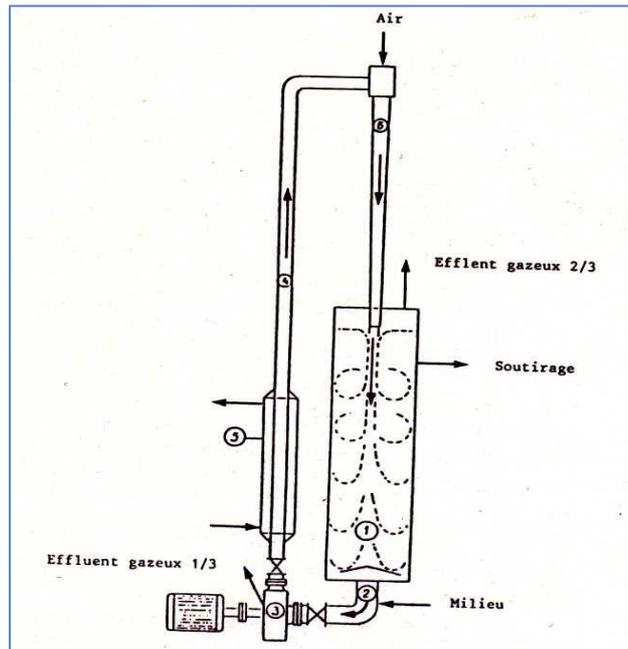
**Figure 3.4.** Bioréacteurs airlift : (a) inner loop ; (b) outer loop

---

- **agitation hydraulique par pompage et recirculation ou "à jet"**.

L'aspiration du fluide et sa projection brutale dans la cuve peuvent contribuer à l'agitation.

Cela sous-entend une structure en boucle externe puisque la pompe va devoir aspirer le fluide dans une zone externe avant de le projeter avec un maximum de turbulence dans la cuve de fermentation proprement dite. On profitera du passage dans la boucle externe pour apporter l'O<sub>2</sub> nécessaire et éventuellement corriger les paramètres du substrat.



**Figure 3.5.** Réacteur à agitation hydraulique

### 3.1.2. Régulation :

L'activité métabolique au sein du réacteur induit une modification permanente des caractéristiques de son contenu.

Afin de satisfaire en permanence les exigences de la biomasse, des systèmes de régulation doivent nécessairement intervenir dans la conception d'un réacteur efficace. De tels systèmes sont toujours constitués de trois éléments, formant ce qu'on appelle couramment une "boucle de régulation". On y trouve ainsi : un capteur (= sonde) , un comparateur , un actionneur.

Ces trois actions, qui visent donc à minimiser l'écart entre une valeur mesurée (ce qui est réellement) et une valeur imposée (ce qui devrait être), constituent un système dit servo-commandé ou asservi.

### **3.1.2.1. Principales régulations**

Idéalement tous les facteurs de production de la biomasse devraient être régulés.

On régule la plupart du temps la température, le pH, la teneur en O<sub>2</sub>, et le phénomène de moussage.

#### ***Régulation de la température***

La température est le principal facteur de développement d'une population microbienne.

La nature des sondes thermométriques est très diverse. Cela va du simple thermomètre, à des thermocouples plus ou moins sophistiqués selon la sensibilité de la biomasse, ... et les budgets.

Le principe de base est toujours de faire circuler à l'intérieur de ceux-ci, et donc à proximité du substrat, une quantité d'eau froide ou chaude, voire de vapeur, destinée respectivement à prélever ou à fournir des calories. La régulation thermique doit donc pouvoir s'opérer positivement et négativement

#### ***Régulation du pH***

Pour rappel, les bactéries sont en général neutrophiles à légèrement acidophiles, avec, pour certaines espèces, une adaptation génétique à des niveaux d'acidité relativement élevé.

Concernant les sondes à pH, il n'y a rien de spécial à signaler si ce n'est que le choix de l'électrode doit bien sûr tenir compte de la nature du substrat, afin d'éviter tout risque d'altération.

Le maintien d'une acidité constante aux cours du processus peut s'obtenir soit en utilisant un substrat préalablement tamponné, soit en apportant des correctifs (acide ou base) tout au long de l'opération.

#### ***Régulation de l'oxygène***

L'**aération** du substrat, qui conditionne la disponibilité en oxygène pour les micro-organismes aérobies, exige aussi un système régulateur.

Comme sera expliqué au chapitre 4, le transfert d'O<sub>2</sub> jusqu'aux sites d'utilisation au sein de la cellule est loin d'être aisé.

L'enregistrement de la concentration en oxygène dissous dans le milieu est réalisé par une sonde à oxygène qui mesure la concentration en O<sub>2</sub> via une électrode ad hoc.

Il est bien sûr évident que tout ce raisonnement ne présente aucun intérêt pour les digesteurs **anaérobies**, puisque dans ce cas l'oxygène doit absolument être banni du processus.

#### ***Régulation de la mousse***

Un grand nombre de fermentations génèrent des gaz dont la solubilité dans la phase aqueuse est limitée. La respiration aérobie fournit également du CO<sub>2</sub>. Ces gaz forment des bulles et, selon la tension superficielle de la phase liquide, celles-ci peuvent provoquer la formation d'une mousse plus ou moins abondante.

L'accumulation de mousse au sein d'un digesteur peut provoquer divers problèmes : défauts de stérilité, imprégnation des filtres de sortie des gaz, perturbations dans les régulations, ....

Pour pallier à ce risque, on dispose une sonde destinée à détecter la présence de mousse dans le réacteur. Celui-ci peut consister en une action mécanique ou physico-chimique "anti-mousse".

Ce dernier s'agit d'une substance tensio-active qui modifie la tension superficielle du liquide et diminue la cohésion entre les molécules de substrat à l'interface liquide-gaz.

## **3.2. Types de bioréacteurs**

### **3.2.1. Selon la biomasse :**

On rencontre essentiellement deux types de réacteurs en fonction du fait que la biomasse y est en suspension ou pas.

En définitive on peut donc considérer deux situations : bio-particules libres et maintenues en suspension dans un substrat liquide d'une part (**réacteurs homogènes**), et présence d'un support immobile sur ou dans lequel sont fixées les cellules, d'autre part (**réacteurs hétérogènes**).

**-Bioréacteurs homogènes**

**- Bioréacteurs hétérogènes**

### **3.2.2. Selon le volume**

Le scale up (ou mise à l'échelle) est le transfert du procédé d'un bioréacteur de laboratoire de petit volume à celui d'un bioréacteur industriel à grande échelle.

Le scale up s'effectue en plusieurs étapes : de la fiole d'Erlenmeyer au bioréacteur de paillasse, du bioréacteur de paillasse au bioréacteur pilote de laboratoire et du bioréacteur pilote de laboratoire au bioréacteur industriel. Il est impossible de conserver l'ensemble des paramètres identiques ou proportionnels au changement d'échelle.

Chaque transfert à une plus grande échelle est complexe car divers paramètres tels que le barème de stérilisation, l'aération et l'agitation sont modifiés lorsqu'on augmente le volume, le diamètre et la hauteur du bioréacteur. Des conditions physicochimiques similaires doivent être maintenues dans l'environnement de chaque cellule malgré l'augmentation du volume de culture. À chaque étape du scale up, divers paramètres sont analysés puis modifiés car les réactions physicochimiques et enzymatiques se produisant à l'intérieur du bioréacteur varient en fonction du volume du réacteur utilisé.

---

En outre, lors du changement d'échelle il est indispensable :

- de prendre en compte les coûts d'investissement du matériel (bioréacteur, techniques d'extraction et de purification) et de fonctionnement (milieu de culture et énergie) ;
- de réaliser si possible une automatisation du matériel ;
- de réduire la production de déchets ;
- d'obtenir des produits correspondant à la qualité souhaitée.

On classe les bioréacteurs en fonction de leur volume maximal (figure 3. ) :

- les bioréacteurs de laboratoire stérilisables à l'autoclave jusqu'à 18 L ;
- les bioréacteurs de laboratoire stérilisables in situ jusqu'à 30 L ;
- les bioréacteurs pilotes jusqu'à 300 L ;
- les bioréacteurs industriels jusqu'à 500000 L(500 m<sup>3</sup>).



Bioréacteur de laboratoire  
stérilisable à l'autoclave Tryton™  
(1 à 18 L)



Bioréacteur de laboratoire  
stérilisable in situ BioPro™  
(10 à 30 L)



Bioréacteur BioPro™ série  
Pilote (60 à 300 L)



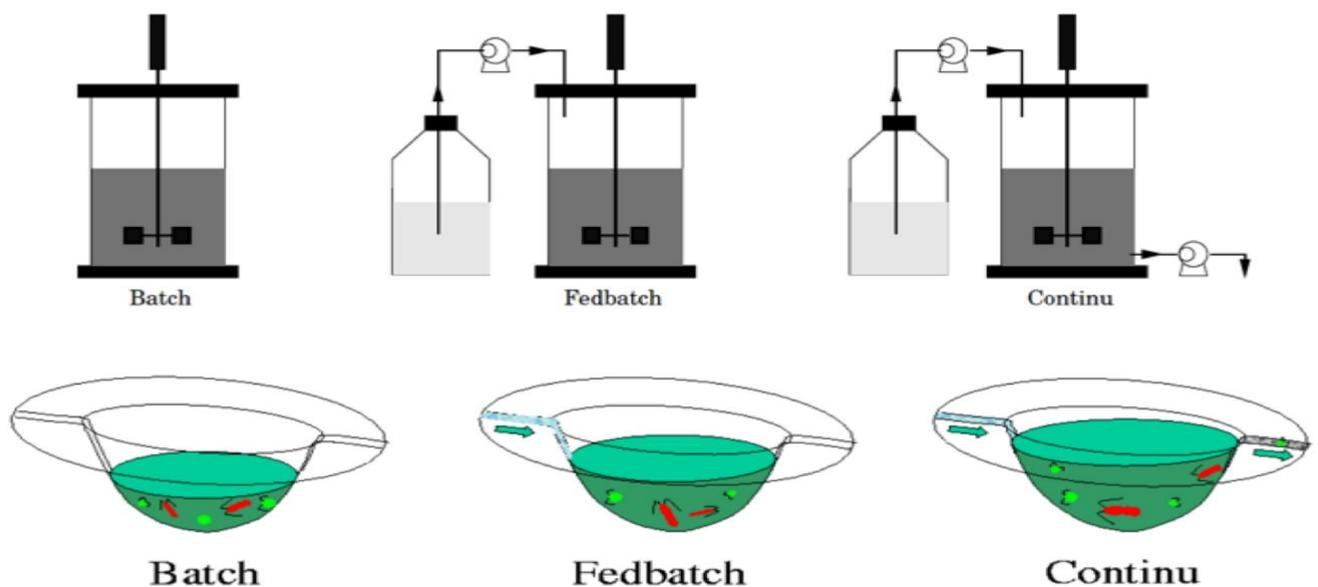
Bioréacteur  
BioPro™  
série Industrie  
(600 à 30 000 L)

**Figure 3.6.** Bioréacteurs de laboratoire, bioréacteur pilote et bioréacteur industriel

### 3.2.3. Selon le mode de fonctionnement

On distingue trois modes d'alimentation classiques des bioréacteurs (Fig. 3.) :

- Le mode "Batch" : à l'instant initial, la cuve est remplie par le milieu de culture stérilisé (contenant substrats, précurseurs et activateurs), et les espèces sont introduites. La croissance des micro-organismes se déroule ensuite sans addition supplémentaire de milieu. Le volume reste constant. On parle alors de **fermenteur**. En général, la productivité est faible. En fin de processus, le fermenteur est vidé et son contenu est remplacé.
- Le mode "semi-continu" (ou "Fedbatch") : à l'instant initial, la cuve est remplie d'un volume initial  $V_0$  puis alimentée en continu par le milieu de culture selon un débit réglé de façon à ce que la concentration en substrat soit constante et ce jusqu'à son volume final. L'alimentation est alors coupée. Le fedbatch permet en pratique un meilleur contrôle des conditions de croissance, un gain de temps et la possibilité de modifier le milieu en cours de culture. Il y a par contre un risque important de contamination externe.
- Le mode "continu" (ou **chémostat**) : c'est le mode le plus largement employé dans le domaine de la dépollution biologique de l'eau . Caractérisé par un volume constant, un chémostat est soumis à un soutirage du milieu de culture égal au taux d'alimentation de la cuve. Son fonctionnement a été décrit dès 1950 par Novick et Szilard.



**Figure 3.7** : Les différents modes de fonctionnement d'un bioréacteur

### 3.3. Bioréacteurs batch (fonctionnement discontinu)

Le procédé est réalisé dans un système clos dans lequel un même volume de milieu non renouvelé est utilisé pour la croissance des micro-organismes ; la quantité de nutriments est donc limitée. On arrête le processus lorsque, par épuisement du substrat et/ou accumulation de produits, la réaction ralentit provoquant une diminution de la productivité (exprime la quantité de produits fabriqués par unité de temps. Cela correspond à la vitesse de production).

Le fonctionnement en batch est un procédé employé très couramment car il présente les avantages de la simplicité et d'un relativement faible coût puisque les investissements se limitent à la cuve de fermentation et aux régulations.

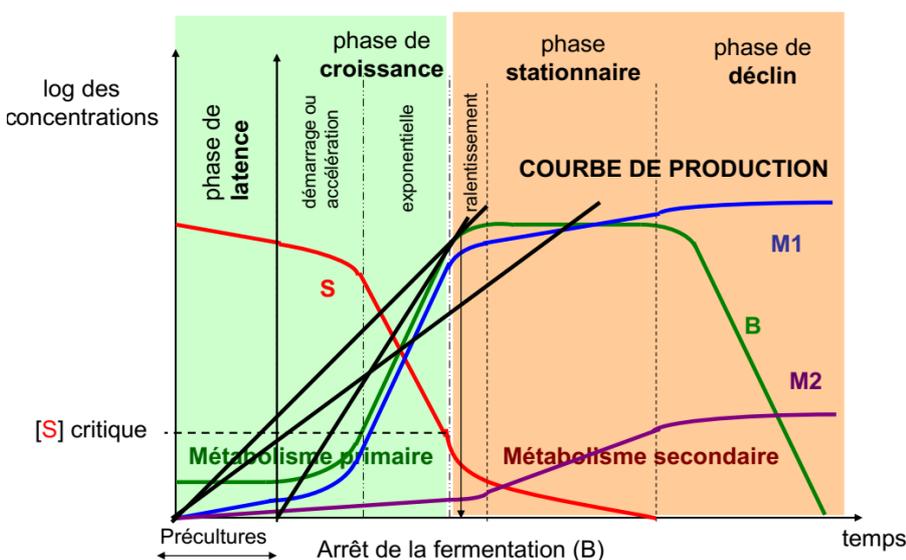
L'inconvénient majeur de cette technologie réside dans le risque de répression catabolique. Il s'agit en fait d'une **inhibition par le substrat**. On constate, en effet, que l'excès de certaines molécules théoriquement nutritives, comme par exemple le glucose, peut perturber le métabolisme microbien et induire une diminution du taux de croissance ou la production de métabolites non attendus.

