

THESE

En vue de l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE TOULOUSE

Délivré par l'INSA de Toulouse

Spécialité : Génie des Procédés de l'Environnement

Présentée et soutenue par

Maëlle DOUAIRE

Le 9 Décembre 2010

**ETUDE EXPERIMENTALE ET NUMERIQUE DE LA REPONSE DE
LACTOCOCCUS LACTIS NCDO2118 AUX CONDITIONS
HYDRODYNAMIQUES LOCALES EN REACTEUR COUETTE**

JURY

Jack LEGRAND	Professeur, GEPEA, Nantes	Rapporteur
Benoît HAUT	Professeur, Université libre de Bruxelles, Brussels	Rapporteur
Nic LINDLEY	Directeur de recherche, CNRS, INSA, Toulouse	Examineur
Pascal LOUBIERE	Directeur de recherche, INRA, Toulouse	Co-directeur
Jérôme MORCHAIN	Maître de Conférences, INSA, Toulouse	Co-directeur

Ecole doctorale : Mécanique, Energétique, Génie Civil, Procédés

Unité de recherche : Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés

RESUME

Cette thèse présente les résultats de travaux visant à étudier les interactions entre les conditions hydrodynamiques et le comportement bactérien en bioréacteur. En s'intéressant plus particulièrement aux phénomènes agissant aux petites échelles, nous avons cherché à identifier, caractériser et quantifier les couplages hydro-bio à l'échelle de la cellule. Ici, la souche *Lactococcus lactis* a été choisie comme modèle microbiologique, alors qu'un réacteur de type Couette a été préféré afin d'engendrer des contraintes hydrodynamiques connues et définies. Il a été démontré que dans des conditions spécifiques d'écoulement (Modulated Wavy Vortex Flow), les bactéries lactiques s'agrègent au sein d'une matrice riche en polysaccharides. Le lien entre ce phénotype atypique et les contraintes locales liées à l'écoulement a été étudié à l'aide de simulation numérique directe de l'écoulement combiné à un suivi de particule. Cette approche permet d'établir les profils temporels des contraintes subies et de comparer la nature des forces disruptives subies au mécanisme d'agrégation séparation des cellules bactériennes au sein de leur matrice. Ce travail de recherche donne ainsi d'autres exemples d'interactions cellule – environnement en bioreacteurs, mettant en exergue des effets mécaniques.

Mots clés : Réacteur Couette, *Lactococcus lactis*, hydrodynamique locale, dissipation d'énergie, interaction.

ABSTRACT

The aim of this work is to reach a better understanding of environmental effects on bacterial behaviour in bioreactors. Particular attention has been paid to hydrodynamically-induced stresses at the cell scale, with a view to characterizing and quantifying these local interactions. As a “model experiment”, *Lactococcus lactis* NCD02118 has been cultivated in a Couette

Bioreactor, a device generating a known and defined flow field. Under specific flow regime (Modulated Wavy Vortex Flow), the cells end up being entrapped in a polysaccharidic matrix. The phenotype of the cells has been demonstrated to be strongly affected by the flow conditions. The stress signal encountered by the cells has been characterized, through numerical simulation (Direct Numerical Simulation) and lagrangian particle tracking, and linked to the phenotypic expression. These studies provide further examples of bacterial response to local hydrodynamic conditions.

Key words: Couette bioreactor, *Lactococcus lactis*, local hydrodynamics, energy dissipation, interaction.

REMERCIEMENTS

J'ai réalisé ma thèse au sein du Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des procédés, dont je tiens à remercier le directeur Nic Lindley pour m'y avoir accueillie. Je voudrais également adresser un merci particulier à mes directeurs de thèse, Jérôme Morchain et Pascal Loubière, ainsi qu'à Alain Liné pour leurs conseils et encouragements, et aussi pour toutes les discussions animées que ce projet de recherche a entraîné.

Je tiens également à remercier les membres de mon jury, tout particulièrement Benoît Haut et Jack Legrand pour avoir accepté de rapporter ma thèse. Merci aussi à Eric Olmos, malheureusement victime de la neige (pas faute d'avoir essayé de se rendre à Toulouse) pour le jour J, sans qui je n'aurais pas eu connaissance de cette opportunité.

Une pensée chaleureuse à tous ceux qui ont permis la réalisation de ce travail dans la bonne humeur, tant chez les 'bio' qu'au 'hall'. Un merci spécial à Valérie et Myriam pour leur aide, leur disponibilité, leur rigueur et leurs conseils précieux.

Autre merci spécial à tous ceux qui m'ont aidé à démonter mon réacteur Couette quand il se faisait capricieux. J'ai plus les chronos en tête mais il me semble que Jan et Jillian avaient battu des records.

Je voudrai aussi remercier mes copines de gamelles, Marlène, Charlotte, Christelle, Nathalie, Fanny et plus généralement tous ceux qui ont contribué à la bonne ambiance de la cafèt'.

Une pensée affectueuse pour mes comparses du bureau, dans lequel il en est passé des thésards, post docs, stagiaires... mention spéciale à Ben « double B », Séb, Charlotte, Flo, Mallorie, JC, ... et aussi pour l'équipe de Auch où j'ai effectué la totalité de mes vacances, Babé, Géraldine, Cathy, Fred, Domi et les autres.

Une pensée spéciale à la « thésarde d'avant moi », Angélique, rencontrée en pleine rédaction de sa thèse et néanmoins disponible pour accompagner mes 1ers pas dans ce laboratoire et plus spécifiquement dans cette thématique de recherche.

Je ne voudrais pas oublier les copains et copines, ceux du labo, ceux des apéros d'après le labo, et ceux d'ailleurs (Ben, Emeu, Voisin Pierrot et ses 'tit punchs, Sam, et j'en oublie)

Un merci tout spécial à Jan et Marlène (et leur futon) sans lesquels je n'aurais pas vécu mes dernières soirées de thésarde de la même façon.

Autre merci spécial pour Françoise et son forfait illimité, qui nous a permis de partager nos hauts et nos bas de thésardes, les petites et grandes joies, ainsi qu'à Amélie pour l'approche non scientifique.

Je ne voudrais pas terminer sans remercier ma famille, qui a supporté sans broncher ma soutenance – c'est bon, maintenant, vous pouvez m'avouer qui s'est endormi ! En particulier Madé et ses conseils avisés pleins d'expérience, et surtout mes parents pour leur soutien et leurs encouragements.

Finally, I am especially thankful to Jon who managed to bear me in "writing up" mode, his lunch boxes (I never ate so many curries!), his nerdiness (Matlab...) and his constant and loving care.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	5
TABLE DES MATIERES	7
NOMENCLATURE	13
ABRÉVIATIONS	15
INTRODUCTION	17
BIBLIOGRAPHIE	21
1 LES INTERACTIONS HYDRO – BIO	22
1.1. <i>Introduction : les différents types de mécanismes et de réponse</i>	22
1.2. <i>Le couplage mélange - réaction</i>	24
1.2.1. Le mélange turbulent.....	24
1.2.2. Modélisation du micromélange	30
1.2.3. Outils de caractérisation du mélange.....	30
1.2.4. Caractérisation des effets de mélange et conséquences sur la réaction biologique.....	31
1.2.5. Conclusion partielle	38
1.3. <i>Effets des contraintes hydrodynamiques</i>	40
1.3.1. Quelles sont les contraintes hydrodynamiques en bioréacteurs.....	41
1.3.1.1. Expression des contraintes.....	41
1.3.1.2. Application aux bioréacteurs et lien avec la dissipation d'énergie	46
1.1.1.1. Notions de rhéomécanique et viscoélasticité	48
1.3.1.3. Propriétés des bioparticules et interactions avec l'écoulement	52
1.3.1.4. Phénomènes d'agrégation et d'adhésion.....	54
1.3.2. Effets des contraintes hydrodynamiques sur des cellules en bioréacteurs	56
1.3.2.1. Effets des contraintes liées à l'écoulement sur des cellules en suspension	56
1.3.2.2. Impact de la structure de l'écoulement et des contraintes sur les populations bactériennes	61
1.4. <i>Réponse biologique</i>	64
1.4.1. Du phénotype au génotype.....	65
1.4.2. Influence de la biologie sur son environnement	69
1.5. <i>Conclusion – transition : Quelles sont les contraintes imposées quant aux outils choisis pour l'étude des interactions hydro - bio</i>	69
2 ETUDE DES INTERACTIONS HYDRO – BIO A TRAVERS DES CULTURES DE <i>LACTOCOCCUS LACTIS</i> EN REACTEUR COUETTE	71
2.1. <i>Réacteur couette</i>	71
2.1.1. Présentation.....	71
2.1.2. Hydrodynamique dans un réacteur Couette.....	72
2.1.2.1. Ecoulement laminaire	73
2.1.2.2. Vortexde taylor : écoulement toubillonnaire.....	73

2.1.2.3.	Ecoulements tourbillonnaires ondulants (Wavy Vortex flows)	74
2.1.2.4.	Ecoulements tourbillonnaires turbulents et écoulement turbulent	74
2.1.3.	Effets de mélange dans un réacteur Couette.....	75
2.1.4.	Cultures bactériennes et cellulaires	77
2.1.5.	Agrégation et floculation.....	78
2.2.	<i>Lactococcus lactis</i> NCDO 2118.....	79
2.2.1.	Présentation et quelques généralités	79
2.2.2.	Catabolisme des sucres et shift métabolique de <i>L. lactis</i> NCDO 2118.....	80
2.2.2.1.	Devenir des sucres en amont du pyruvate.....	80
2.2.2.2.	Devenir du pyruvate	83
2.2.2.3.	Shift métabolique chez <i>L. lactis</i> NCDO 2118.....	85
2.2.3.	Les mécanismes de réponses au stress chez <i>L. lactis</i>	86
2.2.4.	EPS et PS chez <i>L. lactis</i>	88
2.2.4.1.	Quelques définitions	88
2.2.4.2.	Rôle des EPS et intérêt	89
2.2.4.3.	Structure et composition des exopolysaccharides.....	90
2.2.4.4.	Production d'EPS par les bactéries lactiques / voies de synthèse	91
2.2.5.	Propriétés d'adhésion.....	94
2.2.5.1.	Composition de la paroi et état de surface, propriétés fonctionnelles	94
2.2.5.2.	Facteurs favorisant l'adhésion chez <i>L. lactis</i>	96
2.2.5.3.	Adhésion, biofilm, et croissance immobilisée	97
	CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES D'ETUDE	98
ANALYSE DU COUPLAGE MELANGE – REACTION ET ETUDE DE CAS SUR DES CULTURES		
DE <i>L. LACTIS</i> NCDO 2118 EN REACTEUR COUETTE 101		
1	ANALYSE PRELIMINAIRE	102
1.1.	<i>Comparaison des échelles spatio-temporelles et identification des phénomènes limitants</i>	102
1.2.	<i>Echelles de mélange dans le réacteur Couette et effet de la dissipation</i>	105
2	RESULTATS EXPERIMENTAUX	107
2.1.	<i>Cultures réalisées en microaérophilie</i>	107
2.1.1.	Croissance	107
2.2.	<i>Métabolisme</i>	109
2.3.	<i>Cultures anaérobies</i>	113
2.3.1.	Croissance	113
2.3.2.	Métabolisme.....	115
3	DISCUSSION	118
3.1.	<i>Production de formiate et conditions de culture</i>	118
3.2.	<i>Effet du mélange au niveau de l'apport de glucose</i>	119
3.3.	<i>Effet du mélange au niveau de l'apport d'oxygène</i>	121
3.4.	<i>Conditions d'écoulement et croissance de <i>L. lactis</i> NCDO 2118</i>	122

4	MODELISATION DES EFFETS DE MICROMELANGE.....	123
4.1.	<i>Présentation du modèle utilisé et de l'expérience de Dunlop</i>	124
4.1.1.	Expérience : mise en œuvre et résultats expérimentaux	124
4.1.2.	Modèle de micromélange	126
4.2.	<i>Simulation du couplage mélange – réaction biologique</i>	128
4.3.	<i>Conclusion</i>	131
5	CONCLUSION.....	134
CULTURE DE LACTOCOCCUS LACTIS NCDO 2118 DANS UN REACTEUR COUETTE.....		151
1	APPARITION D'UN PHENOTYPE PARTICULIER ET NOUVEAU.	151
1.1.	<i>Introduction</i>	152
1.2.	<i>Matériel et méthodes</i>	156
1.3.	<i>Résultats</i>	163
1.4.	<i>Discussion</i>	171
1.5.	<i>Conclusion</i>	176
2	ANALYSES COMPLEMENTAIRES SUR LA MATRICE PRODUITE	182
2.1.	<i>Matériel et méthodes</i>	182
2.1.1.	Extraction aux ultrasons	182
2.1.2.	Dosages	183
2.2.	<i>Résultats</i>	184
2.2.1.	Dosages et caractérisation biochimique	184
2.2.2.	Microbial Adsorption To Solvents	186
2.3.	<i>Discussion et conclusion</i>	188
3	CONCLUSION GENERALE	192
DESCRIPTION DES CONTRAINTES LOCALES PAR SIMULATION NUMERIQUE DE L'ÉCOULEMENT		195
1	DESCRIPTION DE L'ÉCOULEMENT DANS LE REACTEUR COUETTE	196
1.1.	<i>Caractérisation du régime d'écoulement</i>	196
1.2.	<i>Puissance dissipée et contraintes</i>	198
1.3.	<i>Conséquences pour la mise en œuvre des simulations</i>	199
2	DESCRIPTION DE L'ÉCOULEMENT A L'AIDE DE LA MECANIQUE DES FLUIDES NUMERIQUE.....	200
2.1.	<i>Mise en œuvre de la simulation numérique directe (DNS)</i>	200
2.1.1.	Description de la DNS.....	201
2.1.2.	Convergence des écoulements résolus en DNS	203
2.2.	<i>Description de l'écoulement grâce aux résultats obtenus en DNS</i>	208
2.2.1.	Écoulement à 20 RPM.....	208
2.2.2.	Comparaison des profils de vitesse pour différentes vitesses de rotation	213
2.3.	<i>Confrontation avec les résultats expérimentaux</i>	215

2.4.	<i>Conclusion</i>	216
3	OBSERVATION DES CHAMPS INSTANTANES – APPROCHE PHENOMENOLOGIQUE	216
4	UTILISATION DE LA CFD POUR DECRIRE LES CONTRAINTES.....	220
4.1.	<i>Amplitude et distributions des contraintes – cartographie de l'écoulement</i>	221
4.1.1.	Représentativité des valeurs	221
4.1.2.	Dissipation	223
4.1.3.	Echelle de Kolmogorov.....	225
4.1.4.	Contrainte de cisaillement.....	228
4.2.	<i>Suivi Lagrangien de particule : nature et fluctuation des contraintes</i>	229
4.2.1.	Amplitude et fluctuation.....	230
4.2.2.	Nature des contraintes	233
5	APPLICATION AUX CULTURES DE <i>LACTOCOCCUS LACTIS</i> EN REACTEUR COUETTE	237
5.1.	<i>Effet des contraintes sur la taille des agrégats</i>	237
5.2.	<i>Contraintes, structure de l'écoulement et agrégation</i>	240
5.2.1.	Aspect quantitatif des contraintes.....	240
5.2.2.	Aspect qualitatif des contraintes.....	242
6	CONCLUSION.....	243
	CONCLUSION	245
	REFERENCES	251
	TABLE DES ILLUSTRATIONS	267
	LISTE DES FIGURES	267
	LISTE DES TABLEAUX	269
	LISTE DES GRAPHES	271
	ANNEXE 1 : CULTURE DE <i>LACTOCOCCUS LACTIS</i> NCDO 2118	277
1	SOUCHES.....	277
2	CULTURES.....	277
2.1.	<i>Milieux de cultures</i>	277
2.2.	<i>Techniques de culture</i>	279
2.2.1.	Conservation des souches.....	279
2.2.2.	Précultures.....	280
2.2.3.	Cultures batch en réacteur	280
2.2.3.1.	Réacteurs Couette	280
2.2.3.2.	Réacteur Parfaitement Mélangé.....	281
2.2.4.	Conditions de culture régulation du pH, température	281
2.2.5.	Echantillonnage et suivi de la croissance	282
	ANNEXE 2 : CHIMIE ANALYTIQUE	283
1	DOSAGES BIOCHIMIQUES.....	283

1.1.	<i>Dosage des polysaccharides par la méthode à l'anthrone</i>	283
1.2.	<i>Dosage des sucres et acides en HPLC</i>	283
1.3.	<i>Dosage des protéines</i>	284
1.4.	<i>Quantification des polysaccharides par précipitation à l'éthanol</i>	284
ANNEXE 3 : MESURES PHYSICOCHIMIQUES		287
1	QUANTIFICATION DE L'AFFINITE POUR LES SOLVANTS – MATS (MICROBIAL ADSORPTION TO SOLVENTS) 287	
2	MESURES GRANULOMETRIQUES	287
3	TRAITEMENTS D'EXTRACTION	288
3.1.	<i>Séparation des cellules et de la matrice filamenteuse</i>	288
3.1.1.	Traitement aux ultrasons	288
3.1.2.	Vérification de la lyse cellulaire par le dosage de l'activité LDH	288
ANNEXE 4 : FLUORESCENCE ET MICROSCOPIE		291
1	ECHANTILLONNAGE ET PREPARATION.....	291
2	FISH (FLUORESCENT IN SITU HYBRIDIZATION).....	291
3	MARQUAGE PAR DES LECTINES	292
4	MICROSCOPIE CONFOCALE ET EPIFLUORESCENTE, CFDA ET SYTO 61	293
4.1.	<i>Intérêt et principe de la microscopie confocale</i>	293
4.2.	<i>Epifluorescence</i>	293
4.3.	<i>Observation des échantillons hybridés et marqués par les lectines</i>	294
ANNEXE 5 : METHODOLOGIE D'IDENTIFICATION DES PARAMETRES DE MELANGE CRITIQUE		295

NOMENCLATURE

Lettres latines

d_p	diamètre de particule, cellule (m)
E	paramètre d'incorporation
E_c	module de Young (Pa)
G_c	module élastique de cisaillement ($N.m^{-2}$ ou Pa)
H	hauteur du réacteur Couette (m)
K_s	constante d'affinité pour le substrat ($mg.L^{-1}$)
K_{la}	coefficient de transfert d'oxygène (s^{-1})
M^*	moment angulaire normalisé (m)
N_p	nombre de puissance (-)
P	puissance (W)
q_s	vitesse spécifique de consommation du substrat ($g_s.g_x^{-1}.h^{-1}$)
q_{smax}	vitesse maximale spécifique de consommation du substrat ($g_s.g_x^{-1}.h^{-1}$)
r	coordonnée radiale (m)
r^*	coordonnée radiale normalisée (-)
Re	nombre de Reynolds (-)
Re_{crit}	nombre de Reynolds critique (-)
R_i	rayon du cylindre interne (m)

R_o	rayon externe (m)
$\langle S \rangle$	concentration moyenne en substrat dans le réacteur (mg.L^{-1})
Ta	nombre de Taylor (-)
t_e	constante élastique (s)
t_c	temps de circulation (s)
t_k	temps de mélange par incorporation (s)
t_R	temps de réaction (s)
t_s	temps de mésomélangement (s)
u_θ	composante tangentielle de la vitesse (m.s^{-1})
u_r	composante radiale de la vitesse (m.s^{-1})
u_z	composante axiale de la vitesse (m.s^{-1})
V	volume (L, m^3)
Y_{xs}	rendement de conversion du substrat en biomasse ($\text{g}_x.\text{g}_s^{-1}$)

Lettres grecques

ε	taux de dissipation de l'énergie cinétique turbulente (W.kg^{-1})
ρ	masse volumique (kg.m^{-3})
μ	viscosité (Pa.s), précisé dans le texte lorsque le symbole a cette signification
μ	vitesse spécifique de croissance (h^{-1})
μ_{\max}	vitesse spécifique maximale de croissance (h^{-1})

Ω	vitesse de rotation (rad.s ⁻¹)
ν	viscosité cinématique (
λ, λ_k	microéchelle de Kolmogorov (μm)
η	ratio des rayons des cylindres, dimension caractéristique (-)
Λ	échelle intégrale de la turbulence (μm)
τ, τ_c	contrainte visqueuse (Pa)
$\dot{\gamma}$	taux de cisaillement (s ⁻¹)

ABREVIATIONS

AFM	microscopie à force atomique
BCA	acide bicinchronique
BSA	sérum albumine bovine
CcpA	Catabolite control protein A
CSPs	Cold Shock Proteins
DO	densité optique
DPWVF	doubly periodic wavy vortex flow
EPS	exopolysaccharides
FISH	Fluorescent in situ hybridization
HSP	Heat Shock Proteins

LDH	lactate déshydrogénase
MATS	microbial adsorption to solvents
PFL	Pyruvate Formate Lyase
RPM	rotation par minute
SPWVF	singly periodic wavy vortex flow

INTRODUCTION

De l'échelle du laboratoire à l'échelle industrielle, l'hydrodynamique des bioréacteurs varie considérablement et l'extrapolation de leurs performances révèle bien des surprises si le comportement de la biomasse est considéré comme indépendant de ces conditions. Le *scale up* des bioprocédés a pour inconvénient principal d'engendrer des gradients de toutes sortes dans le bioréacteur : température, pH, concentration, contraintes, etc. En effet, l'environnement hydrodynamique de cellules cultivées en bioréacteur inclut de nombreux facteurs, allant des champs de concentration en différents composés (qu'il s'agisse de substrats ou de produits du métabolisme) aux contraintes mécaniques subies par les cellules. Les sources d'interaction, entre les cellules elles-mêmes et entre les cellules et leur environnement, sont donc multiples.

De la mise en évidence du couplage entre conditions hydrodynamiques et réaction biologique à la description de leurs effets délétères, les références aux interactions entre microorganismes et leur environnement sont nombreuses dans la littérature scientifique. Mais une meilleure compréhension de ces effets d'échelle passe par l'analyse du couplage entre procédé et réaction biologique, un problème complexe en raison de ses multiples dimensions. Qualitativement tout d'abord, deux domaines se rejoignent ici : d'une part, le vivant (microbiologie au sens large, physiologie microbienne) et d'autre part, le procédé et les aspects physico-chimiques associés. En outre, cette problématique revêt aussi une dimension multi-échelles, de taille (de l'échelle de la cellule, microscopique, à celle du réacteur, macroscopique) et de temps (de la milliseconde, caractéristique du mouvement turbulent, au temps d'exploitation du réacteur). Or ces interactions sont généralement envisagées dans la littérature à l'échelle d'une culture ou d'un bioréacteur, et les données concernant la compréhension des mécanismes d'interaction aux petites échelles manquent. Intégrer ces dimensions et obtenir une cartographie complète des interactions microorganismes - procédé relève du challenge.

L'objectif de ce travail doctoral consiste à apporter des éléments visant à dresser un tableau plus précis des interactions locales entre des microorganismes et leur

environnement. L'approche pluri-disciplinaire procédé / microbiologie / mécanique des fluides permet d'envisager ces interactions de la façon la plus globale possible.

La première partie de la revue bibliographique s'attache donc à décrire les différents types d'interactions et leurs effets observés sur les cultures bactériennes. Cette partie met en exergue la complexité de ces interactions et insiste sur la nécessité de s'appuyer sur une expérience modèle pour simplifier au maximum les hypothèses. En conséquence, un procédé et une souche bactérienne sont choisis comme outils d'étude. Ces outils, un réacteur Couette et la souche *Lactococcus lactis* NCDO 2118, seront décrits dans la seconde partie de la revue bibliographique. Le réacteur Couette est de longue date utilisé par les mécaniciens des fluides pour décrire et étudier les instabilités d'écoulement. De ce fait, l'hydrodynamique dans ce type de réacteur est très bien décrite. La souche *Lactococcus lactis* NCDO 2118, quant à elle, permet de travailler sans ajout gazeux et permet de visualiser un stress lié au flux de substrat reçu par un shift métabolique.

Ainsi dotés d'une expérience modèle permettant d'éclaircir la problématique du couplage entre conditions hydrodynamiques et réponse biologique, les chapitres suivants apportent des éléments de réponse aux questions suivantes :

- qu'en est-il du mélange à l'échelle cellulaire, ou micromélange ?
- à l'exception des conditions de mélange au sens strict, quel est l'impact de l'écoulement moyen en lui-même sur le comportement cellulaire ?

Le deuxième chapitre répond à la problématique de la compréhension des effets de micromélange par une double approche. En premier lieu, cette problématique est envisagée de façon plutôt théorique, via une analyse de l'interaction mélange-réaction par comparaison des temps de mélange et de réaction. L'étude du métabolisme de *Lactococcus lactis* NCDO 2118 cultivé dans un réacteur Couette sous deux conditions de mélange différentes est complétée par la modélisation de résultats expérimentaux issus de la littérature. Les premiers résultats de fermentation révèlent l'apparition d'un

phénotype unique et filamenteux dans certaines conditions d'écoulement : les cellules s'agrègent et forment une matrice.

Exemple de réponse de la biomasse aux contraintes environnementales, le chapitre suivant cherchera à définir ce qui, parmi les différentes contraintes imposées par le procédé, conduit à l'apparition de ce phénomène. Il est pour l'essentiel constitué d'une publication acceptée dans le journal *Biotechnology & Bioengineering*. Ce chapitre, après avoir décrit ce phénotype, se conclura sur quelques hypothèses concernant son origine.

Ces hypothèses seront discutées dans le dernier chapitre qui abordera le procédé du point de vue de la mécanique des fluides. L'écoulement au sein du réacteur Couette, est résolu par Simulation Numérique Directe à l'aide du code de calcul de mécanique des fluides numérique FLUENT. L'intensité et la distribution des stress mécaniques sont identifiées dans les différentes configurations d'écoulement. Cartographie et approche Lagrangienne sont alors combinées pour étudier la dimension temporelle des contraintes subies par les cellules. Ce chapitre permet donc d'établir un lien entre les distributions des contraintes et de la dissipation et l'apparition de ce phénotype. Une approche comparative est enfin développée dans le but d'établir une relation entre les tailles caractéristiques des agrégats et les différentes conditions d'agitation.

Pour terminer, et en guise de conclusion, les principaux résultats de ces travaux sont résumés et nous proposons quelques perspectives à cette étude.

BIBLIOGRAPHIE

L'étude des interactions entre conditions hydrodynamiques et cellule vivante a pour origine l'apparition de problèmes lors du changement d'échelle (*scale up*) de bioréacteurs. Rendements, productivité et viabilité de la biomasse en réacteur industriel sont bien souvent inférieurs aux prédictions issues d'essais préliminaires réalisés dans des réacteurs de laboratoire. La performance globale est le résultat intégré des perturbations, l'intégration ayant lieu à différents niveaux simultanément : à l'échelle de la population, du volume ou de la durée de la culture. L'augmentation du volume utile des réacteurs implique l'ajustement des paramètres de conduite de culture et des modifications au niveau du design des bioréacteurs et de leurs systèmes d'agitation. Bien qu'une certaine dose d'empirisme et de sens pratique soit indispensable à une bonne extrapolation des procédés, la compréhension des mécanismes d'interactions reste critique pour quiconque souhaite réaliser un *scale up* éclairé.

Au-delà des constatations réalisées sur des cultures à grande échelle, les interactions hydro-bio sont également mises en évidence lors de l'opération de réacteurs de laboratoire. Systèmes d'agitation, localisation de l'injection de substrat, aération des bioréacteurs ont une influence reconnue sur les performances biologiques, même à l'échelle des réacteurs de laboratoire. Pour preuve l'utilisation de différents designs en fonction du type cellulaire (bactéries, cellules animales, ...) cultivé. Cependant, l'étude de ces interactions est très souvent centrée sur la réponse biologique en elle-même et peu de travaux se concentrent sur les paramètres physiques mis en jeu, se contentant bien souvent de détailler les caractéristiques du bioréacteur (design, système d'agitation) ou d'approcher les contraintes subies à une échelle qualifiée de macroscopique. Ainsi par exemple, en ce qui concerne la problématique du mélange, de nombreuses références se rapportent aux gradients de concentrations dans les gros bioréacteurs, présentant une photographie lointaine de l'environnement cellulaire. Le mélange comme les contraintes mécaniques subies sont bien souvent reliés à la puissance totale dissipée dans le réacteur, ne rendant compte que très grossièrement

des conditions locales rencontrées par les cellules. Cependant, l'hydrodynamique d'un bioréacteur agité et aéré est complexe et bien souvent très hétérogène. Dans ces conditions, il devient donc évident que le recours à des paramètres globaux ne permet pas de caractériser précisément la nature, l'amplitude et la fréquence des contraintes exercées à l'échelle cellulaire. De plus, si les phénomènes physiques tels que mélange ou cisaillement sont des mécanismes distincts selon l'approche phénoménologique, ils dépendent de l'hydrodynamique et sont de ce fait difficiles à découpler.

La première partie de ce chapitre consacré à l'étude bibliographique est de recenser puis de détailler les mécanismes d'interactions hydro-bio en s'approchant le plus possible de l'échelle cellulaire. Chaque mécanisme physique sera caractérisé quantitativement et qualitativement avant d'être illustré à l'aide d'exemples tirés de la littérature. L'étude de la nature des réponses biologiques, sera ensuite abordée. Elle permettra de souligner le fait qu'il s'agit d'une interaction à part entière, la réponse cellulaire étant capable elle aussi en retour de modifier son environnement en adaptant son métabolisme par exemple (couplage direct inverse).