En résumé dans un bioréacteur batch : Conditions "fermées"

- Pas d'apport de substrat
- Pas de soutirage en cours de fermentation
- Régulations actives
- Arrêt de la réaction quand la productivité est maximale = quantité produite / temps de production (pente de la droite issue de l'origine et tangente à la courbe de production)

La courbe de croissance microbienne en mode discontinu fait apparaître différentes phases (figure 3.3

)



**Figure 3.8.** Les phases de la croissance bactérienne en mode discontinu

### 3.4. Cuves agitées continues

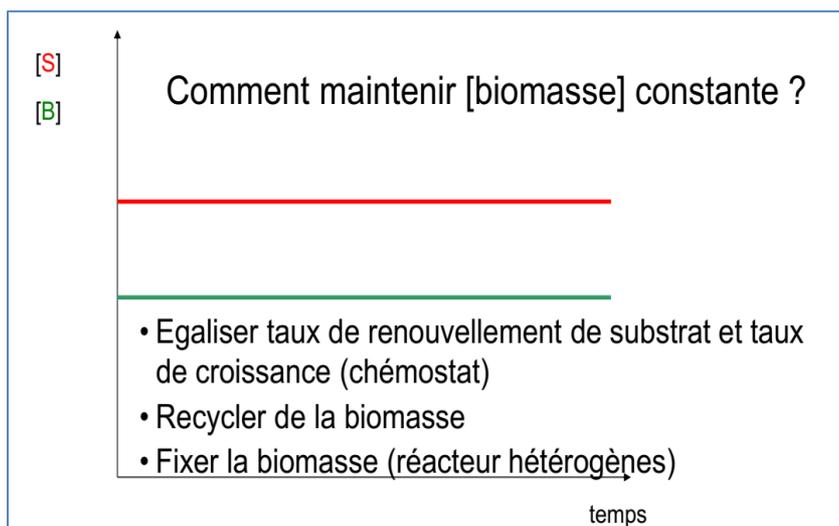
Le mode continu ou “chémostat” prévoit une entrée (substrat et/ou biomasse) et une sortie (produit, substrat, biomasse, résidus) au niveau du bioréacteur, de sorte qu’elles fonctionnent sans arrêt et tout en gardant un volume de culture constant.

Le principe du chémostat repose sur les travaux de Monod (1942) qui ont pointé la relation entre le taux de croissance ( $\mu$ ) d’une population microbienne et la concentration en substrat (S). Les différentes phases qui définissent le cycle de croissance de la population (latence, croissance et phase stationnaire) résultent de l’interaction du microorganisme avec son environnement physico-- chimique.

Dans une culture continue en chémostat, le bioréacteur est alimenté en continu en milieu neuf et le milieu usagé, y compris la biomasse, est soutiré au même débit. Le procédé de culture en chémostat a pour objectif de maintenir tous les paramètres à un niveau constant, y compris le taux de croissance et d’épuisement de la culture, par l’apport contrôlé de milieu de culture. Si cet état stationnaire (steady state) est atteint, il est par exemple possible d’analyser le métabolisme de l’organisme pour déterminer les modifications des paramètres. Il est également possible d’augmenter la productivité en maintenant un taux de croissance optimal pour le taux de formation de produits.

#### Conditions "ouvertes"

- Apport de substrat permanent en cours de fermentation
- Soutirage permanent en cours de fermentation
- Régulations actives
- Arrêt de la réaction quand la productivité diminue (signe d’une dégénérescence)



**Figure 3.9.** Les phases de la croissance bactérienne en mode continu

Idéalement donc, pour garder un effectif cellulaire constant, il convient de gérer le digesteur de façon à conserver en permanence l'égalité entre le taux de croissance ( $\mu$  = nombre de division par unité de temps, en  $[T^{-1}]$ ) et le taux de dilution ( $D$  = rapport du débit  $[L^3T^{-1}]$  d'entrée de substrat frais au volume  $[L^3]$  total du digesteur, en  $[T^{-1}]$  également).

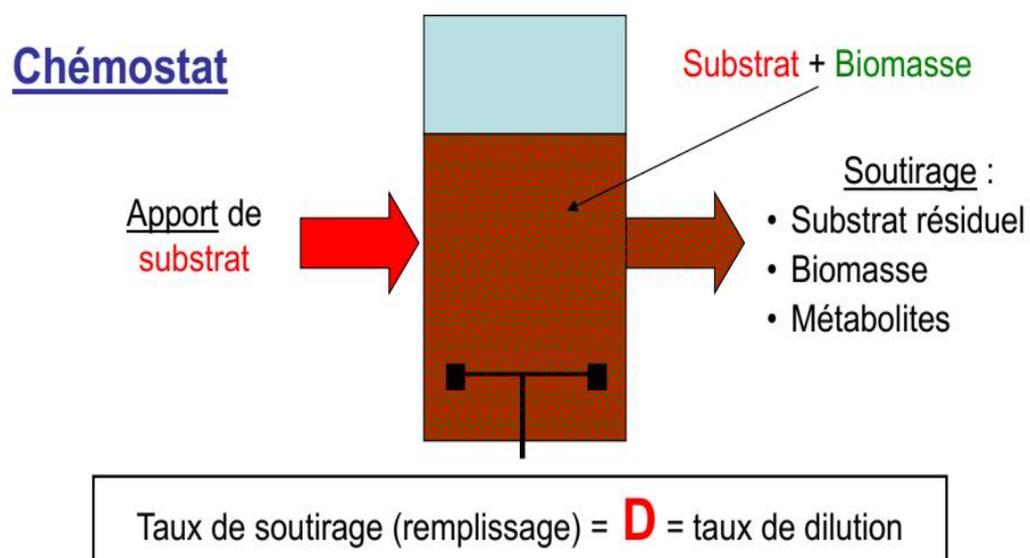
Dans le cas contraire, si  $\mu < D$  on assistera à un lessivage (= perte de biomasse) du digesteur car, vu qu'il s'agit d'un Réacteur Infiniment Mélangé, la dispersion des cellules est idéale et par conséquent une partie de celles-ci est entraînée lors du soutirage.

Or si la croissance microbienne ne permet pas de compenser la disparition de biomasse par soutirage, le digesteur s'appauvrit et son rendement s'en trouve affecté.

D'autre part, lorsque  $\mu > D$ , ce qui signifie que le renouvellement de substrat ne suffit pas à satisfaire les besoins de la biomasse, des symptômes de carence apparaissent, entraînant un ralentissement du métabolisme, c'est à dire une diminution du  $\mu$ .

Il y a donc dans ce dernier cas une autorégulation du digesteur puisque la biomasse s'adapte automatiquement aux conditions de fonctionnement.

Un digesteur ainsi autorégulé est appelé chémostat.



**Figure 3.10.** Illustration du Chémostat sans recyclage

Il est évident que  $D$  doit correspondre au taux de soutirage sous peine de voir la cuve se remplir ou se vider. Il est possible aussi de faire fonctionner un réacteur à particules libres en continu sans trop se soucier de l'équilibre  $\mu/D$ . C'est ce qui se passe dans une station d'épuration à boues activées.

Dans ce cas, à la sortie du bassin biologique (réacteur), un décanteur permet de récupérer les cellules. Une partie de celles-ci est alors réinjectée dans le bassin biologique afin de maintenir la concentration constante.

Donc :

Si  $D > \mu \rightarrow$  lessivage du réacteur : la biomasse enlevée n'est pas remplacée par de nouvelles cellules

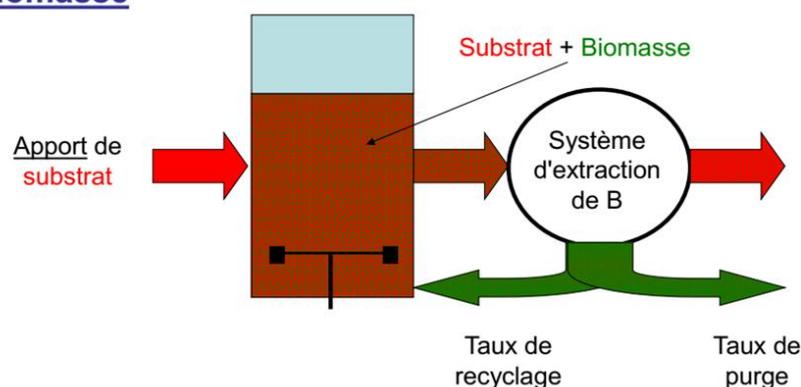
Si  $D < \mu \rightarrow$  autorégulation : pas assez de substrat  $\rightarrow \mu \downarrow \rightarrow \mu = D$ , mais productivité  $\rightarrow$  car  $\mu < \mu_{\max}$

Dans une fermentation en mode continu, le taux de dilution de la culture est limité par le taux de croissance spécifique maximal ( $\mu_{\max}$ ) du microorganisme.

De plus la concentration en biomasse ne peut pas être augmentée puisque les cellules sont soutirées du réacteur au même rythme qu'elles sont formées. Pour contourner ces limites et optimiser le procédé, diverses techniques de recyclage de la biomasse sont appliquées pour récupérer la biomasse dans la culture soutirée, pour la retourner dans le réacteur. Ainsi, il n'y a pas de perte de microorganismes et la concentration en biomasse augmente dans le temps. Le moyen le plus efficace pour recycler la biomasse est la microfiltration membranaire.

La culture soutirée du réacteur est filtrée sous pression sur une membrane de porosité absolue ne laissant pas passer les microorganismes. Le débit doit être égal au débit d'alimentation en milieu frais pour maintenir constant le volume de culture.

### Recyclage de la biomasse



**Figure 3.11.** Illustration du Chémostat avec recyclage de la biomasse

---

### 3.5. Bioréacteurs à flux piston

Dans un réacteur à **flux piston** idéal, tout élément de fluide avec ses matières en suspension subit une translation tout du long du bassin sans mélange important avec les éléments de fluide connexes. Il est assimilé à un ouvrage présentant un rapport longueur/largeur élevé et, dans ce cas, des gradients de concentrations axiaux apparaissent.

Les considérations théoriques montrent que, dès qu'une réaction est d'ordre supérieur à zéro, un flux piston doit permettre, pour un volume d'ouvrage donné, d'obtenir un état d'avancement des réactions supérieur au mélange intégral ou, pour un même état d'avancement d'une réaction, un volume d'ouvrage plus réduit.

En fait, il n'existe pas à l'échelle industrielle de bioréacteurs fonctionnant en mélange intégral ou en flux piston parfaits. En revanche, certains réacteurs seront proches surtout d'un mélange intégral (agitation forte) et plus rarement d'un flux piston. Afin de quantifier cette tendance, il est d'usage d'utiliser un coefficient de dispersion longitudinale. Une valeur zéro correspond à un flux piston parfait, tandis qu'une valeur infinie correspond à un mélange intégral parfait.

#### 3.5. Comparaison bioréacteurs batch et bioréacteurs continus

Les similitudes entre bioréacteurs batch et bioréacteurs discontinus sont :

- Fermentation discontinue et continue sont deux procédés de fermentation industriels.
- Dans les deux fermentations, des milieux frais sont utilisés pour fournir les nutriments. intervalles réguliers.
- En fermentation discontinue et continue, des microorganismes bénéfiques sont utilisés.
- Les deux fermentations produisent des produits utiles ou de la biomasse à la suite du processus de fermentation.
- Dans les deux cas, des conditions de croissance sont prévues pour les micro-organismes..
- Dans les deux cas, le pH, la température et l'aération sont maintenus.
- Les deux sont utilisés pour la production à grande échelle dans les industries.

La différence entre la fermentation discontinue et continue résumé dans ce tableau :

**Tableau 3.1.** Comparaison bioréacteurs batch et bioréacteurs continus

Bioréacteurs batch	Bioréacteurs continus
La fermentation batchs est un type de fermentation industrielle dans laquelle les produits sont récoltés par lots tout en arrêtant le processus à la fin de chaque lot..	La fermentation en continu est un autre type de processus de fermentation industrielle dans lequel la fermentation est effectuée pendant une période de temps plus longue tout en ajoutant des nutriments au début et entre le processus et la récolte à intervalles réguliers..
<b>Médias frais</b>	
Dans la fermentation discontinue, au début, on ajoute du milieu frais.	En fermentation continue, des milieux frais sont ajoutés à intervalles réguliers.
<b>Récolte de produits</b>	
En fermentation discontinue, une fois la fermentation terminée, le produit est récolté.	En fermentation continue, les produits et la biomasse sont récoltés à intervalles réguliers plusieurs fois pendant le processus..
<b>Terminaison du processus</b>	
En fermentation en batch, lorsqu'un lot est prêt, le processus est terminé.	En fermentation continue, le processus dure longtemps jusqu'à ce que la récolte soit effectuée plusieurs fois..
<b>Configuration de la fermentation</b>	
La configuration de la fermentation batch n'est pas modifiée de l'extérieur une fois qu'elle est lancée.	La configuration de la fermentation en continu peut être modifiée pendant le processus de fermentation.
<b>Conditions de croissance à l'intérieur du fermenteur</b>	
En fermentation discontinue, les conditions ne resteront pas constantes.	En fermentation continue, les conditions sont maintenues constantes.

<b>Taux de roulement</b>	
En fermentation discontinue, le taux de roulement est faible.	En fermentation continue, le taux de roulement est élevé.
<b>Utilisation d'éléments nutritifs dans le fermenteur</b>	
Dans la fermentation discontinue, les nutriments sont utilisés par les microorganismes à un rythme plus lent.	En fermentation continue, les nutriments sont utilisés rapidement par les microorganismes.
<b>Croissance microbienne</b>	
Dans la fermentation en discontinu, la croissance microbienne se manifeste dans les phases de latence, de log et de stationnaire.	En fermentation continue, la croissance microbienne existe en phase exponentielle tout le temps.
<b>Type de système</b>	
La fermentation continue est un système ouvert.	La fermentation en lots est un système fermé.
<b>Nettoyage de fermenteur</b>	
Le fermenteur est nettoyé après la récolte d'un lot en fermentation discontinue.	Le fermenteur n'est pas obligé de nettoyer car l'ajout et la récolte sont effectués en continu.
<b>Taille du fermenteur</b>	
Des fermenteurs de plus grande taille sont utilisés pour la fermentation discontinue.	Des fermenteurs de plus petite taille sont utilisés pour la fermentation continue.
<b>Conditions environnementales à l'intérieur du fermenteur</b>	
En fermentation discontinue, les conditions environnementales sont moins proches de l'environnement naturel.	En fermentation continue, les conditions sont plus proches de l'environnement naturel.
<b>Pertinence</b>	

La fermentation batch convient à la production de métabolites secondaires.	La fermentation en continu convient à la production de métabolites primaires.
<b>Risque de contamination</b>	
La chance de contamination est moins dans la fermentation discontinue.	Risque de contamination élevé en fermentation continue.
<b>Coût initial</b>	
Le coût initial sera inférieur pour la configuration de la fermentation batch.	Le coût initial sera élevé pour l'installation de la fermentation continue.

#### 4. Stérilisation

Si on utilise une biomasse spécifique, il est absolument nécessaire de stériliser l'installation de fermentation et le milieu de culture.

En effet, des contaminants différents de la souche normalement exploitée risquent de concurrencer celle-ci dans l'utilisation du substrat, voire de produire des métabolites non désirés. Les usines mettent en œuvre, fin 1999, des techniques appropriées et prennent des précautions pour maîtriser les contaminations préjudiciables à la qualité des produits finis et à la rentabilité économique.

Les méthodes les plus utilisées sont les stérilisations thermiques et par filtration ; les stérilisations par agent chimique sont peu utilisées.

La stérilisation par filtration est plus adaptée pour l'air ou le gaz de fermentation et les solutions de composés thermolabiles tels que vitamines et enzymes ou les liquides peu chargés comme l'eau du milieu de culture. Cette filtration ne permet pas d'éliminer les particules virales et les bactériophages, qui peuvent être préjudiciables aux cultures cellulaires et microbiennes.

Il est d'usage d'utiliser des filtres dont les pores sont calibrés à 0,2  $\mu\text{m}$  pour assurer une stérilité microbienne des fluides.

Les débits gazeux nécessaires pour certaines fermentations industrielles imposent des performances particulières au niveau des équipements de filtration : faible perte de charge et débit élevé par surface filtrante installée.

Les équipements actuels sont constitués de bougies en inox poreux ou de cartouches filtrantes en polymère contenues dans un carter qui permet de réaliser une stérilisation à la vapeur et un

---

démontage aisé pour en assurer le décolmatage et la régénération.

Il existe plusieurs types de stérilisation différents, et tous exigent la température, le gaz et le taux d'humidité pression utilisés soigneusement contrôlé pour assurer leur validité et de l'efficacité.

Les protocoles pour ces scénarios de nettoyage et de stérilisation sont généralement établis par des organismes de conformité et de surveillance.

Une fois adoptés, ces protocoles doivent être mis en œuvre dans le cadre d'une procédure de fonctionnement standard du laboratoire et de l'industrie . Les optimisations de conception ou de processus pouvant contribuer à un nettoyage efficace avant la stérilisation, permettront un meilleur rendement et un gain de temps.