Cette première partie de la revue bibliographique permet donc de définir les bases requises concernant le procédé (aspects physiques) et la biomasse (aspect biologique) afin de formuler des recommandations en vue de la constitution d'une expérience modèle pour éclairer l'étude de ces interactions.

La deuxième et dernière partie du chapitre consistera donc en la description des outils choisis pour cette étude, à savoir un réacteur de type Couette et la souche bactérienne *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* NCD02118.

1 LES INTERACTIONS HYDRO – BIO

1.1. Introduction : les différents types de mécanismes et de réponse

La mise en culture de cellules animales ou bactériennes soulève de nombreux problèmes. A l'échelle industrielle comme à celle du laboratoire, se pose la question du mélange de substrat, du transfert d'oxygène et des dommages causés par les contraintes

mécaniques. Mélange, transfert, contrainte dépendent de l'hydrodynamique au sein du bioréacteur qui conditionne les distributions de valeurs du taux de dissipation de l'énergie cinétique. On recense ainsi de nombreux travaux traitant des effets induits par l'écoulement, souvent négatifs, sur des matériaux biologiques divers : cellules en suspension (cellules animales (Barbouche *et al.*; Haut *et al.* 2003), bactériennes (Arnaud *et al.* 1993; Sahoo *et al.* 2003), hématies, algues (Cussatlegras and Le Gal 2004) ou biopolymères (protéines, polysaccharides) (Ashton *et al.* 2009; Hackney *et al.* 1994). L'opération de bioréacteurs conduit à des interactions à différentes échelles et de différente nature entre l'hydrodynamique et la réponse biologique.

En effet, le mouvement du fluide est à l'origine de différents stress potentiels pour des cellules cultivées en bioréacteur :

- Stress chimique : les conditions hydrodynamiques, via les effets de mélange, déterminent la distribution spatiale des substrats et des produits dans un bioréacteur, tant au niveau du flux de matière en lui-même qu'au niveau des fluctuations possibles.
- Stress mécanique : il est issu des contraintes exercées par le fluide sur les particules en suspension. Si les biomatériaux sensibles aux conditions d'écoulement sont souvent qualifiés de sensibles au cisaillement, il convient cependant de ne pas imputer les effets mécaniques au seul cisaillement, mais aussi aux contraintes élongationnelles (Yim and Shamlou 2000).

Néanmoins, il est très difficile dans la plupart des cas d'imputer la réponse biologique à l'un ou l'autre de ces effets, ces deux stress étant couplés dans la plupart des bioréacteurs. En effet, il est très difficile de concevoir des réacteurs pilotes dans lesquels mélange et contraintes mécaniques sont clairement différenciés, puisque résultant du même phénomène. Tout au mieux, il est possible de minimiser l'impact de l'un pour étudier spécifiquement les effets de l'autre.

L'énergie dissipée lors de l'écoulement du fluide dans un bioréacteur constitue donc un facteur de mélange et de contrainte pour les cellules (cisaillement, élongation), dans des écoulements organisés ou non. Ces points seront développés dans la suite de ce premier chapitre de bibliographie. L'interaction mélange - réaction sera illustrée après avoir défini brièvement les mécanismes propres au mélange. Les concepts de base nécessaires à la compréhension de l'aspect mécanique seront ensuite définis. Après avoir mis en évidence les effets des contraintes d'origine mécanique sur des cellules, celles-ci seront analysées à l'échelle de la population de cellules.

Il est important de souligner ici que ces effets sont fortement dépendant du temps (fréquence et durée d'exposition au stress), ce qui fera l'objet d'une analyse plus fine dans le second chapitre.

La réponse biologique quant à elle peut être observée à différents niveaux, schématiquement, de la régulation génétique à sa manifestation phénotypique. Avec le séquençage d'un nombre croissant de souches bactériennes, on dispose désormais du chemin menant de l'information contenue dans le génome à l'expression de protéines et à la synthèse des métabolites. La réponse apportée par une cellule à une contrainte hydrodynamique peut en effet être observée au niveau des ARNm transcrits (induction ou répression de la transcription d'un gène), de leurs conséquences sur les enzymes synthétisées (protéomique) ou au niveau des modifications induites au niveau du métabolisme ou du phénotype. Ce sujet sera donc traité à la fin de ce chapitre à partir d'exemples tirés de la littérature afin de donner un éclairage sur les différents niveaux d'expression de la réponse biologique.

1.2. Le couplage mélange - réaction

1.2.1. Le mélange turbulent

Le phénomène de mélange est responsable de l'homogénéisation d'une solution via le transport de composés. Dans un écoulement turbulent, on observe deux types de fluctuations : des fluctuations de vitesse et des fluctuations de concentration, d'amplitude différente selon l'échelle considérée. La dissipation de l'énergie cinétique

turbulente permet l'atténuation des fluctuations de vitesse, alors que le mélange conduit lui à l'atténuation des fluctuations de concentration. La théorie de la turbulence permet d'associer des tailles caractéristiques à chaque niveau de fluctuation. En ce qui concerne les fluctuations d'énergie, on distingue alors la macro échelle de la turbulence, constituée de gros tourbillons transportant une grande quantité d'énergie, qui sera progressivement dissipée dans des structures tourbillonnaires de plus en plus petites, jusqu'à atteindre la micro échelle de Kolmogorov de taille caractéristique notée λ_k . Les mécanismes de mélange dans les écoulements turbulents sont généralement décomposés en trois étapes ayant lieu de manière simultanée (Baldyga and Bourne 2003). Les différents processus de mélange sont classés par leur niveau d'action (figure I.2 reprise de Delafosse (2008) d'après Baldyga and Bourne (2003) et Baldyga *et al.* (1997)). On distingue ainsi le macromélange, lié à l'écoulement moyen, le mésomélange et le micromélange, liés aux fluctuations de l'écoulement turbulent.

Le **macromélange** ou mélange par convection fait référence au mélange à l'échelle du réacteur. C'est le mécanisme responsable de la dispersion d'un paquet de fluide (substrat) dans le volume considéré, transporté par la vitesse moyenne. Il détermine la distribution des temps de séjour dans un réacteur opéré en continu et dépend de la géométrie du réacteur et des caractéristiques de l'agitateur. L'échelle de taille caractéristique du macromélange est la macro échelle de Taylor, ou échelle intégrale. Le temps caractéristique quant à lui, est le temps de circulation dans le bioréacteur.

Le **mésomélange** ou mélange inertiel convectif est dû aux structures tourbillonnaires, et contribue à réduire les fluctuations spatiales de concentration. D'un point de vue phénoménologique, il consiste en la désintégration des paquets de fluide introduits au point d'alimentation. Ces paquets de substrat convectés par le mouvement moyen sont étirés, déformés et cassés par les tourbillons, avec pour conséquence une réduction de la taille de ces éléments. Le phénomène dépend de la géométrie du système considéré et de la turbulence.

Le **micromélange** conduit à la formation d'une structure lamellaire, incorporant le milieu environnant (micromélange par incorporation, ou visqueux convectif). Le

micromélange par incorporation (engulfment) dépend de la dissipation de l'énergie cinétique turbulente et de la viscosité du fluide considéré. Puis l'homogénéisation des scalaires (disparition des gradients de concentration) à l'échelle moléculaire se produit sous l'effet de la diffusion moléculaire. La diffusion moléculaire a lieu entre les couches de la structure lamellaire issues du micromélange par incorporation. C'est le micromélange qui est responsable du mélange intime des constituants, et donc, dans le cas des bioréacteurs, de l'apport de substrat aux cellules. Le micromélange dissipe les fluctuations jusqu'à l'uniformisation des concentrations à toutes les échelles.

L'échelle de Batchelor représente l'échelle de longueur à partir de laquelle le transport d'un scalaire passif est principalement effectué par diffusion moléculaire (il n'y a plus de fluctuation d'énergie cinétique). L'échelle de Kolmogorov correspond à la taille des tourbillons en deçà de laquelle les contraintes turbulentes sont négligeables devant les contraintes de dissipation visqueuse.

La figure I.1 résume les échelles de tailles correspondant aux fluctuations d'énergie cinétique et de concentration lors de phénomène de mélange turbulent.

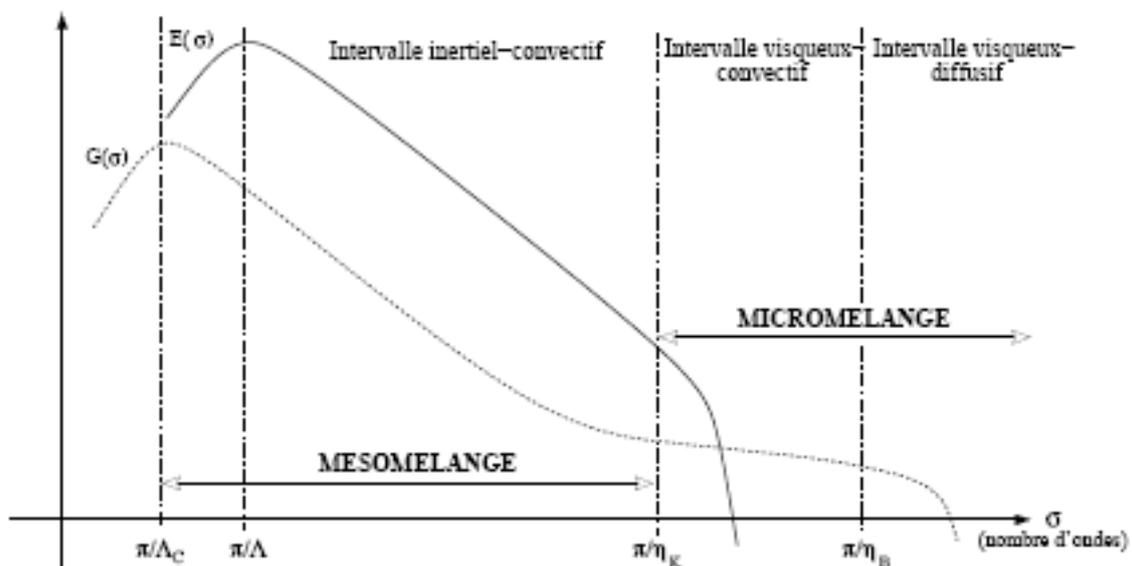


Figure I.1 : Spectres de l'énergie cinétique $E(\sigma)$ et des fluctuations de concentration $G(\sigma)$, d'après Delafosse (2008)

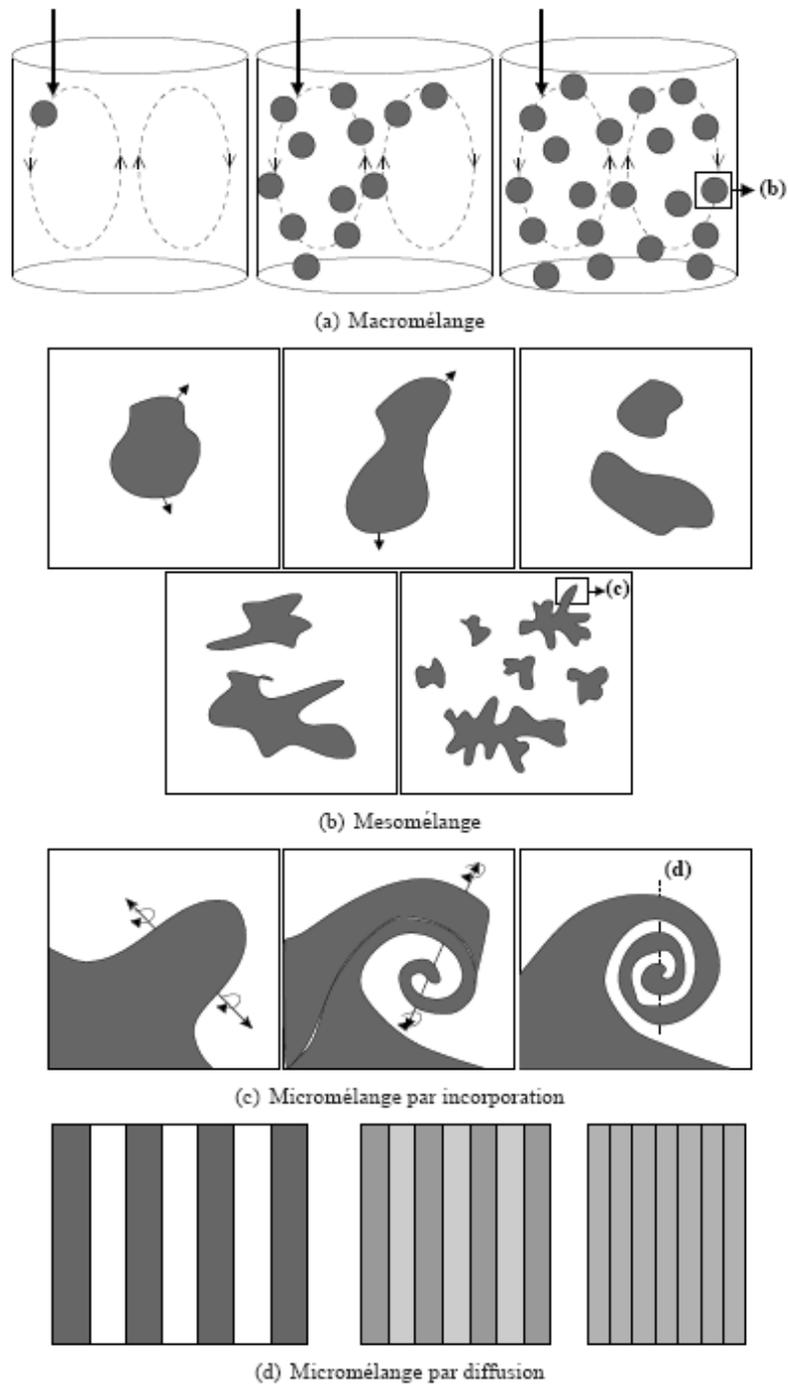


Figure I.2 : représentation schématique des mécanismes de mélange turbulent, d'après Baldyga et Bourne repris de Delafosse (2008)

Les échelles de taille et de temps pour les différents mécanismes de mélange sont résumées dans le tableau I.1. Ces formules s'appliquent pour des phénomènes de

turbulence homogène et isotrope. k représente l'énergie cinétique turbulente, ε la dissipation de l'énergie cinétique turbulente. Dans le cas d'une turbulence homogène, la dissipation de l'énergie est identique en tout point, on obtient donc $P/\rho V = \varepsilon$ et le temps caractéristique devient $t_c = k/\varepsilon$. L'échelle de taille caractéristique du mésomélange L_c est difficile à prédire. Elle dépend de la turbulence et des caractéristiques de l'alimentation (concentration, débit, localisation du point d'injection). Cependant, on l'assimile souvent à l'échelle intégrale de la turbulence Λ .

	Macromélange	Mésomélange Réduction de l'échelle intégrale	Micromélange par incorporation	Micromélange par diffusion
Echelle de temps	$t_c = \frac{V}{N_{Qc} \cdot N \cdot d^3}$	$t_s = 2 \left(\frac{L_c^2}{\varepsilon} \right)^{\frac{1}{3}}$	$t_k = \left(\frac{\nu}{\varepsilon} \right)^{\frac{1}{2}}$	$t_D = 2 \left(\frac{\nu}{\varepsilon} \right)^{\frac{1}{2}} \arcsin h \left(0.05 \frac{\nu}{D} \right)$
Echelle de taille		$\Lambda = \frac{1}{2} \frac{k^{\frac{3}{2}}}{\varepsilon}$	$\lambda_k = \left(\frac{\nu^3}{\varepsilon} \right)^{\frac{1}{4}}$	$\lambda_B = \left(\frac{D^2 \nu}{\varepsilon} \right)^{\frac{1}{4}}$

Table I.1 : échelles caractéristiques du mélange dans un écoulement turbulent homogène

Ces différentes échelles sont directement liées aux propriétés de la turbulence. En effet, l'écoulement turbulent est composé d'innombrables tourbillons, dont les échelles de taille sont distribuées entre une taille maximale initiale (échelle intégrale) et une taille minimale (échelle de Kolmogorov). Ils sont en interaction par la cascade de Kolmogorov. Cette cascade suppose que les tourbillons les plus gros alimentent les tailles inférieures en dissipant leur énergie cinétique (zone inertielle-convective), jusqu'à l'échelle de Kolmogorov au-delà de laquelle l'énergie cinétique est entièrement dissipée et convertie en chaleur par effets visqueux (zone visqueuse-convective).

La simultanéité de ces étapes, ainsi que leur interdépendance, rend délicate la mise en cause de tel ou tel mécanisme pour expliquer un défaut de mélange. On remarque de

plus que le taux de dissipation de l'énergie cinétique ε est un paramètre permettant de définir les échelles de taille et de temps du méso et du micro mélange.

Dans le cadre de l'étude des interactions mélange/réaction, on définit deux régimes :

- le régime chimique, dans lequel le temps de mélange est largement inférieur au temps de réaction : l'avancement de la réaction est donc contrôlé par la réaction elle même.
- le régime hydrodynamique, dans lequel le temps de mélange, très grand devant le temps de réaction, contrôle l'avancement de cette dernière.

Comme nous allons l'évoquer par la suite, les défauts de mélange, que ce soit à l'échelle macro ou micro sont souvent observés lors de l'opération de bioréacteurs, menant ainsi à des réactions opérées en régime hydrodynamique. Ces défauts de mélange peuvent avoir lieu à différentes échelles plus ou moins interdépendantes.

En effet, si un réacteur est mal macromélangé (apparition de gradient microscopique), il sera forcément mal micro et méso mélangé. Cependant, on peut trouver des réacteurs dans lesquels le défaut de mélange apparait à des échelles plus petites. Par exemple, un réacteur bien macromélangé (dans lequel aucun gradient macroscopique n'apparait) pourra être bien micromélangé (chaque micro élément de volume a la même concentration) ou mal micromélangé (à l'intérieur des éléments de volumes considérés, il y a une distribution de concentration).

Pour pouvoir incriminer l'un ou l'autre de ces phénomènes de mélange, on peut par exemple recourir à l'utilisation de plusieurs points d'injection (Baladyga *et al.* 1997; Baladyga and Pohorecki 1995). De ce fait, on diminue la taille des paquets de fluide incorporés, et on diminue le temps de mésomélange. Si une amélioration du procédé est constatée, un défaut de mésomélange est à incriminer : celui ci ne permet pas la création de structures suffisamment petites. Si, au contraire, aucune amélioration n'est observée, le micromélange est en cause : la réduction de la taille des paquets de fluide et l'amélioration de leur dispersion ne corrigent pas le fait que le micromélange reste le mécanisme limitant la rencontre des réactifs entre eux.

1.2.2. Modélisation du micromélange

Différents modèles de micromélange ont été développés, parmi lesquels :

- Le modèle IEM (*Interaction et Echange avec la Moyenne*), proposé par Villiermaux et Devillon (1972) et Villiermaux (1995) afin d'éviter l'utilisation de modèles stochastiques qui demandent des temps de calcul importants. Dans ce modèle, le changement de concentration d'une espèce i en un point p est dû à la fois à la réaction chimique et à un échange avec son environnement.
- Le modèle EDD pour *Engulfment* (incorporation), *Deformation*, *Diffusion*, plus complexe et complet que le précédent car il prend mieux en compte les phénomènes de l'érosion d'un élément de fluide marqué injecté dans une turbulence donnée ainsi que l'aspect vorticité de l'écoulement turbulent. Ce modèle a été développé par (Baladyga and Bourne 2003).
- Différents modèles statistiques, non détaillés ici (travaux de Fox entre autres), pour lesquels on considère non plus une concentration de scalaire mais une densité de probabilité (PDF) qui est transportée, ont été également développés.

1.2.3. Outils de caractérisation du mélange

Dans un bioréacteur, le mélange a donc pour fonction d'assurer une bonne répartition des microorganismes dans le milieu de culture, de dissiper les gradients de température et d'assurer une répartition homogène du/des substrat(s) dans tout le volume du réacteur (Bryant 1977), tout en permettant l'évacuation de métabolites potentiellement toxiques à terme pour la cellule. C'est sur un défaut concernant la répartition du substrat que nous allons focaliser ce paragraphe.

Nombreux sont les exemples que l'on peut tirer de la littérature mettant en évidence des défauts de mélange dans des bioréacteurs. Ces défauts de mélange, quantifiés via la

distribution des temps de séjour (DTS) pour les réacteurs continus ou la distribution des temps de circulation (réacteurs ouverts), peuvent être observés :

- directement, par la mesure de la concentration en différents points du réacteur (George *et al.* 1998),
- par une mesure chimique du mélange (réactions compétitive) (Bourne 2003; Fournier *et al.* 1996), ces mesures s'attachant généralement à évaluer l'intensité du micromélange,
- en utilisant des réactions colorées type indicateur coloré pour visualisation du pH, ou des particules non miscibles + images (Dusting and Balabani 2009), dispersion d'un colorant (Rudman *et al.* 2008),
- ou encore par une mesure de la DTS pour les réacteurs continus (alimentés) : dans des cas extrêmes, on peut ainsi observer des courts circuits.

Il existe aussi des moyens indirects, en constatant par exemple les conséquences d'un mélange défectueux sur les performances d'un bioréacteur (apparition d'un métabolisme « overflow » ou effet Crabtree ayant pour conséquence une diminution significative des rendements de conversion). C'est le cas par exemple des travaux de Bylund et ses collaborateurs sur la production de protéines recombinantes par *E. coli* (Bylund *et al.* 1998; Enfors *et al.* 2001) ou des études sur des cultures fed-batch de *Saccharomyces cerevisiae* (George *et al.* 1998; Larsson *et al.* 1996). Depuis les premiers travaux mettant en cause des effets de mélange, de nombreuses études traitent de ce sujet. L'objectif de la partie suivante n'est pas d'en faire une revue exhaustive mais de montrer comment ces effets peuvent avoir lieu à différentes échelles.

1.2.4. Caractérisation des effets de mélange et conséquences sur la réaction biologique

De l'échelle industrielle...

Leib et al. (2001) fournissent à travers une revue une description assez complète des différents challenges liés au mélange à l'échelle des bioréacteurs. Si, de manière

générale, le défaut de mélange n'est pas critique pour des fermentations à haute valeur ajoutée et faible volume réactionnel, l'impact économique peut se révéler très important pour des grosses productions à faible valeur ajoutée, comme pour la production de levure de boulangerie par exemple. En effet, les défauts de mélange vont en s'empirant avec le *scale up* des bioréacteurs : le temps de macromélange augmente (maintien de la puissance dissipée par unité de volume et diminution de la vitesse d'agitation) alors que celui de la réaction d'assimilation du substrat peut être considéré comme constant.

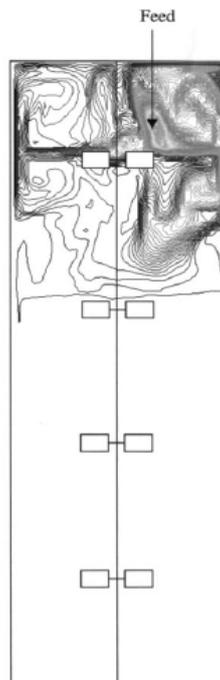


Figure I.3 : Champs de concentration en glucose obtenu par simulation LES (Large Eddy Simulation) dans un bioréacteur de 22 m³ alimenté en glucose à 500 g/L au taux de 180 L/h, d'après Enfors *et al.*, 2000.

Comme expliqué précédemment, le défaut de mélange à l'échelle macroscopique (échelle du bioréacteur) conduit à l'apparition de gradients de concentration dans le réacteur, les concentrations locales en substrat pouvant varier d'un facteur 1 (loin du point d'injection) à 100 (près de l'injection) (George *et al.* 1998), ou encore atteindre localement des valeurs 400 fois supérieures à la valeur moyenne (Bylund *et al.* 1998). Une illustration est donnée figure I.3.

Les cellules étant mises en circulation dans le bioréacteur, elles vont donc être confrontées, au gré de leur cheminement, à des concentrations en substrat pouvant varier considérablement, avec des conséquences potentiellement très négatives sur le rendement de la bioréaction. Agger et al. (2001) ont étudié la production d'amylase par un champignon filamenteux. Cette enzyme est produite lorsque la concentration en glucose n'excède pas 10 g/L, la quantité produite étant proportionnelle à la biomasse présente. Lors du *scale up* du procédé, ils rapportent néanmoins que la production d'enzyme lors de fermentations réalisées à forte concentration cellulaire dans un réacteur continu est presque nulle : la très grande viscosité du milieu de culture à ces concentrations cellulaires rend quasiment impossible le mélange rapide du substrat, de ce fait, les cellules circulent dans une alternance de zones à forte concentration, au voisinage de l'alimentation, et à faible concentration dans le reste du bioréacteur. Dans ce cas précis, le temps de résidence dans des zones à forte concentration est suffisant pour que la répression de l'enzyme puisse s'effectuer. Si les cellules circulent dans des zones où la concentration locale en substrat est largement supérieure à la concentration moyenne, elles peuvent également se retrouver dans des zones où ce dernier est largement limitant, avec les mêmes effets délétères. Citons par exemple la perte irréversible d'un plasmide, causée par une limitation en substrat dans le cas de la production d'antibiotiques.

L'impact négatif de ce type de gradients est aussi déploré lors de la culture de levures (Namdev *et al.* 1992), où le passage dans des zones très concentrées en substrat entraîne une répression catabolique du métabolisme et de ce fait, diminue le rendement de bioréaction (Dunlop and Ye 1990).

Outre une adaptation à un stress maintenu constant, les cellules peuvent aussi répondre à une contrainte fluctuante. C'est ce qu'ont montré Lin and Neubauer (2000) sur des cultures semi continues de *E. coli* recombinantes. L'alimentation est constante ou réalisée avec deux niveaux d'oscillation, faible (0,25/min) ou élevé (1/min). Dans le cas d'une alimentation constante ou à faible fréquence de fluctuation, la croissance de cellules sans plasmide est favorisée alors que des fluctuations plus rapprochées conduisent à privilégier la croissance de cellules possédant le plasmide. Ces expériences

témoignent de la sensibilité des cellules à des perturbations répétées ayant pour temps caractéristique la minute. Hewitt *et al.* (2000) ont obtenu des résultats similaires sur des cultures fed-batch de *E. coli* : des perturbations fluctuantes ont pour effet une production de biomasse plus faible mais de viabilité supérieure, indiquant que la cellule fournit une réponse adaptative à une perturbation fluctuante.

Le problème se complexifie avec l'ajout de gaz. En effet, il va apparaître un double problème de mélange : celui du substrat carboné et celui du gaz, le plus souvent de l'air, responsable de l'apport en oxygène, ces deux composés n'étant généralement pas injectés aux mêmes points. Ainsi, Bylund *et al.* (1998) ont observé une diminution du rendement en biomasse de 20 % à laquelle s'ajoute la production de co-produits issus du métabolisme « overflow » pour des cultures fed-batch d'*E. coli* dans un bioréacteur de taille industrielle (12 m³) par rapport à l'échelle laboratoire. En effet, lors de la circulation des cellules dans le bioréacteur, celles-ci vont être confrontées à des zones de composition chimique très différentes. Dans la plus grande partie du volume considéré, la concentration en sucre est moyenne et la quantité d'oxygène suffisante : le métabolisme pourra donc être oxydatif. Cependant, dans les zones proches de l'alimentation, où la concentration en sucre est bien plus élevée, la faible quantité d'oxygène disponible ne permet pas l'oxydation de tout le glucose assimilé, entraînant une dérivation de celui-ci vers les voies du métabolisme « overflow ». Outre le problème de mélange des substrats, la présence de bulles de gaz dans le réacteur va elle aussi modifier les paramètres intrinsèques du mélange (et rendre plus complexe la simulation de l'écoulement dans un tel réacteur).

La présence d'un gradient de concentration à l'échelle du réacteur peut également conduire à la division de la culture en deux sous-populations cellulaires d'état physiologique différent. Il en est de même pour des populations exposées à de régulières fluctuations de concentration, menant à un phénomène de ségrégation au sein de la population bactérienne (Delvigne *et al.* 2009). Ces travaux ont permis de conclure à une différenciation de la population bactérienne via le niveau d'expression de certains gènes. La question de la réponse bactérienne sera traitée de manière plus spécifique à la fin de ce chapitre consacré aux interactions hydro-bio, les points

concernant la physiologie cellulaire ne sont pas détaillés ici et nous nous contentons de rapporter des observations.

De nombreux modèles, couplant réaction biologique et mécanique des fluides numérique ont été établis. Ces modèles permettent de prédire le comportement d'une population bactérienne cultivée dans un réacteur compartimenté du fait des effets de macromélange. Cependant, si ces modèles sont encore assez éloignés de la réalité, de nombreux efforts ont été fournis ces 10 dernières années, en incluant des paramètres biologiques de plus en plus fins, ainsi que des modèles de réponse dynamique des systèmes microbiens (Schmalzriedt *et al.* 2003).

... à l'échelle laboratoire

En revanche, le mélange dans les réacteurs de laboratoire, de petit volume, n'est généralement pas considéré comme critique. En effet, l'énergie dissipée par unité de volume dans ces réacteurs est bien souvent largement supérieure à celle rencontrée dans les fermenteurs industriels, et les réacteurs de laboratoire sont souvent qualifiés de parfaitement mélangés (Bailey and Ollis 1986). De ce fait, peu de travaux ont été menés sur cette thématique. Cependant, on peut citer ici les travaux de Dunlop and Ye (1990) qui ont montré sur des cultures fed-batch de *Saccharomyces cerevisiae* un impact du point d'injection de substrat sur les performances globales des cultures. La qualité du mélange pour les différentes localisations du point d'injection a été évaluée selon une méthode chimique développée par Bourne *et al.* (1981). Ils ont notamment mis en évidence que l'ajout de substrat dans une zone à forte dissipation d'énergie (donc, où la micro-échelle de mélange est faible) permet une production plus importante de biomasse, via une meilleure distribution du substrat. Dans le même temps et de façon assez paradoxale, ils ont noté l'apparition de la répression par le substrat (effet Crabtree) à des taux de dilution plus faibles lorsque l'injection est réalisée dans des zones à forte dissipation, suggérant ainsi que l'apport de substrat aux cellules est plus rapide. Ces travaux soulèvent donc la question du mélange à l'échelle même des cellules (micro et méso mélange) et apportent une nouvelle dimension à la problématique du mélange dans les bioréacteurs.

Al-Homoud and Hondzo (2008) et Hondzo and Al-Homoud (2007) dans un tout autre domaine d'application (i.e. la description des écosystèmes marins, dans lesquels la dissipation d'énergie est très faible, ε environ $10^{-7} \text{ m}^2.\text{s}^{-3}$), se sont aussi penchés sur l'influence des paramètres du micromélange sur des cultures bactériennes. Comme expliqué précédemment dans la partie consacrée aux mécanismes de mélange, le taux de dissipation de l'énergie cinétique turbulente (ε) est un paramètre clé définissant la taille des plus petits tourbillons, conditionnant par conséquent l'épaisseur de la couche au delà de laquelle seule la diffusion moléculaire permet l'apport du substrat à la cellule. Afin d'étudier les effets du taux de dissipation de l'énergie cinétique turbulente sur les performances biologiques, ces auteurs ont réalisé des cultures de *E. coli* dans un réacteur avec une turbulence de grille, permettant une dissipation très homogène, dans des conditions batch afin d'éviter l'apparition d'un quelconque gradient macroscopique. Ils ont alors observé que la demande biologique en oxygène (soit l'oxygène requis pour le bon fonctionnement du métabolisme microbien) est fonction de ε (varie entre $0,6.10^{-6}$ et $46,3.10^{-6} \text{ m}^2.\text{s}^{-3}$). Autrement dit, plus la dissipation autour des cellules est importante, plus celles-ci vont consommer rapidement leur substrat carboné, entraînant alors une demande accrue en oxygène pour leur métabolisme oxydatif. Cette étude montre le lien étroit entre mélange à l'échelle cellulaire et assimilation du substrat, bien qu'il soit encore couramment considéré qu'une fois le macromélange réalisé, il n'y a plus aucun frein à l'assimilation du substrat par les cellules. Ainsi, même une très faible dissipation suffit à diminuer la diffusion de substrat vers les cellules. Le phénomène de mélange à l'échelle cellulaire pourrait s'avérer plus critique qu'il n'y paraît puisqu'en effet, (1999a; Ferenci 1999b) a montré qu'une cellule adaptée à une limitation en substrat était ponctuellement capable d'assimiler une sur-quantité de substrat pourvu que celui-ci lui soit apporté.

Enfin, Garcia et al. (2009) ont montré, grâce à une construction plasmidique (insertion d'un promoteur d'une enzyme sensible à une limitation sévère en O_2 dans un plasmide codant pour une protéine fluorescente, la GFP) capable de rapporter d'éventuelles limitations en oxygène, qu'il existait une limitation en O_2 même dans des réacteurs de laboratoire aérés « parfaitement mélangés ». Pour cela, la bactérie *E. coli* a été cultivée à

très forte concentration dans des réacteurs de laboratoire (V. Utile 4 L) agités avec une vitesse de rotation de 400 RPM avec des agitateurs munis de 1 ou 4 mobiles d'agitation. Les résultats montrent, qu'à profils de croissance et tension en oxygène dissous identiques, les cultures réalisées avec un seul agitateur sont bien plus fluorescentes que celles réalisées avec les 4, témoignant ainsi d'une limitation en oxygène induite par le micromélange à l'échelle de la cellule. Ces résultats corroborent ceux de Akiti (Akiti O. and Armenante P. M. 2004) qui, par une méthode chimique, ont montré que l'efficacité du micromélange peut varier de façon significative d'un réacteur de laboratoire à un autre. Bien que macroscopiquement bien mélangés, ces réacteurs peuvent néanmoins présenter des défauts de mélange aux échelles plus petites qu'il conviendra de prendre en compte.

Cas général

Ainsi, les cellules circulant dans des bioréacteurs peuvent être confrontées à plusieurs types de fluctuations :

- des fluctuations de forte amplitude et à « basse fréquence », avec une période proche du temps de circulation,
- des fluctuations de plus faible amplitude et de fréquence élevée, liée à la turbulence locale.

En fonction du mode d'opération du réacteur et de son volume, l'un ou l'autre type de fluctuation sera prédominant. Un réacteur alimenté de taille industrielle pourra en effet présenter des gradients macroscopiques de concentration, donc pour les cellules des fluctuations de concentration de forte amplitude, et aussi des gradients locaux. Par contre, dans des configurations batch ou pour des réacteurs parfaitement agités, seules les fluctuations à l'échelle de la cellule pourront avoir lieu.

Les effets de grosses amplitudes de fluctuation sont relativement bien compris désormais. En effet, de nombreux travaux dans des réacteurs de type *scale down*, développés afin d'imiter à l'échelle du laboratoire l'alternance entre des zones à forte concentration et des zones à concentration limitante, ont permis de relier pertes de

performances et comportement cellulaire à l'intensité de la perturbation en terme de fréquence et d'amplitude. Citons par exemple ici les travaux de Schweder *et al.* (1999) qui ont montré une réponse au niveau de la transcription des gènes liés au stress, à l'échelle de la seconde, chez *E. coli* cultivé dans des réacteurs industriels et *scale down*. Il faut noter ici que l'exposition à des fluctuations répétées peut, elle aussi, induire à terme des modifications physiologiques, comme par exemple la capacité des cellules à répondre plus ou moins rapidement à un stress (mécanismes d'adaptation cellulaire). En revanche, si au vu des études citées précédemment, il semble y avoir un effet du mélange à l'échelle de la cellule sur la réaction biologique, ces effets sont encore peu étudiés et leur importance mal définie.

1.2.5. Conclusion partielle

Le mélange turbulent est un phénomène relativement complexe faisant intervenir en parallèle des mécanismes opérants à des échelles de taille et de temps très variables. Cependant ces mécanismes sont de mieux en mieux compris par la communauté scientifique et les avancées technologiques permettent désormais son étude à des échelles de taille et de temps de plus en plus petites. De nombreuses techniques permettent d'évaluer la qualité du mélange et les études en génie des procédés – biotechnologie s'attachent désormais à mieux comprendre les interactions qu'il peut y avoir entre mélange et réaction biologique. La compréhension des mécanismes de réponse bactérienne à un défaut de mélange est/a été largement étudiée via des cultures dans des bioréacteurs de type *scale down*, visant à reproduire à l'échelle laboratoire les gradients subis dans les bioréacteurs de taille industrielle. Il est ainsi communément admis qu'un mauvais mélange entraîne une baisse de performance des bioréacteurs, via des modifications métaboliques des cellules cultivées, qu'il s'agisse d'un défaut de mélange à l'échelle du réacteur ou à l'échelle de la cellule, ce dernier cas étant cependant moins fréquent et ses effets peut-être sous estimés.

Dans de nombreux procédés (polymérisation, précipitation, compétition entre réactions chimiques...) impliquant conjointement des étapes de mélange et de réaction, l'importance du micromélange a été démontrée (Bourne 2003). La comparaison des

échelles de temps caractéristiques pour le mélange et la réaction permet généralement de définir le régime du procédé : régime chimique contrôlé par la réaction ou régime hydrodynamique contrôlé par le mélange. Si cette démarche a largement fait ses preuves dans le domaine des réactions chimiques, elle est néanmoins plus difficile à mettre en place pour des bioréactions. En effet, s'il est aisé de considérer un temps caractéristique de réaction dans le domaine du génie chimique, quel temps considérer pour une cellule microbienne ? La figure I.4 illustre à titre d'exemple les différents niveaux de réponse bactérienne et les temps caractéristiques associés.

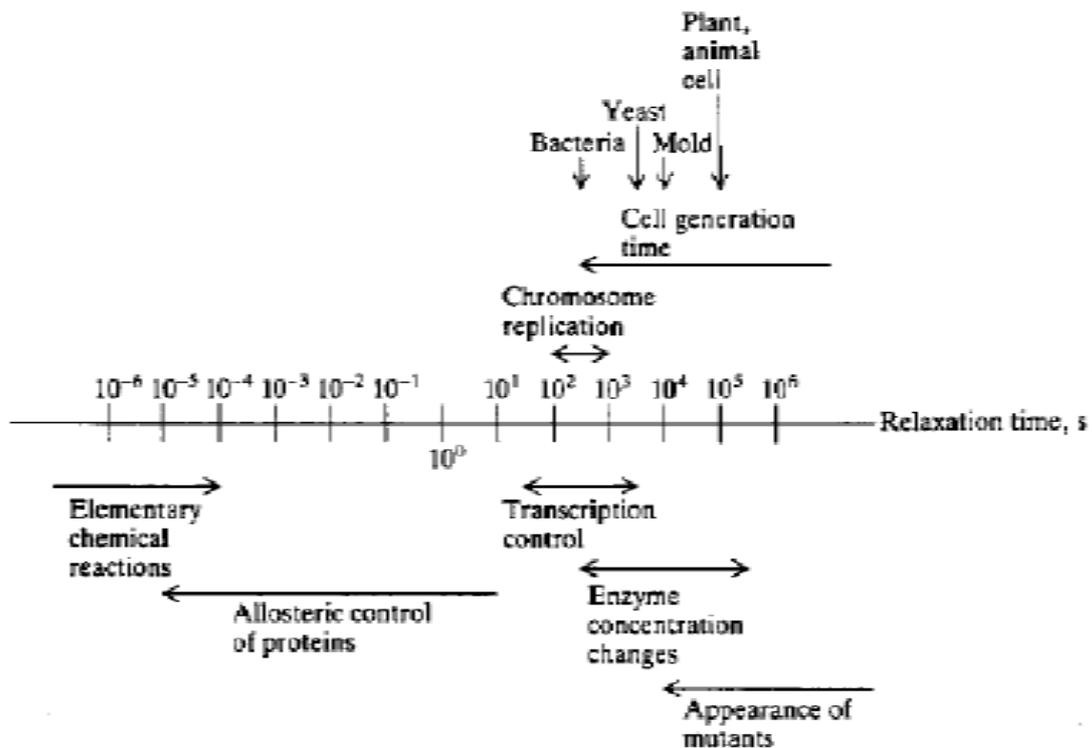


Figure I.4 - Ordre de grandeur des temps de relaxation des microorganismes (Bailey and Ollis 1986)

L'étude théorique de l'interaction mélange - réaction biologique requiert de s'intéresser aux temps caractéristiques de chaque phénomène :

- celui du mélange, accessible grâce aux nombreux travaux s'attachant à décrire le mélange,
- celui de la (bio)réaction, moins aisé à évaluer. Quelle réaction? La consommation du substrat? Son assimilation? Ou bien considérer la

croissance cellulaire dans son ensemble? Ou encore, comme pour le cas de l'amylase produite par *Aspergillus* cité plus haut, les temps d'induction (de la répression) et de relaxation? Si les temps de génération cellulaire et de consommation de substrat sont faciles d'accès par des dosages simples, il est bien plus compliqué d'évaluer proprement des temps d'induction de phénomène ou d'assimilation de substrat, malgré les avancées réalisées récemment dans le domaine de l'étude des voies métaboliques. Il existe bien sûr des mécanismes biologiques dont les temps caractéristiques sont bien plus petits que ceux de la consommation de substrat ou encore de la croissance. L'étude de Schweder *et al.* (1999) fait état par exemple de l'induction d'une réponse transcriptomique à un stress à l'échelle de la seconde.

Ceci pose donc la question du choix du niveau d'observation de la réponse biologique, traitée plus loin dans un paragraphe consacré à la réponse physiologique.

1.3. Effets des contraintes hydrodynamiques

Yim and Shamlou (2000) définissent ainsi les contraintes s'exerçant sur des particules en suspension dans un bioréacteur :

- Collision particule-particule et particule-support (i)
- Contraintes élongationnelles et de cisaillement induites par un écoulement, qu'il soit laminaire ou turbulent (ii)
- Interactions physiques et physico-chimiques aux interfaces gazeuses (iii)

La densité des particules biologiques étant généralement peu différente de celle du fluide environnant, on peut s'attendre à ce que les effets des collisions soient très négligeables dans le cas de cellules cultivées en bioréacteurs. De plus, la suite de notre étude ne mettant en jeu aucun transfert gazeux, le point (iii) ne sera pas développé ici. C'est pourquoi ce chapitre ne traitera que des contraintes d'origine purement liée au fluide, exercées sur les cellules.

1.3.1. Quelles sont les contraintes hydrodynamiques en bioréacteurs

1.3.1.1. Expression des contraintes

Les particules en suspension, à condition que leur densité ne soit pas très différente de celle du fluide, suivent le mouvement de ce dernier. Elles sont alors soumises à des contraintes résultant des efforts exercés par le fluide en mouvement. Ces contraintes peuvent être définies de façon globale ou plus précisément en calculant leurs composantes dans chacune des directions du repère. Pour comprendre comment ces contraintes peuvent interagir avec les particules, il convient de considérer les propriétés rhéomécaniques de ces dernières, l'échelle des contraintes « principale » étant celles apparaissant à l'échelle locale, soit celle de la particule considérée.

Toutes les particules en suspension dans un écoulement sont en interaction avec le milieu environnant et de ce fait subissent des contraintes hydrodynamiques liées à leur déplacement et/ou leur déformation dans cet écoulement. Les différentes contraintes subies peuvent se résumer ainsi :

- Contraintes de pression (cette dernière ne sera pas développée puisque largement négligeable),
- Contraintes de déformation visqueuses (tenseur des contraintes qui donne les contraintes de déformation, soit élongation ou compression et cisaillement),
- Contraintes de Reynolds ou contraintes turbulentes, liées au déplacement de la particule et aux fluctuations turbulentes.

La contrainte de déformation visqueuse peut être exprimée sous la forme de tenseur, ce qui sera abordé plus loin dans ce chapitre de bibliographie. En effet, les composants des tenseurs permettent de définir précisément les types de contraintes subies (élongation ou compression, cisaillement) alors qu'en génie des procédés une approche plus globale est généralement privilégiée et c'est ce que nous allons tout d'abord développer. Cette approche se propose de déterminer quelle est la nature des contraintes dominantes,

leur intensité, leur niveau de fluctuation et la durée d'exposition des cellules à ces contraintes.

Les contraintes hydrodynamiques sont le résultat de l'effet de forces hydrodynamiques exercées sur une particule suite à une fluctuation de la vitesse du fluide. Le calcul de la valeur de la contrainte locale est donc basé sur l'estimation de la fluctuation de vitesse à l'échelle locale, celle de la cellule. On définit ainsi le gradient de vitesse local G (s^{-1}) (Barbouche 2008):

$$G = \frac{\sqrt{\bar{u}_{dp}^2}}{d_p} \quad \text{Eq I.1}$$

Duquel on déduit la contrainte visqueuse τ (Pa) en fonction de la viscosité μ (Pa.s) :

$$\tau = \mu \times G \quad \text{Eq I.2}$$

On peut également définir une contrainte turbulente locale :

$$\tau_t = \rho \times \bar{u}_{dp}^2 \quad \text{Eq I.3}$$

où \bar{u}_{dp}^2 est la vitesse quadratique moyenne, dont l'expression dépend de la zone dans laquelle se trouve la particule (zone inertielle ou zone de dissipation visqueuse).

Il faut pour cela revenir à la théorie de la turbulence, déjà abordée dans la partie consacrée au mélange. La théorie de Kolmogorov concernant les écoulements turbulents suppose toute une cascade de dissipation d'énergie, des grandes échelles (zone inertielle) aux plus petites (zone de dissipation visqueuse). La micro échelle de Kolmogorov détermine la nature des contraintes hydrodynamiques auxquelles sont soumises les cellules de diamètre d_p en fonction de leur taille.

Zone inertielle $d_p \gg \lambda_k$

Pour des particules de taille supérieure à λ_k , les forces s'exerçant sur les particules résultent de la dissipation d'énergie dans la zone inertielle. Les particules subissent alors majoritairement des contraintes turbulentes : fluctuations rapides de pression sur la surface, entraînant compression, élongation et étirement intenses. L'équation du gradient de vitesse peut s'exprimer en fonction d'une constante C, du taux de dissipation de l'énergie cinétique turbulente et du diamètre de la particule :

$$\frac{\sqrt{\overline{u_{dp}^2}}}{d_p} = \sqrt{C_1} \left(\frac{\varepsilon}{d_p^2} \right)^{\frac{1}{3}} \quad \text{Eq I.4}$$

$C_1 \approx 1,9$ (Kolmogorov, 1958)

De ce fait, la contrainte hydrodynamique (équation I.3) peut être exprimée ainsi

$$\tau = \rho \left(\sqrt{\overline{u_{dp}^2}} \right)^2 \approx 1,9 \rho (d_p \varepsilon)^{\frac{2}{3}} \quad \text{Eq I.5}$$

Les contraintes visqueuses sont généralement négligées dans cette zone.

Zone de dissipation visqueuse $d_p \ll \lambda_k$

Pour des particules de taille inférieure, ce sont les contraintes de déformation issues du mouvement des plus petits tourbillons (zone de dissipation visqueuse) qui dominent. Le gradient de vitesse devient :

$$\frac{\sqrt{\overline{u_{dp}^2}}}{d_p} = \sqrt{\frac{C_v}{2}} \left(\frac{\varepsilon}{\nu} \right)^{\frac{1}{2}} \quad \text{Eq I.6}$$

avec $C_v = \frac{4}{15}$

et la contrainte visqueuse peut être estimée d'après l'équation suivante (Barbouche 2008; Yim and Shamlou 2000):

$$\tau = \mu \frac{\sqrt{u_{dp}'^2}}{d_p} \approx 0,365 \mu \sqrt{\frac{\varepsilon}{\nu}} \quad \text{Eq I.7}$$

Cas général :

Ces définitions de la contrainte subie par une particule dans la zone de dissipation visqueuse ne considèrent qu'une contrainte visqueuse. (Schügerl *et al.* 2000) suggère qu'à cette échelle, une contrainte dynamique globale, incluant les effets de la turbulence peut être aussi calculée, dont l'expression est donnée ici:

$$\tau_t = 0,0676 \rho \cdot d_p^2 \frac{\varepsilon}{\nu} \quad \text{Eq I.8}$$

Pour les particules situées dans la zone de dissipation inertielle convective, la contrainte turbulente est ainsi exprimée :

$$\tau_t = 1,9 \rho (\varepsilon d_p)^{\frac{2}{3}} \quad \text{Eq I.9}$$

Cela permet de définir une expression adimensionnalisée de la contrainte turbulente, quelle que soit la taille de la particule par rapport aux échelles turbulentes :

$$\frac{\tau_t}{\rho \sqrt{\nu \varepsilon}} = A \left(\frac{d_p}{\lambda_t} \right)^a \quad \text{Eq I.10}$$

Les constantes a et A dépendant de l'échelle turbulente considérée λ_t et trois zones sont ici considérées :

Zone dissipative :	$d_p < 6 \lambda_k$	$a = 2$	$A = 0,0676$
Zone de transition :	$6 \lambda_k < d_p < 25 \lambda_k$	$a = 4/3$	$A = 0,22$
Zone inertielle :	$d_p > 25 \lambda_k$	$a = 2/3$	$A = 1,9$

La valeur de la contrainte adimensionnée en fonction de l'échelle considérée est représentée sur la figure suivante (Schügerl *et al.* 2000):

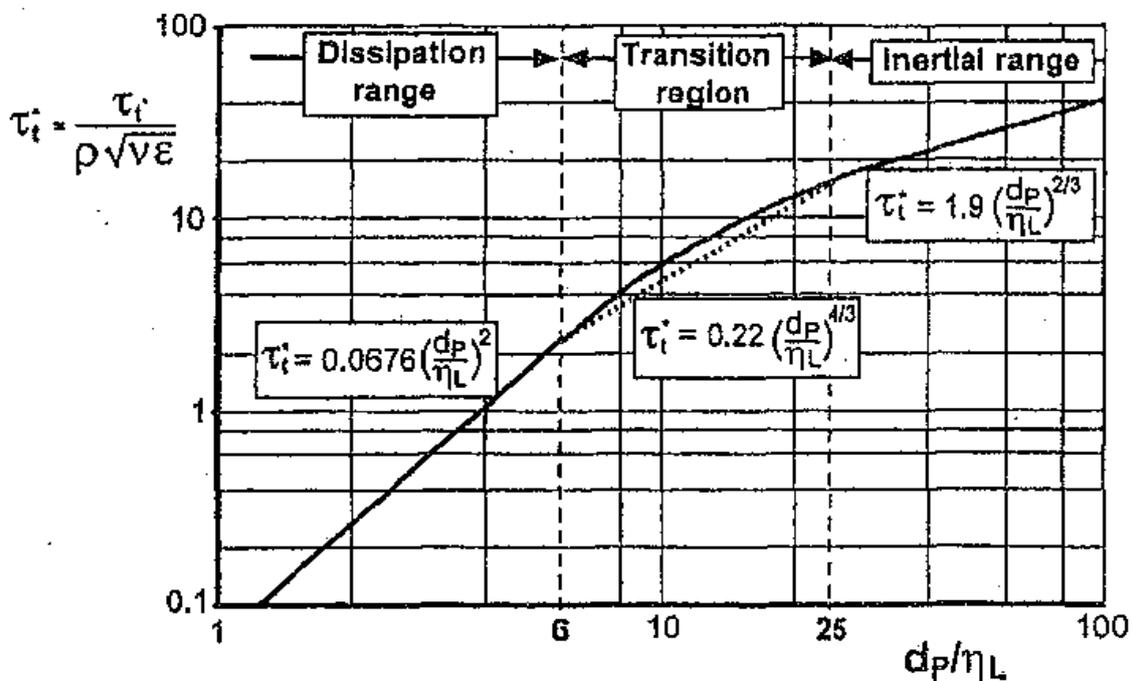


Figure I.5 Expression de la contrainte adimensionnée en fonction de la taille de la particule considérée. Ainsi, la comparaison entre la taille des particules considérées et celle des tourbillons indique quelle zone est déterminante pour la définition des contraintes. Cette zone dépend alors de la dissipation d'énergie et de la taille des particules. Ainsi, plus la particule est grande devant l'échelle de la turbulence, plus les contraintes auxquelles elles sont soumises seront importantes et intenses.

Quelle que soit l'approche adoptée (contraintes turbulentes ou contraintes visqueuses), la contrainte hydrodynamique subie par les particules en suspension dans un écoulement est proportionnelle au taux de dissipation de l'énergie cinétique ε .

1.3.1.2. Application aux bioréacteurs et lien avec la dissipation d'énergie

L'approche développée précédemment permet de décrire la nature des contraintes dominantes (visqueuses ou turbulentes) et leur intensité en comparant l'échelle de taille de la cellule par rapport à celle de la turbulence.

Si la contrainte est proportionnelle au taux de dissipation, celui-ci est rarement réparti de manière homogène dans les bioréacteurs et une cellule transportée dans ce type d'écoulement subit donc des contraintes fluctuantes. Une valeur moyenne de la dissipation, même calculée à l'échelle cellulaire, ne reflète pas l'amplitude des contraintes ni la durée d'exposition au stress.

Deux approches permettent d'appréhender ces fluctuations.

- L'approche Eulérienne consiste à considérer un réacteur compartimenté dans lequel on considère non plus une valeur moyenne de dissipation mais une densité de probabilité pour une plage de valeurs de dissipation (on associe un pourcentage du volume à une plage d'intensité). Wray and Hunt (rapporté par Boller and Blaser (1998)) résumant ainsi les contraintes induites par un écoulement turbulent : ils considèrent l'écoulement comme la superposition de 4 zones (type d'écoulement) : écoulement convergent, rotation dans les tourbillons, écoulement de cisaillement, « *streams* » pour lesquels ils déterminent un volume et une dissipation d'énergie relative et le type de stress dominant.
- Il peut être également intéressant d'accéder à l'histoire des contraintes subies par les cellules (par un suivi de la particule le long de sa trajectoire), c'est l'approche Lagrangienne. A la différence de l'approche Eulérienne, qui considère une répartition des contraintes à un instant donné, l'approche lagrangienne considère des cellules se déplaçant dans

un écoulement hétérogène et enregistrant les fluctuations vues. C'est l'approche qui permet d'intégrer les effets d'histoire, et qui est développée lors du suivi de particules lancées dans un écoulement.

Ces deux approches permettent d'accéder à la dissipation d'énergie à l'échelle locale et d'appréhender leur niveau de fluctuation. Ici, ce n'est plus une valeur moyenne de dissipation qui est considérée mais plutôt une probabilité de se trouver dans une zone d'intensité donnée via une cartographie du réacteur (Eulérien) ou un enregistrement des contraintes subies le long de la trajectoire (Lagrangien).

Les valeurs locales de la dissipation d'énergie peuvent être approchées en résolvant l'écoulement à l'aide de codes de mécanique des fluides numériques ou de façon expérimentale, par PIV par exemple, dont le principe est de mesurer les vitesses de particules fluorescentes dans l'écoulement considéré (Ducci and Yianneskis 2005; Huchet *et al.* 2009).

Les avancées dans le domaine de la mécanique des fluides numérique (Computational Fluid Dynamic, CFD) (codes et capacité de calcul des machines) permettent de calculer ces valeurs à des échelles de plus en plus proches des cellules. La résolution des écoulements par cette méthode permet d'extraire le tenseur des contraintes turbulentes et le tenseur des contraintes de déformations. Dans le cas de fluides newtoniens, celui-ci est proportionnel au tenseur des contraintes visqueuses :

$$\mu (\text{tenseur des déformations}) = (\text{tenseur des contraintes visqueuses})$$

Le tenseur des contraintes visqueuses est ainsi exprimé :

$$S_{vij} = \begin{pmatrix} -p + 2\mu \frac{du}{dx} & \mu \left(\frac{du}{dy} + \frac{dv}{dy} \right) & \mu \left(\frac{du}{dz} + \frac{dw}{dx} \right) \\ \mu \left(\frac{dv}{dx} + \frac{du}{dy} \right) & -p + 2\mu \frac{dv}{dy} & \mu \left(\frac{dv}{dx} + \frac{dw}{dy} \right) \\ \mu \left(\frac{du}{dz} + \frac{dw}{dx} \right) & \mu \left(\frac{dv}{dz} + \frac{dw}{dy} \right) & -p + 2\mu \frac{dw}{dz} \end{pmatrix}$$

Le tenseur des contraintes turbulentes contient les termes liés aux fluctuations de vitesses. Il a la dimension d'une contrainte et, bien qu'il représente l'accélération convective, il est couramment nommé 'contrainte' (White 2002).

$$S_{ij} = \begin{pmatrix} -\rho\bar{u}'^2 & -\rho\bar{u}'\bar{v}' & -\rho\bar{u}'\bar{w}' \\ -\rho\bar{u}'\bar{v}' & -\rho\bar{v}'^2 & \rho\bar{v}'\bar{w}' \\ -\rho\bar{u}'\bar{w}' & -\rho\bar{v}'\bar{w}' & -\rho\bar{w}'^2 \end{pmatrix}$$

Ces tenseurs sont des matrices symétriques, l'extraction des termes de la matrice permet de définir les contraintes s'exerçant sur une surface. On distingue alors :

- Contraintes normales (diagonale de la matrice), compression ou élongation : elles s'exercent perpendiculairement à la surface considérée.
- Contraintes tangentielles ou cisaillement (termes non diagonaux).

On retrouve ici la définition de la contrainte pour un fluide newtonien : $\mu G = \tau$

Dans les bioréacteurs de type cuve agitée, le cisaillement est bien entendu bien plus intense à proximité de l'agitateur. Pour le cas de réacteurs aérés, outre les contraintes liées à l'écoulement turbulent ou aux déformations visqueuses, les auteurs ont proposé que les contraintes liées à l'éclatement des bulles est lui aussi très important et devient la cause majeure de stress pour les cellules (Yim and Shamlou)

1.1.1.1. Notions de rhéomécanique et viscoélasticité

Le terme rhéomécanique concerne l'étude des déformations et contraintes appliquées à un solide. Toute contrainte appliquée à un corps solide a pour conséquence une réponse: déformation, rupture. La rhéomécanique va s'attacher à décrire l'amplitude de la déformation en fonction des forces mises en jeu, ainsi que l'éventuelle rupture. On définit ainsi différents types de solides : élastique, visqueux et viscoélastique. Ces notions seront rapidement définies dans les paragraphes suivants.

Pour toute déformation appliquée à un corps solide élastique, la réponse (contrainte) sera proportionnelle à la déformation qui est réversible, linéaire et immédiate.