Ces types de méthodes de stérilisation peuvent être classés comme suit:

#### **4.1. Stérilisation physique**

Dans ce type de méthode, on utilise les procédures utilisant la chaleur humide appelée vapeur et chaleur sèche, également appelée dépyrogénéation.

Dans la première dénaturation de stérilisation des cas et la coagulation des protéines, il se produit, alors que dans le processus de séchage à la chaleur sèche de la cellule se produit.

**Dépyrogénéation:** utilisé dans les produits qui peuvent se dégrader lorsqu'ils sont exposés à la vapeur ou à l'humidité, mais peuvent résister à des températures élevées.

Les instruments en métal, les aiguilles sont souvent stérilisés de cette manière.

#### **Le rayonnement :**

Elle est réalisée à température ambiante élevée et à pression atmosphérique normale, en appliquant des rayons gamma (rayonnements ionisants), es rayons X, les rayons  $\beta$ , les rayons ultra-violets ou les ondes ultrasons.

En pratique, la stérilisation par rayons gamma peut être utilisée pour des objets contenant des dispositifs à semi-conducteurs susceptibles d'être endommagés par la vapeur.

Pour un rayonnement non ionisant, une longueur d'onde plus longue et de faible puissance est utilisé, de sorte qu'il ne peut pas parvenir à pénétrer les substances et ne peut être utilisé pour stériliser des surfaces.

La forme la plus courante de rayonnement non ionisant est la lumière ultraviolette, qui est utilisée de diverses manières dans l'industrie.

## 4.2. Stérilisation chimique

La stérilisation chimique est généralement utilisée pour les dispositifs sensibles à la chaleur élevée utilisée dans la stérilisation à la vapeur et pour les dispositifs pouvant être endommagés par l'irradiation.

Souvent, les stérilisants chimiques fonctionnent en utilisant des gaz hautement réactifs à basse température qui sont en contact direct avec l'article d'essai (souvent à travers une membrane ou un paquet semi-poreux).

La stérilisation des fermenteurs vides par des agents chimiques gazeux est possible ( $\beta$ -propiolactone, oxyde d'éthylène), mais c'est la vapeur d'eau sous pression qu'est universellement employée pour la stérilisation des fermenteurs et des milieux de culture, parce que son utilisation est plus pratique et moins onéreuse.

L'une des principales préoccupations lors de la réalisation de ce type de stérilisation est l'effet toxique des produits chimiques résiduels restant dans le produit; et la sécurité de l'opérateur associée à l'exposition à un stérilisant.

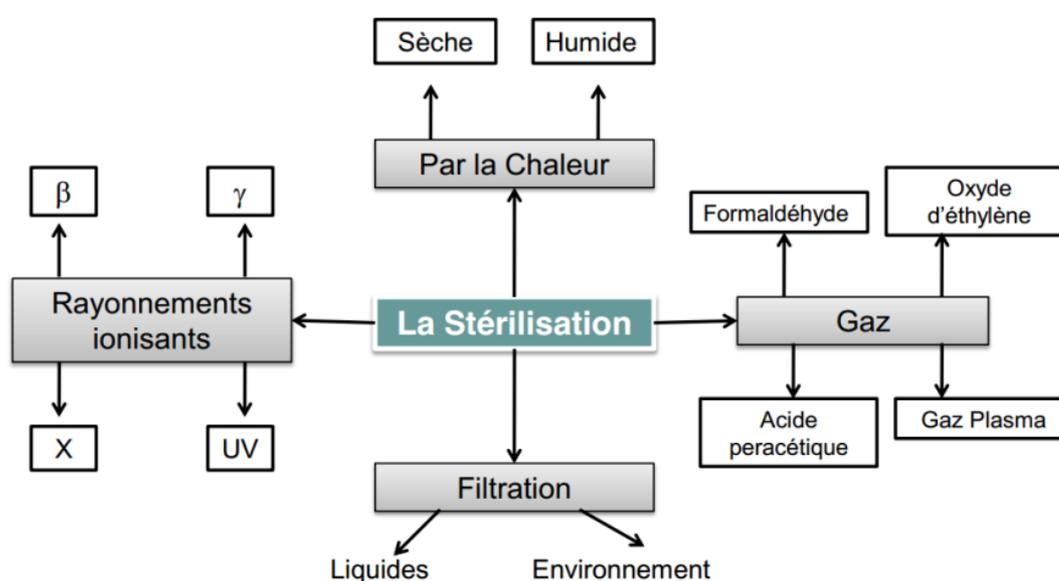


Figure 4.1. Différentes méthodes de stérilisation.

## 4.3. stérilisation à la vapeur

La stérilisation par la vapeur, malgré sa simplicité apparente, présente cependant certains inconvénients :

- dénaturation des protéines et inactivation de certaines enzymes ;

- 
- destruction de certaines vitamines et de certains facteurs de croissance;
  - surchauffage qui entraîne la polymérisation de certains composés ;
  - caramélisation des sucres, oxydation des phénols et de l'acide ascorbique, polymérisation des aldéhydes insaturés, réaction de Maillard.

Les méthodes classiques de stérilisation par la vapeur peuvent se faire de deux manières :

***En cuves, dans le fermenteur :***

Celui-ci est chauffé, soit par injection de vapeur dans le milieu (il faut alors tenir compte du volume d'eau ainsi condensée sans la constitution finale du milieu de culture), soit par chauffage de la cuve et de son contenu portés à une température convenable par de la vapeur circulant dans un serpentin ou dans une double paroi.

***Stérilisation continue :***

Elle permet un gain de temps et une meilleure utilisation du milieu. Ainsi, dans le cas de la vitamine B12, on obtient un rendement plus élevé (160%).

Le milieu passe dans un échangeur de température où il est porté instantanément à une température élevée, puis refroidi.

Les procédés de fermentation peuvent, en effet, être classés au point de vue des impératifs de stérilité, en deux groupes :

- Ceux dans lesquels la pénétration d'une microflore étrangère dans le milieu ne présente pas trop d'inconvénients (production d'acides organiques, solvants organiques, levures, stéroïdes et nucléotides).
- ceux exigeant le maintien de conditions strictement aseptiques (production d'antibiotiques, vitamines B12, vitamine B2 et cellules animales)

#### **4.4. La stérilisation par filtration**

La stérilisation par filtration est plus adaptée pour l'air ou le gaz de fermentation et les solutions de composés thermolabiles tels que vitamines et enzymes ou encore les liquides peu chargés comme l'eau des milieux de culture. Cette filtration ne permet pas d'éliminer les particules virales et les bactériophages, qui peuvent être préjudiciables aux cultures cellulaires et microbiennes.

Il est d'usage d'utiliser des filtres dont les pores sont calibrés à 0,2 µm pour assurer une stérilité microbienne des fluides.

#### **2.5. Rappel des principes de stérilisation**

Les procédés de destruction des populations microbiennes ou virales suivent dans la plupart des cas une loi cinétique de premier ordre qui tient compte des paramètres suivants :

N : nombre de cellules initiales par millilitre ;

N t : nombre de cellules tuées au temps t ;

---

$N_s$  : nombre de cellules survivantes au temps  $t$

Le taux de mortalité est défini par :

$$-\frac{dN_s}{dt} = K(N_0 - N_t) = KN_s$$

$K$  est la constante spécifique de mortalité par minute.

Si on intègre cette relation entre  $N$  à  $t = 0$  et  $N_s$  au temps  $t$ , on obtient :

$$Kt = \ln \frac{N}{N_s} \quad \text{ou} \quad \ln \frac{N_s}{N} = -Kt$$

$N/N_s$  est le taux d'inactivation ;

$N_s/N$  est le taux de survie ;

$K$  augmente considérablement avec la température et peut être déterminé pour une culture pure.

Selon l'équation d'Arrhénius, il existe une relation entre  $K$  et la température :

$$\frac{d \ln K}{dt} = \frac{E}{RT^2}$$

avec :

$R$  constante des gaz parfaits (en  $J \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1}$ ),

$T$  température (en  $K$ ),

$E$  énergie d'activation spécifique pour la population (en  $J/mol$ ).

Dans le cas le plus fréquent de solutions non stériles avec cultures mixtes de micro-organismes ayant des résistances variées à la température, la variation du taux de destruction n'est plus linéaire mais suit une courbe résultante.

L'utilisateur devra mettre en place des procédures de stérilisation du fermenteur, des tuyauteries annexes (sondes, filtres, etc.) et des fluides entrants (air, milieu de culture, etc.), puis valider les conditions de stérilisation de façon à calculer le risque de contamination.

La stérilisation peut s'effectuer par batch ou en continu, en utilisant des échangeurs de chaleur avec maintien de la température et du temps de séjour avant refroidissement.

**Exemple :** on a comme énergie d'activation :

*bacillus stearothermophilus* : 282,2 kJ/mol ;

*bacillus subtilis* : 316,8 kJ/mol

---

## 5. Transfert de matière dans les bioréacteurs

### 5.1. Aération : transfert de matière gaz-liquide

Satisfaire les besoins en oxygène d'une population microbienne n'est pas chose aisée. En effet, si on compare la demande en  $O_2$  à la quantité disponible, on s'aperçoit qu'il existe un fossé entre ces deux données.  $O_2$  peut donc constituer un facteur limitant à gérer prioritairement pour optimiser la production.

#### 5.1.1. Demande en oxygène (OUR)

La demande en oxygène dépend principalement des caractéristiques de la biomasse et de l'effectif de celle-ci. L'intervention de la biomasse est exprimée par le  $QO_2$  (taux d'assimilation spécifique d' $O_2$ ) qui correspond à la quantité d' $O_2$  consommée au cours d'une fermentation par unité de biomasse et par unité de temps ( $mmole \times gr^{-1} \times h^{-1}$ ). Sa valeur est bien entendu fonction de la nature du microorganisme (espèce) mais également de son état physiologique.

Dans l'hypothèse d'une fermentation en batch, ce dernier dépend de la phase de la courbe de croissance dans laquelle la population se trouve.

La demande biologique totale en oxygène (OUR en anglais pour Oxygen Uptake Rate) peut donc s'écrire  $QO_2 \times X$ , avec  $X$  exprimant l'effectif microbien.

Indépendamment de toute activité biologique, le substrat peut lui-même être consommateur d'oxygène s'il est fortement réduit et aisément oxydable. La demande en oxygène pour des oxydations non biologiques est considérée comme négligeable dans la plupart des fermentations faisant appel à un substrat standardisé.

Ce n'est pas toujours le cas (cfr. : différence entre DBO5 et DCO en épuration des eaux).

Le graphique suivant représente l'évolution des principaux paramètres liés à la demande et à l'offre d'oxygène dans le cas d'une fermentation en batch dans un bioréacteur aéré.



---

### 5.1.2. Offre d'oxygène (OTR)

L'offre d'O<sub>2</sub> est assurée par l'injection d'air, voire d'oxygène pur, dans le réacteur. Toutefois, deux difficultés majeures interviennent : d'une part la faible solubilité de l'oxygène dans l'eau qui limite la quantité disponible à un moment donné, et d'autre part l'existence de plusieurs facteurs qui ralentissent le transfert des molécules d'O<sub>2</sub> vers les cellules.

On peut illustrer l'écart entre demande et offre d'oxygène par un exemple chiffré. Tenant compte d'une solubilité d'O<sub>2</sub> dans l'eau de l'ordre de +/-8 ppm (8 mg/L) aux températures habituelles d'incubation (20 - 30°C) et en se référant au tableau 5.2, ci-dessus on constate que les besoins en O<sub>2</sub> pour une minute de fermentation dépassent largement la quantité disponible. Cela signifie que sans aération, il faut moins d'une minute à une culture concentrée à 10 g de biomasse par litre pour consommer tout l'oxygène du réacteur. Ajoutons que le fonctionnement de la biomasse sera perturbé bien avant que l'anoxie ne s'installe puisque l'oxygène intervient comme facteur limitant dès que sa concentration est inférieure à la

concentration critique (cfr. : équation de Monod, avec O<sub>2</sub>, comme substrat).

Le premier problème concerne donc la solubilité de l'O<sub>2</sub> dans la phase aqueuse du substrat. En effet celle-ci est assez limitée et d'autant plus faible que la température du substrat est élevée.

Or la plupart des fermentations industrielles utilisent des biomasses mésophiles voire thermophiles, et on privilégie toujours la régulation thermique en vue de maintenir la flore à son optimum de température.

Le tableau suivant donne quelques valeurs de la solubilité de l'oxygène dans l'eau pure.

**Tableau 5.2. :** Solubilité d'O<sub>2</sub> dans l'eau en fonction de la température

T° (°C)	Solubilité O <sub>2</sub> (mg/L)
10°	11,25
15°	10,06
20°	9,09
25	8,26
30	7,49
35°	6,91
37°	6,70
40°	6,41
45°	5,94

---

Par ailleurs, le substrat n'est pas de l'eau pure, et la présence de solutés (éléments nutritifs) diminue encore la solubilité de l'oxygène.

Dès lors, Il s'agit de mettre en œuvre des techniques permettant d'apporter suffisamment d'O<sub>2</sub> à la biomasse malgré la faible quantité susceptible d'être "stockée" (solubilisée) dans la phase aqueuse. Comme il n'est pas possible de jouer sur le "stock" disponible, c'est sur la vitesse de renouvellement de celui-ci qu'il va falloir travailler.

Le paramètre qu'il s'agit ainsi de maximiser n'est donc plus la solubilité d'O<sub>2</sub> dans le substrat, mais bien le taux de transfert de l'oxygène de la phase gazeuse (les bulles d'air injectées dans le substrat) vers les cellules. C'est ici qu'intervient la deuxième difficulté.

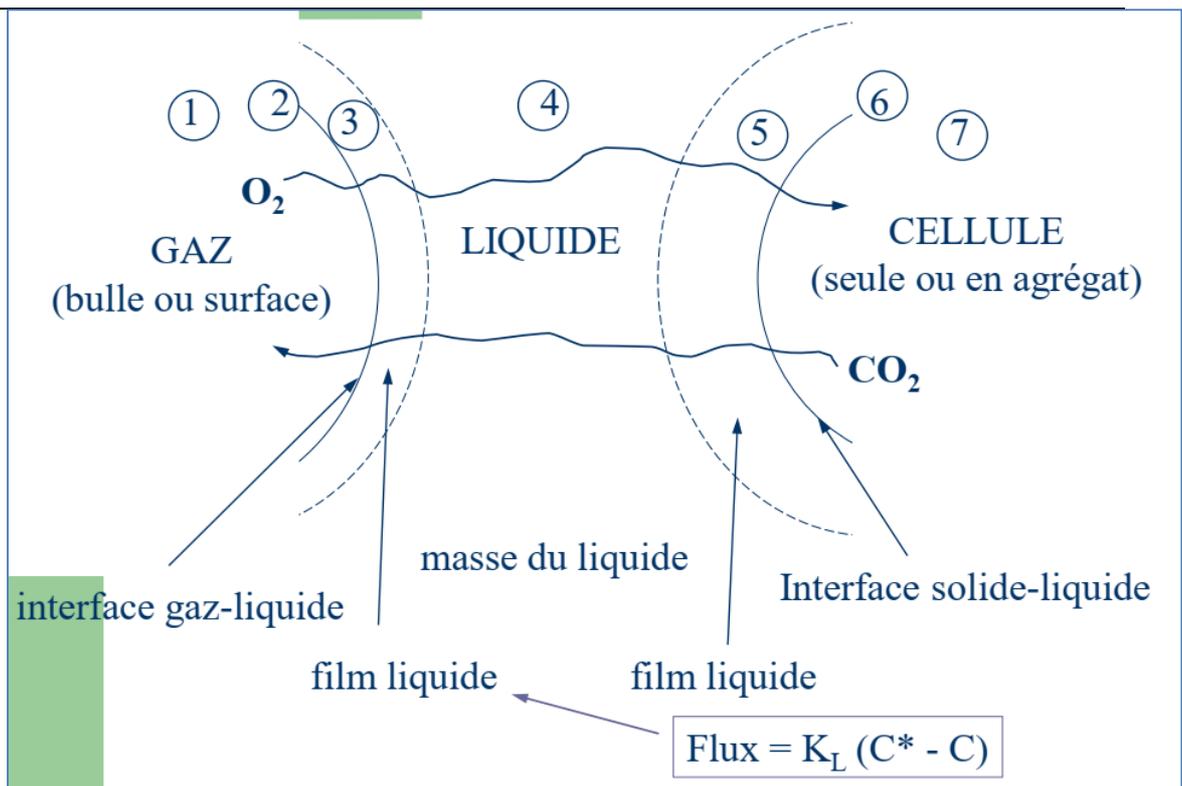
En effet, pour qu'un atome d'oxygène soit utilisable par une cellule, il doit se trouver à l'endroit où il est nécessaire, c'est-à-dire dans le cytoplasme. Or, au départ, cet atome est inclus dans un mélange de gaz (l'air, qui contient également N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, ...) formant une bulle au sein de la phase aqueuse du substrat. Entre l'intérieur de cette bulle et l'intérieur de la cellule, voire de la mitochondrie si O<sub>2</sub> intervient dans la respiration d'un eucaryote, toute une série de barrières ralentissent le transfert. Le schéma ci-dessous, représente cette succession d'entraves au transfert.