Si la déformation est assimilable à un allongement relatif γ , on définit E_c , la constante élastique ou module de Young (Pa, soit la dimension d'une contrainte). Les déformations sont alors réversibles, linéaires et immédiates.

$$\tau_a = E_c \cdot \gamma \quad \text{Eq I.11}$$

Pour une déformation de cisaillement on considère un module élastique de cisaillement G_c [$\text{N}\cdot\text{m}^{-2}$ ou Pa] et la contrainte τ_c s'exprime :

$$\tau_c = G_c \cdot \gamma \quad \text{Eq I.12}$$

Le comportement visqueux est lui dépendant du temps et permet la dissipation d'une partie de l'énergie sous forme de chaleur. La contrainte est donc définie :

$$\tau = \mu \frac{d\gamma}{dt} = \mu \dot{\gamma} \quad \text{Eq I.13}$$

La plupart des matériaux biologiques sont en réalité viscoélastiques (Yim and Shamlou 2000): la relation contrainte-déformation dépend du temps et l'objet, de part ses propriétés élastiques, peut se relaxer c'est à dire retourner à l'état natif. Ainsi, au cours du temps, chaque déformation induit une contrainte sur le solide, pouvant s'additionner entre elles si leur fréquence ($1/t$) d'apparition est telle que l'objet n'a pas le temps de relaxer.

Il existe de nombreux modèles décrivant le comportement viscoélastique des cellules, nous allons ici résumer le modèle de Maxwell décrit par Yim and Shamlou (2000).

Pour un solide de Maxwell, on peut écrire

$$\mu \frac{du_x}{dy} = \tau + \frac{d\tau}{dt} \frac{\mu}{Gc} \quad \text{Eq I.14}$$

$\frac{du_x}{dy}$ représente la déformation globale [s^{-1}] causée par une contrainte τ [Pa] et μ [Pa.s] correspond à la viscosité.

La constante élastique t_e [s] est donc : $t_e = \frac{\mu}{Gc}$

Afin de définir laquelle des contraintes, visqueuse ou élastique, va dominer, il convient de comparer le temps caractéristique de la réponse élastique t_e et celui de la contrainte imposée t_p . On considère alors le nombre de Debora (De), tel que :

$$De = \frac{t_e}{t_p}$$

Si le temps de la contrainte est très petit, donc De élevé, ce sont les contraintes élastiques qui vont dominer, résultant en des contraintes élongationnelles (allongement du solide).

Si au contraire, la durée de la contrainte est élevée, ce sont les propriétés visqueuses qui vont dominer, et donc un stress lié à du cisaillement, résultant en la réécriture de l'équation I.14 :

$$\tau = \mu \frac{du_x}{dy} \quad \text{Eq I.15}$$

Force est de constater que dans la plupart des bioréacteurs, l'écoulement est tellement hétérogène que bien souvent, les termes élastiques et visqueux sont à considérer.

Outre la déformation, tout solide soumis à une contrainte peut également se rompre. La figure I.6 issue de (Yim and Shamlou 2000) résume les valeurs estimées d'efforts

nécessaires à la rupture d'une particule biologique (ce terme a la dimension d'un couple exercé sur une surface).

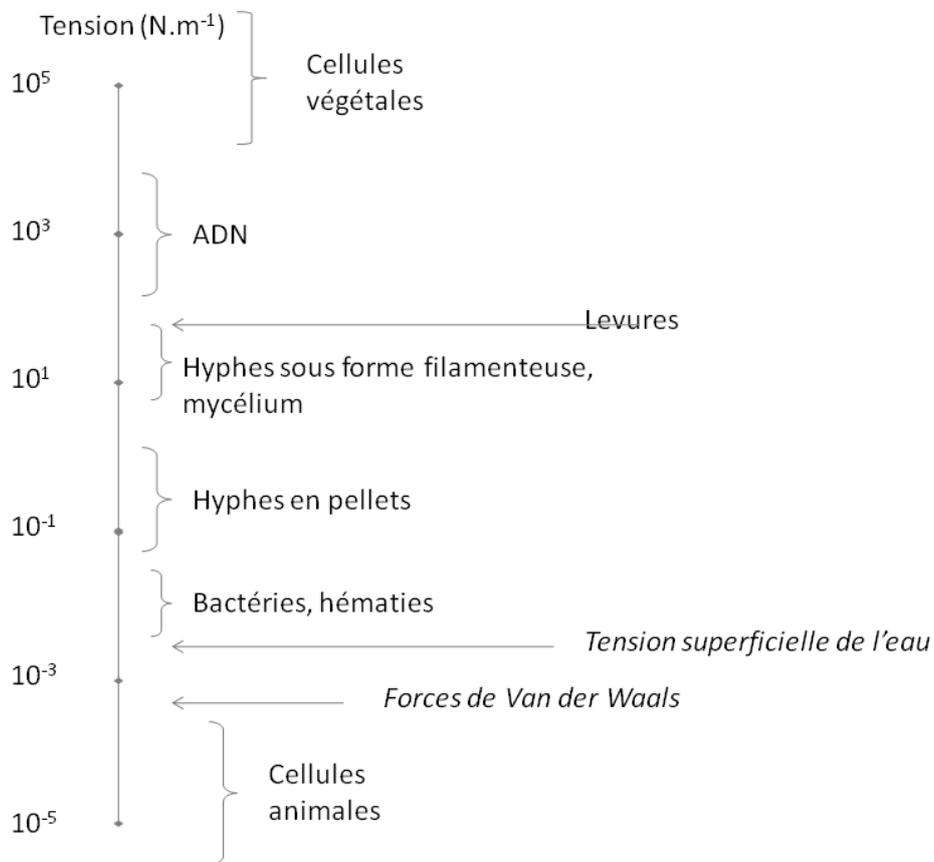


Figure I.6 d'après (Yim and Shamlou 2000): estimation de la contrainte minimum nécessaire à la rupture de la bioparticule considérée

En conclusion, toute particule ou ensemble de particules soumis à une contrainte pourra donc répondre à cette contrainte par

- une rupture (si cette force est supérieure aux forces cohésives)
- une déformation (si la force exercée par la contrainte est inférieure à la force qui maintient la cohésion de la structure). Pour des structures viscoélastiques, la déformation sera plus ou moins amplifiée selon le rapport fréquence d'exposition / temps de relaxation. Si la fréquence

d'exposition est grande devant le temps de relaxation, la structure reprendra sa forme initiale. Dans le cas contraire, si la fréquence d'exposition est petite devant le temps de relaxation (i.e. la structure n'a pas le temps de reprendre sa forme initiale), la contrainte peut conduire à une déformation permanente ou à une rupture.

La prédiction du comportement d'une particule dans un écoulement vis à vis des contraintes qu'il exerce nécessite :

- La bonne connaissance des contraintes hydrodynamiques, qui dépendent de l'écoulement et de son organisation, et de la taille et la forme de la particule sur laquelle elles s'exercent.
- La connaissance des propriétés biomécaniques de la cellule et une évaluation correcte des constantes rhéomécaniques et des forces de cohésion de la particule considérée. Dans le cas de cellules (bactéries, levures, cellules animales...), ces constantes restent bien difficiles à évaluer. Elles dépendent des propriétés physico-chimiques de la membrane, ces dernières pouvant être grandement affectées par l'état physiologique et l'histoire de la cellule.

1.3.1.3. Propriétés des bioparticules et interactions avec l'écoulement

Des propriétés des composants...

Les cellules, tout comme leurs constituants, présentent des propriétés élastiques et viscoélastiques, c'est pourquoi nous allons tout d'abord nous intéresser ici aux propriétés rhéologiques et biomécaniques des membranes et des bio-polymères. De manière générale, la biophysique s'intéresse beaucoup aux propriétés mécaniques des tissus et membranes biologiques, ainsi que des constituants cellulaires tels le cytoplasme, dont nous ne citerons que quelques exemples ici. Le peptidoglycane, constituant majoritaire de la paroi bactérienne, possède de fortes capacités d'étirement, allant jusqu'à 400 % lorsqu'il est soumis à un stress (Needham et al, 1991, rapporté par (Yim and Shamlou 2000). Les propriétés mécaniques des bi-couches phospholipidiques

ont elles aussi été largement étudiées (Janmey and Kinnunen 2006). Dans un tout autre registre, les brins d'ADN soumis à une contrainte élongationnelle peuvent doubler leur longueur avant de rompre (Odell and Taylor 1994).

En conséquence et d'un point de vue purement physique, les cellules, au sens large, (membrane et composés intracellulaires) peuvent se déformer ou rompre selon le niveau de contrainte exercée. Le cas des hématies, dont les propriétés élastiques leur permettent de se déformer suite à des contraintes induites par des fluides, peut être rapporté ici. De nombreuses études s'attachent en effet à décrire leur comportement dans les écoulements sanguins : leur déformation permet le passage dans de petits capillaires sanguins et leur agrégation sous les effets des contraintes mécaniques, est critique pour la santé.

Cependant, la membrane externe des cellules, sensible aux contraintes mécaniques, est constituée d'un réseau organisé de polymères : peptidoglycane, double couche phospholipidique... Etant donné que l'activité physiologique réalisée à la paroi est très variée, les composés de la membrane et leurs propriétés mécaniques sont très hétérogènes et cette dernière est loin de constituer une surface uniforme, complexifiant de ce fait un peu plus l'étude des interactions milieu environnant – membrane et rendant encore un peu plus compliquée la prédiction des propriétés mécaniques de la paroi extérieure. De plus, des changements dans la structure de ce réseau peuvent être induits par des contraintes extérieures, telles celles exercées par l'écoulement du fluide.

... à celles des cellules

Si les effets de l'écoulement sur la conformation de cellules biologiques sont largement rapportés, la prédiction de la déformation ou de la rupture est difficile à prévoir. En effet, les constantes rhéomécaniques caractéristiques nécessaires à la modélisation sont relativement difficile d'accès et ne sont pas prédictibles, comme évoqué précédemment. La caractérisation du comportement rhéologique d'une cellule ou d'une population cellulaire peut être réalisée via des études en Microscopie à Force Atomique (AFM) ou plus simplement, à l'aide d'un rhéomètre. Ces deux méthodes ne vont pas sans la présence de biais dans la mesure : méthode de fixation de la cellule pour l'AFM,

interaction avec le milieu de culture et effet de la concentration cellulaire pour le rhéomètre. Cependant, quelques articles font état de propriétés rhéologiques pour des cellules bactériennes : on trouve dans la littérature (Rotsch et al, Investigating living cells) par exemple une valeur du module de Young allant de 0,5 à 200 kPa pour des bactéries. Des études similaires ont été menées pour des bactéries organisées en biofilms. De plus, la surface des cellules bactériennes est décorée de nombreux polymères, protéines, polysaccharides, lipopolysaccharides... qui interfèrent également avec les propriétés mécaniques et d'adhésion des cellules.

Les cellules peuvent également présenter une élasticité anisotrope, c'est à dire que la résistance aux stress tels l'étirement est variable en fonction de la direction. L'anelasticité est induite par le stress et requiert de l'énergie dissipée sous forme de chaleur. La membrane est ainsi localement fragilisée, entraînant une modification de ses propriétés élastiques. De plus, la modification de la forme des cellules sous l'effet des contraintes liées à l'écoulement (principalement l'élongation) rend cette étude encore plus difficile puisque la surface cellulaire exposée au stress s'en trouve modifiée, sans compter que la dissipation de l'énergie sous forme de chaleur, peut modifier et fragiliser la structure des cellules. Du fait de l'anelasticité, les cellules cultivées dans un bioréacteur, qui n'ont par conséquent pas toutes la même orientation par rapport à l'écoulement, peuvent présenter une réponse au stress faussement dépendante du temps, le temps justement que toutes les cellules soient passées par l'orientation les rendant les plus sensibles.

Cependant, on relève dans la littérature d'autres exemples d'effet de contraintes sur un matériau biologique, le mécanisme de réponse étant encore mal compris. Dans la section suivante, nous proposerons une brève revue des interactions cellule – contrainte relevées dans la littérature. La compréhension des mécanismes moléculaires mis en œuvre pour fournir une telle réponse est du registre de la biophysique et ce point ne sera pas, ou très peu, abordé ici.

1.3.1.4. Phénomènes d'agrégation et d'adhésion

N'oublions pas que dans un ensemble de particules dans un écoulement, elles peuvent interagir aussi entre elles : suite aux rencontres et autres collisions provoquées par l'écoulement, certaines cellules ont la possibilité d'adhérer entre elles et de former un agrégat.

Selon l'approche physico-chimique, tout processus d'adhésion ou d'agrégation est le résultat d'interactions intermoléculaires s'établissant entre particules ou entre une particule et une surface. On cite alors :

- les interactions de type électrostatique ;
- les interactions liées aux forces de van der Waals (apolaires);
- et enfin les interactions polaires (hydrophiles/hydrophobes, liaisons hydrogène).

Les théories DLVO (initialement formulée par Derjaguine, Landau, Verwey, Overbeek dans les années 1940) et DVLO étendue par van Oss et ses collaborateurs (prenant en compte les interactions électrostatiques), issues de la physico-chimie des colloïdes, permettent de décrire le comportement de particules en suspension et leurs interactions. Dans le cas d'interactions entre deux bioparticules, il convient de considérer également les interactions stériques, type d'interaction intervenant en la présence de macromolécules. Adsorbées ou fixées à la surface des particules, ces macromolécules peuvent modifier charge de surface et affinité desdites particules ou conduire à un encombrement stérique, empêchant le rapprochement. L'interaction, à priori répulsive, peut être attractive si les polymères parviennent à s'accrocher entre eux, c'est le phénomène de pontage.

Ces considérations sont résumées dans la théorie DLVO mais la réalité est plus complexe. Les deux particules en interaction peuvent se déformer et entrent alors en jeu les effets plastiques et élastiques, de plus, dans le cas d'interaction dans un écoulement, il convient de tenir compte des forces liées à cet écoulement.

Les flocs résultant de processus d'agrégation ont généralement une dimension fractale, la croissance des agrégats donnant lieu à des courbes de distribution de taille caractéristique présentant plusieurs pics : distributions modales.

La formation d'agrégats dans un écoulement requiert donc ;

- Une fréquence de collision correcte pour permettre l'interaction
- Une bonne efficacité de collision, qui dépend des propriétés d'adhésion des particules

La taille finale des agrégats dépend de l'équilibre entre forces hydrodynamiques exercées sur l'agrégat et forces de cohésion.

1.3.2. Effets des contraintes hydrodynamiques sur des cellules en bioréacteurs

1.3.2.1. Effets des contraintes liées à l'écoulement sur des cellules en suspension

La théorie suppose que les cellules subissent les contraintes hydrodynamiques les plus importantes si leur taille est similaire à celle de la taille des tourbillons du domaine de dissipation inertielle convective. Cela implique que les cellules concernées soient de taille supérieure à l'échelle de Kolmogorov (λ_k) précédemment définie. Cependant, il existe bel et bien des contraintes qui s'exercent sur des cellules de taille inférieure à λ_k (Nienow 2006) : celles-ci, sans être immédiatement détruites sous l'effet des contraintes turbulentes (cas de particules de taille supérieure à l'échelle de Kolmogorov et donc subissant un phénomène de rupture instantané si les forces rencontrées sont supérieures à leur force de cohésion), peuvent fournir une réponse physiologique plus subtile que la simple et immédiate destruction sous l'effet des contraintes (zone inertielle : déformation ou rupture). Ainsi, les cellules peuvent fournir une réponse plus modérée lorsqu'elles sont dans la zone de dissipation visqueuse.

Très peu d'études concernent les effets des contraintes hydrodynamiques (de l'ordre de celles rencontrées habituellement dans les bioréacteurs) sur des cellules bactériennes, et le peu qui le font ne relèvent que peu d'effet sur la physiologie. Cela s'explique

probablement par le fait que, contrairement aux cellules animales, celles ci sont bien plus résistantes aux contraintes subies dans les gammes habituelles et les hécatombes liées à de trop fortes contraintes mécaniques ne sont généralement pas à déplorer dans le cas de cultures bactériennes. Néanmoins, sans être soumises à des stress létaux, la physiologie de la cellule comme la structure de ses composants peuvent être affectés.

Réponse cellulaire macroscopique et génétique

Sahoo et al. (2003) ont étudié l'influence du cisaillement sur des cultures de *Bacillus subtilis* en réacteur Couette alimenté en oxygène via le cylindre interne (membrane perméable à l'oxygène). Ils ont noté une diminution de la taille des cellules, une augmentation du taux de croissance et de la concentration cellulaire finale pour des cultures réalisées avec un taux de cisaillement de 1480 s^{-1} comparé à une culture témoin, réalisée en fiole agitée pour lesquelles le cisaillement est estimé à $0,028 \text{ s}^{-1}$ (soit une contrainte de cisaillement exercée sur la cellule de $2,8 \times 10^{-5} \text{ N.m}^{-2}$). Ces observations sont complétées par des mesures de l'activité spécifique de deux enzymes, catalase intracellulaire et protéase, qui témoignent de l'intensification de l'activité cellulaire. Une réponse génétique a aussi été remarquée au niveau de la transcription d'un facteur de stress : le facteur sigma B dont l'expression est contrôlée par la présence d'espèces oxydantes à l'intérieur de la cellule. La réponse au stress de cisaillement au niveau génétique est donc exprimée via le niveau de stress oxydatif. Il est nécessaire de faire remarquer ici que le kl_a peut lui aussi être modifié par ces mêmes paramètres qui font varier le cisaillement, ainsi, une augmentation de la vitesse de rotation aura aussi pour conséquence une amélioration du transfert d'oxygène dans le milieu et sera donc potentiellement source de stress oxydatif.

Les observations de Sahoo et al. (2003) sont partiellement contraires aux conclusions de Arnaud et al. (1993), pour qui le cisaillement plus élevé entraîne une augmentation de la taille des cellules. Cependant, elles démontrent clairement une réponse bactérienne à la contrainte hydrodynamique imposée.

Hewitt et al. (2000; 1999) ont travaillé sur des cultures de *Escherichia coli* soumises à des niveaux d'agitation et d'aération largement supérieurs à ceux habituellement

pratiqués dans les bioréacteurs, exposant donc les cellules à de fortes contraintes. A la différence des conclusions de Wase and Patel (1985) pour qui une forte agitation entraîne l'augmentation du volume intracellulaire pour équilibrer les pressions osmotiques, leurs résultats vont dans le sens de l'indifférence des bactéries vis à vis des contraintes mécaniques. Pour la plupart des conditions d'aération et d'agitation, les paramètres intrinsèques de la cellule, observés par cytométrie en flux, ne sont pas affectés : taille, potentiel membranaire et structure cellulaire. Ils remarquent cependant que pour de fortes agitations, la couche de polysaccharide est arrachée (visualisation au Microscope à Transmission Electronique TEM).

Smith et Greenfield (Barbouche 2008) ont noté une augmentation du flux glycolytique parallèlement à l'augmentation des contraintes hydrodynamiques sur des hybridomes (cellule animale). De même, Confer and Logan (1991) remarquent que l'assimilation de macromolécules comme le dextrane ou la BSA (Bovine Serum Albumin) est favorisée par le cisaillement (taux de cisaillement de l'ordre de 200 s^{-1}) chez *E. coli* et *Zoogloea ramigera*. En effet, l'agitation conduit à une augmentation de l'assimilation bien supérieure à celle liée à l'amélioration du transfert de matière résultant de l'amélioration du mélange par l'agitation.

Rikmanis et al. (2007) font état du concept de « turbohypobiosis » pour décrire l'interaction entre une cellule et son environnement turbulent. Ce terme fait sa première apparition dans la littérature dès 1986 et fait référence au fait que sous l'effet de contraintes turbulentes, les mécanismes cellulaires sont altérés, la rupture de la cellule étant un cas extrême de turbohypobiosis. Dans une revue parue en 2007, ils interprètent les résultats obtenus dans des réacteurs *scale down* (perturbation du métabolisme), non plus comme des conséquences en termes de transfert de matière, mais comme une réponse à un stress turbulent. Au delà du fait qu'ils remettent en cause bon nombre de conclusions avec une théorie basée sur des arguments très fragiles, ils ont le mérite de recenser de nombreux travaux. Par exemple, les travaux de Namdev et Dunlop, sur des cellules végétales, ont montré que l'application de contraintes sur des cellules entraînait une accumulation de Ca^{2+} dans le cytoplasme ainsi que l'activation de protéines de stress. De la même façon, Berzins et al. (2001) font état de modification de

l'agrégation et de l'arrangement entre cellules (*Trichoderma viride*, *Sphaerotilus natans*), modifications morphologiques (*Penicillium chrysogenum*) et diminution de l'activité biologique (*Brevibacterium flavum*) suite à l'augmentation de la turbulence (turbohypobiosis).

Gao et al. (2001) montrent que la contrainte de cisaillement permet d'améliorer la production de microcin B17 chez *E. coli*.

Enfin, les travaux de Cussatlegras and Le Gal (2004) montrent que les cellules du dinoflagellé *Pyrocystis noctiluca*, sont elles aussi sensibles à la turbulence. Cultivées dans un réacteur Couette dans des régimes transitoires et laminaires, leur fluorescence est bien moins importante que lorsqu'elles sont dans des conditions turbulentes ou suite à un changement brusque de l'écoulement dans lequel elles sont placées.

Modifications locales : effet des contraintes sur les membranes cellulaires

En ce qui concerne les membranes, on peut trouver dans la littérature plusieurs exemples de modification de structure au cours de la croissance induite par des contraintes hydrodynamiques. C'est le cas par exemple de la paroi de *Egremia menziesii* (Hackney et al. 1994) dont l'organisation des polysaccharides constitutifs est dépendante des stress rencontrés au cours de la croissance. Il en est de même pour la croissance hyphale de *Neurospora crassa* pour laquelle des études ont précédemment fait état d'une biopolymérisation des précurseurs et des enzymes excrétées contrôlée et induite par les contraintes liées à l'écoulement. Cependant, les phénomènes biophysiques conduisant à l'augmentation de la résistance mécanique des parois ne sont pas encore complètement compris. D'autre part de récents travaux font état de réponse physiologique non négligeable de la part de cellules eucaryotes soumises à un stress mécanique (Janmey and Weitz 2004; Vogel and Sheetz 2006) et les contraintes exercées sur les membranes externes peuvent provoquer une réponse chez les bactéries (induction de la production de polymères, Schwab and Ganzle, 2006). Janmey and Kinnunen (2006) suggèrent ainsi que pour des cellules entourées d'une bicouche phospholipidique, celle ci peut détecter des stress et y répondre, en association avec les protéines transmembranaires ou des protéines de surface. De manière générale, on

trouve de nombreuses études de l'interaction entre fluide et structure biologique déformable (Alpkvist and Klapper 2007) ; Duddu *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2000; Zhu and Peskin, 2007). (Janmey and Kinnunen 2006) proposent une revue de travaux sur des membranes phospholipidiques. Les propriétés biophysiques des membranes leur permettent des déformations, qui seront 'vues' par les protéines transmembranaires. La tension exercée sur une membrane peut induire une réponse enzymatique au stress, et affecter les propriétés de transport des canaux transmembranaires. Ainsi, l'induction de la synthèse de fructanes (EPS) peut être liée à une pression sur la membrane chez certains lactobacilles (Schwab and Ganzle 2006), ces molécules constituant une protection pour la membrane.

A la frontière entre biologie et biophysique, Lau et ses collaborateurs (Lau *et al.* 2009) ont montré que des modifications dans la structure de la capsule polysaccharidique de *Pseudomonas aeruginosa* affecte de façon significative les propriétés d'adhésion de la cellule, ainsi que les propriétés de cohésion et viscoélastiques du biofilm. Ainsi, une modification dans la composition du lipopolysaccharide (qui, dans cette étude avait une origine génétique) entraîne des modifications conséquentes des propriétés mécaniques de la cellule.

Ainsi, des mécanismes d'ordre biophysique peuvent être à l'origine de la détection du stress par les cellules bactériennes. Une enzyme transmembranaire déformée sous l'effet d'une tension exercée sur la membrane verra peut-être sa structure tridimensionnelle modifiée et par voie de conséquence, son activité et sa spécificité. De plus, comme mentionné plus haut, les contraintes hydrodynamiques, via de subtiles modifications à la surface de bio-particules, peuvent considérablement en modifier les propriétés.

A titre d'exemple d'interactions entre contraintes turbulentes et activité enzymatique, Ghadge et al. (2005) ont fait état de la désactivation d'une enzyme, la cellulase, sous l'effet des contraintes normales dans des bioréacteurs assez fortement agités (taux de dissipation allant de 0,02 à 12,56 kW/m³). Ces résultats sont à mettre en parallèle avec

des travaux mettant en avant des modifications structurelles des biopolymères dans des écoulements (Pelletier *et al.* 2001; Priebe *et al.* 2010).

1.3.2.2. Impact de la structure de l'écoulement et des contraintes sur les populations bactériennes

Cas des biofilms et des floccs

Le comportement des biofilms (population bactérienne, le plus souvent mixte, adhérente à une surface et emprisonnée dans une matrice) en fonction des contraintes hydrodynamiques a été largement étudié. L'analyse du comportement des biofilms dans un écoulement n'est pas l'objet de cette étude et trouve sa place ici à titre d'illustration des effets de l'hydrodynamique sur la structure d'associations de cellules agrégées et emprisonnées dans une matrice.

Il en résulte que l'écoulement peut influencer la composition et la structure du biofilm (densité et organisation interne) de part les contraintes apportées qui érodent le biofilm et lui soutirent les éléments les moins liés et de part les contraintes d'ordre chimique qu'il implique (apport de substrat, oxygène...)

D'autre part, leur forme peut être modélisée par l'écoulement. Besemer *et al.* (2007) ont étudié la croissance de biofilms sous différents régimes d'écoulement. Ils ont montré que le biofilm était ainsi sculpté et modelé au cours de sa croissance par le flux. La croissance d'un biofilm dans un écoulement laminaire ne privilégie aucune direction. En régimes transitoires et turbulents apparaissent des fils (*streamers*) et la surface présente des arêtes, orientées par le courant (Puervforj 2002). Dans des écoulements réguliers (contrainte unidirectionnelle), les biofilms tendent à s'allonger. En effet, les cellules tendent à s'orienter dans l'écoulement de façon à minimiser les contraintes subies. Ainsi, la sculpture de la forme du biofilm par l'écoulement permettrait aux cellules agrégées une organisation réduisant les efforts et contraintes auxquelles elles sont soumises (Taherzadeh *et al.* 2010). Un biofilm cultivé sous des contraintes fortes sera par conséquent moins épais que celui développé en régime laminaire (Battin *et al.* 2003).

Les propriétés rhéomécaniques des biofilms ont elles aussi été l'objet de beaucoup d'attention. Les travaux de Stoodley et al. (2002) par exemple, visent à étudier les propriétés viscoélastiques des biofilms de *Pseudomonas aeruginosa*, par le suivi de la déformation du biofilm en fonction des contraintes de cisaillement appliquées. On observe un comportement élastique pour des stress de quelques secondes, et au delà, un comportement visqueux (et linéaire...). C'est la matrice polymérique qui contrôle les forces de cohésion. Par analogie avec les observations en couette, en écoulement tourbillonnaire, les agrégats restent dans la structure un temps suffisamment long pour que les propriétés visqueuses dominent, d'où la déformation – ici allongement –, alors que dans le régime turbulent, la contrainte n'est pas assez longue et donc, les propriétés élastiques dominent, avec retour à l'état initial rapidement. De plus, de fortes contraintes turbulentes provoquent rupture et petits agrégats. En ce qui concerne l'effet de l'intensité de la contrainte sur la forme du biofilm, celle ci doit être suffisamment importante pour induire une déformation, les biofilms cultivés sous de faibles contraintes ne forment pas de filaments mais de petits monticules. Ces observations sont à rapprocher du comportement d'un fluide à seuil d'écoulement. Dans des cas de contraintes extrêmes, on observe un détachement et la rupture du biofilm.

Cas des « bacterial streamers »

Si, comme nous l'avons précédemment évoqué, le terme de biofilm se réfère à des populations de cellules adhérees à une surface, le terme de « *streamers* » ou « *bacterial streamers* » est utilisé pour décrire une structure filamenteuse en suspension dans un écoulement. Il s'agit de populations mixtes ou pures, observées à l'origine dans les écosystèmes naturels (lit des rivières ou des torrents), et rapportées dans des écoulements turbulents en laboratoire (Stoodley *et al.* 1998). L'équipe de Howard Stone (Rusconi *et al.* 2009) a reproduit ce phénotype dans des micro-canaux en conditions laminaires, à des vitesses de fluides allant de 0,2 à 1 mm/s, soit très lent par rapport aux vitesses instantanées observées en bioréacteurs. Néanmoins, leurs travaux fournissent d'importants renseignements concernant la formation et l'organisation de telles structures en rapport avec l'écoulement. Tout d'abord, ces *streamers* se situent au centre des canaux, se rattachant aux seules arêtes internes qu'ils rencontrent (figure

I.7), et n'apparaissent jamais dans des écoulements rectilignes. La localisation particulière est liée à une accumulation de la biomasse à cet endroit précis.

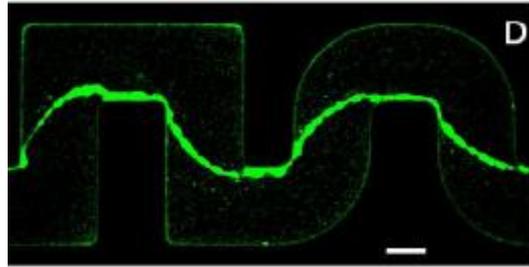


Figure I.7 (Rusconi *et al.*) : observation de *streamer* dans un écoulement laminaire

Le filament (apparition après 6 à 7 h), d'abord constitué d'un petit nombre de cellules emprisonnées dans une matrice polymérique, croît ensuite très rapidement (environ 1h) avec l'adhésion de cellules sur la matrice déjà formée. La matrice constitue un élément essentiel à la formation du *streamer*, formation d'autant plus rapide que la concentration cellulaire est importante.

L'apparition de *streamer* semble être également liée à la configuration particulière de l'écoulement. Si dans ce cas précis l'écoulement est laminaire, des simulations numériques de l'écoulement ont montré qu'à proximité des angles, un léger écoulement secondaire était superposé à l'écoulement principal suivant le courant. Cet écoulement secondaire consiste en tourbillons contrarotatifs allant du centre des canaux vers l'extérieur, entraînant une accumulation de biomasse au centre. Les auteurs supposent que ces tourbillons favorisent le détachement des substances polymériques produites par la biomasse adhérente aux parois et les transportent ensuite vers le centre.

Dans les écoulements turbulents, le *streamer* est lui aussi à l'origine de perturbations de l'écoulement avec la formation de vortex de Karman, engendrant la cause même de son mouvement oscillatoire (Taherzadeh *et al.* 2010) (figure I.8).

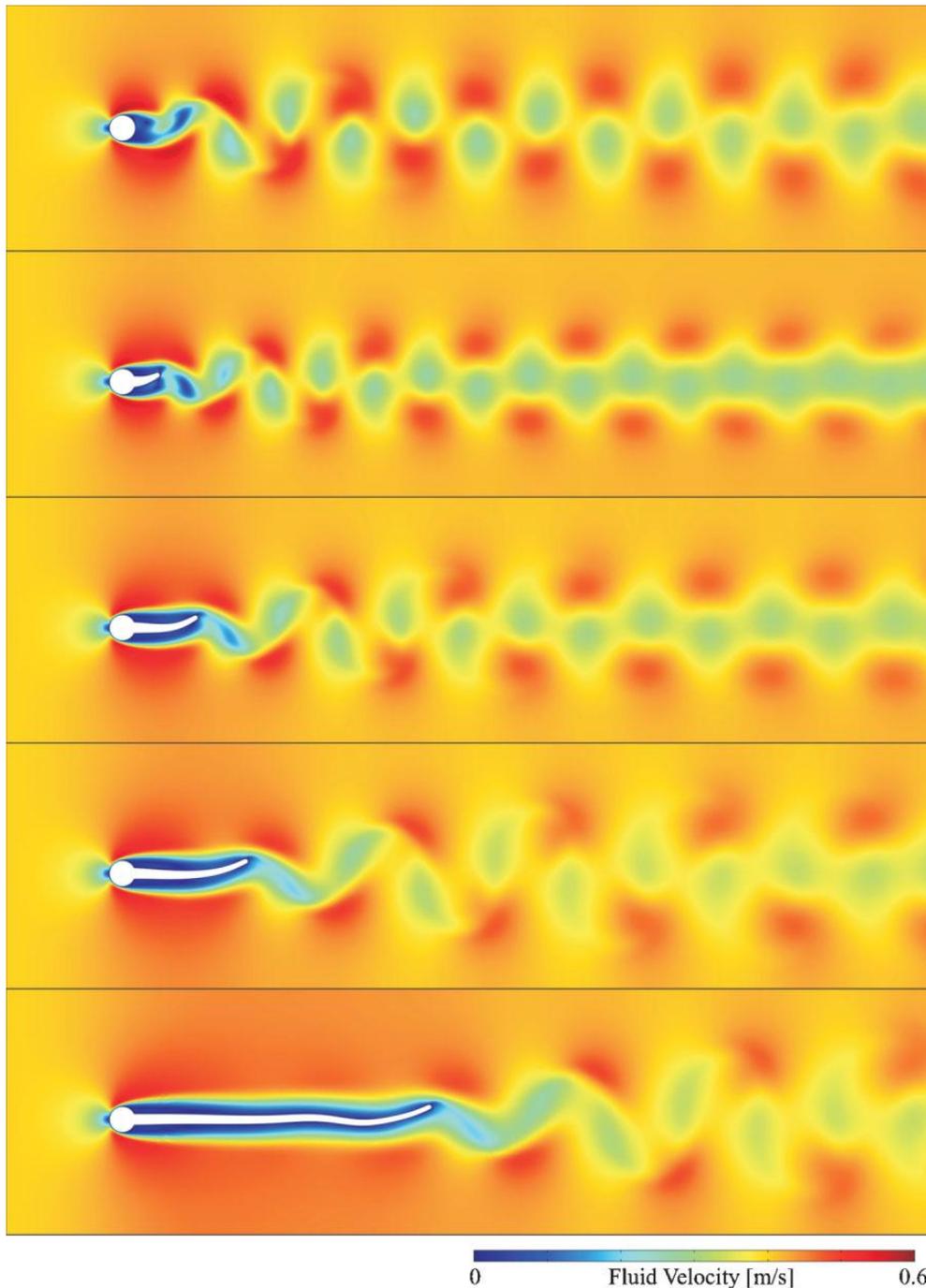


Figure 1.8 d'après Taherzadeh *et al.* (2010) : perturbation de l'écoulement par un *streamer*

1.4. Réponse biologique

L'objectif de ce chapitre est d'expliciter les étapes menant à la manifestation phénotypique de la réponse bactérienne et d'identifier les possibles moyens de détection de la réponse biologique pour l'expérimentateur.

1.4.1. Du phénotype au génotype

Les nombreux exemples cités précédemment tendent à démontrer que de nombreuses cellules et bioparticules répondent aux stress causés par les contraintes hydrodynamiques auxquelles elles sont soumises. Une des manifestations les plus claires de la réponse biologique est une modification de l'aspect phénotypique et de ses caractéristiques :

- Croissance ralentie ou retardée
- Changements morphologiques : taille, forme, organisation entre cellules
- Modification de l'activité biologique : activité enzymatique, activité spécifique, de l'état énergétique, des constituants cellulaires...
- Perturbation de la viabilité cellulaire (Barbouche 2008; Barbouche *et al.*; Hewitt *et al.* 1999)
- Métabolisme : modification du catabolisme, de l'anabolisme

Tous ces mécanismes sont fortement imbriqués et le chemin menant d'une contrainte à sa manifestation phénotypique est parfois compliqué, la réponse globale de la cellule étant très certainement le résultat de la combinaison entre des facteurs physiques et biologiques.

Toute cellule soumise à un stress va tenter de diminuer l'intensité de ce stress, par exemple en utilisant une autre source de nutriment lorsqu'elle est épuisée. Lorsque le stress est persistant et/ou dommageable pour les constituants cellulaires, la résistance devient nécessaire. Elle peut être acquise par une modification irréversible du matériel génétique (mutation, remaniement), conduisant à une meilleure tolérance aux conditions environnementales, ou par l'induction de systèmes de protection et de lutte contre le stress ou de réparation contre les dommages causés. Ces réponses impliquent donc :

- Une régulation biochimique : inhibition ou au contraire activation de certaines enzymes du métabolisme. C'est le cas par exemple du shift

métabolique de *L. lactis* qui sera évoqué par la suite ou du métabolisme overflow chez *E. coli* : un déséquilibre dans la concentration cellulaire de certains métabolites oriente les flux métaboliques, inhibant ou au contraire activant l'activité d'enzymes déjà présentes et actives.

- Une régulation génétique dans le cas de la résistance permet, contrairement au contrôle biochimique, une adaptation de la cellule en réponse à des changements environnementaux sur du long terme. L'expression des gènes et des opérons codant pour des enzymes cataboliques est induite par la présence d'un substrat approprié. Une telle induction peut être réalisée à un niveau transcriptionnel en activant ou réprimant l'expression des gènes (cas de l'opéron lactose dont le fonctionnement est rappelé brièvement ici : la transcription du gène codant pour la dégradation du lactose est empêchée par la fixation d'un répresseur en amont de ce gène en l'absence de lactose. La présence de lactose dans l'environnement va empêcher la fixation du répresseur et ainsi permettre la transcription du gène codant pour la beta galactosidase), ou en jouant sur l'antiterminaison et l'élongation des transcrits.

Dunlop et ses collaborateurs (Dunlop *et al.* 1994; Namdev and Dunlop 1995), pressentent l'existence de protéines de stress, qui sont exprimées par des cellules à des fins de protection vis-à-vis des stress subis (conditions environnementales non optimales).

Le cas de la répression catabolique fait partie des réponses génétiques. Elle implique des protéines régulatrices CcpA (Catabolite control protein A) faisant office de régulateur transcriptionnel et se liant sur des sites (*cre*) localisés en amont, à l'intérieur ou en aval des promoteurs des gènes cataboliques, entraînant ainsi soit l'activation, la répression ou l'avortement de la transcription. Si CcpA est le régulateur principal impliqué dans la répression catabolique, d'autres régulateurs transcriptionnels jouent également un rôle important dans le contrôle de l'expression des gènes cataboliques.

Tout comme CcpA, ils peuvent agir sur la transcription de façon différente en la réprimant, en l'activant ou en empêchant la terminaison de la transcription.

Quelques exemples de réponse adaptative

L. lactis ssp. *cremoris* MG 1363, prélevé en phase exponentielle de croissance et incubé au pH non létal de 4,5 pendant 15 min, présente un taux de survie de 100 % après 3 h d'incubation à pH 4 alors que ce taux était 10 000 fois plus faible sans préadaptation des cellules (Rallu *et al.* 1996) De même, *L. lactis* ssp. *lactis* IL 1403 voit son taux de survie augmenter lors d'un stress acide sévère (pH 3,9) après une incubation de 30 min à pH 5,5 (Hartke *et al.* 1996).

L'induction de la réponse adaptative chez *L. lactis* ssp. *cremoris* NCDO 712 augmente le taux de survie de la bactérie lorsqu'elle est soumise à un stress acide sévère mais la protège également contre d'autres stress, thermique, oxydatif, osmotique (O'Sullivan and Condon 1997). La réciproque n'est pas vraie sauf pour le choc thermique qui confère la résistance au stress acide. D'autre part, l'entrée des bactéries en phase stationnaire confère également une grande résistance au stress acide mais également à d'autres stress physico-chimiques (Hartke *et al.* 1996; Kim *et al.* 1999).

La réponse adaptative à des conditions non optimales de température implique également la synthèse de protéines, CSPs (Cold Shock Proteins) ou HSP (Heat Shock Proteins) pour la réponse adaptative au froid ou au chaud respectivement. L'induction des CSPs par le froid est complexe mais malgré tout probablement essentiellement contrôlée à un niveau post-transcriptionnel (Goldenberg *et al.* 1996; Kaan *et al.* 1999). L'induction de la résistance nécessite généralement une adaptation des cellules pendant une durée de 30 min à 1 heure.

Outils d'investigation

L'investigation de la réponse bactérienne peut être réalisée selon les approches transcriptomiques, protéomiques et métabolomiques (voir figure 1.9) ou grâce à l'utilisation de la cytométrie en flux (viabilité cellulaire) ou de marqueurs fluorescents témoins de l'activité transcriptomique (Lara *et al.* 2008; Lara *et al.* 2006). La sensibilité

de ces méthodes s'améliorant, il devient possible d'observer une réponse cellulaire à des temps et fluctuations très courts.

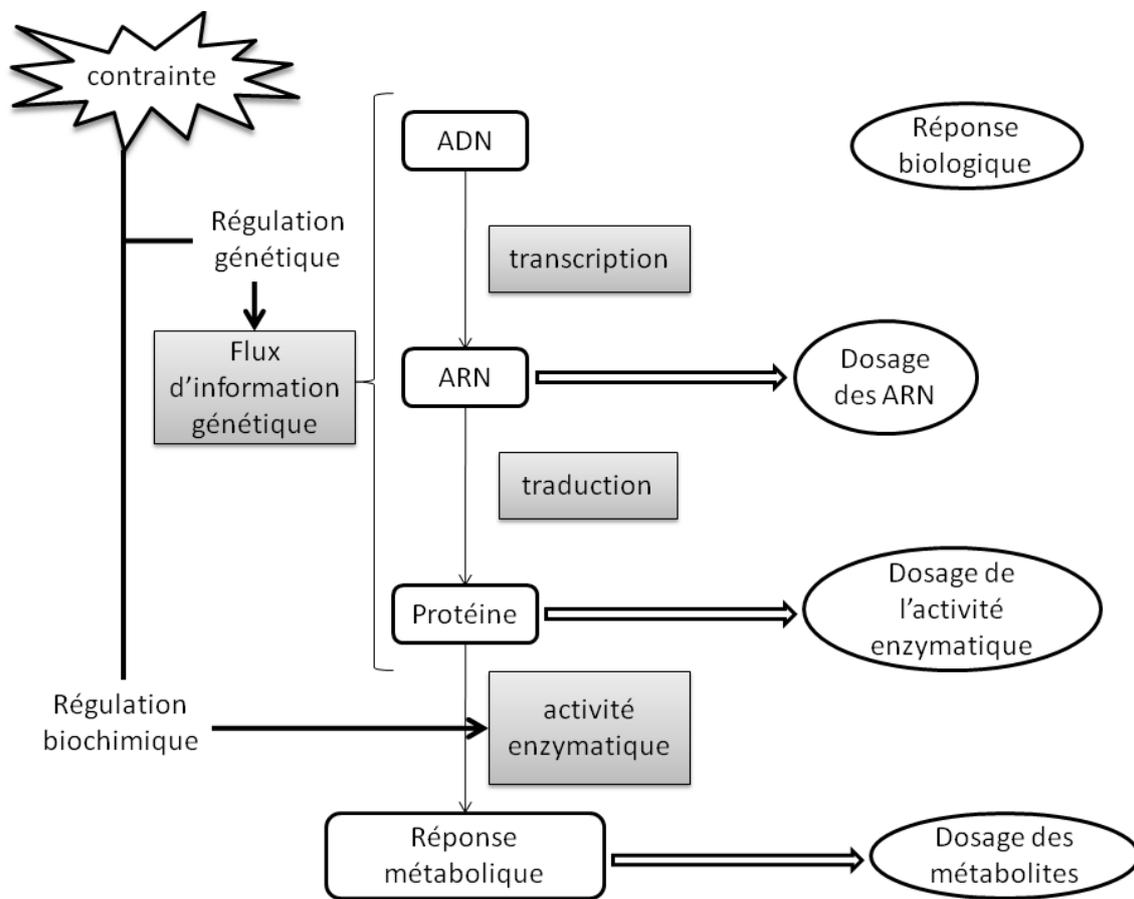


Figure I.9 : schéma simplifié des niveaux de régulation et d'observation de la réponse biologique

Ainsi, Schweder *et al.* (1999) proposent de suivre les perturbations subies par *E. coli* dans un bioréacteur (en termes de fluctuations de la concentration en substrat) en suivant le niveau d'expression des gènes liés au stress (excès ou limitation en glucose, stress osmotique ou limitation en oxygène). Les niveaux d'ARN messagers (ARNm) liés à ces gènes sont en effet bien plus élevés dans les zones du bioréacteur dans lesquelles la cellule est effectivement soumise à un stress (zone d'alimentation riche en substrat). Ils ont montré que la réponse au niveau des ARNm apparaît à l'échelle de la seconde et constitue de ce fait un outil correct de suivi des modifications induites par la conduite du procédé. Les progrès réalisés dans le domaine de l'analyse des flux métabolomiques permettent de détecter une réponse cellulaire au plus tôt via le suivi des métabolites

transitoires. Cela ouvre la possibilité de créer des modèles métaboliques plus précis (Chassagnole Christophe *et al.* 2002; Rizzi *et al.* 1997; Rizzi *et al.* 1996), et d'inclure une réponse adaptative dans les modèles biologiques.

1.4.2. Influence de la biologie sur son environnement

Les paragraphes précédents ont permis de montrer que les cellules ont la capacité de répondre aux contraintes imposées par leur environnement, et, le cas échéant, de s'adapter à ce dernier. La manière avec laquelle un microorganisme s'adapte et répond peut également constituer un facteur de modification de l'environnement : l'excrétion de métabolites et la production de biomasse peuvent par exemple modifier les propriétés physico-chimiques du milieu de culture telle la viscosité. La composition chimique du milieu est également influencée par le comportement de la biomasse. La baisse du pH consécutive à la production de métabolites acides peut conduire à une modification des propriétés rhéologiques de l'ensemble. Plus critique, l'adaptation de cellules à des concentrations limitantes en substrat peut conduire à une augmentation de leur capacité d'assimilation (Ferenci 1996; 1999a; 1999b; Ferenci and Robert 2007; Lara *et al.* 2006). Ces cellules, placées dans des conditions plus favorables, pourront donc consommer ce substrat de façon plus rapide, et être elles même à l'origine de gradients de concentration.

La présence de gradient d'un des paramètres de culture peut entraîner la formation de gradients pour d'autres paramètres (Lara *et al.* 2006). Biomasse et environnement sont en équilibre très instable et la moindre perturbation peut causer une cascade de modifications, pouvant à terme remettre en cause tous les paramètres de conduite et de design du procédé.

1.5. Conclusion – transition : Quelles sont les contraintes imposées quant aux outils choisis pour l'étude des interactions hydro - bio

Les interactions entre conditions hydrodynamiques et réponse biologique sont d'une importance critique dans le domaine du design et de l'opération des bioréacteurs, se faisant ressentir à toutes les échelles (de la micro échelle à la macro échelle) et peuvent

conduire à des stress chimiques (mélange) ou mécaniques (contraintes de cisaillement), ou encore conduire à une organisation de la population cellulaire gouvernée par la structure de l'écoulement (*streamers*, agrégats). La compréhension de ces interactions est rendue délicate par la multitude de paramètres interdépendants en ce qui concerne l'aspect purement procédé et par le fait que la réponse biologique, qui peut apparaître à de multiples niveaux, est difficilement imputable à l'effet d'une contrainte précisément identifiée. Cette première partie de l'étude bibliographique conduit à plusieurs constatations qu'il faudra considérer lors du choix des outils utilisés lors de l'expérience modèle :

- Si l'on considère le procédé, la modification d'un paramètre d'agitation par exemple, entraînera toute une cascade d'effets sur l'organisation de l'écoulement, dont dépendent les qualités de mélange et le niveau de contrainte subie. S'il est relativement impossible de dissocier ces effets, il convient pour l'étude des interactions à l'échelle locale de choisir un réacteur avec peu d'hétérogénéité macroscopique, d'où le choix du réacteur de type Couette qui sera détaillé dans le chapitre suivant.
- L'outil biologique doit permettre d'obtenir une réponse appréciable (qualitativement et quantitativement) à une contrainte identifiée. Cette problématique se résume en trois questions ; *quel type de réponse ? A quel niveau choisit-on de l'observer ? Pour quel type de contrainte ?* En termes de stress chimique par exemple, l'outil doit être capable de témoigner des fluctuations de concentration ou du flux de substrat.
- Le temps caractéristique de la réponse doit être comparable au temps caractéristique de l'exposition au stress.
- L'ajout de gaz complexifie grandement la mise en œuvre des simulations numériques, impliquant la prise en compte de la phase gazeuse et constitue une source supplémentaire de contrainte pour les cellules. Dans l'objectif de simplifier au maximum les conditions expérimentales afin d'avoir une analyse la moins bruitée possible, il conviendra donc de

choisir un microorganisme qui peut être cultivé en anaérobie.

Ces constatations nous ont amené à choisir la souche *Lactococcus lactis* NCDO 2118, largement étudiée par le passé au laboratoire. La réponse biologique pouvant être très variable, la dernière partie de ce chapitre traitera du métabolisme, de la production de polysaccharides et des propriétés d'adhésion de cette espèce.

2 ETUDE DES INTERACTIONS HYDRO – BIO A TRAVERS DES CULTURES DE *LACTOCOCCUS LACTIS* EN REACTEUR COUETTE

2.1. Réacteur couette

2.1.1. Présentation

Le réacteur Taylor-Couette (figure I.10) est constitué de deux cylindres concentriques. Le liquide présent dans l'espace inter-annulaire (ou entrefer) est mis en mouvement par la rotation du cylindre interne.

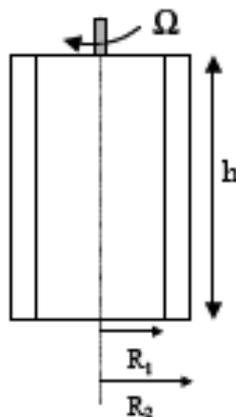


Figure I.10: représentation schématique du réacteur Couette

L'entrefer est noté e , les rayons internes (R_i) et externes (R_o) R_1 et R_2 , leur rapport étant $\eta = R_i/R_o$. η , le rapport H/e constituent les dimensions caractéristiques des réacteurs de type Couette.

Ce type de réacteur, parce que doté de conditions hydrodynamiques particulières, est couramment utilisé lors de travaux allant de l'étude du processus de floculation de particules à la production de cellules animales (Barbouche *et al.*; Haut *et al.* 2003).

2.1.2. Hydrodynamique dans un réacteur Couette

Dans un écoulement quel qu'il soit, deux mécanismes sont responsables du transport de la quantité de mouvement : les forces inertielles et les forces visqueuses. Pour une géométrie quelconque, le nombre de Reynolds (Re) caractérise le rapport des forces inertielles et visqueuses et permet alors de définir le régime d'écoulement considéré. Un écoulement turbulent sera donc dominé par des forces inertielles ; un écoulement laminaire le sera par les contraintes visqueuses.

Dans un réacteur Couette, l'équivalent du nombre de Reynolds est le nombre de Taylor. De nombreuses études se sont attachées à caractériser les écoulements dans des cellules de Couette et on peut trouver dans la littérature différentes expressions du nombre de Taylor donc voici un exemple :

$$Ta = \frac{(R_2 - R_1)^3 R_1}{\nu^2} \Omega^2$$

Avec :

R_1 Rayon du cylindre interne (mm)

R_2 Rayon du cylindre externe (mm)

Ω Vitesse de rotation du cylindre interne (s^{-1})

ν Viscosité cinématique du fluide ($m^2 \cdot s^{-1}$)

Le nombre de Taylor, adimensionnel comme le Re, est caractéristique du régime d'écoulement dans des conditions données. Pour un réacteur de Couette, l'écoulement présente différents régimes, largement étudiés par le passé. Ces régimes et leurs

transitions sont résumés par Coufort (2004) pour une vitesse de rotation du cylindre interne croissante. La figure I.11 illustre ces différentes transitions.

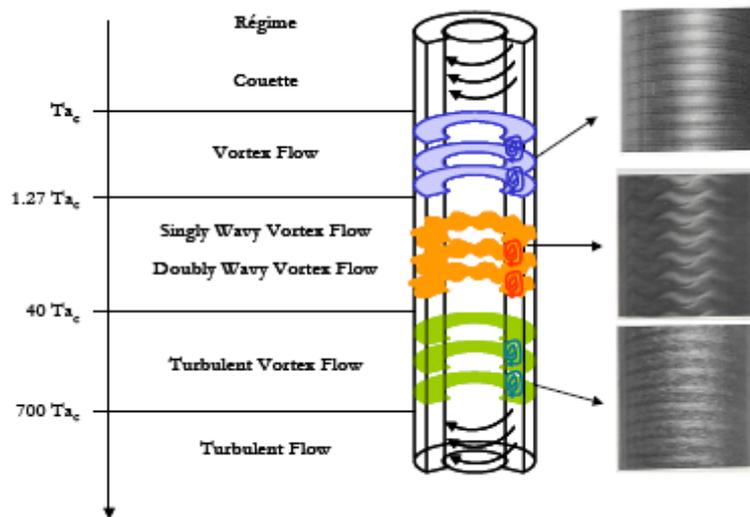


Figure I.11 : transitions dans un réacteur Couette, d'après Andereck, 1986 (Coufort 2004)

Notons que cette synthèse ne considère que les écoulements induits par le mouvement du cylindre interne, dans des réacteurs non alimentés (sans flux axial de fluide) : réacteurs Couette et Taylor Couette.

2.1.2.1. Écoulement laminaire

L'écoulement engendré par de faibles vitesses de rotation du cylindre interne est stable et axisymétrique, pour lequel il est possible de donner une solution analytique pour sa résolution. La forme du champ de vitesse obtenu à ces faibles vitesses de rotation correspond à un écoulement purement tangentiel appelé écoulement de Couette.

2.1.2.2. Vortex de Taylor : écoulement tourbillonnaire

Avec l'augmentation de la vitesse de rotation, et donc de l'apport d'énergie au système, l'écoulement devient instable et apparaissent des structures appelées rouleaux ou vortex de Taylor. Ce sont des structures toroïdales qui viennent se superposer à l'écoulement laminaire lorsque le nombre de Taylor atteint ou dépasse une valeur critique $Ta_c = 1712$. Des vortex toroïdaux se forment tout d'abord aux extrémités du

réacteur. Ensuite, l'entrefer se remplit de vortex de section carrée correspondant à la taille de l'entrefer. Les vortex adjacents sont à contre courant. Cet écoulement est connu sous le nom d'écoulement tourbillonnaire ou vortex flow. Cet écoulement, stable, est constitué de la superposition de l'écoulement de Couette et d'un écoulement hélicoïdal tournant autour de l'axe des tourbillons (figure I.12).

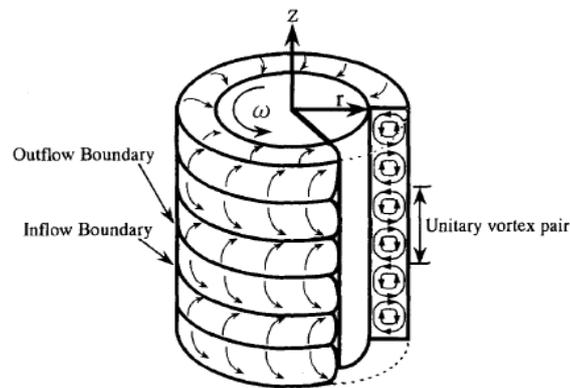


Figure I.12- Schématisation des tourbillons de l'écoulement Taylor vortex flow, d'après Ohmura *et al.*, (1997)

2.1.2.3. Écoulements tourbillonnaires ondulants (Wavy Vortex flows)

Il s'agit d'écoulements périodiques, présentant une structure organisée. Lorsque $Ta = 1,27 Ta_c$, un mouvement ondulatoire se superposant aux vortex de Taylor apparaît. Lors de ce mouvement, l'ensemble des vortex ondule suivant la direction axiale avec une phase identique. Ce type d'écoulement appelé wavy vortex flow comprend deux régimes d'écoulement : le singly periodic wavy vortex flow (SPWVF) et le doubly periodic wavy vortex flow (DPWVF).

Le premier régime d'écoulement SPWVF est caractérisé par un certain nombre de vortex et de vagues conditionné par le nombre Ta . Lorsqu'on augmente la vitesse de rotation du cylindre interne, l'écoulement devient plus complexe et l'amplitude des vagues varie périodiquement. Cet écoulement correspond à l'écoulement DPWVF.

2.1.2.4. Écoulements tourbillonnaires turbulents et écoulement turbulent

Lorsque $Ta = 40 Ta_c$, les vagues disparaissent mais les structures tourbillonnaires sont conservées. Cet écoulement est appelé écoulement de Taylor turbulent ou turbulent vortex flow.

Pour un $Ta = 700 Ta_c$, un écoulement axisymétrique commence à s'établir. Au delà, la turbulence casse les tourbillons, l'écoulement est alors turbulent et purement tangential (turbulent flow).

Remarquons que si le nombre de Taylor représente toujours un rapport entre les forces inertielles et visqueuses, différentes expressions littérales ont été relevées dans la littérature conduisant à différentes valeurs critiques en ce qui concerne les transitions.

L'intérêt principal du réacteur de type Taylor-Couette pour notre étude est qu'il présente une répartition volumique relativement homogène de taux de dissipation de l'énergie cinétique turbulente. Contrairement aux bioréacteurs traditionnels (cuve agitée) dans lesquels de grandes différences du taux de dissipation sont observées selon la géométrie du réacteur et la position par rapport aux modules d'agitation, le taux de dissipation de l'énergie cinétique présente une distribution étroite.

2.1.3. Effets de mélange dans un réacteur Couette

La qualité du mélange dépend évidemment du régime d'écoulement.

En régime laminaire, seule la diffusion moléculaire permet le transfert de matière et le mélange est donc de faible qualité. (Liu and Lee 1999) ont montré que l'indice de ségrégation (qui permet d'évaluer la qualité du mélange intime des constituants) reste proche de 1 pour des réacteurs opérés en régime laminaire, témoin d'un micromélange de mauvaise qualité. Dans ce régime d'écoulement, l'augmentation de la vitesse de rotation du cylindre ne permet qu'une très faible amélioration du mélange.

En revanche, les performances du système en matière de mélange s'améliorent dans les autres régimes d'écoulement. Racina and Kind (2006a; 2006b) par des techniques PIV, ou Liu et Lee (1999) grâce à une technique de réactions parallèles et compétitives développée par Villermaux, ont relié la qualité du micromélange au Ta .