On y identifie 6 étapes qui séparent la molécule de dioxygène incluse dans la bulle d'air du site d'utilisation de l'atome d'oxygène (cytoplasme, mitochondrie ou membrane).

Ainsi, entre la bulle d'air et l'eau existe un double film gazeux (1) et liquide (2) qui, dans une certaine mesure, s'oppose au transfert.

La solubilisation d'O<sub>2</sub> dans l'eau a été discutée plus haut et la diffusion des molécules n'est pas instantanée, ce qui constitue une troisième barrière (3). Au niveau de la cellule on retrouve un film liquide (4) qui constitue l'interface entre le milieu et la biomasse.

Passées les enveloppes cellulaires, dont la perméabilité n'est pas absolue (5), au sein de chaque cellule, le mouvement (6) d'O<sub>2</sub> vers les sites d'utilisation demande aussi un certain temps.



**Figure 5.2.** Les entraves au transfert de l'oxygène

Tenant compte des considérations précédentes, on admet l'équation suivante pour exprimer la vitesse du transfert ( $dC_L/dt$ ) d'un gaz vers un liquide :

$$\frac{dC_L}{dt} = K_L \times a \times (C^* - C_L)$$

où  $C^*$  = concentration en gaz dans la phase liquide à saturation :  $[M][L]^{-3}$  (mmole x Litre<sup>-1</sup>)

$C_L$  = concentration en gaz dans la phase liquide au temps  $t$  :  $[M][L]^{-3}$  (mmole x Litre<sup>-1</sup>)

$K_L$  = coefficient de transfert (spécifique du gaz et du liquide) :  $[L][T]^{-1}$ (cm/h)

$a$  = superficie de l'interface gaz-liquide :  $[L]^2[L]^{-3}$  (cm<sup>2</sup>/cm<sup>3</sup>)

Ce taux (vitesse) de transfert s'exprime en mmoles x Litre<sup>-1</sup> x heure<sup>-1</sup> ( $[M][L]^{-3} [T]^{-1}$ ) et est couramment désigné par l'abréviation OTR (Oxygen Transfert Rate).

On voit qu'il sera d'autant plus élevé que la concentration du gaz sera éloignée de la saturation. Réciproquement il sera nul à saturation ( $C^* = C_L \rightarrow C^* - C_L = 0$ ), ce qui est logique.

Le  $K_L$  étant une constante typique de la situation étudiée, il n'est pas possible d'agir dessus. Il représente en fait la vitesse avec laquelle les molécules de gaz peuvent traverser l'espace qui les sépare du liquide.

---

Cela fait référence aux barrières mentionnées plus haut. Par contre on améliore le taux de transfert en maximisant l'interface gaz-liquide ( $a$ ). Pour ce faire, il s'agit d'injecter le gaz de façon à ce qu'il se forme des bulles de taille réduite.

En effet, dans ces conditions, pour un volume donné de gaz, la surface est élevée.  $a$  exprime donc la surface volumique du gaz.

Concrètement, il n'est pas possible de distinguer ni de mesurer séparément le  $K_L$  et le  $a$ .

Ces deux facteurs sont donc étudiés de façon combinée - notion de  $K_{LA}$  - et caractérisent globalement chaque système de transfert de gaz, en incluant la nature du gaz et du liquide, le type d'injection, le type d'agitation et les caractéristiques morphologique du réacteur de mélange. Différentes méthodes permettent de déterminer le  $K_{LA}$  d'un fermenteur (cfr. : l'informatique industrielle pour l'évaluation du  $K_{LA}$  pour l'oxygène).

Par ailleurs, dans le cadre de l'alimentation d'une biomasse consommatrice d'oxygène,  $O$  est assimilé au fur et à mesure de sa solubilisation. Cette assimilation est exprimée par le  $QO_2 \times X$  (OUR).

Le taux de transfert global - qui représente la vitesse de variation de la concentration en  $O_2$  dans le substrat - devient alors

$$\frac{dC_L}{dt} = K_L \times a \times (C^* - C_L) - QO_2 \times X = OTR - OUR$$

Au vu de cette formule, on comprend que l'apport d'oxygène ne doit pas nécessairement être constant tout au long d'une fermentation.

En effet, comme cela a été expliqué plus haut, le terme  $QO_2X$  varie au cours de celle-ci (voir. : Figure 5.1. : Evolution des paramètres d'aération durant une culture en batch).

En fait le premier terme du second membre de l'égalité représente les variations (positives) de la concentration en  $O_2$  dues à l'injection d'air dans le réacteur ; tandis que le second terme désigne les variations (négatives) liées à l'assimilation d' $O_2$  par la biomasse.

A l'aide de cette équation, on peut calculer différentes données spécifiques de la fermentation en cours. Cela suppose de disposer de sondes à oxygène permettant de mesurer la concentration en  $O_2$  dissous ( $C_L$ ) à tout moment.

Ainsi, via un essai relativement simple (dynamic gassing out) on peut obtenir les valeurs de l'OUR et du  $K_{LA}$ . Cela se déroule durant une fermentation (phase exponentielle) et on opère en deux temps (cfr. : Figure 5 : Essai de mesure du  $K_{LA}$  et du  $QO_2X$ , ci-dessous) :

A) arrêt de l'aération (tout en gardant un minimum d'agitation afin de maintenir la biomasse en suspension). L'offre d'oxygène (OTR) est donc nulle et

$$\frac{dC_L}{dt} = K_L \times a \times (C^* - C_L) - QO_2 \times X$$

Devient

$$\frac{dC_L}{dt} = -QO_2 \times X$$

La sonde enregistre une diminution linéaire de la concentration en O<sub>2</sub> (C<sub>L</sub>) en fonction du temps. La pente de cette droite, qui par définition est précisément ( dC<sub>L</sub>/dt ) correspond donc à l'**OUR**.

B) reprise de l'aération et de l'agitation dans les conditions pour lesquelles on veut mesurer le K<sub>L</sub>a. La sonde enregistre alors une croissance +/- rapide de la concentration en O<sub>2</sub>. Celle-ci n'est pas linéaire mais la pente de la tangente à la courbe obtenue n'est autre que ( dC<sub>L</sub>/dt ) par définition.

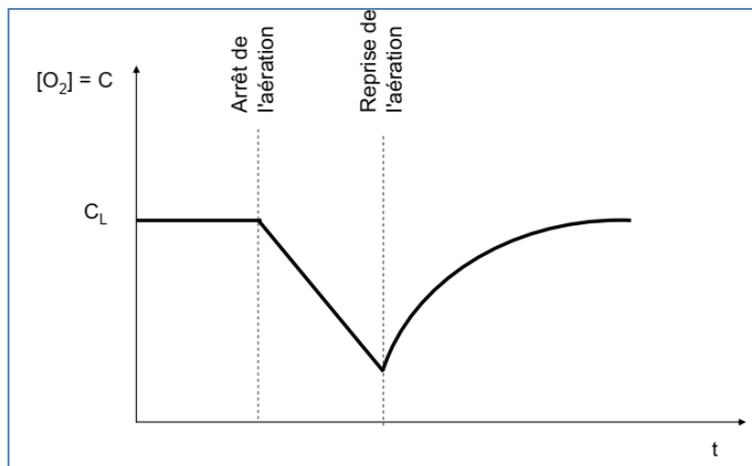
Par ailleurs, on peut transformer 
$$\frac{dC_L}{dt} = K_L \times a \times (C^* - C_L) - QO_2 \times X$$

et obtenir une nouvelle relation :

$$C_L = \frac{1}{K_L a} \left( \frac{dC_L}{dt} + QO_2 X \right) + C^*$$

Il s'agit de l'équation d'une droite dont la pente n'est autre que ( -1/K<sub>L</sub> a ) et qui apparaîtra sur un graphique dans lequel on porte en abscisse les valeurs de  $\frac{dC_L}{dt} + QO_2 X$

et en ordonnée celles de C<sub>L</sub> :



**Figure 5.3.** Essai de mesure du K<sub>L</sub>a et du QO<sub>2</sub>X

## 5.2. Agitation : transfert de matière par convection forcée

Ce dernier critère est un critère majeur de la conception des fermenteurs ; il s'agit classiquement de maintenir à la température de fermentation. Ces réactions de fermentation pouvant être fortement exothermiques, il convient de traiter ce critère de manière approfondie.

### 5.2.1. transfert thermique dans un bioréacteur

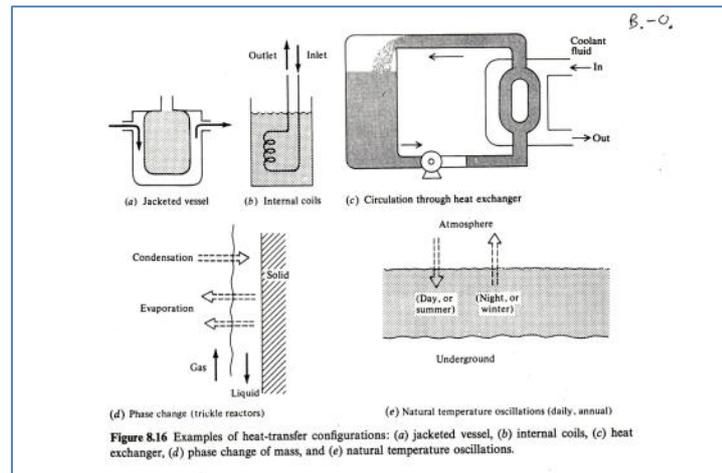


Figure 5.4 : Moyens d'évacuation de la chaleur

#### • Gains:

- $Q_{met}$ : Chaleur générée par culture
- $Q_{ag}$ : chaleur générée par agitation mécanique
- $Q_{gaz}$ : chaleur générée par puissance d'aération

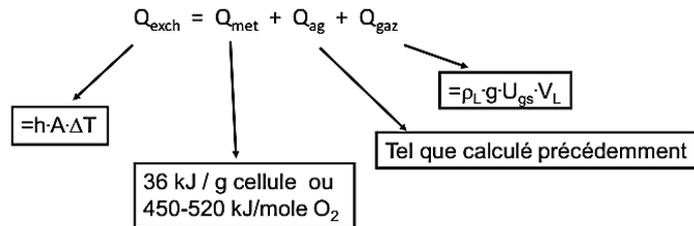
#### • Pertes:

- $Q_{évap}$ : chaleur évacuée par évaporation
- $Q_{exch}$ : chaleur éliminée par l'échangeur
- $Q_{sen}$ : différence d'enthalpie des écoulements

#### • Accumulation: $Q_{acc}$

## BILAN THERMIQUE

- $Q_{acc} = Q_{met} + Q_{ag} + Q_{gaz} - Q_{exch} - Q_{évap} - Q_{sen}$ 
  - On peut utiliser  $Q_{acc}$  pour mesurer  $Q_{met}$  en système isolé
  - En général, on peut négliger  $Q_{évap}$ ,  $Q_{sen}$
  - En régime permanent,  $Q_{acc} = 0$



Les gradients de température étant relativement faibles et la surface d'échange limitée pour un volume donné, on cherchera à obtenir un coefficient de transfert thermique le plus grand possible, défini par la relation donnant la quantité de chaleur échangée :  $< 15 \text{ }^\circ\text{C}$  :

$$Q = h S \Delta T$$

avec  $Q$  (W/h) quantité de chaleur échangée,

$h$  (W/h · m<sup>2</sup> · K) coefficient de transfert thermique global,

$S$  (m<sup>2</sup>) surface d'échange,

$\Delta T$  (K) moyenne logarithmique des températures produit/fluide caloporteur,

$Q$ ,  $S$ ,  $\Delta T$  étant figés, on s'assurera que l'agitation et la vitesse du fluide caloporteur soient suffisantes pour satisfaire la demande.

### ■ Bilan thermique général

Il est donné par la relation suivante et s'exprime en W/h :

$$Q_a + Q_p + Q_m = Q = Q_e$$

Avec

$Q_a$  énergie apportée par l'air injecté,

$Q_p$  énergie apportée par la chaleur de réaction,

$Q_m$  énergie apportée par la dissipation de l'énergie due à l'agitation,

$Q_e$  énergie extraite par l'eau de refroidissement.

Nous avons volontairement ignoré les pertes thermiques avec le milieu extérieur. En effet, les

---

températures étant toutes voisines (produit, eau de refroidissement, air ambiant), les pertes sont faibles et peuvent changer de signe suivant la saison :

— en hiver :  $q_{\text{ambiante}} < q_{\text{eau de refroidissement}}$  les « pertes » agissent comme un réfrigérant supplémentaire ;

— en été :  $q_{\text{ambiante}} > q_{\text{eau de refroidissement}}$

### 5.2.2. Détermination du coefficient de transfert thermique global $h$ . Influence de l'agitation

$$\frac{1}{h} = \frac{1}{h_i} + \frac{e}{\lambda_m} + \frac{1}{h_e} + \frac{1}{h_p}$$

Le coefficient de transfert côté produit,  $h_i$ , dépend du type de mobile, de son diamètre, de la vitesse de rotation, du diamètre de la cuve et des caractéristiques physiques du produit ( $r$ ,  $m$ ,  $l$ ,  $C_p$  ; cf. tableau des symboles).

Accroître  $h_i$  revient à modifier  $N$  ou  $D$ , mais cela n'est pas souhaitable, en effet  $N$  et  $D$  sont calculés en premier lieu pour assurer le transfert de matière, « l'équilibre » puissance dissipée/dispersion du gaz ne doit pas être rompu.

Seule l'action sur le type de mobile permet quelques améliorations ; les fermenteurs industriels nécessitent plusieurs mobiles. On peut alors décomposer leur action et privilégier pour l'un la dispersion du gaz et de la puissance, pour les autres le pompage pour l'homogénéisation et le transfert thermique.

En conclusion, le transfert thermique est dans la pratique un problème délicat à résoudre, pour lequel la concertation et le savoir-faire du constructeur de cuves et du constructeur d'agitateurs est primordiale.

---

## Références Bibliographiques

- [1] CRUEGER W. & CRUEGER A., Biotechnology : A textbook of industrial microbiology, 2<sup>n</sup> edition, Sunderland (USA), Science Tech Publishers, 1990
- [2] LARPENT-GOURGAU M. & SANGLIER J. J., Biotechnologie : principes et méthodes, Biosciences et Techniques, Doin Editions, 1992
- [3] **M. MALIOU Djamil** , COURS DE MICROBIOLOGIE GENERALE, CHAPITRE I: Introduction à la Microbiologie, <http://fsnv.univ-bouira.dz/wp-content/uploads/2020/04/cours-microbiologie-2eme-ann%C3%A9e-.pdf>
- [4] Catherine FOUCAUD-SCHEUNEMANN, Sandra HELINCK, Les micro-organismes au Coeur des biotechnologies, Éditions Techniques de l'Ingénieur, BIO 550, 5 – 2009.
- [5] AOUATI. Hanan, Cours de : MICROBIOLOGIE INDUSTRIELLE, [http://staff.univ-batna2.dz/sites/default/files/aouati\\_hanane/files/mise\\_a\\_jour\\_i\\_cours\\_microbiologie\\_industrielle.pdf](http://staff.univ-batna2.dz/sites/default/files/aouati_hanane/files/mise_a_jour_i_cours_microbiologie_industrielle.pdf)
- [6] Maurice NONUS, Patrice COGNART, Françoise KERGOAT, Jean-Michel LEBEAULT, Fermenteurs industriels : Conception et réalisation, Éditions Techniques de l'Ingénieur, J 6 006, 2013.
- [7] Joël Cnokaer, Françoise Guillet , Opérations unitaires en génie biologique, tome 3 : La fermentation, Éditeur : CRDP d'Aquitaine, 2011
- [8] S. Charles, C. Lopes, J.R. Lobry & H. Charles, Bioréacteur & Modélisation, [INSA P2i-1] , 2021. <http://umr5558-shiny.univ-lyon1.fr/web/bioreacteur.pdf>
- [9] Fermentation modelling” de Sinclair C. G., Cantero D. 1990. In: Fermentation a practical approach. Eds.: McNeil B., Harvey L. M.; IRL PRESS at Oxford University Press, New York (ça ne vieillit pas).
- [10] Bernard J. Abbott, Allen I. Laskin, and C. J. McCoy ; Effect of Growth Rate and Nutrient Limitation on the Composition and Biomass Yield of *Acinetobacter calcoaceticus* ; Appl Microbiol. 1974 July; 28(1): 58-63 ;
- [11] E.feraga, cours de la cinétique enzymatique, 2020 [http://univ.ency-education.com/uploads/1/3/1/0/13102001/biochimie1an-cinetique\\_enzymatique2020feraga.pptx](http://univ.ency-education.com/uploads/1/3/1/0/13102001/biochimie1an-cinetique_enzymatique2020feraga.pptx)

---

[12] Bolesław Tabiś\*, Dominika Boroń, A simple analytical method for determining basic hydrodynamic characteristics of hybrid fluidized-bed air-lift apparatus, *Chemical and Process Engineering* 2017, 38 (1), 121-133. DOI: 10.1515/cpe-2017-0010

[13] B. Dauby, *Fermentations industrielles*, IG5 ch 2010-2011, HELMO – Gramme.

---

## Annexe 1

Le tableau suivant cite quelques autres modèles non structurés rencontrés dans la littérature. La plupart de ceux-ci sont plus précis que l'équation de Monode et permettent de décrire les autres phases de la courbe de croissance (autre que la phase exponentielle). Tous ces modèles sont établis pour la culture discontinue et peuvent être éventuellement modifiés et adaptés aux cultures semi-continues et continues.

Tableau résumant la liste des principaux modèles utilisés dans l'étude des cultures en fermenteur.

Modèle de	Equations	Descriptions
Monod (1949)	$\mu = \mu_m \cdot \frac{S}{K_s + S}$	Modèle hyperbolique $K_s$ : contante de saturation
Teissier (1936)	$\mu = \mu_m \cdot [1 - \exp(-S/K_s)]$	Exprime le contrôle de la diffusion du substrat
Moser (1958)	$\frac{1}{\mu} = \frac{1}{\mu_m} + \frac{K_s}{\mu_m} \cdot \frac{1}{S^n}$	Analogie avec la cinétique des enzymes allostériques
Contois (1959)	$\mu = \mu_m \cdot \frac{S}{K_1 \cdot X + S}$	Modèle hyperbolique $K_1$ : contante
Powell (1967)	$\mu = \mu_m \cdot \frac{S}{(K_2 + K_3 \cdot D) + S}$	$K_2$ et $K_3$ : contantes $D$ : diffusion du substrat
Edwards et Wilke (1968)	$\mu = \mu_m \cdot \left(1 - \frac{X}{X_f}\right) \cdot (a_1 + 2 \cdot a_2 \cdot t + 3 \cdot a_3 \cdot t^2 + \dots)$ avec $X_f =$ biomasse finale	Fonction polynomiale du temps $a_1, a_2, a_3, \dots$ : constantes
Herbert (1967)	$\mu = \mu_m \cdot \frac{S}{K_s + S} - K_d$	$K_d$ : taux de mortalité
Edwards (1970)	$\mu = \mu_m \cdot \frac{S}{K_s + S} \cdot e^{-S/K_i}$	inhibition par le substrat $K_i$ : constante d'inhibition
Edwards (1970)	$\mu = \mu_m \cdot [e^{-S/K_i} - e^{-S/K_s}]$	inhibition par le substrat selon l'équation de Teissier
Andrews (1968)	$\mu = \mu_m \cdot \frac{S}{K_s + S + S^2/K_i}$	inhibition par le substrat $K_i$ : constante d'inhibition
Luong (1987)	$\mu = \mu_m \cdot \frac{S}{K_s + S} \cdot \left[1 - \frac{S}{S_m}\right]^n$	$S_m$ : concentration limite > il n'y a plus de croissance
Hinshelwood (1946)	$\mu = (\mu_m - K_i \cdot P) \cdot \frac{S}{K_s + S}$	inhibition par le produit $K_i$ : constante d'inhibition
Aiba (1968)	$\mu = \mu_m \cdot \frac{S}{K_s + S} \cdot e^{-P/K_i}$	inhibition par le produit $K_i$ : constante d'inhibition
Nagatani (---)	$\mu = \mu_m \cdot \frac{S}{K_s + S} \cdot \left(\frac{K_i}{K_i + P}\right)$	inhibition par le produit $K_i$ : constante d'inhibition
Levenspiel (1980)	$\mu = \mu_m \cdot \frac{S}{K_s + S} \cdot \left[1 - \frac{P}{P_m}\right]^n$	$P_m$ : concentration limite > il n'y a plus de croissance

Modèle de	Equations	Descriptions
Monod (1949)	$\mu = \mu_m \cdot \frac{S}{K_s + S}$	Modèle hyperbolique $K_s$ : contante de saturation
Teissier (1936)	$\mu = \mu_m \cdot [1 - \exp(-S/K_s)]$	Exprime le contrôle de la diffusion du substrat
Moser (1958)	$\frac{1}{\mu} = \frac{1}{\mu_m} + \frac{K_s}{\mu_m} \cdot \frac{1}{S^n}$	Analogie avec la cinétique des enzymes allostériques
Contois (1959)	$\mu = \mu_m \cdot \frac{S}{K_1 \cdot X + S}$	Modèle hyperbolique $K_1$ : contante
Powell (1967)	$\mu = \mu_m \cdot \frac{S}{(K_2 + K_3 \cdot D) + S}$	$K_2$ et $K_3$ : contantes $D$ : diffusion du substrat
Edwards et Wilke (1968)	$\mu = \mu_m \cdot \left(1 - \frac{X}{X_f}\right) \cdot (a_1 + 2 \cdot a_2 \cdot t + 3 \cdot a_3 \cdot t^2 + \dots)$ avec $X_f$ = biomasse finale	Fonction polynomiale du temps $a_1, a_2, a_3, \dots$ : constantes
Herbert (1967)	$\mu = \mu_m \cdot \frac{S}{K_s + S} - K_d$	$K_d$ : taux de mortalité
Edwards (1970)	$\mu = \mu_m \cdot \frac{S}{K_s + S} \cdot e^{-S/K_i}$	inhibition par le substrat $K_i$ : constante d'inhibition
Edwards (1970)	$\mu = \mu_m \cdot [e^{-S/K_i} - e^{-S/K_s}]$	inhibition par le substrat selon l'équation de Teissier
Andrews (1968)	$\mu = \mu_m \cdot \frac{S}{K_s + S + S^2/K_i}$	inhibition par le substrat $K_i$ : constante d'inhibition
Luong (1987)	$\mu = \mu_m \cdot \frac{S}{K_s + S} \cdot \left[1 - \frac{S}{S_m}\right]^n$	$S_m$ : concentration limite > il n'y a plus de croissance
Hinshelwood (1946)	$\mu = (\mu_m - K_i \cdot P) \cdot \frac{S}{K_s + S}$	inhibition par le produit $K_i$ : constante d'inhibition
Aiba (1968)	$\mu = \mu_m \cdot \frac{S}{K_s + S} \cdot e^{-P/K_i}$	inhibition par le produit $K_i$ : constante d'inhibition
Nagatani (---)	$\mu = \mu_m \cdot \frac{S}{K_s + S} \cdot \left(\frac{K_i}{K_i + P}\right)$	inhibition par le produit $K_i$ : constante d'inhibition
Levenspiel (1980)	$\mu = \mu_m \cdot \frac{S}{K_s + S} \cdot \left[1 - \frac{P}{P_m}\right]^n$	$P_m$ : concentration limite > il n'y a plus de croissance

# Vitesse d'une réaction enzymatique

Dans cette partie, nous allons revenir sur le modèle de Michaelis-Menten (§ 3.3) proposé en 1913 par l'allemand *Leonor Michaelis* et la canadienne *Maud Menten* pour décrire la vitesse ( $v$ ) d'une réaction chimique catalysée par une enzyme agissant sur un substrat ( $[S]$ ) unique pour donner un produit (Michaelis et Menten, 1913) :

$$v([S]) = \frac{v_{max}[S]}{K_M + [S]}$$

On parle de **cinétique enzymatique**. Il s'agit d'une relation monotone croissante sans point d'inflexion, telle que  $\lim_{[S] \rightarrow +\infty} v([S]) = v_{max}$  et  $v(K_M) = \frac{v_{max}}{2}$ .

Dans cette relation,  $[S]$  est la **variable indépendante explicative** (on l'appelle aussi **variable de contrôle**), tandis que  $v$  est la **variable dépendante à expliquer**.

## Les observations

Nous allons travailler avec des données tirées de la littérature scientifique (Fig. 11).

## VITESSE D'UNE RÉACTION ENZYMATIQUE

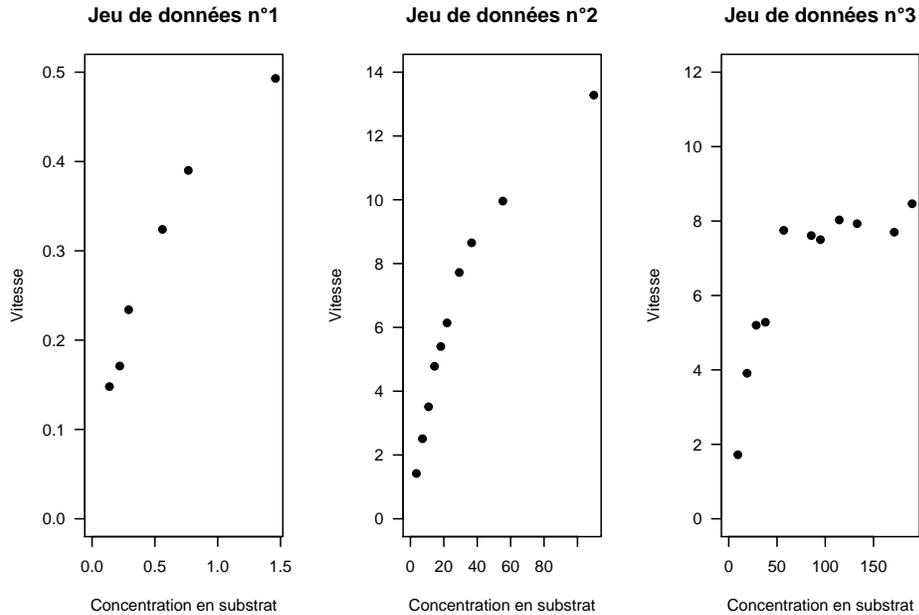


Fig. 11: Représentation graphique de la relation vitesse versus concentration en substrat pour trois jeux de données tirés de la littérature (Ritchie et Prvan, 1996).

La tendance moyenne des données semble suivre le modèle de Michaelis-Menten avec, pour chaque jeu de données, des valeurs des paramètres  $v_{max}$  et  $K_M$  différentes.

Télécharger le jeu de données n°1

Télécharger le jeu de données n°2

Télécharger le jeu de données n°3

## La méthode de régression

### Généralités

Soit  $(x_i, y_i)$  les couples de valeurs observées pour  $[S]$  et  $v$  dans un jeu de données, avec  $i = 1, \dots, n$  et  $n$  le nombre d'observations dans le jeu de données.

Si on suppose que la concentration en substrat peut être déterminée avec suffisamment de précision, alors on peut considérer que les  $x_i$  sont connus "sans erreur". Par contre, il est souvent difficile expérimentalement de mesurer la vitesse d'une réaction chimique, ce qui nous conduit à considérer que les  $y_i$  seront distribués aléatoirement et selon une certaine loi autour de la tendance moyenne décrite par le modèle de Michaelis-Menten. La variable  $v$  étant une variable quantitative continue, il est raisonnable de supposer qu'elle se distribue

## LA MÉTHODE DE RÉGRESSION

selon une loi de probabilité gaussienne, c'est-à-dire une loi normale (ou loi de Gauss). Ainsi :

$$y_i \sim \mathcal{N}(v(x_i), \sigma) \Leftrightarrow y_i = v(x_i) + \varepsilon_i$$

avec  $\varepsilon_i \sim \mathcal{N}(0, \sigma)$ . On appelle les  $\varepsilon_i$  les **résidus**, c'est-à-dire les écarts entre les valeurs observées et les valeurs théoriques moyennes prédites par la partie déterministe du modèle.

Il s'agit d'un **modèle statistique** dans lequel la fonction  $v(x_i)$  correspond à la partie déterministe et la loi normale à la partie stochastique. C'est un modèle qui compte trois paramètres,  $v_{max}$ ,  $K_M$  et  $\sigma$ , dont nous allons chercher à estimer les valeurs pour chacun des jeux de données ci-dessus. Ainsi, nous allons chercher à optimiser la valeur des paramètres pour que la courbe représentant la tendance moyenne passe "au mieux" entre les points ; nous allons faire ce que l'on appelle de la **régression**.

Le terme "régression" a été introduit par Francis Galton à la suite d'une étude sur la taille des descendants de personnes de grande taille, qui diminue de générations en générations vers une taille moyenne, c'est-à-dire que leur taille régresse (Galton, 1890).

### Le critère des moindres carrés

Lorsque l'on a affaire à un modèle statistique gaussien, l'optimisation des paramètres consiste à minimiser la Somme des Carrés des Écarts (*SCE*) entre les observations et la valeur moyenne prédite par le modèle, c'est-à-dire à minimiser la fonction suivante :

$$SCE(\Theta) = \sum_{i=1}^n (y_i - v(x_i))^2$$

avec  $\Theta = (v_{max}, K_M)$  le vecteur des paramètres à estimer dans le cas du modèle de Michaelis-Menten.

On parle d'**estimation selon le critère des moindres carrés**.

Pour être exhaustif, il y a un troisième paramètre à estimer,  $\sigma$ , lié à la distribution normale supposée des observations autour de  $v(x_i)$ . Celui-ci est estimé une fois le processus de minimisation terminé par :

$$\hat{\sigma} = \sqrt{\frac{SCE_{\min}}{n-2}}$$

Graphiquement, minimiser la *SCE* revient à minimiser la somme des distances représentées par les segments noirs sur la figure ci-dessous (Fig. 12).