Ainsi, le passage d'un régime tourbillonnaire à un régime tourbillonnaire ondulant permet d'améliorer encore le mélange grâce à l'onde azimutale qui transporte la matière verticalement. Cependant, en fonction de la position par rapport au vortex, les temps de mélange sont encore très variables à ce régime. Racina and Kind (2006a; 2006b) montrent que les temps de mélange sont nettement plus homogènes en régime turbulent

Une approche phénoménologique du mélange dans un réacteur Couette en régime tourbillonnaire a longtemps constitué à considérer chaque vortex comme un réacteur parfaitement agité (Katakaoa and Takigawa 1981 et Ito et al 1989 rapporté par Ohmura (Ohmura *et al.* 1997), l'ensemble du réacteur présentant donc trois niveaux de mélange usuellement considérés (macro-, méso- et micro- mélange). Il en résulte que dans un réacteur de type Couette, le macromélange est assimilable à l'échange de matière entre les vortex. Chaque vortex étant considéré comme un réacteur parfaitement agité, le réacteur est assimilé à une cascade de RPA. Le mésomélange est quant à lui relié au mélange à l'intérieur des vortex. Si l'ordre de grandeur du temps de mésomélange est bien inférieur au temps de macromélange (0.2 - 2 s contre 2 - 60s), ce dernier est cependant limitant vis-à-vis du mésomélange. Le micromélange est lui entièrement dépendant des caractéristiques locales de l'écoulement, les échelles de micromélange devenant plus homogènes avec l'augmentation de la turbulence au sein du réacteur (Racina and Kind 2006b).

Cette approche a été démentie entre autre par Desmet (Desmet *et al.* 1996; 1997) et Haut *et al.* (2003) puis plus récemment Rudman et al. (2008). La figure I.13 permet de visualiser le mélange de lait dans un réacteur couette en régime tourbillonnaire : on observe que le transfert de matière entre les vortex est plus rapide que le mélange à l'intérieur même du vortex.

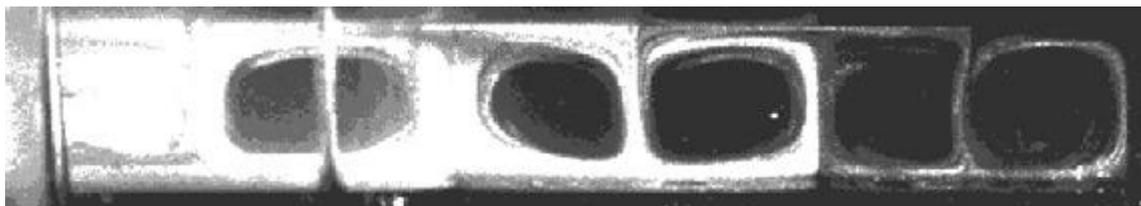


Figure I.13 (Haut *et al.*, 2003) : visualisation du mélange dans un écoulement tourbillonnaire

Si l'empilement de vortex a longtemps été considéré comme une cascade de réacteurs parfaitement agités, les progrès dans les techniques de visualisation locale (réaction colorée, dispersion de traceur) ont permis, outre d'acquérir de jolies images, d'émettre quelques réserves. En effet :

- Le mélange intra vortex n'est pas aussi rapide qu'on le croit.
- Il existe des zones où il n'y a pas de mélange à l'intérieur des vortex (Dusting and Balabani 2009). C'est le cas des travaux de Rudman *et al.* (2008) qui montrent que le cœur des vortex ondulant présente des zones où le faible mélange empêche la neutralisation de la base, laissant apercevoir des filets bleus dans la zone préalablement neutralisée (jaune) (Figure I.14).



Figure I.14 d'après Rudman *et al.* (2008) : non mixing vortex cores

Un réacteur Couette est le siège d'un écoulement particulier permettant l'étude de l'interaction hydro - bio et les deux paragraphes suivants évoquent deux des applications possibles du réacteur Couette.

2.1.4. Cultures bactériennes et cellulaires

Les travaux faisant état de cultures cellulaire et bactérienne en réacteur couette sont référencés et détaillés dans le chapitre consacré aux interactions hydro-bio. Ce ne sera donc pas répété ici.

2.1.5. Agrégation et floculation

Comme évoqué précédemment, la taille d'un floc résulte d'un équilibre :

- Entre les forces hydrodynamiques mises en jeu et les forces de cohésion du floc ou de l'agrégat considéré, ou en d'autres termes,
- Entre les phénomènes d'agrégation et de rupture

La géométrie du réacteur couette se prête très bien à l'étude de cet équilibre puisque les forces hydrodynamiques mises en jeu sont relativement homogènes en termes d'intensité. En effet, la dissipation de l'énergie cinétique, principal paramètre déterminant l'intensité des contraintes hydrodynamiques, est distribuée équitablement dans tout le volume du réacteur (voir figure I.15)

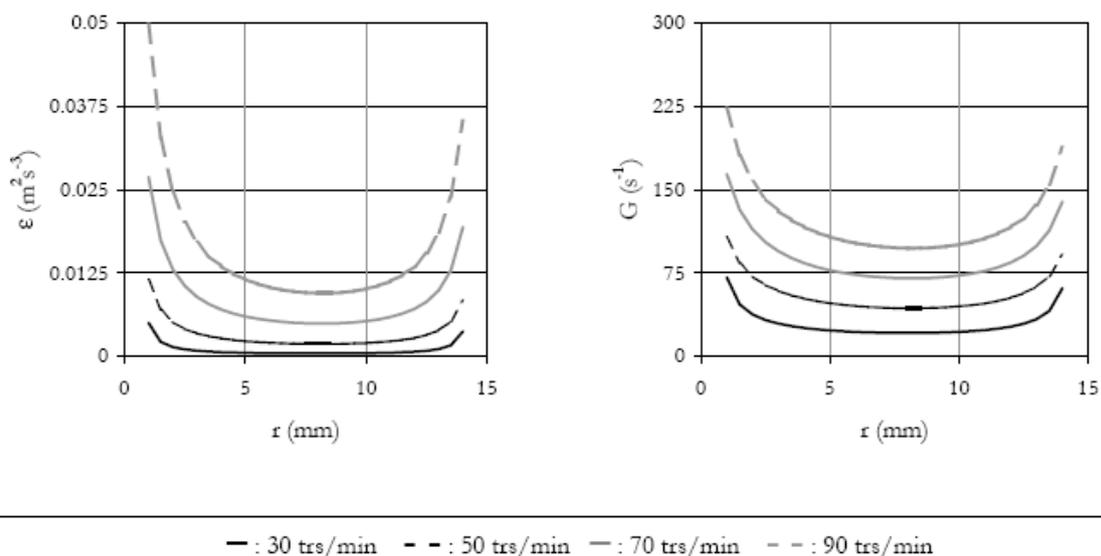


Figure I.15 : d'après Coufort, (2004) : profil de répartition de la dissipation ϵ et du cisaillement G dans un réacteur Couette

Lors de l'étude de la floculation dans un réacteur de Taylor Couette, Coufort (2004) a montré que :

- Malgré la relative homogénéité du réacteur en termes de dissipation d'énergie, la distribution de la taille de l'échelle de Kolmogorov présente plusieurs pics : un pic correspondant à la valeur la plus probable, de taille

λ_k , un pic de taille supérieure, correspondant à des zones de faible écoulement, à l'intérieur des vortex par exemple, et un pic de taille inférieure, correspondant à des zones de forte dissipation d'énergie, aux parois.

- En termes de taille de floccs minéraux, celle-ci semble être contrôlée par l'échelle de Kolmogorov, avec des tailles comprises entre λ_k et $2\lambda_k$.
- L'hydrodynamique joue un rôle important dans la rupture des agrégats, celle-ci ayant lieu dans des zones à forte dissipation, menant à des agrégats transitoires de petite taille.

2.2. *Lactococcus lactis* NCDO 2118

2.2.1. Présentation et quelques généralités

Lactococcus lactis est une espèce appartenant à la famille des bactéries lactiques, nommée ainsi en référence à leur capacité à produire de l'acide lactique lors du catabolisme des sucres. Cette propriété en fait la famille bactérienne la plus utilisée par l'industrie agroalimentaire. Les bactéries lactiques, connues pour le rôle qu'elles jouent dans la préparation des laits fermentés ou du fromage, participent également à d'autres préparations alimentaires telles que la fermentation de viandes et poissons, la production de boissons alcoolisées, pain au levain ainsi que de sauce soja. De part les métabolites produits, elles participent à la saveur (formiate, diacétyl, ou amines biogènes en ce qui concerne les arômes indésirables), la conservation (acide lactique) et à la texture des produits (production d'exopolysaccharides). De plus, certaines bactéries lactiques, de par leurs vertus probiotiques (du grec pro bios : en faveur de la vie), ont un rôle bénéfique pour la santé du consommateur.

Leur classification parmi les microorganismes GRAS (Generally Regarded As Safe), leurs nombreuses applications alimentaires et le classement de certaines d'entre elles parmi les microorganismes probiotiques, expliquent l'intérêt porté à ce genre bactérien et ses propriétés : métabolisme, voies de synthèse des polysaccharides, capacités d'adhésion...

La famille des bactéries lactiques comprend de nombreuses espèces classées en six genres : *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* et *Bifidobacterium*. Le genre *Lactococcus* est constitué de plusieurs espèces, *garviae*, *lactis*, *plantarum* et *raffinolactis*. L'espèce *lactis* regroupe elle-même trois sous-espèces, *cremoris*, *lactis* et *hordniae*.

Lactococcus lactis est une espèce à Gram +, anaérobie mais aérotole'érante, catalase négative, non sporulante, non mobile, formant des cellules sphériques ou ovoïdes, isolées ou en courtes chaînettes.

Si l'habitat courant des lactocoques demeure le lait, on peut cependant les isoler, comme c'est le cas pour *L. lactis* ssp *lactis* NCDO2118, des plantes, qui constituent vraisemblablement leur habitat d'origine.

2.2.2. Catabolisme des sucres et shift métabolique de *L. lactis* NCDO 2118

L. lactis est une bactérie homo-fermentaire, c'est-à-dire qu'elle utilise la voie homo-fermentaire (glycolyse ou voie de Embden-Meyerhoff-Parnas, EMP) pour la dégradation des sucres. Cette voie conduit dans des conditions optimales de croissance à la production de deux molécules de lactate et deux molécules d'ATP par molécule de glucose consommée (Thompson et Gentry-Weeks, 1994). Des sucres autres que le glucose peuvent également être fermentés via cette voie : monosaccharides, disaccharides, hexitols. Ces microorganismes présentent un métabolisme de type homolactique lorsque le lactate représente plus de 90 % des produits de fermentation. Dans certaines conditions de croissance (certains sucres, limitation carbone ...), le métabolisme de ces bactéries se diversifie vers un métabolisme mixte avec production en plus du lactate, de formiate ou de CO₂, d'acétate et d'éthanol (Cocaign-Bousquet et al. 1996).

2.2.2.1. Devenir des sucres en amont du pyruvate

Le transport du sucre à l'intérieur de la cellule se fait par le biais de deux systèmes chez *L. lactis* : le système phosphotransférase phosphoénolpyruvate dépendant (PTS), qui

couple le transport et la phosphorylation du glucide (Postma *et al.* 1993), et le système perméase énergie-dépendant, qui fait pénétrer les sucres sous forme libre.

Le système PTS (phosphotransférase PEP-dépendant) est impliqué dans le transport de divers hydrates de carbone chez les bactéries (Postma *et al.* 1993), Il s'agit d'un groupe de translocation qui catalyse de façon concomitante l'entrée du sucre dans la cellule ainsi que sa phosphorylation. Différentes protéines sont impliquées dans ce système, les deux protéines de couplage énergétique, l'enzyme I (EI) et HPr, sont communes à tous les systèmes alors que les complexes « enzyme II » (EII) sont spécifiques du sucre et impliqués dans son transport (Postma *et al.* 1993) (Fig. I.16). Le système PTS semble énergétiquement plus favorable que les systèmes perméase, en effet il couple entrée et phosphorylation du sucre avec la dépense d'une molécule de PEP, tandis que l'accumulation du sucre par un système non-PTS nécessite la dépense de plus d'un équivalent ATP car transport et phosphorylation ATP-dépendante sont physiquement séparés.

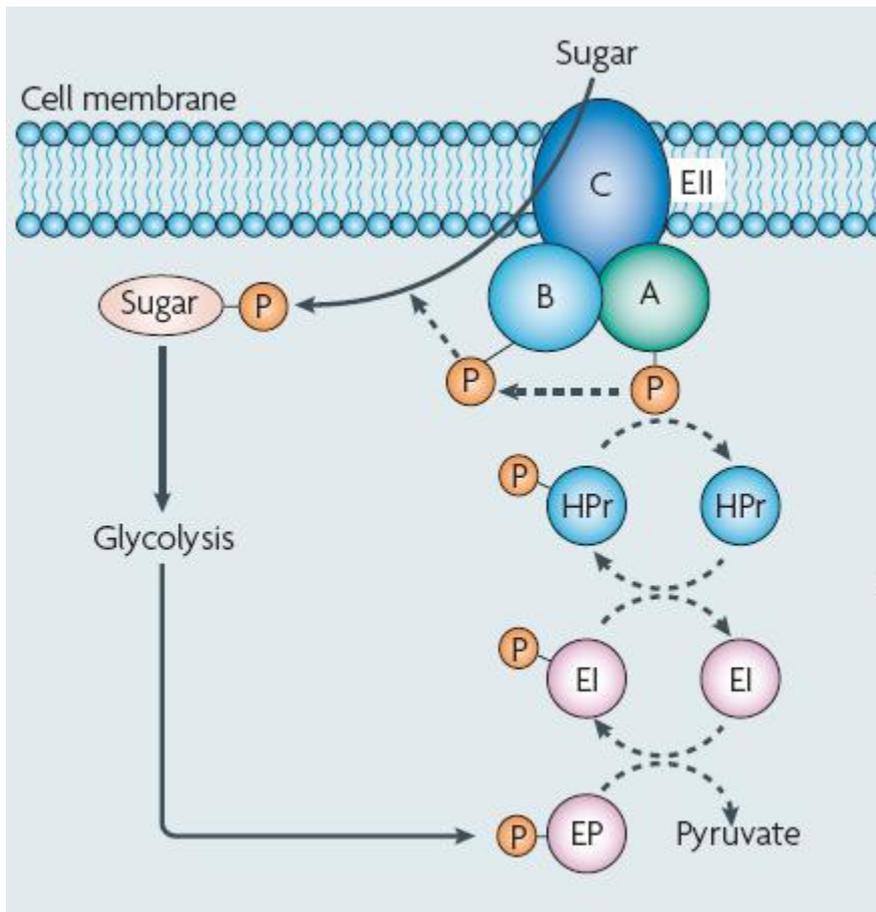


Figure I.16 : schéma succinct du système PTS (Görke and Stülke 2008)

Le système perméase permet de transporter le sucre à l'intérieur de la cellule contre son gradient de concentration, à l'aide d'une enzyme transmembranaire consommant une molécule d'ATP. Une fois à l'intérieur de la cellule, le substrat carboné est phosphorylé grâce à une kinase ATP-dépendante puis va être dégradé. Le transport par les perméases est beaucoup moins étudié puisque l'affinité de ce système pour le glucose est plus faible que celle du PTS. Cependant l'étude de mutants du PTS^{man} a révélé l'importance de ces transporteurs qui dans de telles conditions sont capables d'assurer la croissance sur glucose avec un flux d'entrée allant jusqu'à 80 % de ce qu'il aurait été avec un système PTS fonctionnel (Garrigues *et al.* 1997).

Une fois à l'intérieur de la cellule le glucose rejoint la glycolyse au niveau du glucose-6-phosphate (G6P), soit directement s'il entre grâce au PTS, soit après phosphorylation par la glucokinase (GLK) s'il a emprunté une perméase (Fig. I.17). Le sucre ainsi

phosphorylé suit la glycolyse jusqu'au phosphoénolpyruvate (PEP) lui-même transformé en pyruvate par le biais de la pyruvate kinase (PK) ou du système PTS.

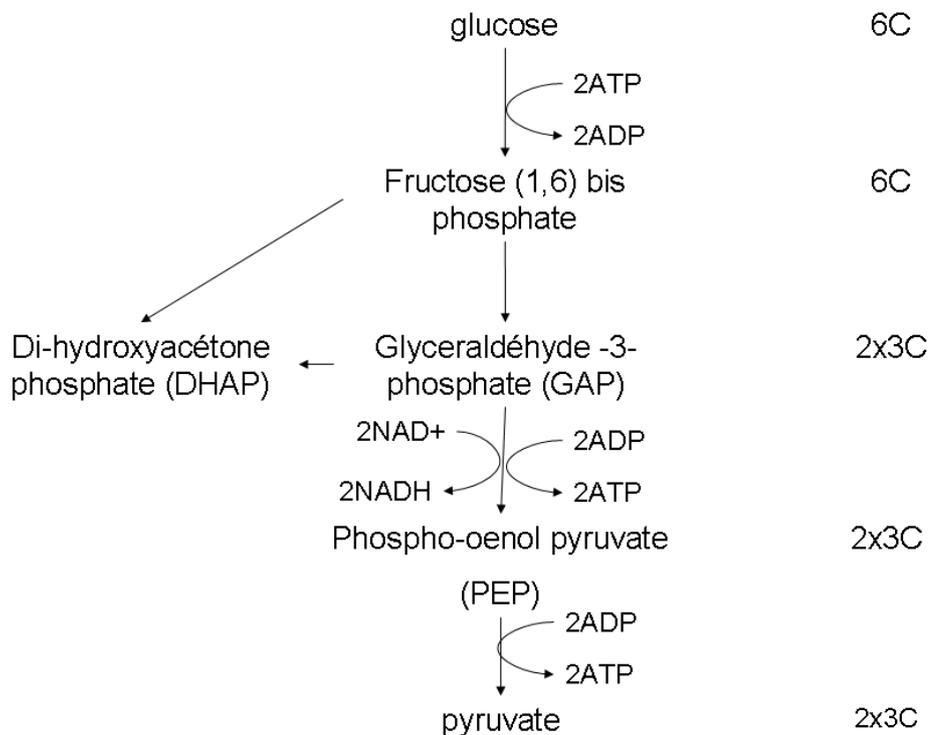


Figure I.17 : voie de la glycolyse (et bilan carbone)

2.2.2.2. Devenir du pyruvate

Métabolisme homolactique

Les lactocoques sont considérés comme des microorganismes homolactiques puisque généralement ils convertissent plus de 90 % du pyruvate produit en acide lactique. Le pyruvate est un intermédiaire métabolique clé chez les bactéries lactiques et d'ailleurs sa production ainsi que sa conversion sont l'objet d'une régulation fine. La glycolyse génère de l'ATP qui est indispensable aux voies de biosynthèse, mais aussi du NADH. Chez les organismes « respirant », le recyclage de ce coenzyme est réalisé grâce à

l'activité respiratoire. Les lactocoques sont anaérobies et dépourvus de chaîne respiratoire, la réduction du NADH pourra donc être effectuée par la lactate déshydrogénase (LDH) qui transforme le pyruvate en acide lactique (Figure I.18).

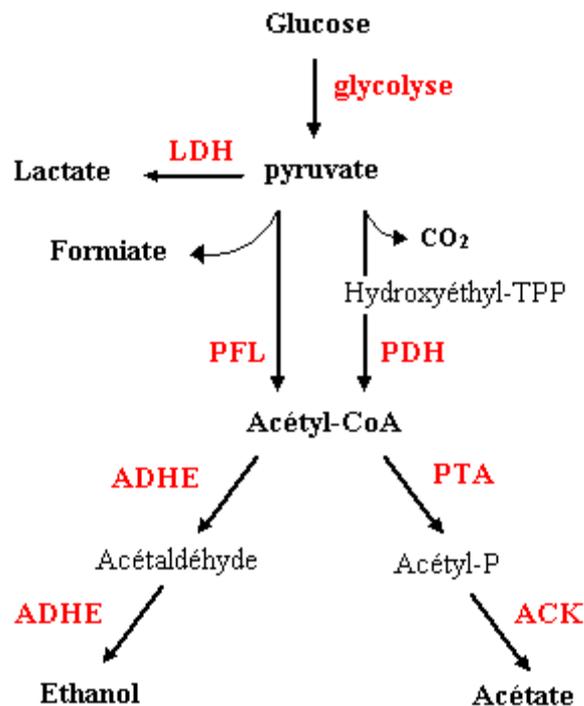


Figure I.18 : Métabolisme du pyruvate. LDH : lactate deshydrogénase, PFL : pyruvate formiate lyase, PDH : pyruvate deshydrogénase, PTA : phosphotransacétylase, ACK : acétate kinase, ADHE : alcool deshydrogénase.

Métabolisme mixte

Dans certaines conditions (certaines sources de carbone, limitation carbone, milieux appauvris ...) le métabolisme de *Lactococcus lactis* dévie vers la production de produits dérivés du pyruvate autres que le lactate : acide acétique, éthanol, acide formique et/ou CO₂ selon l'environnement gazeux (Cocaign-Bousquet *et al.* 1996). Au cours du métabolisme mixte, les sucres qui empruntent la glycolyse continuent à générer du pyruvate mais le flux à travers la LDH est fortement diminué. Le pyruvate est alors métabolisé par la pyruvate formiate lyase (PFL) ou la pyruvate deshydrogénase (PDH) en acétyl-CoA avec formation respectivement de formiate ou de CO₂ (Fig. I.18). En

condition anaérobie l'activité PFL est détectée ce qui n'est pas le cas en condition d'aérobiose car cette enzyme est très sensible à l'oxygène (Abbe *et al.* 1982; Takahashi *et al.* 1982). Cette enzyme qui transforme le pyruvate en formiate et acétyl-CoA est également inhibée par le glycéraldéhyde-3-phosphate (GAP) et le dihydroxyacétone-phosphate (DHAP), intermédiaires glycolytiques (Takahashi *et al.* 1982). La réaction de décarboxylation du pyruvate est réalisée par la PDH qui permet de générer outre du CO₂ et de l'acétyl-CoA, un autre coenzyme réduit. Chez *Lactococcus lactis* cette enzyme est faiblement exprimée et rapidement inactivée en anaérobiose et semble sensible au potentiel redox ainsi qu'au ratio NADH/NAD (Snoep *et al.* 1992).

La métabolisation de l'acétyl-CoA implique soit la phosphotransacétylase (PTA) et l'acétate kinase (ACK) avec formation d'acétate, soit l'alcool déshydrogénase (ADHE) avec production d'éthanol. Si la voie de l'acétate permet la synthèse d'une molécule supplémentaire d'ATP, celle de l'éthanol permet le recyclage de deux molécules de NADH. Ainsi lorsque la PFL est employée, un équilibre réducteur peut être obtenu par la répartition équimolaire entre la production d'acétate et d'éthanol permettant ainsi également un gain net en ATP de 50 % par rapport au métabolisme homofermentaire.

2.2.2.3. Shift métabolique chez *L. lactis* NCDO 2118

Le passage ou le « shift » d'un métabolisme homolactique vers un métabolisme mixte est causé par une diminution du flux glycolytique, c'est-à-dire par une diminution de la vitesse de consommation du sucre. En effet, il a été constaté qu'en condition d'excès de substrat carboné, le métabolisme de *L. lactis* est généralement homolactique. Si les bactéries sont placées dans des conditions de limitation, par exemple en chemostat, leur métabolisme dérive alors vers un métabolisme mixte lorsque le taux de dilution diminue. Les travaux effectués par (Thomas *et al.* 1979) rapportent que le métabolisme de *Streptococcus lactis* (ancien nom de *L. lactis*) est strictement homolactique à fort taux de dilution (95 % du pyruvate est converti en lactate à 0.8 h⁻¹). A faible taux (0.1 h⁻¹) moins de 1 % du pyruvate est converti en lactate.

Le métabolisme mixte ne dépend pas uniquement du taux de substrat dans le milieu, mais aussi de la nature du substrat. Ainsi, il a été constaté que la souche *L. lactis* NCDO

2118 cultivée en culture discontinue sur milieu synthétique présente un métabolisme homolactique pour des substrats permettant une croissance rapide tels que le glucose. En présence de sucres à croissance faible (lactose, galactose, maltose), le métabolisme de *L. lactis* NCDO 2118 se révèle être mixte. Cette diversité de métabolisme semble être liée à la valeur du flux glycolytique (Garrigues *et al.* 1996).

En effet, la valeur du flux glycolytique conditionne le ratio NADH/NAD qui constitue l'élément premier d'un enchaînement de régulations subtiles. Un fort ratio NADH/NAD va favoriser l'activité de la LDH. De plus, un fort flux glycolytique entraîne une concentration élevée de GAP et DHAP inhibiteurs de la PFL, et de pyruvate. La conjugaison de ces éléments résulte en une orientation du pyruvate vers la formation de lactate. En cas de diminution du flux glycolytique, la concentration de GAP et DHAP diminue, levant ainsi l'inhibition de la PFL. Il en est de même du ratio NADH/NAD, qui active moins la LDH. De plus, la concentration en pyruvate étant plus faible, l'activité LDH diminue, ayant pour conséquence un métabolisme mixte.

La capacité de ces bactéries à orienter leur métabolisme selon les flux glycolytiques perçus les rend particulièrement adaptées à l'étude de l'effet du mélange sur le métabolisme microbien. En effet, un shift métabolique sur glucose est la preuve concrète d'une limitation en substrat. De plus, contrairement à des bactéries telles que *E. coli* très utilisée dans ce type d'études, à cause de leur métabolisme d'over flow, les bactéries lactiques ne consomment pas les produits issus de leur fermentation. Ceci permet donc de connaître avec plus de précision à quel moment ces bactéries se sont retrouvées en limitation de substrat.

2.2.3. Les mécanismes de réponses au stress chez *L. lactis*

Lactococcus lactis, que ce soit dans son habitat naturel (plantes) ou lors de sa mise en œuvre dans les processus industriels, doit faire face à de multiples stress nutritionnels ou physico-chimiques (thermique, oxydatif, acide, osmotique) parfois concomitants (Sanders *et al.* 1999; Stuart *et al.* 1999).

Les mécanismes de perception du stress, essentiels pour que la cellule puisse se protéger avant que les effets de ce stress ne soient irréversibles, sont encore peu connus chez *Lactococcus lactis*, mais semblent se faire chez les autres bactéries, soit au niveau membranaire soit au niveau du cytoplasme (Rallu *et al.* 2000).

Face aux différents effets du stress, les bactéries disposent de plusieurs types de réaction qui se répartissent en trois catégories (Rallu, 2000). La fuite consiste, pour les bactéries capables de motilité, à rechercher des conditions plus favorables à la croissance, mais *Lactococcus lactis* qui est dépourvu de flagelle ne peut pas utiliser cette tactique. Le refus a pour but de diminuer l'intensité du stress, par exemple en utilisant une autre source de nutriment lorsqu'elle est épuisée. Enfin la résistance devient nécessaire lorsque le stress est persistant et/ou dommageable pour les constituants cellulaires. Elle peut être acquise par une modification irréversible du matériel génétique (mutation, remaniement), conduisant à une meilleure tolérance aux conditions environnementales, ou par l'induction de systèmes de protection et de lutte contre le stress ou de réparation contre les dommages causés.

L'enveloppe cellulaire est la première cible des stress physicochimiques. Il semble que ce soit également le cas pour le stress acide puisque chez *S. mutans* l'adaptation à l'acidification du milieu implique un enrichissement de la membrane en acides gras mono-insaturés à longue chaîne (Quivey *et al.* 2000). Parmi les autres réponses au stress acide, on peut citer l'activation des voies d'expulsion de protons, la production de composés basiques ou la décarboxylation des fonctions acides. Les cellules peuvent également présenter une réponse adaptative : la capacité de répondre à un stress est alors acquise au cours d'un conditionnement cellulaire. La réponse adaptative se caractérise en général par l'induction de certaines protéines nécessaires à l'acquisition de la résistance au stress. Hartke *et al.* (1996) ont identifié 33 polypeptides induits par un stress acide dont 9 protéines de choc thermique (HSP), 4 communes avec le stress UV et 2 communes avec le stress oxydatif.

Lactococcus lactis semble répondre au stress causé par une diminution de la quantité de substrat carboné disponible par un shift métabolique comme détaillé précédemment. Il

ne semble pas qu'une limitation en substrat induise la production de transporteur spécifique ou l'augmentation de l'activité du système PTS. En effet, (Christian Vadeboncoeur and Lortie 2000; Vadeboncoeur *et al.* 2000) ne rapportent que des exemples de diminution de l'activité et de la quantité d'enzymes du système PTS conséquente à l'appauvrissement du milieu. Cependant, il s'agit majoritairement d'expériences issues de cultures batch, au cours desquelles la diminution de la quantité de substrat disponible s'accompagne de l'apparition de conditions environnementales différentes (pH, accumulation de métabolites). La disparition du glucose lève la répression catabolique, ce qui autorise la synthèse d'enzymes spécifiques au transport d'autres sucres s'ils sont disponibles (Redon *et al.* 2005a; 2005b).

2.2.4. EPS et PS chez *L. lactis*

2.2.4.1. Quelques définitions

Chez les bactéries lactiques, les polysaccharides peuvent être classés selon leur localisation par rapport à la cellule (Cerning *et al.* 1992). On distingue ainsi :

- les polysaccharides intracellulaires, dans le cytosol, qui constituent une source d'énergie,
- les polysaccharides de la paroi, tels les peptidoglycanes et les acides teichoïques,
- les exopolysaccharides, synthétisés et excrétés hors de la cellule. Parmi ceux-ci, on peut distinguer les polysaccharides extracellulaires, qui ne restent pas liés à la cellule mais sont excrétés dans le milieu et les polysaccharides constitutifs d'une capsule épaisse ou d'une pellicule autour de la paroi bactérienne.