## Jeu de données n°1

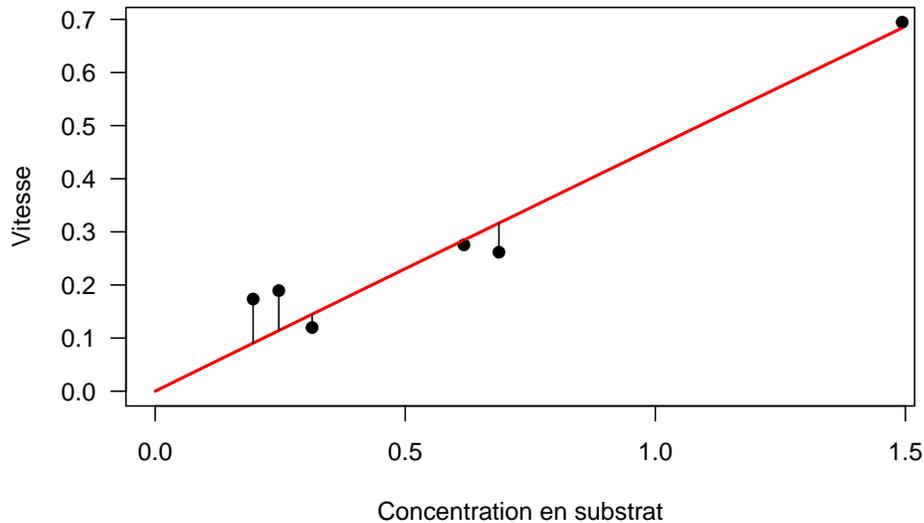


Fig. 12 : Régression du modèle de Michaelis-Menten sur le jeu de données numéro 1.

Dans le cas du modèle de Michaelis-Menten :

- la partie déterministe est non linéaire, c'est-à-dire que les dérivées partielles de  $v([S])$  par rapport aux deux paramètres  $v_{max}$  et  $K_M$  dépendent encore des paramètres ;
- la partie stochastique est gaussienne.

On parle donc de **régression non linéaire gaussienne** et c'est ce qui nous occupera pour cette troisième partie. Néanmoins, il existe d'autres formes de régression : la régression linéaire gaussienne, la régression linéaire non gaussienne (par exemple, la régression logistique), la régression non linéaire non gaussienne (par exemple, un modèle concentration-effet pour des données de survie binaires).

### Algorithmes de minimisation

La plupart du temps, en régression non linéaire gaussienne, la minimisation de la *SCE* n'admet pas de solution analytique, c'est-à-dire pas de solution exacte. Cette minimisation se fait donc par résolution numérique selon une méthode itérative qui impose :

- une évaluation initiale "à l'oeil" des paramètres ;
- des calculs itératifs pour converger vers le vecteur des paramètres qui minimise la *SCE*.

## TRANSFORMATIONS LINÉAIRES

Parmi les algorithmes de minimisation les plus connus, on trouve : l'algorithme de Gauss-Newton, l'algorithme de Golub-Pereyra ou encore l'algorithme de Levenberg-Marquardt. Ces algorithmes reposent tous sur des déplacements à petits pas dans la direction de plus grande pente de la fonction SCE, en linéarisant le modèle à chaque itération ; ils sont pour la plupart implémentés dans la fonction `nls` du logiciel R.

A l'époque de Michaelis-Menten, et pendant de nombreuses années ensuite, l'utilisation de ces algorithmes n'était pas permise, soit parce que les méthodes n'avaient pas encore été découvertes, soit parce qu'elles nécessitaient de gros moyens de calculs. Il a donc fallu ruser ; en particulier, plusieurs méthodes ont été proposées pour transformer les données de cinétique enzymatique de façon à produire une relation linéaire et ainsi faciliter l'estimation des paramètres (Atkins et Nimmo, 1975).

## Transformations linéaires

S'il existe près d'une dizaine de transformations linéaires, nous ne verrons que les trois transformations les plus couramment utilisées (Ritchie et Prvan, 1996) . La rédaction de ce paragraphe est très largement inspirée de la fiche `tdr47` élaborée par J.R. Lobry.

### La transformation de Lineweaver & Burk

La transformation linéaire de Lineweaver & Burk (1934) consiste à représenter  $y = 1/v$  en fonction de  $x = 1/[S]$  (Fig. 13) :

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{v_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{max}}$$

Il s'agit bien d'une équation de droite dont la pente est donnée par  $\frac{K_M}{v_{max}}$  et l'ordonnée à l'origine par  $1/v_{max}$ . A cela s'ajoute le paramètre  $\sigma$  de la loi normale.

## VITESSE D'UNE RÉACTION ENZYMATIQUE

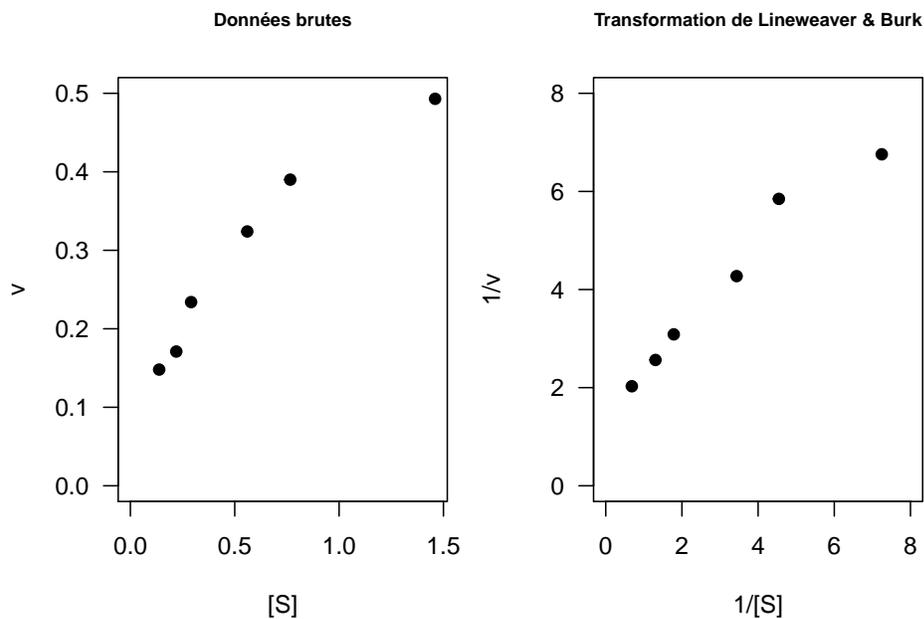


Fig. 13 : Comparaison des données brutes et transformées selon Lineweaver & Burk sur le jeu de données n°1.

### La transformation de Eadie et Hofstee

La transformation linéaire de Eadie et Hofstee (Eadie 1942, Hofstee 1952) consiste à représenter  $y = v$  en fonction de  $x = v/[S]$  (Fig. 14) :

$$v([S]) = -K_M \frac{v}{[S]} + v_{max}$$

Il s'agit bien d'une équation de droite dont la pente est donnée par  $-K_M$  ( $< 0$ ) et l'ordonnée à l'origine par  $v_{max}$ . A cela s'ajoute le paramètre  $\sigma$  de la loi normale.

## TRANSFORMATIONS LINÉAIRES

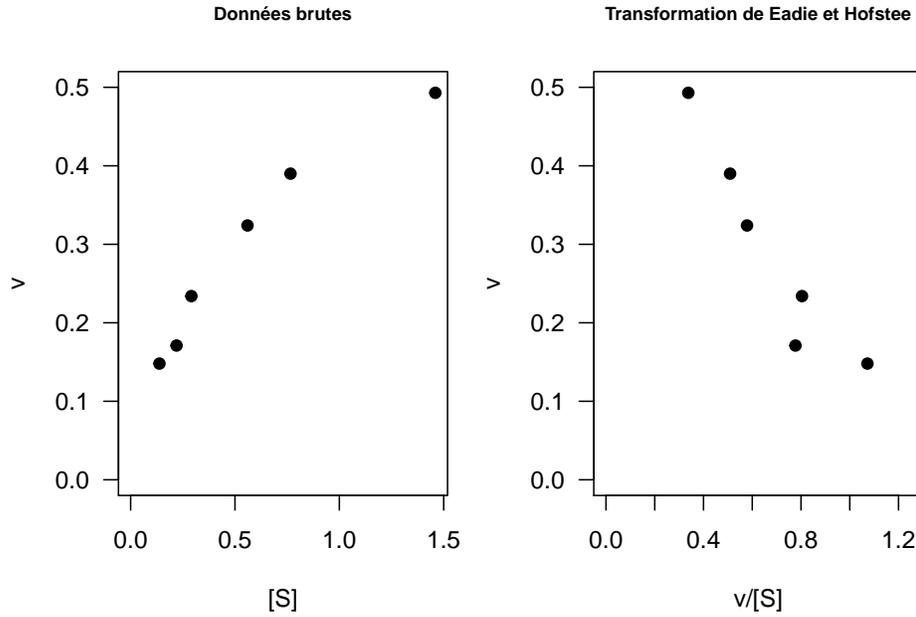


Fig. 14 : Comparaison des données brutes et transformées selon Eadie et Hofstee sur le jeu de données n°1.

### La transformation de Wilkinson

La transformation linéaire de Wilkinson (1961) consiste à représenter  $y = [S]/v$  en fonction de  $x = [S]$  (Fig. 15) :

$$\frac{[S]}{v} = \frac{1}{v_{max}} [S] + \frac{K_M}{v_{max}}$$

Il s'agit bien d'une équation de droite dont la pente est donnée par  $1/v_{max}$  et l'ordonnée à l'origine par  $K_M/v_{max}$ . A cela s'ajoute le paramètre  $\sigma$  de la loi normale.

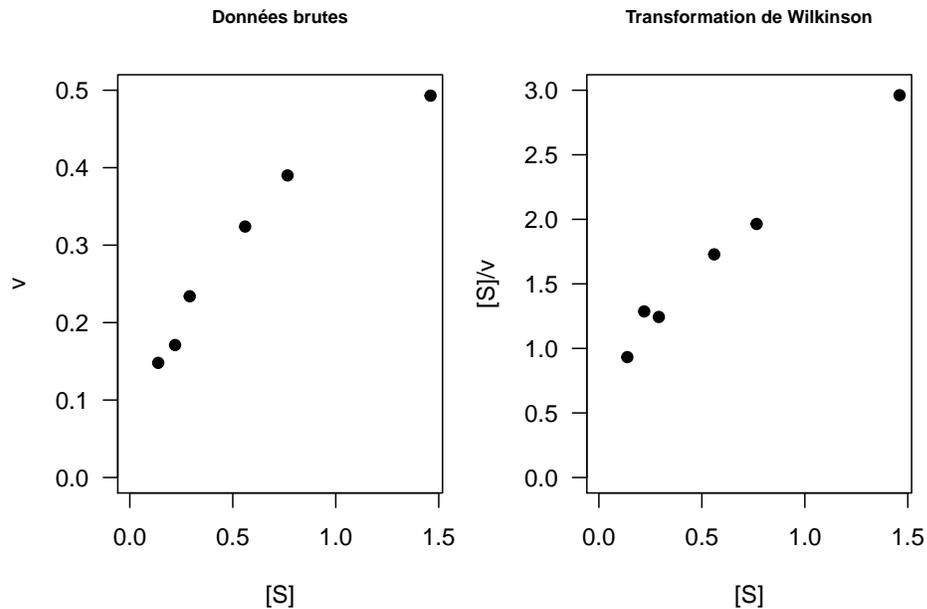


Fig. 15 : Comparaison des données brutes et transformées selon Wilkinson sur le jeu de données n°1.

## Retour à la régression gaussienne

Lorsque l'on fait de la régression, on cherche donc à estimer les paramètres d'un modèle à partir de données expérimentales ; on dit qu'on cherche à **ajuster** un modèle à des données. Nous allons maintenant voir comment procéder grâce au logiciel R (pour plus de détails, voir ici). Nous utiliserons le **jeu de données numéro 1** pour illustrer les différents points.

### Ajuster un modèle linéaire gaussien avec R

Nous travaillerons avec la transformation linéaire de Lineweaver & Burk dont la partie déterministe s'écrit :

$$y = \frac{K_M}{v_{max}}x + \frac{1}{v_{max}}$$

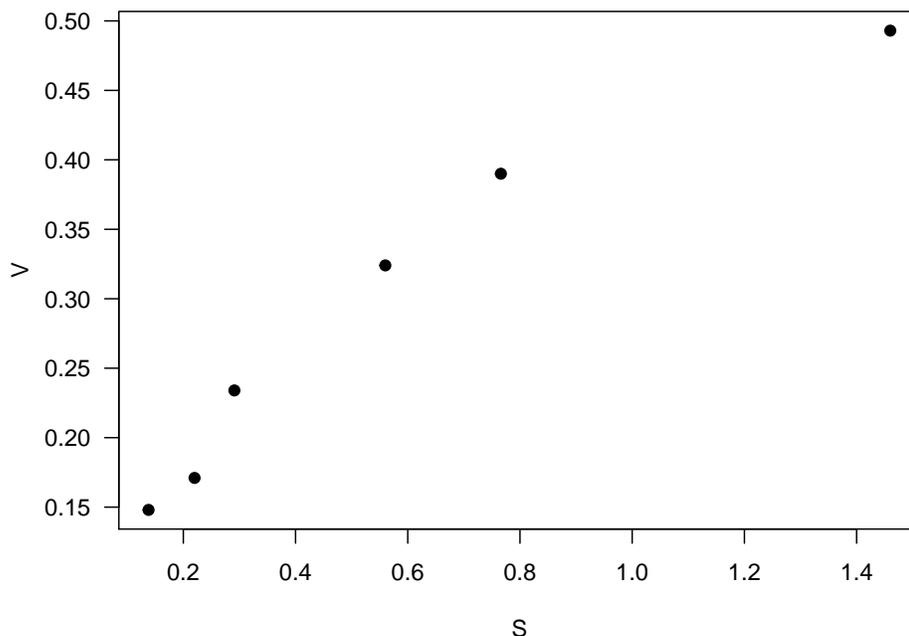
avec  $x = 1/[S]$  et  $y = 1/v$ .

**1. On commence par importer les données** sous la forme d'un tableau à deux colonnes : S pour la concentration substrat (notre variable explicative) et V pour la vitesse de la réaction enzymatique (notre variable à expliquer).

```
# Création du tableau de données
dataMM1 <- read.table("dataMM1.txt", header = TRUE)
# ATTENTION au chemin d'accès à votre propre fichier "dataMM1.txt"
```

## RETOUR À LA RÉGRESSION GAUSSIENNE

```
# Visualisez le jeu de données
par(mar = c(4, 4, 0.2, 0.2)) # réglage des marges
plot(dataMM1, las = 1, pch = 19)
```



```
n <- nrow(dataMM1) # Nombres d'observations dans le jeu de données
# Transformez les données selon Lineweaver & Burk
x <- 1/dataMM1$S
y <- 1/dataMM1$V
```

**2. On ajuste le modèle linéaire** de Lineweaver & Burk à l'aide de la fonction `lm` (pour "linear model").

```
m <- lm(y ~ x)
# On demande les résultats de l'ajustement
summary(m)
```

Call:

```
lm(formula = y ~ x)
```

Residuals:

```
      1      2      3      4      5      6
-0.40673  0.71770 -0.02187  0.03369 -0.12712 -0.19567
```

Coefficients:

```
              Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
(Intercept)  1.70846     0.30327   5.634  0.00489 **
```

```
x          0.75279    0.07815    9.632  0.00065 ***
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

```
Residual standard error: 0.4291 on 4 degrees of freedom
Multiple R-squared:  0.9587,    Adjusted R-squared:  0.9483
F-statistic: 92.78 on 1 and 4 DF,  p-value: 0.0006497
```

On obtient en sortie les valeurs des résidus (*Residuals*), c'est-à-dire les écarts entre observations et valeurs calculées par le modèle, les estimations moyennes (*Estimate*) des deux paramètres  $1/v_{max}$  (*Intercept*) et  $K_M/v_{max}(x)$ , avec leur écart-type (*Std. Error*). L'estimation moyenne de  $\sigma$  est donnée par la quantité *Residual standard error* (ici 0.4291).