Techniquement, cette différenciation par la localisation entre polysaccharides (PS) et exopolysaccharides (EPS) peut s'avérer délicate : lors du prélèvement et du traitement des échantillons, les EPS de la capsule, ou les EPS faiblement liés peuvent être séparés de la cellule et être ainsi assimilés à tort à des EPS excrétés. Certaines bactéries

lactiques sont capables de synthétiser deux formes de polysaccharides extracellulaires et là encore, la distinction entre les capsules et les polysaccharides libérés dans le milieu est difficile (Cerning 1995; Cerning *et al.* 1992). De plus, l'extraction et la quantification des PS et EPS restent délicates ; si différents protocoles d'extraction sont présentés dans la littérature, la quantification ultérieure dépend fortement de la méthode choisie. La quantification est réalisée selon des méthodes indirectes, souvent colorimétriques, et les résultats, exprimés en équivalent glucose, sont fortement dépendants de la bonne mise en œuvre de l'extraction (pour une revue des protocoles d'extraction, voir (Ruas-Madiedo and de los Reyes-Gavilan 2005). La mesure de la masse sèche est une alternative prometteuse quoique non dénuée d'aléas (nécessité de laver et de déprotéiniser l'échantillon).

Si la synthèse de polysaccharide sous forme de capsule est très répandue chez les bactéries pathogènes (propriétés d'adhérence, facteur de virulence, protection contre la réponse immunitaire) et chez les bactéries Gram-, certaines bactéries lactiques semblent être pourvues d'une pellicule polysaccharidique (Chapot-Chartier *et al.* 2010). Cette pellicule, dont la production est codée par des gènes chromosomiques, n'est pas une capsule et se différencie des PS de paroi. Il s'agit d'une fine couche externe, constituée de PS contenant des résidus glucose, N-acétyl-glucosamine, rhamnose et galactose liés par des ponts phospho-diesters. Cette pellicule, observable en microscopie à transmission électronique, confère aux cellules une surface plus lisse que celle des mutants non pelliculés. De plus, ces mutants apparaissent sous forme de longues chaînes. Ce défaut de séparation pourrait être directement lié à l'absence de pellicule, ou en être une conséquence : l'absence de pellicule permettant la fuite des enzymes responsables de la séparation des cellules filles.

2.2.4.2. Rôle des EPS et intérêt

Comme chez les autres bactéries, les EPS ont un rôle protecteur pour le microorganisme vis à vis de la dessiccation, de la phagocytose, des antibiotiques et des molécules toxiques (Kleerebezem *et al.* 1999), et protègent de l'attaque phagique en limitant l'adhésion des phages à la surface des cellules. Cependant, ce dernier point semble

controversé, certains auteurs arguant du fait que les EPS pourraient fournir des sites de reconnaissance et d'attache spécifiques pour les phages.

D'un point de vue technologique, la production d'EPS par les bactéries lactiques présente un intérêt industriel car elle confère au produit ses propriétés rhéologiques (texturation, épaississement, stabilisation) et permet la production de produits « innovants » (Doublier *et al.* (2000) interaction protéines – polysaccharides).

Enfin, les EPS bactériens, en particulier ceux des bactéries lactiques, ont récemment été l'objet d'une attention particulière en raison de leurs vertus prébiotiques (Ruas-Madiedo *et al.* 2002).

2.2.4.3. Structure et composition des exopolysaccharides.

Les exopolysaccharides des bactéries lactiques peuvent être subdivisés en deux groupes : homo-polysaccharides ou hétéro-polysaccharides (Degeest and de Vuyst 1999). La masse moléculaire apparente des EPS produits par les bactéries lactiques est comprise entre 4.0×10^4 et 6.0×10^6 Da.

- Parmi les homo-polysaccharides, on distingue deux principaux groupes ; Le premier groupe consiste en alpha-glucanes, composés de résidus de glucose liés en α -1,6 et α -1,3. Parmi ceux-ci, on peut citer les dextrans, produits à partir de saccharose par *Leuconostoc mesenteroides*, et les mutanes, synthétisés par *Streptococcus mutans* par exemple. Les fructanes, formant le second groupe, sont généralement composés de molécules de fructose, comme les levanes synthétisés par *S. salivarius* (Cerning 1990; De Vuyst *et al.* 1998).
- Les hétéro-polysaccharides du troisième groupe sont synthétisés par plusieurs bactéries lactiques thermophiles (*S. thermophilus*, *Lb. delbrueckii ssp bulgaricus*) et mésophiles (*L. lactis ssp lactis* et *L. lactis ssp cremoris*). Comme leur nom l'indique, ces macromolécules sont composées de différents résidus osidiques parmi lesquels sont présents en majorité (80 – 90 %) glucose et galactose.

D'autres monomères, bien qu'en faible quantité, sont fréquemment rencontrés dans les hétéro-polysaccharides : le rhamnose (Cerning *et al.* 1986; Grobben *et al.* 1995; Nakajima *et al.* 1992), le mannose (Petit *et al.* 1991), le fructose (Manca de Nadra *et al.*, 1985 rapporté par Cerning), l'arabinose et le xylose, ainsi que des dérivés de sucres tels que la N-acétyl-galactosamine (Doco *et al.* 1990; Petit *et al.* 1991) et la N-acétyl-glucosamine (Cerning 1995).

En quantités infimes, sont également présents des composés non glucidiques comme des galactosamines, des acides neuraminiques et des protéines. Nakajima *et al.*, 1990 mentionnent également des phospho-polysaccharides. Leur présence explique pourquoi certaines souches peuvent synthétiser de façon simultanée deux types d'EPS de charges différentes : l'un est neutre alors que l'autre est chargé négativement car possédant un groupement phosphate (Kitazawa *et al.* 1998; Laws *et al.* 2001; Marshall *et al.* 1995).

Les propriétés fonctionnelles des EPS, notamment en terme de rhéologie et de pouvoir stabilisant, sont dépendantes de la structure tridimensionnelle de la molécule. De cette conformation va dépendre la capacité à former des liaisons ou à entrer en interaction avec d'autres molécules en découvrant ou masquant certaines fonctions ou groupements chimiques. Cette conformation secondaire est néanmoins très dépendante de la structure primaire, et donc de la composition de la macromolécule. La présence de groupement chargés (groupements phosphates) peut conférer aux EPS des propriétés fonctionnelles et donc une structure secondaire dépendantes du pH.

2.2.4.4. Production d'EPS par les bactéries lactiques / voies de synthèse

La production d'EPS par les bactéries lactiques peut être codée au niveau du chromosome ou être apportée par un plasmide (cas de *L. lactis ssp lactis* et des bactéries lactiques mésophiles de manière générale) (vanKranenburg *et al.* 1997). Quoi qu'il en soit, l'apparition de phénotypes mucoïde (ropy, slime) est très aléatoire (mutation, nombreux repiquage, conditions de culture).

Si la synthèse de certains homo-polysaccharides peut s'effectuer à l'extérieur de la cellule (Cerning 1994), les EPS sont généralement élaborés au niveau de la membrane

plasmique. Les hétéro-polysaccharides sont synthétisés par la polymérisation d'unités répétitives produites dans le cytoplasme. Ces unités répétitives sont constituées d'un hexose phosphorylé (hexose-1-P) et activé par association avec un nucléotide. C'est l'activation qui permet la polymérisation du motif.

Quelle que soit la composition finale du polysaccharide en unités osidiques, il semble que le glucose-1-P soit le précurseur de toutes les unités osidiques (Figure I.19). La composition en monomères dépend donc des sucres nucléotidiques présents et disponibles et de l'activité des glycosyl transférases, responsables de l'allongement de la chaîne polymérisée.

Le polysaccharide est ensuite exporté hors de la cellule par translocation où il est alors séparé du transporteur, puis relargué dans le milieu (EPS) ou ancré à la membrane (capsules).

La synthèse d'EPS est coûteuse en énergie (phosphorylation des hexoses puis transport) ; les bactéries lactiques ne produisant que peu d'énergie par comparaison à d'autres bactéries aérobies, on peut de manière générale s'attendre à une production plus faible d'EPS. De plus, on note une compétition entre la synthèse d'EPS et la croissance (Ramos *et al.* 2001). Cependant, la synthèse d'EPS n'est pas dépendante de la croissance, une production d'EPS pouvant être observée pour des cultures en phase stationnaire (Looijesteijn and Hugenholtz 1999).

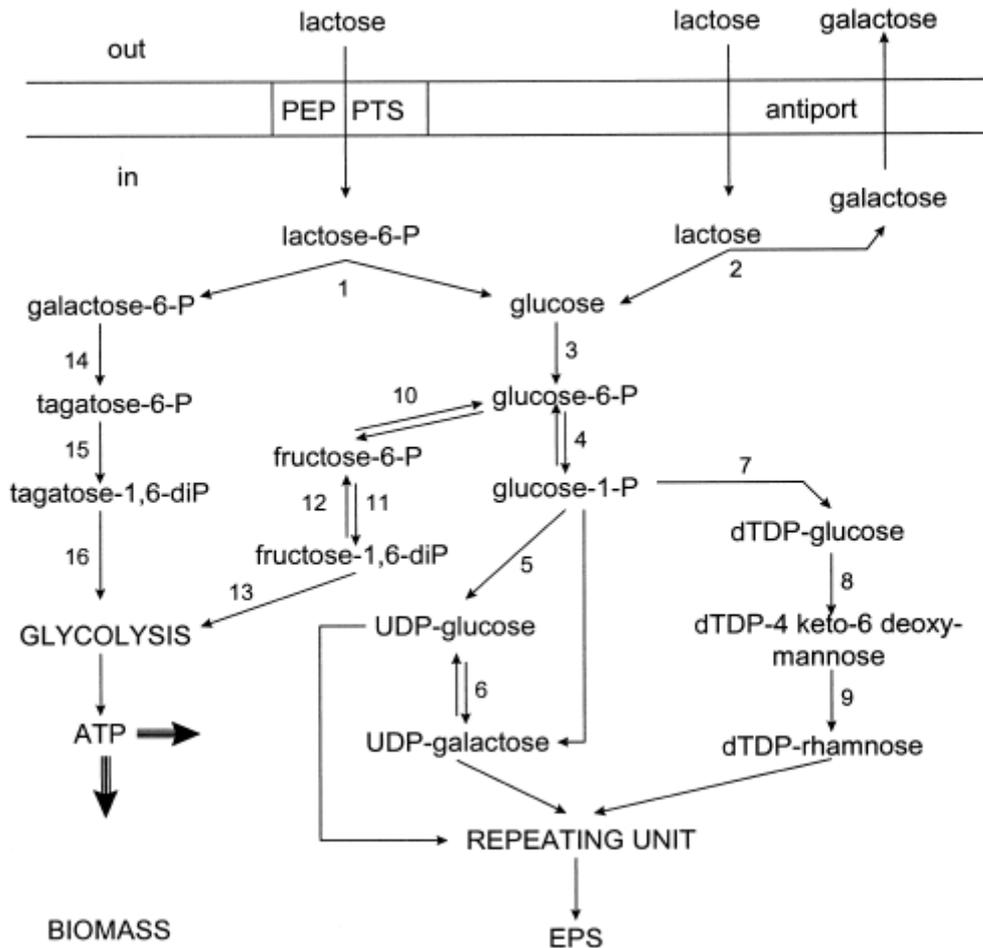


Figure I.19, d'après de Vuyst and Degeest, 1999 : représentation schématique des voies métaboliques mettant en jeu catabolisme du lactose et synthèse d'EPS chez *Lactococcus lactis* fermentant le lactose (transport du lactose via un système spécifique de phosphotransférase) et les souches *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*, galactose-negative (transport du lactose via un système d'antiport lactose/galactose). Chez les souches fermentant le glucose, celui-ci est transporté à l'intérieur de la cellule par le système PTS et entre dans les voies métaboliques sous forme phosphorylée. Les enzymes impliquées sont numérotées comme suit : 1, phospho-L-galactosidase; 2, L-galactosidase; 3, glucokinase; 4, phosphoglucomutase; 5, UDP-glucose pyrophosphorylase; 6, UDP-galactose-4-epimerase; 7, dTDP-glucose pyrophosphorylase; 8, déhydratase; 9, epimerase reductase; 10, phosphoglucose isomerase; 11, 6-phosphofruktokinase; 12, fructose-1,6-bisphosphatase; 13, fructose-1,6-diphosphate aldolase; 14, galactose 6-phosphate isomerase; 15, tagatose 6-phosphate kinase; 16, tagatose-1,6-diphosphatealdolase.

Parmi les facteurs influençant la synthèse d'EPS par les bactéries lactiques, on peut citer bien sûr la composition chimique du milieu de culture, mais aussi le pH (valeur optimale autour de 6.0, (De Vuyst *et al.* 1998; Mozzi *et al.* 1996 ; Cerning 1995), la température, la pression partielle d'oxygène et la durée d'incubation (Gancel et Novel, 1994a, b). Ces paramètres influencent la production d'EPS de manière qualitative et quantitative, mais

aussi sa dégradation ultérieure. Outre les paramètres liés au contrôle du procédé comme décrits ci-dessus, le substrat a une importance cruciale.

Looijesteijn *et al.* (2000) ont étudié l'influence de la limitation en substrat sur la production d'EPS : si la culture est limitée en glucose, on observe une diminution de la masse molaire et de la viscosité intrinsèque des EPS produits par *L. lactis ssp cremoris*. Le ratio azote/carbone est lui aussi critique pour la production d'EPS. Si certaines souches voient leur rendement EPS augmenter dans le cas d'une limitation en substrat azoté, il est dans la plupart des cas essentiel de contrôler ce ratio pour une production optimale (De Vuyst *et al.* 1998).

Les caractéristiques quantitatives et qualitatives des EPS produits dépendent bien évidemment de la souche utilisée. Le rendement en EPS (généralement autour de 0,6 g/L pour les souches productrices, pouvant dans certains cas aller jusqu'à 1,2 g/L) et leur composition est fortement dépendante de la composition du milieu de culture pour une souche donnée. Si les premières constatations liées à la production d'EPS ont eu lieu sur des cultures utilisant du lait comme substrat, il a été constaté que l'ajout de glucose dans le milieu résultait en une augmentation du nombre de résidus glucose dans les EPS produits et la disparition de résidus mannose par comparaison avec une production sur milieu synthétique.

La production d'EPS par des bactéries lactiques dépend de la phase de croissance et des conditions de culture de manière générale. Ainsi, les souches mésophiles verront leur rendement s'améliorer dans des conditions non optimales de croissance (température, pH) et en fin de phase exponentielle de croissance.

2.2.5. Propriétés d'adhésion

2.2.5.1. Composition de la paroi et état de surface, propriétés fonctionnelles

Comme évoqué précédemment, *L. lactis* appartient au groupe des Gram +. Pour cette catégorie bactérienne, le contenu cellulaire est contenu dans une enveloppe (membrane plasmique et paroi). La paroi est constituée de peptidoglycane, principalement composé

de N-acétyl-glucosamine β (1 \rightarrow 4)-N-acétyl-muramic acide sur lequel sont insérés protéines, acides teichoïques, polysaccharides et éventuellement une couche S (empilement de protéines/ voir la figures I.20). Cette enveloppe constitue un réseau très ramifié. Le peptidoglycane est d'abord formé à l'intérieur, avant d'être repoussé vers l'extérieur par le peptidoglycane nouvellement formé.

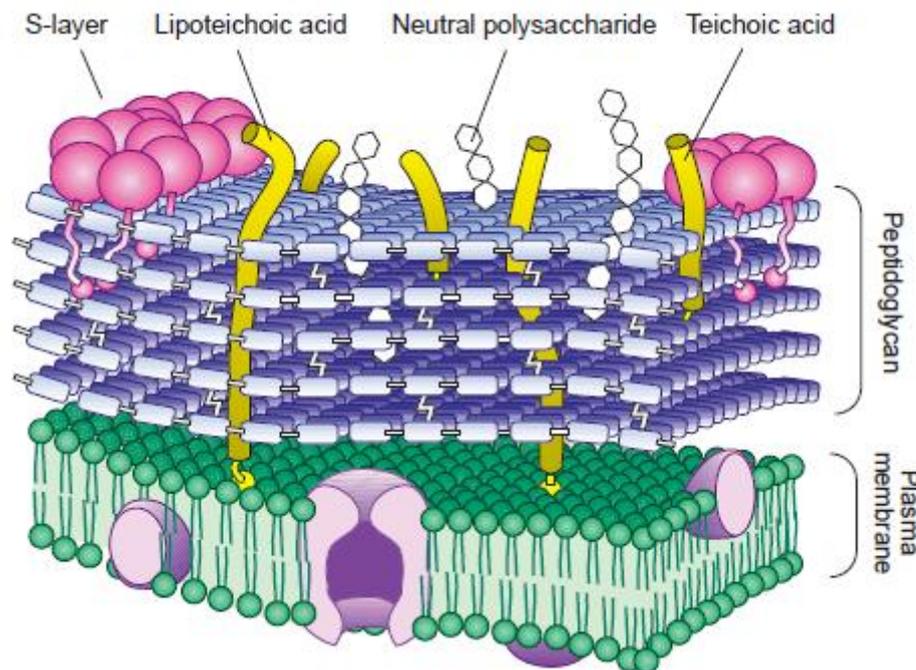


Figure I.20 : schéma de la paroi des Gram + , membrane plasmique et peptidoglycane, d'après Delcour *et al.* 1999.

Les acides teichoïques peuvent représenter jusqu'à 50 % (W/W) de la paroi bactérienne. Ils sont généralement imbriqués dans le peptidoglycane et confèrent à la paroi une bonne partie de sa fonctionnalité. Entre autres, le caractère hydrophobe de l'enveloppe cellulaire est apporté par les acides lipoteichoïques, ce caractère étant étroitement lié avec les propriétés d'adhésion de la cellule.

Les polysaccharides sont des composés ubiquitaires de la paroi cellulaire. Ils sont parfois appelés polysaccharides neutres, en opposition aux polysaccharides des acides teichoïques, chargés négativement, bien qu'en réalité, leur association avec des composés anioniques comme le glycérol-phosphate peuvent les rendre chargés (Coyette & Ghuyssen 1970; Kojima *et al.* 1985b, 1986 rapportés par Delcour *et al.* (1999).

Il convient de distinguer les polysaccharides de la capsule, qui forment une couche extérieure épaisse, associée ou liée de façon covalente à la paroi et les polysaccharides inclus ou associés au peptidoglycane. Ce sont des structures compliquées, impliquant des monomères de nature différentes, de nombreux types de liaisons ou ramifications et le plus souvent, la seule information disponible est le ratio entre les différents monomères, dans lesquels le rhamnose est très souvent présent.

2.2.5.2. Facteurs favorisant l'adhésion chez *L. lactis*

L'organisation structurelle de la paroi cellulaire et les propriétés physico-chimiques des constituants de la surface (conformation des macromolécules en particulier) déterminent les propriétés générales de la surface des cellules vis-à-vis de l'agrégation et de l'adhésion (Schär-Zammaretti and Ubbink 2003).

Par exemple, la co-agrégation entre des polysaccharides de paroi est responsable de la formation de la plaque dentaire par des streptocoques oraux (Whittaker *et al.* 1996). Des structures permettant une co-agrégation ont été aussi révélées chez *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium longum* et *Bifidobacterium catenulatum* (Nagaoka *et al.* 1990, 1995 et 1996 rapporté par (Schär-Zammaretti and Ubbink 2003).

Comme mentionné précédemment, le peptidoglycane est d'abord formé à l'intérieur, avant d'être repoussé vers l'extérieur. La paroi cellulaire des Gram + augmente donc en surface et en épaisseur au cours de la croissance. L'augmentation de la surface est limitée par la division cellulaire, alors que le maintien d'une épaisseur correcte est assuré par un subtil équilibre entre formation de peptidoglycane neuf et un processus ressemblant à la desquamation (Delcour *et al.* 1999) permettant sa dégradation, rôle assuré par les autolysines. De ce fait, les bactéries lactiques sont très sensibles à l'autolyse, qui peut résulter d'une rupture de cet équilibre. Le peptidoglycane est dégradé par les autolysines (AcmA muramidase pour *L. lactis ssp cremoris*) pour permettre la division cellulaire. Ainsi, une souche dépourvue d'autolysine se présentera plutôt sous la forme de longues chaînes. D'autre part, la rupture du peptidoglycane est un facteur favorisant l'adhésion bactérienne aux surfaces (Mercier *et al.* 2002).

Giaouris *et al.* (2009), à travers l'étude de l'hydrophobicité de surface, de la charge de Lewis et de la charge globale, ont montré que pour 50 souches de *L. lactis* de différentes origines, l'adhésion est fortement corrélée à l'hydrophobicité de surface et à la charge globale. Les souches au caractère hydrophobe prononcé ou de charge globale faible ont ainsi la plus forte propension à adhérer aux surfaces. Il convient ici de remarquer que la faible charge apparente de certaines cellules peut en réalité être la conséquence du masquage de ces charges par d'autres biomolécules (Mozes and Rouxhet 1987). Giaouris *et al.* ont, en outre, montré une très forte variabilité en ce qui concerne les propriétés de surface des souches étudiées, variabilité apparemment sans aucun lien avec l'origine ou la phylogénie de la souche étudiée. D'après ces mêmes auteurs, les 2 souches utilisées dans notre étude (*L. lactis* ssp *lactis* NCDO 2118 et *L. lactis* ssp *lactis* IL1403) possèdent un caractère hydrophile marqué.

2.2.5.3. Adhésion, biofilm, et croissance immobilisée

Il existe différents exemples de croissance immobilisée pour les lactocoques : outre la culture en boîte de Pétri, les bactéries peuvent être emprisonnées dans une matrice fromagère ou encore adopter une mode de croissance en biofilm.

La croissance non planctonique des lactocoques a été étudiée par Ibrahim *et al.*, (2004). Ces auteurs déduisent que la distribution limitée dans le milieu, la croissance lente, associés à un mélange entre cellules en phases stationnaire et exponentielle, constituent des éléments caractéristiques de la croissance sessile. Ils notent au passage que l'immobilisation peut être à l'origine de l'instabilité génétique de la culture (les bactéries croissant en biofilm expriment des gènes que les bactéries planctoniques ne transcrivent pas). Les caractéristiques de l'association immobile dépendent de la composition moléculaire de la paroi cellulaire :

- La rupture du peptidoglycane, qui peut être induite non seulement par des peptidoglycane hydrolases, mais aussi suite à des défauts de la machinerie de synthèse du peptidoglycane (mutation du gène *ponA*), est importante dans la croissance sous forme immobilisée des lactocoques (adhésion, sédimentation, formation de chaînes).

- les protéines ancrées à la paroi cellulaire jouent un rôle positif dans l'adhésion de *L. lactis*.

Le plus souvent, le polymère qui lie les cellules au sein d'un biofilm est un polysaccharide, parfois le peptidoglycane. Le terme biofilm se réfère à des cellules adhérentes à une surface, cependant, les agrégats, ne nécessitant pas d'adhésion en premier lieu, présentent des caractéristiques similaires aux biofilms dans leur composition. L'adhésion est une première étape à la formation de biofilm, nécessaire mais non suffisante pour créer un biofilm. Deux molécules de la paroi sont reconnues impliquées dans le phénomène d'adhésion chez *Lactococcus*: PrtP et AcmA, cette dernière hydrolysant le peptidoglycane et possédant des propriétés adhésives intrinsèques.

Park *et al.* (1999) ont remarqué la formation d'agrégats filamenteux et floculant pour des cultures de *L. lactis ssp. lactis* (phénotype non défini) cultivées sans agitation, dans un bouillon MRS ou bouillon tryptone soja additionné de Tween 80, un surfactant. L'observation de ces agrégats révèle une structure filamenteuse au microscope.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES D'ETUDE

Les conditions hydrodynamiques au sein d'un bioréacteur sont la source de multiples contraintes. Outre les stress mécaniques et chimiques, la structure même de l'écoulement peut déclencher une réponse chez les microorganismes. En ce qui concerne l'aspect chimique, la théorie de la turbulence permet d'associer à chaque mécanisme de mélange une échelle caractéristique de temps et de taille. Il en est de même pour les niveaux d'efforts exercés sur les cellules par les contraintes mécaniques. Cependant, si la plupart des auteurs s'accordent à imputer la dégradation du comportement de la biomasse à un effet de la turbulence au sens large, il reste difficile d'identifier le mécanisme critique.

La réponse bactérienne quant à elle est complexe et intervient à différents niveaux : du génome à la manifestation phénotypique. Cette réponse n'est toutefois pas toujours instantanée et fait appel à des mécanismes d'adaptation dont les temps caractéristiques sont très variables. Aussi, l'apparition d'une réponse à un stress donné dépend du rapport entre le temps caractéristique d'exposition à une contrainte (incluant durée et fréquence) et le temps de relaxation de la réponse biologique, qui peut être immédiate ou au contraire, induite.

Si les progrès de la CFD permettent de calculer quelles sont ces contraintes au plus près des cellules, il reste difficile d'établir des modèles fiables couplant réponse biologique et modèle hydrodynamique, indiquant probablement un défaut de compréhension des mécanismes locaux d'interaction. Une analyse par comparaison des échelles de temps et de taille reste néanmoins un outil d'analyse intéressant pour la prédiction de ces interactions et fera l'objet du chapitre II suivant.

En termes d'interactions entre contraintes hydrodynamiques et cultures bactériennes, de multiples références au mélange sont disponibles dans la littérature, les contraintes d'origine mécanique semblant moins critiques. C'est donc en privilégiant l'approche 'mélange' que le choix des outils a été réalisé. Ainsi, *L. lactis* a-t'il été choisi comme outil biologique pour sa capacité à présenter un shift métabolique en fonction du flux de substrat reçu, pour sa croissance rapide et pour le fait qu'il n'est pas nécessaire d'injecter un débit gazeux lors des cultures, simplifiant ainsi l'étude de l'écoulement.

L'étude des effets des contraintes hydrodynamiques à l'échelle cellulaire requiert également de s'affranchir de tout effet de mélange à l'échelle macroscopique. Ce dernier, généralement limitant, masque les effets de micromélange. Cette condition est satisfaite lors de cultures de type batch, non alimentées, où la dispersion de substrat à l'échelle du réacteur est réalisée avant l'inoculation.

Enfin, dans un objectif de simplification du problème, il convient d'éviter de travailler avec des contraintes trop fluctuantes, pour se concentrer sur l'effet de l'intensité des stress sur le comportement bactérien. D'où le choix du réacteur Couette qui présente le double avantage de présenter un écoulement homogène en terme de dissipation, et, en

fonction de son mode d'opération, organisé. En effet, s'il semble que les cellules bactériennes ne soient que très peu affectées par les contraintes mécaniques, l'apparition de *streamers* dans certains écoulements organisés mérite qu'on s'attache à ce point dans notre étude.

Le chapitre III présentera des résultats de culture de *Lactococcus lactis* dans un réacteur Couette et fera état de l'apparition d'un phénotype atypique. Le lien entre les conditions particulières d'écoulement dans le réacteur Couette, appuyé par des résultats de simulations numériques permettant de mieux caractériser les stress locaux, et cette manifestation du phénotype, sera discuté dans le chapitre IV.

ANALYSE DU COUPLAGE MELANGE – REACTION ET ETUDE DE CAS SUR DES CULTURES DE *L. LACTIS* NCDO 2118 EN REACTEUR COUETTE

Ce chapitre s'intéresse aux effets du mélange aux petites échelles sur des cultures de *Lactococcus lactis* NCDO 2118 réalisées en batch. Afin de construire une expérience modèle, les cellules sont cultivées dans un réacteur Couette dans lequel deux vitesses de rotation permettent d'obtenir deux conditions de mélange différentes. En ce qui concerne l'outil biologique de caractérisation des effets de mélange, c'est l'apparition d'un shift métabolique qui est testée. Ce shift est caractérisé par la production de formiate au détriment de la production de lactate. Il est observé en cas de diminution du flux glycolytique, notamment dans le cas d'une limitation de la vitesse de consommation du substrat carboné. Cette production est en revanche inhibée en présence d'oxygène.

Les résultats sont analysés via la production de formiate (vitesse spécifique de production, rendement de conversion du glucose en formiate) qui renseigne sur le flux de glucose assimilé et l'apport d'oxygène. On montre que si les différentes conditions de mélange n'entraînent pas de modification significative du point de vue de la cellule en termes de flux de substrat, il n'en est pas de même pour l'apport d'oxygène. En effet, nos résultats indiquent que les meilleures conditions de micromélange conduisent à une diminution significative de la production de formiate. Cette problématique de l'incorporation rapide de l'oxygène est reliée aux expériences conduites par Dunlop *et al.* dans des réacteurs de type *scale-down*. Un mélange rapide conduit à une plus grande proportion de cellules subissant des concentrations critiques (entraînant un métabolisme *overflow* pour Dunlop et ses collaborateurs ou une inhibition de la production de formiate dans cette présente étude). La dernière partie de ce chapitre propose une modélisation de ce phénomène, illustrant ainsi nos expériences, en s'appuyant sur les résultats de Dunlop (Dunlop and Ye 1990).

1 ANALYSE PRELIMINAIRE

1.1. Comparaison des échelles spatio-temporelles et identification des phénomènes limitants

Une méthodologie consistant à comparer les temps de mélange et de réaction, qui permet d'identifier un phénomène limitant, est mise en oeuvre. En ce qui concerne les contraintes d'ordre chimique, il s'agit de comparer les temps caractéristiques du mélange (t_C macromélange ; t_S mésomélange ; t_K micromélange par incorporation et t_D micromélange par diffusion) et de la réaction (t_R). Plusieurs cas de figure sont donc à considérer. L'analyse ci-dessous considère le cas général d'un bioréacteur alimenté.