```
# Explorer l'objet 'm' à l'aide de la fonction names()
names(m)

[1] "coefficients" "residuals"    "effects"      "rank"
[5] "fitted.values" "assign"       "qr"           "df.residual"
[9] "xlevels"      "call"        "terms"       "model"

# Vous constatez que vous avez accès à différents sous-objets.
# Par exemple les coefficients de la droite de régression
m$coefficients
```

```
(Intercept)          x
  1.7084585    0.7527938
```

### Précision et erreur relative

On peut se faire une idée de la précision avec laquelle un paramètre  $\alpha$  a été estimé en évaluant l'erreur relative comme suit :

$$ER(\alpha) = \frac{SE(\alpha)}{moy(\alpha)} t_{(0.975;n-p)}$$

avec  $moy(\alpha)$  la moyenne du paramètre  $\alpha$ ,  $SE(\alpha)$  l'écart-type (ou erreur standard, *standard error* en anglais) du paramètre  $\alpha$ ,  $p$  le nombre de paramètres dans la partie déterministe du modèle (ici  $p = 2$ ),  $n$  la taille du jeu de données (ici  $n = 6$ ) et  $t_{(0.975;n-p)}$  le quantile 97.5% de la loi de Student à  $n - p$  degrés de liberté ( $t_{(0.975;n-p)} \sim 2$ ).

La précision (exprimée en %) est jugée d'autant meilleure que  $ER$  est petite.

```
estim <- summary(m)$coefficients[, "Estimate"] # estimations moyennes
SE <- summary(m)$coefficients[, "Std. Error"] # écart-types
ER <- 100*qt(0.975, n-2)*SE/estim # erreurs relatives
ER # affichage (en %)
```

```
(Intercept)          x
```

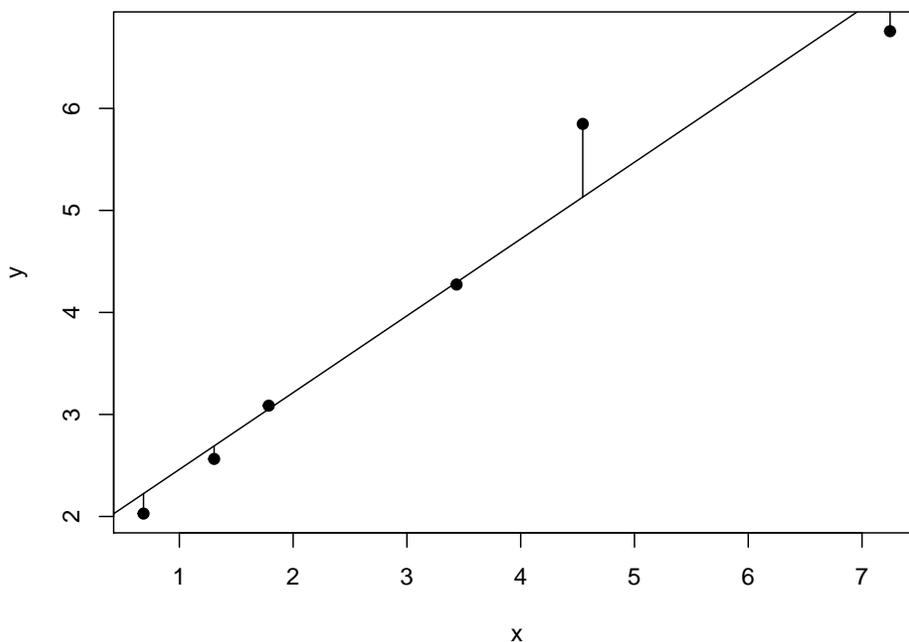
## RETOUR À LA RÉGRESSION GAUSSIENNE

49.28430    28.82484

- Qu'en pensez-vous ?

**3. On représente ensuite les données** sur lesquelles on peut superposer la droite ajustée, fonction abline, et éventuellement aussi les résidus que l'on récupère dans l'objet fitted(m).

```
par(mfrow=c(1,1)) # pour n'avoir qu'un seul graphe dans la fenêtre graphique
par(mar=c(4, 4, 0.2, 0.2)) # réglage des marges
plot(x, y, pch = 19)
abline(m) # superposition de la droite de régression
segments(x, y, x, fitted(m)) # ajout des distances entre observations et valeurs théoriques
```



- Améliorez l'esthétique du graphe si le coeur vous en dit.

On fait ensuite l'**analyse des résidus**.

En effet, notre modèle statistique complet s'écrit :

$$Y_{obs} = y_{theo} + \varepsilon$$

avec  $\varepsilon \sim \mathcal{N}(0, \sigma)$ . Autrement dit, les résidus doivent vérifier plusieurs hypothèses :

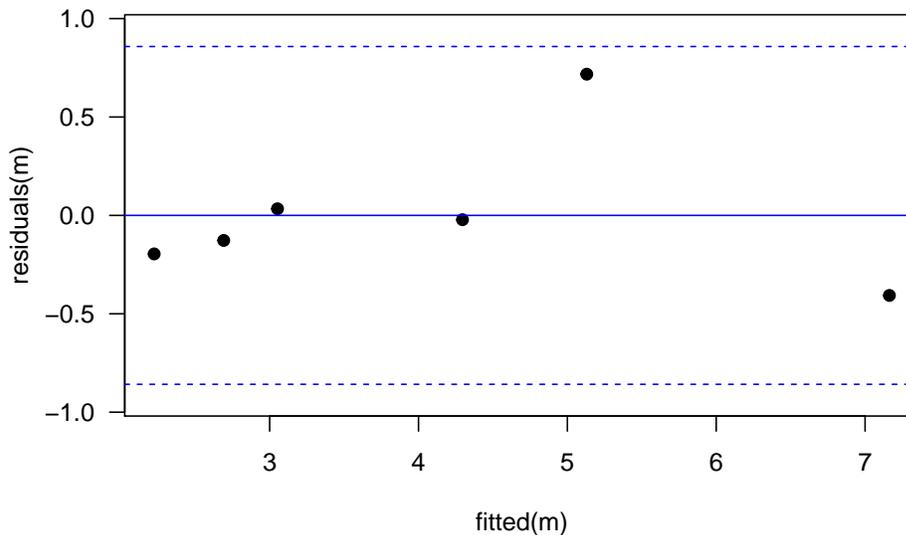
- ils doivent être indépendants les uns des autres : on parle d'**absence d'auto-corrélation** entre les résidus ;

- ils doivent suivre une **loi normale** ;
- la variance de la loi normale des résidus est constante et égale à  $\sigma^2$  : on parle d'**homoscédasticité**.

#### 4. On représente graphiquement les résidus

```
# Graphe des résidus en fonction des valeurs prédites
sigma <- summary(m)$sigma # écart-type résiduel
# fitted(m) fournit les valeurs théoriques
# residuals(m) fournit les résidus
plot(fitted(m), residuals(m), pch = 19,
     main="Résidus en fonction des valeurs prédites",
     las=1, ylim=c(-2.2*sigma,2.2*sigma))
abline(h=0, col="blue") # droite horizontale d'abscisse 0
# On trace ensuite les droites horizontales pour -2*sigma et +2*sigma
abline(h=c(-2*sigma,2*sigma), lty=2, col="blue") # pointillés
```

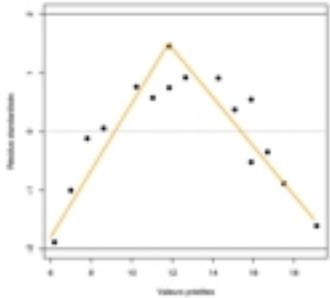
**Résidus en fonction des valeurs prédites**



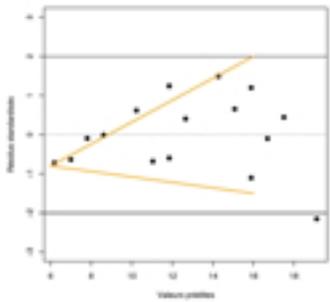
Sur ce type de graphe, on s'attend à une **répartition aléatoire des résidus** selon une loi normale de variance  $\sigma^2$  constante avec environ 95% des résidus dans l'intervalle  $[-2\sigma; 2\sigma]$ , c'est-à-dire entre les deux droites horizontales en pointillés bleus.

Que faut-il repérer sur le graphe des résidus ?

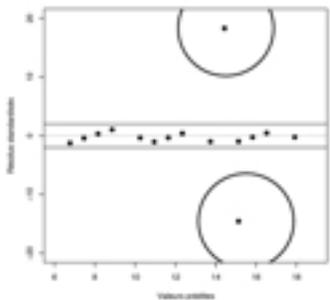
## RETOUR À LA RÉGRESSION GAUSSIENNE



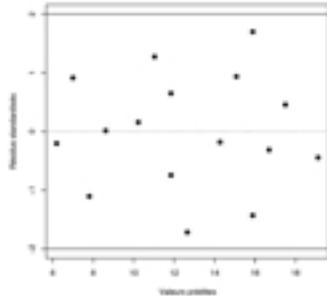
Les résidus ne sont pas distribués aléatoirement → on rejette le modèle



On voit un graphique en entonnoir (**hétéroscédasticité**) → on rejette le modèle



Il y a des résidus extrêmes (*outliers*) → on rejette le modèle



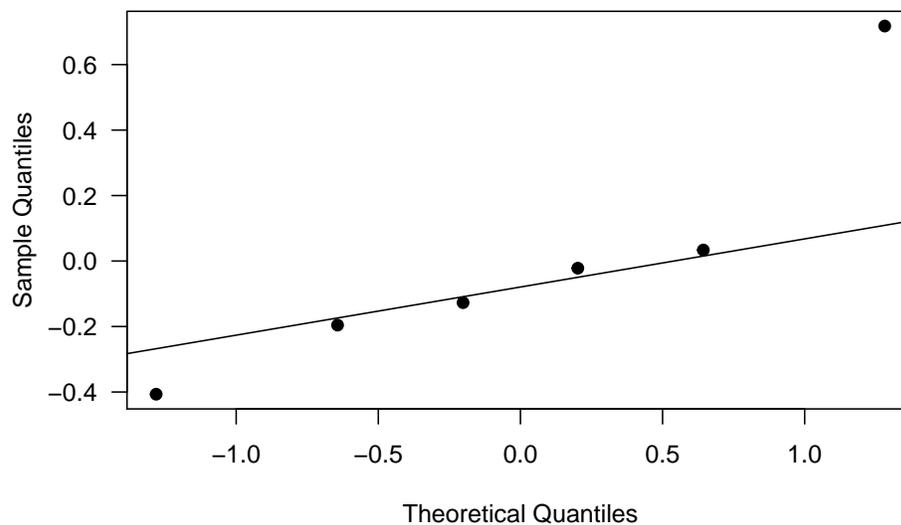
→ Rien ne permet de rejeter le modèle.

### 5. On vérifie la normalité des résidus

On peut représenter graphiquement leurs quantiles en fonction des quantiles d'une loi normale. On s'attend sur ce graphe à ce que les points s'alignent le long de **droite de Henry** (en trait plein ci-dessous).

```
# Graphe des quantiles de nos résidus (axes des x)
# en fonction des quantiles théoriques (axes des y)
# sous l'hypothèse de la loi normale N(0, sigma)
qqnorm(residuals(m), las = 1, pch = 19)
# Ajout de la droite de Henry
qqline(residuals(m))
```

**Normal Q-Q Plot**



Moyennes et variances

## RETOUR À LA RÉGRESSION GAUSSIENNE

Il faut veiller au fait qu'on travaille ici avec la transformation de Lineweaver & Burk dont les paramètres sont  $1/v_{max}$  et  $K_M/v_{max}$ . Ce sont donc ces deux paramètres que l'on estime et non pas directement les paramètres  $v_{max}$  et  $K_M$  du modèle de Michaelis-Menten.

De manière générale, on retiendra les résultats suivants :

- Relation entre les moyennes :

$$\text{moy}\left(\frac{1}{\alpha}\right) = \frac{1}{\text{moy}(\alpha)}$$

$$\text{moy}\left(\frac{\alpha}{\beta}\right) = \frac{\text{moy}(\alpha)}{\text{moy}(\beta)}$$

- Une approximation de l'erreur standard ( $SE$ ) sur l'inverse de  $\alpha$  est :

$$SE\left(\frac{1}{\alpha}\right) \sim \frac{SE(\alpha)}{\alpha^2}$$

- Si on néglige les termes de covariance, une approximation de l'erreur standard d'un rapport est :

$$SE\left(\frac{\alpha}{\beta}\right) \sim \frac{\alpha}{\beta} \sqrt{\left(\frac{SE(\alpha)}{\alpha}\right)^2 + \left(\frac{SE(\beta)}{\beta}\right)^2}$$

## 6. Retour aux paramètres de Michaelis-Menten

```
# Valeurs moyennes des paramètres
```

```
vmax <- 1/estim["(Intercept)"]
```

```
KM <- estim["x"]*vmax
```

```
data.frame(vmax, KM, row.names="Parameters")
```

```
           vmax      KM
Parameters 0.585323 0.4406275
```

```
# Erreurs standards
```

```
SE.vmax <- SE["(Intercept)"]/estim["(Intercept)"]^2
```

```
tmp <- sqrt((SE["(Intercept)"]/estim["(Intercept)"])^2+(SE["x"]/estim["x"])^2)
```

```
SE.KM <- (estim["x"]/estim["(Intercept)"])*tmp
```

```
data.frame(SE.vmax, SE.KM, row.names="Std.errors")
```

```
           SE.vmax      SE.KM
Std.errors 0.1038999 0.09061058
```

```
# Calcul de la précision = erreur relative
```

```
ER.vmax <- 100*qt(0.975, n-2)*SE.vmax/vmax
```

```
ER.KM <- 100*qt(0.975, n-2)*SE.KM/KM
```

```
data.frame(ER.vmax, ER.KM, row.names="ER(%)")
```

```
ER.vmax    ER.KM
ER(%) 49.2843 57.09478
```

- Qu'en pensez-vous ?

Vous voilà prêts maintenant à apprendre les instructions R pour faire de la régression non linéaire.

## Modèle non linéaire gaussien avec R

Nous allons donc maintenant revenir au modèle de Michaelis-Menten dans sa formulation initiale :

$$v([S]) = \frac{v_{max}[S]}{K_M + [S]}$$

Nous garderons le jeu de données n°1 pour illustrer les différentes instructions. Nous utiliserons la librairie `nlstools` du logiciel R qui met à disposition tout un panel d'outils de visualisation et d'analyse des résultats (Baty et al., 2015).

### 1. Prévisualisation du modèle

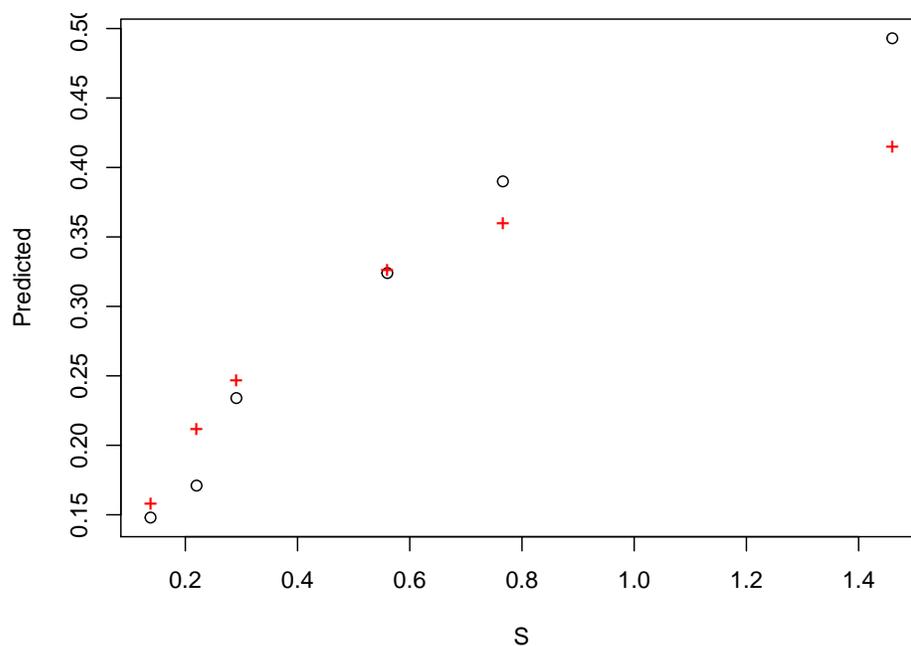
Comme évoqué plus haut (§ 4.2.3), les algorithmes de minimisation du critère des moindres carrés, nécessitent de donner aux paramètres des valeurs initiales. On peut faire cela "à l'oeil", ou bien se référer à la signification biologique et/ou géométrique des paramètres (Fig. 5). On peut donc s'aider des données elles-mêmes pour trouver des valeurs initiales des paramètres (Fig. 11). Ainsi, pour le jeu de données 1, on a  $v_{max} \approx 0.5$  et  $K_M \approx 0.3$ .

Vérifions avec R qu'on n'est pas loin des valeurs optimales.

```
library(nlstools)

# ATTENTION : choisir le chemin d'accès vers votre propre fichier
dataMM1 <- read.table("dataMM1.txt", header=TRUE)

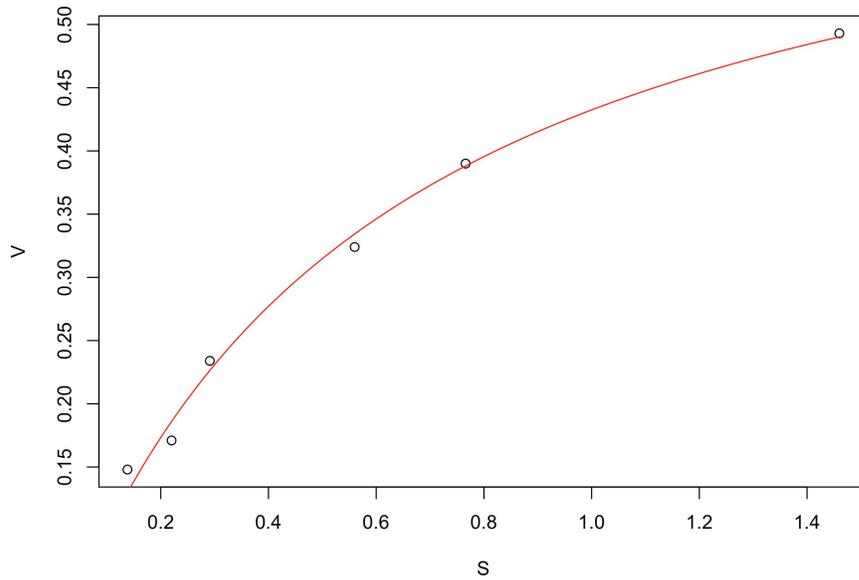
n <- nrow(dataMM1) # nombre d'observations
# Implémentation du modèle
# ATTENTION : le nom des variables doit correspondre exactement
# aux en-têtes de colonne du jeu de données. Ici S et V.
modeleMM <- as.formula("V ~ vmax * S/(KM + S)")
# valeurs initiales des paramètres
valinit <- list(vmax = 0.5, KM = 0.3)
par(mfrow = c(1, 1))
par(mar = c(4, 4, 0.2, 0.2))
preview(formula = modeleMM, data = dataMM1, start = valinit)
```



La valeur RSS: 0.00895 fournie par la fonction `preview()` après le graphe correspond à la valeur de la *SCE* pour les valeurs initiales choisies (`valinit`).

## 2. Ajustement par régression non linéaire

```
ajusMM <- nls(formula = modeleMM, data = dataMM1, start = valinit)
# Pour visualiser le graphe de l'ajustement :
plotfit(ajusMM, smooth = TRUE)
```



**3. Premiers résultats** On récupère tout un ensemble de résultats liés à l'ajustement :

- Les paramètres estimés : valeurs moyennes (*Estimate*) et écart-types (*Std. Error*) ; on obtient la même information avec l'instruction `coef(ajusMM)`.
- L'estimation de  $\sigma$  (*Residual standard error*) ;
- La valeur minimum de la *SCE* (*Residual sum of squares*) ;

Vérifiez numériquement la relation entre  $\sigma$  et *SCE*.

- Et d'autres résultats dont nous ne parlerons pas.

```
overview(ajusMM)
```

```
-----
```

```
Formula: V ~ vmax * S/(KM + S)
```

```
Parameters:
```

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t )	
vmax	0.69040	0.03682	18.75	4.77e-05	***
KM	0.59655	0.06826	8.74	0.000944	***

```
---
```

```
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

```
Residual standard error: 0.01356 on 4 degrees of freedom
```

## RETOUR À LA RÉGRESSION GAUSSIENNE

Number of iterations to convergence: 5  
Achieved convergence tolerance: 1.764e-06

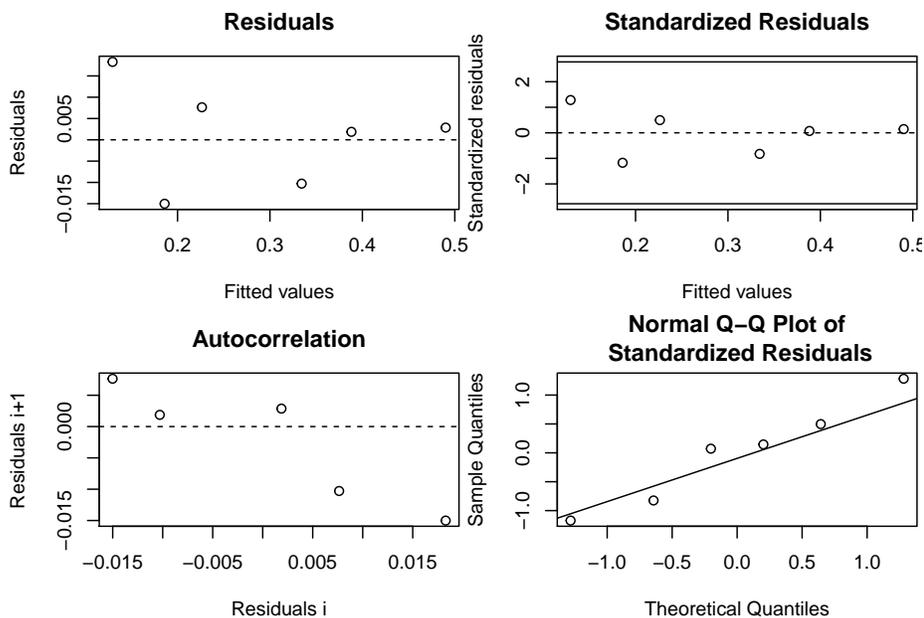
-----  
Residual sum of squares: 0.000736

-----  
t-based confidence interval:  
                  2.5%    97.5%  
vmax 0.5881579 0.7926407  
KM   0.4070356 0.7860596

-----  
Correlation matrix:  
                  vmax          KM  
vmax 1.0000000 0.9450641  
KM   0.9450641 1.0000000

### 4. Analyse des résidus - graphiques

```
residus <- nlsResiduals(ajusMM)  
par(mar = c(4, 4, 3, 0.2))  
plot(residus)
```



- Qu'en pensez-vous ?

Les résidus standardisés sont les résidus divisés par l'écart-type  $\sigma$ . On constate

ici une certaine auto-corrélation

## Comparaison des deux approches

Nous allons maintenant comparer les valeurs des paramètres estimés par linéarisation de Lineweaver & Burk et par régression non linéaire. Pour faire cette comparaison, nous pouvons par exemple nous appuyer sur l'erreur relative des estimations et sur des graphiques montrant simultanément les deux ajustements.

Nous aurons besoin des objets créés précédemment sous R, en particulier `m` et `ajusMM`.

Pour comparer les erreurs relatives, nous devons travailler directement sur les paramètres  $v_{max}$  et  $K_M$ .

```
# Pour la linéarisation
# On a déjà calculé ER.vmax et ER.KM

# Pour la régression non linéaire
estim.nonlin <- summary(ajusMM)$coefficients[,"Estimate"]
SE.nonlin <- summary(ajusMM)$coefficients[,"Std. Error"]
ER.nonlin <- 100*qt(0.975, n-2)*SE.nonlin/estim.nonlin

# Présentation de la comparaison sous forme d'une matrice
comp <- matrix(c(ER.vmax, ER.KM, ER.nonlin), ncol=2, nrow=2)
colnames(comp) <- c("L&B", "MM")
rownames(comp) <- c("vmax", "KM")
print(comp)
```

```
          L&B      MM
vmax 49.28430 14.80903
KM   57.09478 31.76813
```

- Que pouvez-vous en conclure ?

Pour les graphiques, on peut choisir soit le plan  $([S], v)$  du modèle de Michaelis-Menten, soit le plan  $(1/[S], 1/v)$  de la linéarisation de Lineweaver & Burk (voir figure ci-dessous).

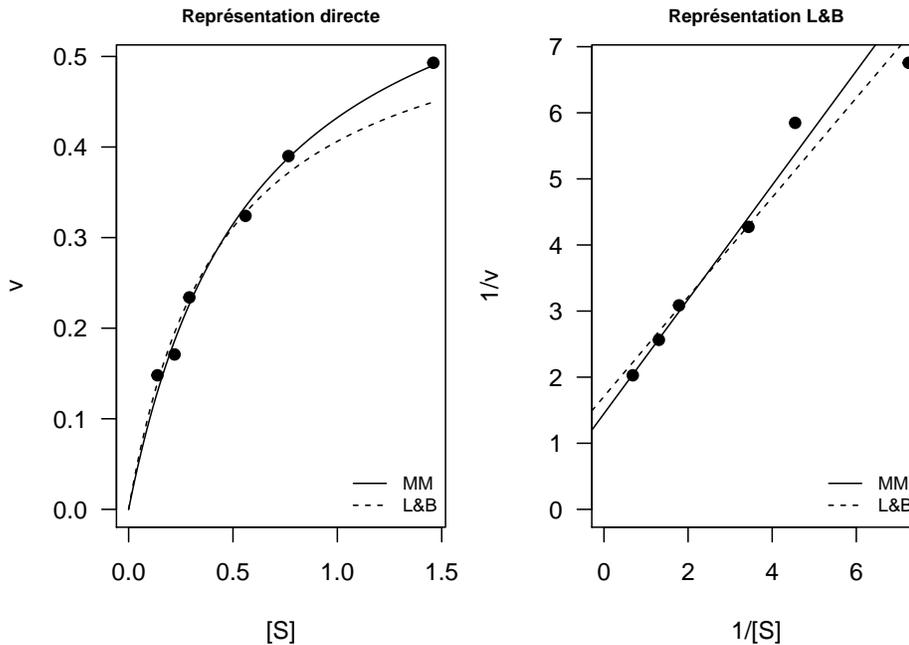
```
par(mfrow = c(1,2), mar = c(4,4,2,1))

# Dans le plan ([S], v)
plot(dataMM1$S, dataMM1$V, xlab="[S]", ylab="v", las=1, pch=19, main="Représentation d
curve(estim.nonlin["vmax"]*x/(estim.nonlin["KM"]+x), from=0, to=max(dataMM1$S), add=TRU
curve(vmax*x/(KM+x), from=0, to=max(dataMM1$S), add=TRUE, lty=2)
legend("bottomright", legend=c("MM", "L&B"), lty=c(1,2), bty="n", cex=0.75)

# Dans le plan (1/[S], 1/v)
plot(1/dataMM1$S, 1/dataMM1$V, xlab="1/[S]", ylab="1/v", las=1, pch=19, main="Représent
```

A VOUS DE JOUER !

```
abline(a=1/coef(ajusMM)["vmax"], b=coef(ajusMM)["KM"]/coef(ajusMM)["vmax"])
abline(m, lty=2)
legend("bottomright", legend=c("MM", "L&B"), lty=c(1,2), bty="n", cex=0.75)
```



- Que pouvez-vous en conclure ?

On voit sur ces deux graphes que la transformation de L&B donne un plus mauvais ajustement que la régression directe avec le modèle de MM, en particulier pour les fortes valeurs de concentrations en substrat.

## A vous de jouer !

Télécharger les jeux de données 2 et 3.

Pour chaque jeu de données, vous ajusterez les trois transformations linéaires ainsi que la version non linéaire du modèle de Michaelis-Menten.

Pour chaque ajustement :

- vous représenterez graphiquement le modèle superposé aux données ;
- vous donnerez l'estimation moyenne des paramètres avec l'intervalle de confiance à 95 % ;
- vous jugerez de la corrélation entre les paramètres ;
- vous examinerez les résidus ;

- vous vérifierez l’hypothèse de normalité des résidus.

Sur la base de vos résultats, vous discuterez du bien fondé des transformations linéaires.

Vous veillerez également à toujours comparer les résultats de l’ajustement avec le modèle de Michaelis-Menten, aux résultats des ajustements avec les différentes transformations linéaires.

Eléments de corrections pour le modèle de Michaelis-Menten.

- Atkins G.L. et Nimmo I.A. 1975. A comparison of seven methods for fitting the Michaelis-Menten equation. *Biochemical Journal*, 149:775-777.
- Baranyi J. et Terry R.A. 1995. Mathematics of predictive food microbiology. *International Journal of Food Microbiology*, 26(2):199-218.
- Baty F., Ritz C., Charles S., Brutsche M., Flandrois J.-P., Delignette-Muller M.L. 2015. The R package nlstools : a toolbox for nonlinear regression. *Journal of Statistical Software*, 66:1–21.
- Bernard O. 2004. *La modélisation des systèmes biologiques : Aller-retours le long des fleuves qui circulent entre l’océan du réel et le lac des modèles*. Habilitation à diriger des recherches, Université de Nice-Sophia-Antipolis. 105p.
- Buchanan R.E. 1918. Life phases in a bacterial culture. *The Journal of Infectious Diseases*, 23:109–123.
- Eadie G.S. 1942. The inhibition of cholinesterase by physostigmine and prostigmine. *Journal of Biological Chemistry*, 146:85-93.
- Edelstein-Keshet L. 2005. *Mathematical Models in Biology*. Classics in Applied Mathematics, SIAM, Philadelphia, 586p.
- Galton F. 1890. Kinship and Correlation. *The North American Review*, 150:419–431.
- Hofstee B.H.J. 1952. On the evaluation of the constants  $V_m$  and  $K_M$  in enzyme reactions. *Science*, 116:329-331.
- Lineweaver H. et Burk D. 1934. The determination of enzyme dissociation constants. *Journal of the American Chemical Society*, 56:658-666.
- Lobry J.R. 1991. *Ré-évaluation du modèle de croissance de Monod. Effet des antibiotiques sur l’énergie de maintenance*. Thèse de doctorat “Ecologie, Environnement”. Université Claude Bernard - Lyon I, 178p..
- Malthus T. 1798. *The Principle of Population*. London. ©1998, Electronic Scholarly Publishing Project.
- Michaelis L. et Menten M.L. 1913. Die Kinetik der Invertinwirkung. *Biochemische Zeitschrift*, 49:333–369.

## A VOUS DE JOUER !

- Monod J. 1935. Le taux de croissance en fonction de la concentration de l'aliment dans une population de *Glaucoma piriformis* en culture pure. *Comptes-Rendus l'Académie des Sciences*, 201:1513–1515.
- Monod J. 1942. *Recherches sur la croissance des cultures bactériennes*, Herman éd., Paris.
- Monod J. 1949. The Growth of Bacterial Cultures. *Annual Reviews of Microbiology*, 3:371–394.
- Monod J, Tessier G. 1936. La concentration de l'aliment, facteur quantitatif de l'accroissement des populations d'Infusoires. *Comptes-Rendus l'Académie des Sciences*, 202:162–164.
- Novick A., Szilard L. 1950. Description of the Chemostat. *Science*, 112:715–716.
- Pavé A. 2012. *Modélisation des systèmes vivants*. Lavoisier, Paris. 633p.
- Pletcher SD. 1999. Model fitting and hypothesis testing for age-specific mortality data. *Journal of Evolutionary Biology*, 12:430–439.
- Ritchie RJ, Prvan T. 1996. Current statistical methods for estimating the Km and Vmax of Michaelis-Menten kinetics. *Biochemical Education*, 24:196–206.
- Verhulst P. 1845. Recherches mathématiques sur la loi d'accroissement de la population. *Nouveaux mémoires de l'Académie Royale des Sciences et Belles-Lettres de Bruxelles*. T. XVIII, 25p.
- Wilkinson G.N. 1961. Statistical estimations in enzyme kinetics. *Biochemical Journal*, 80:324–332.
- Zwietering M.H., Jongenburger I., Rombouts F.M., Van't Riet K. 1990. Modeling of the bacterial growth curve. *Applied Environmental Microbiology*, 56:1875–1881.