(i) le temps de macromélange est inférieur à celui de la réaction : $t_C \ll t_R$.

La réaction biologique est lente par rapport aux mécanismes de mélange. Le réacteur est alors en tout point homogène et l'avancement de la réaction est contrôlé par les constantes de réaction uniquement.

(ii) le temps de réaction est compris entre le temps de macromélange et le temps de mésomélange : $t_C > t_R > t_S$

La réaction biologique est rapide par rapport au macromélange. C'est dans ces conditions que des gradients macroscopiques apparaissent à l'échelle du réacteur. Cependant, le mélange à l'échelle moléculaire est réalisé. On est alors en présence d'un réacteur mal macromélangé et bien micromélangé. Au cours de la circulation dans le réacteur, les cellules sont soumises à des fluctuations de concentrations dont la période est de l'ordre du temps de circulation. A l'échelle du réacteur, il y a compétition entre mélange et réaction, la vitesse de réaction résultante est le résultat du couplage entre les opérations de mélange et de réaction.

(iii) le temps de réaction est compris entre le temps de micromélange et le temps de mésomélange : $t_C \gg t_S > t_R > t_K$.

La réaction biologique est rapide face au temps nécessaire pour réduire l'échelle intégrale de concentration. Le temps de macromélange est dans ce cas également supérieur, conduisant à une compartimentation macroscopique du réacteur : zone autour du point d'alimentation concentrée en substrat alors que le reste du réacteur a une concentration tendant vers zéro. Cependant, le temps de réaction étant supérieur au temps de micromélange, il y a une distribution locale de concentration entre les structures tourbillonnaires. Outre les fluctuations de concentration basse fréquence rencontrées lors de la circulation dans le réacteur, les cellules sont soumises à des fluctuations de fréquence plus élevées dans les tourbillons.

(iv) le temps de réaction est inférieur au temps de micromélange par incorporation : $t_c \gg t_k > t_R$.

L'intensité de la réaction biologique peut conduire à l'épuisement en substrat pendant la durée de vie d'un tourbillon. Dans ces conditions, les cellules subissent des fluctuations de concentration dont la période est de l'ordre du temps de micromélange.

Des d'informations complémentaires concernant les méthodologies d'identification et de résolution des problèmes liés au mélange dans ces réacteurs sont disponibles en annexe 5 d'après les travaux de Bourne. Dans le cas d'un bioréacteur alimenté présentant une limitation par le mélange, les cellules sont confrontées à un signal de concentration d'amplitude et d'intensité variable selon le phénomène de mélange limitant considéré. Dans le cas des bioréacteurs industriels, les autres mécanismes de mélange étant rapides par rapport au macromélange, ce dernier est souvent considéré comme le phénomène limitant. L'étude de la compétition mélange-bioréaction est particulièrement complexe car elle nécessite la bonne description de la dynamique du mélange, de la consommation des réactifs par les cellules et de la dynamique d'adaptation des cellules aux fluctuations de concentrations.

Si la définition d'un temps de mélange est relativement aisée une fois les caractéristiques du bioréacteur définies, le temps de la réaction biologique, lui, est plus difficile à identifier. Comme nous l'avons évoqué, celle ci est loin d'être constituée d'une réaction unique, et les temps caractéristiques à considérer sont donc multiples. Si on

considère par exemple le temps de la croissance (de l'ordre de la dizaine de minutes), celui-ci est bien supérieur aux temps de mélange usuellement rencontrés en bioréacteurs. L'application de la méthodologie décrite ci-dessus conduirait donc à affirmer que la croissance est insensible à la qualité du mélange, conclusion à l'opposé de plusieurs exemples tirés de la littérature. En effet, la croissance est le résultat de nombreuses réactions biologiques de temps caractéristique inférieur et donc susceptibles d'interagir avec le mélange. Cet exemple sert à souligner l'importance du choix de la réaction biologique considérée, qui doit être pertinente.

Considérer l'assimilation du substrat comme réaction caractéristique semble une démarche plus prometteuse. Cette étape d'assimilation précède en effet toutes les autres, elle est le lieu du couplage entre la phase liquide et la phase biologique.

Dans le cas d'un réacteur fermé, le problème de la dispersion des substrats n'a plus lieu d'être. De ce fait, il est possible d'étudier les effets de l'hydrodynamique aux petites échelles sur le comportement des cellules. En particulier on peut penser que dans les conditions de culture batch, le réacteur est et restera macroscopiquement homogène cependant que l'agitation à l'échelle locale va conditionner le transport du substrat jusqu'aux cellules.

Afin d'étudier les effets de l'hydrodynamique aux petites échelles, des cultures batch sont réalisées dans un réacteur Couette. Des conditions de micromélange différentes sont obtenues en modulant la puissance dissipée (ε) qui dépend de la vitesse de rotation du cylindre interne. Le choix du microorganisme s'est porté sur la souche bactérienne *Lactococcus lactis* dont la sensibilité aux conditions de mélange peut s'exprimer via un shift métabolique. En présence d'un flux glycolytique faible, le métabolisme devient hétérolactique et conduit à la production d'un composé excrété le formiate. La présence de formiate témoigne de ce shift, et constitue un marqueur de la sensibilité aux conditions de mélange à la microéchelle.

1.2. Echelles de mélange dans le réacteur Couette et effet de la dissipation

Les échelles caractéristiques du mélange à l'échelle cellulaire sont indiquées dans le tableau II.1 ci-dessous. Puisque nous nous plaçons dans une configuration batch afin de nous affranchir des effets de macromélange, les échelles caractéristiques de ce dernier ne sont pas calculées ici. Le régime n'étant pas pleinement turbulent à 20 RPM, le terme d'échelle de Kolmogorov n'est pas rigoureusement exact dans ce cas, mais donné à titre indicatif pour faciliter l'analyse.

On considère une viscosité cinématique $\nu = 10^{-6} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ et une constante de diffusion du glucose $D = 6 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$

Echelle de Kolmogorov :
$$\lambda_k = \left(\frac{\nu^3}{\varepsilon} \right)^{\frac{1}{4}}$$

Temps de micromélange :

- Par incorporation
$$t_k = 17 \left(\frac{\nu}{\varepsilon} \right)^{\frac{1}{2}}$$
- Par diffusion
$$t_D = 2 \left(\frac{\nu}{\varepsilon} \right)^{\frac{1}{2}} \arcsin h \left(0.05 \frac{\nu}{D} \right)$$

Vitesse de rotation Ω (RPM)	ε moyen ($\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-3}$)	Echelle de Kolmogorov λ_k (μm)	Temps de micromélange par incorporation (ms)	Temps de micromélange par diffusion (ms)
20	0.015	160	435	262
114	0.13	50	47	28

Tableau II.1 : Echelles spatiotemporelles caractéristiques du réacteur Couette utilisé pour le mélange de glucose.

L'échelle de Kolmogorov est, dans les deux cas de figure considérés dans cette étude, supérieure à la taille de la cellule. Deux conclusions s'imposent alors :

- Du point de vue du mélange, il apparaît évident que l'apport de substrat aux cellules est contrôlé par le micromélange.
- Du point de vue des contraintes mécaniques : les cellules seront principalement soumises à des contraintes de dissipation visqueuse puisque de taille inférieure aux plus petites fluctuations turbulentes. (Ceci sera abordé plus en détail dans le chapitre 4).

L'environnement immédiat des cellules est donc renouvelé grâce au micromélange. Dans le cas d'une réaction batch, l'incorporation permet d'engouffrer les cellules dans du milieu « frais » alors que l'apport final se fait par diffusion. Les lois de la diffusion indiquent que celle-ci est fonction du gradient de concentration, soit :

- de l'épaisseur de la couche limite (contrôlée par le micromélange par incorporation)
- de la différence de concentration entre la concentration à la paroi, (dépendante du rapport entre le flux d'assimilation et le flux apporté) et la concentration loin des cellules (c'est-à-dire la concentration moyenne volumique).

A dissipation fixée et constante, le flux transféré aux cellules dépend donc de la concentration moyenne, aussi dans certains cas, les résultats expérimentaux seront présentés en fonction de la concentration en glucose.

Le taux de dissipation de l'énergie cinétique revêt ici une double importance : en contrôlant la taille de l'échelle de Kolmogorov, il conditionne l'épaisseur de la couche limite de diffusion autour des cellules. De plus, il contrôle le temps de mélange par incorporation qui est inversement proportionnel à sa racine carrée.

2 RESULTATS EXPERIMENTAUX

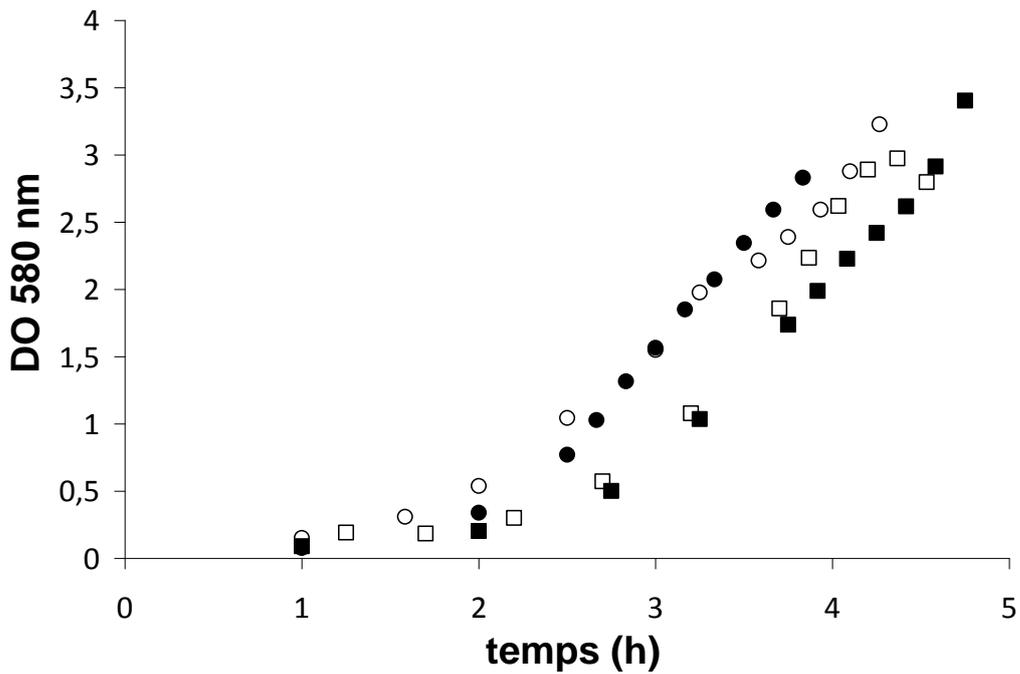
Cette section présente les résultats pour l'évaluation de la croissance par mesure de la DO et du métabolisme. L'objectif de notre étude est d'évaluer si les différentes conditions de micromélange conduisent à un shift métabolique, c'est-à-dire, si, à concentration en glucose égale, le flux apporté aux cellules (fonction de la vitesse d'agitation) diffère suffisamment pour induire un shift métabolique. Aussi, les résultats sont présentés ici en fonction de la concentration en glucose et ne concernent que les métabolites se rapportant au shift métabolique de *Lactococcus lactis* NCDO 2118 (donc les concentrations en lactate et formiate).

2.1. Cultures réalisées en microaérophilie

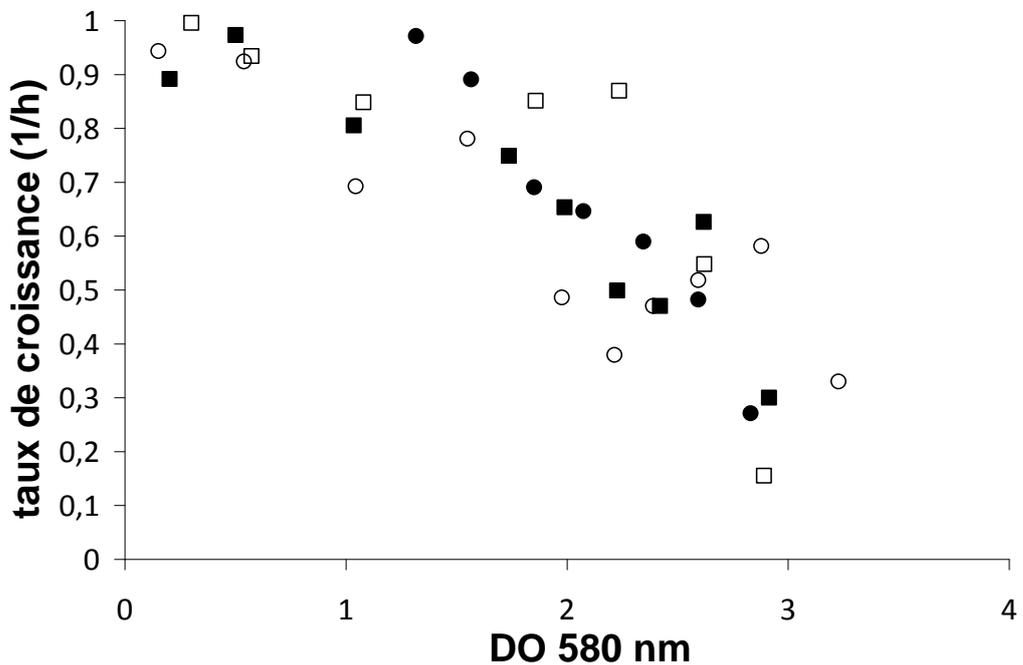
Ces cultures sont réalisées sans balayage d'azote ni aération du milieu, et sont donc représentatives de conditions de microaérophilie. Dans ces conditions, l'oxygène initialement présent dans le milieu est rapidement consommé au cours de la croissance bactérienne pour atteindre des conditions de limitation en oxygène, le seul apport étant constitué par le transfert de la phase gazeuse vers la phase liquide au niveau de la surface libre.

2.1.1. Croissance

L'évolution de la concentration en biomasse est ici évaluée par mesure de la densité optique à 580 nm. Les résultats sont présentés sur le graphe II.1 ci-dessous. Pour les cultures à 20 RPM, la croissance apparaît légèrement retardée par rapport aux cultures réalisées à 114 RPM, ce malgré le fait que toutes les cultures soientensemencées avec des cellules dans le même état physiologique. Cependant, il semble que le taux de croissance ne soit pas, ou très peu, affecté comme le montre le graphe II.2 qui présente l'évolution du taux de croissance en fonction de la biomasse. Le taux de croissance, maximal en début de culture, diminue au fur et à mesure de la production de biomasse.



Graphes II.1 : croissance de *Lactococcus lactis* NCDO 2118 en fonction du temps pour des cultures à 20 RPM (■ □) et 114 RPM (● ○).



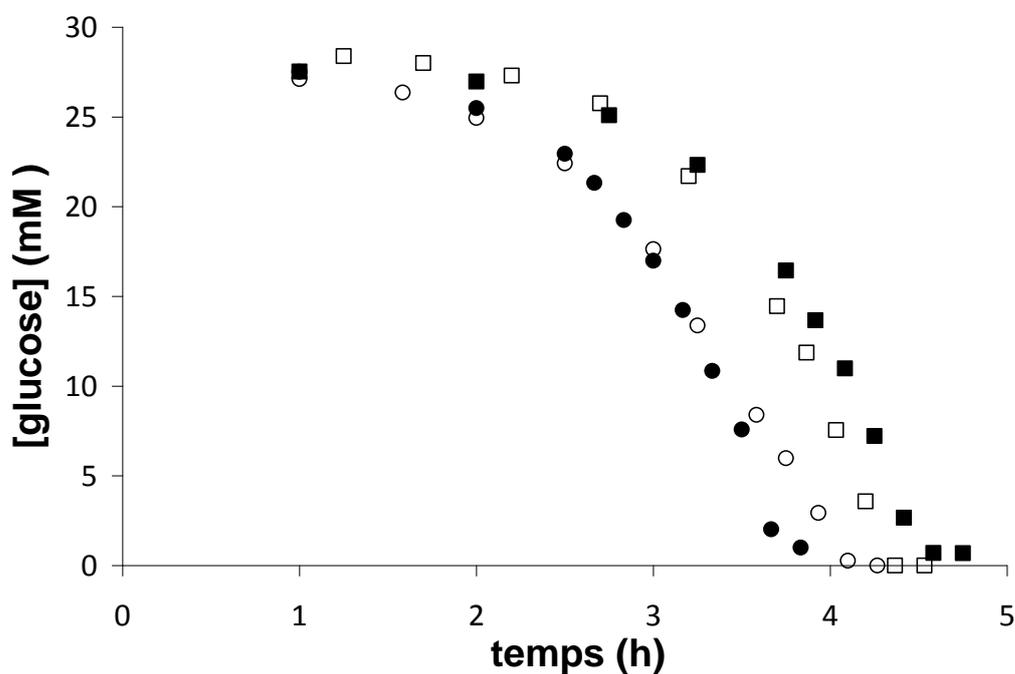
Graphes II.2 : taux de croissance de *Lactococcus lactis* NCDO 2118 en fonction de la biomasse (évaluée en termes de densité optique à 580 nm) pour des cultures à 20 RPM (■ □) et 114 RPM (● ○).

En outre, un phénotype remarquable et inattendu est apparu spécifiquement lors des cultures à 20 RPM. En effet, au fur et à mesure de la croissance, des filaments résultant d'une agrégation cellulaire se développent dans le milieu de culture, alors que les cultures à 114 RPM restent totalement planctoniques. Ce phénotype particulier est analysé en détail dans le chapitre 3.

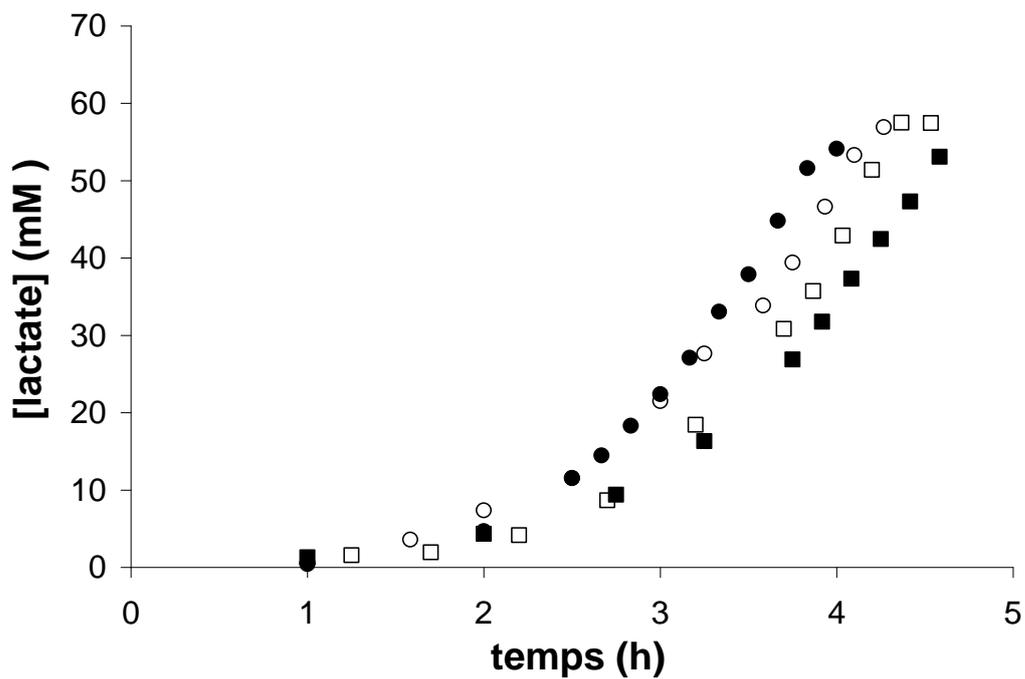
2.2. Métabolisme

Les graphes II.3 et II.4 ci-dessous présentent l'évolution de la concentration en glucose et en lactate respectivement dans le réacteur au cours de la fermentation.

En ce qui concerne la consommation de glucose et la production de lactate, on retrouve un « retard » équivalent à celui observé sur les courbes de croissance. Les résultats en termes de croissance et de production de métabolites sont donc concordants.

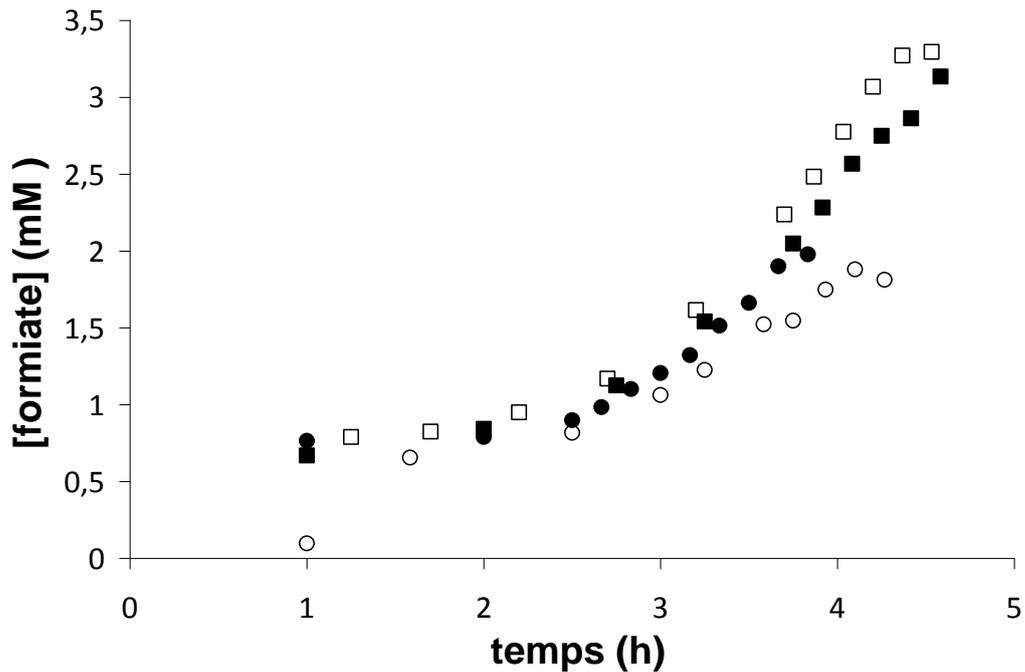


Graphe II.3 : évolution de la concentration en glucose pour des cultures à 20 RPM (■ □) et 114 RPM (● ○).



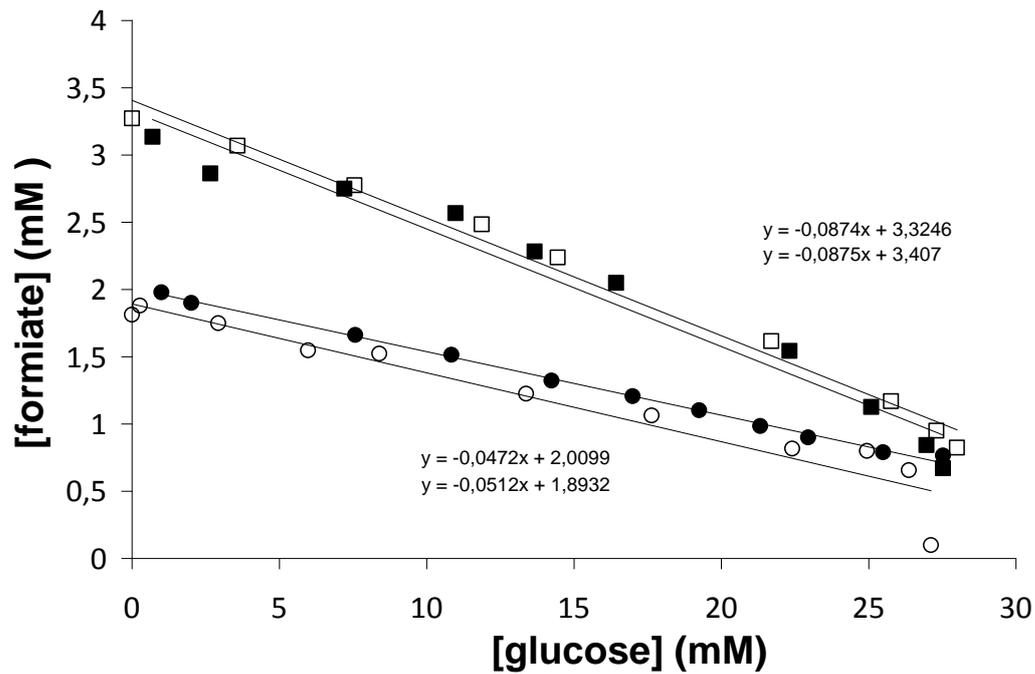
Graph II.4 : concentration en lactate en fonction du temps pour des cultures à 20 RPM (■ □) et 114 RPM (● ○).

Le graphe II.5 présente les résultats concernant la production de formiate ; on remarque que les cultures réalisées à 20 RPM conduisent à une concentration finale en formiate plus importante. Afin de s'affranchir du décalage lié au retard et de comparer les deux conditions à concentration en glucose égale, la concentration en formiate est également visualisée en fonction de la concentration en glucose résiduel (graphe II.6).

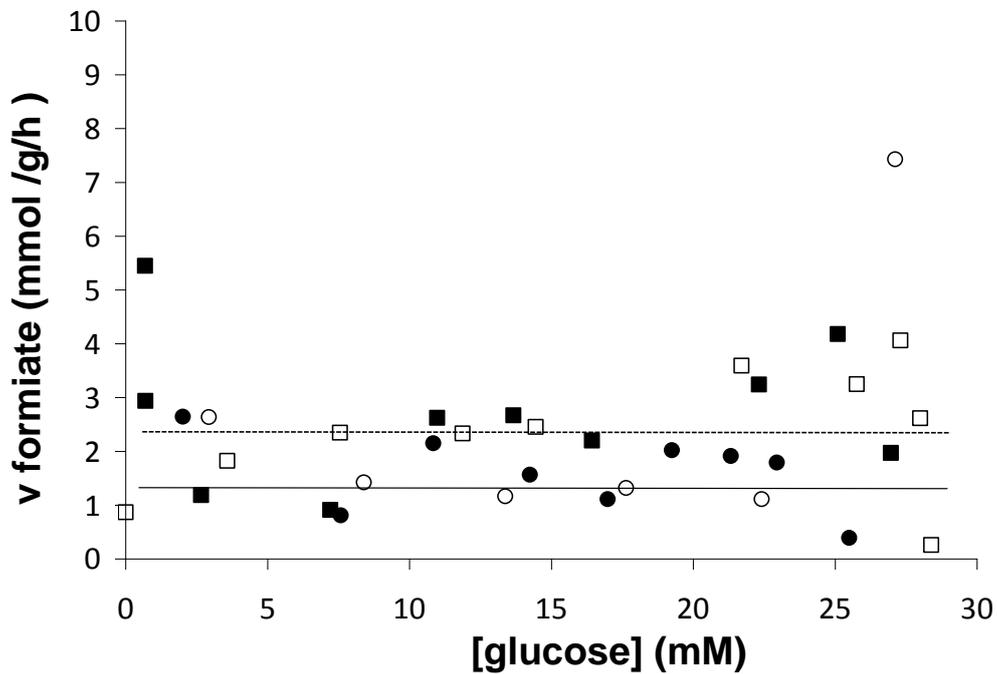


Graphe II.5 : concentration en formiate en fonction du temps pour des cultures à 20 RPM (■ □) et 114 RPM (● ○).

La pente de la droite ($d(\text{formiate})/d(\text{glucose})$) représente le rendement de conversion du glucose en formiate. On calcule ainsi les rendements de conversion : la production est de 0,085 mole de formiate par mole de glucose consommé à 20 RPM contre seulement 0,049 mole de formiate par mole de glucose consommé à 114 RPM. Les rendements de conversion du glucose en lactate sont en revanche similaires dans les deux conditions ($1,84 \pm 0.06$ mol de lactate/mol de glucose à 114 RPM et $1,87 \pm 0.12$ mol de lactate/mol de glucose à 20 RPM).



Graphes II.6 : concentration en formiate en fonction de la concentration en glucose résiduel pour des cultures à 20 RPM (■ □) et 114 RPM (● ○).



Graph II.7 : vitesse spécifique de production de formiate en fonction de la concentration en glucose résiduelle pour des cultures à 20 RPM (■ □) et 114 RPM (● ○). Les vitesses spécifiques moyennes à 20 RPM (-) et 114 RPM (--) sont également indiquées.

Cette différence au niveau de la production de formiate est aussi visible sur le graphe II.7 où est représentée la vitesse spécifique de production de formiate en fonction de la concentration en glucose. Celle-ci est constante, autour de 2,4 mmol de formiate.g⁻¹.h⁻¹ pour les cultures à 20 RPM et 1,4 mmol de formiate.g⁻¹.h⁻¹ pour les cultures à 114 RPM, tout au long du processus de croissance et quelle que soit la concentration résiduelle en glucose. Ainsi, les cellules cultivées à 20 RPM produisent plus de formiate (vitesse spécifique de production et taux de conversion du formiate en glucose plus élevés) qu'à 114 RPM, sans pour autant que les effets de cette orientation du métabolisme vers la production de formiate à 20 RPM soit visible sur les rendements de conversion du glucose en lactate.

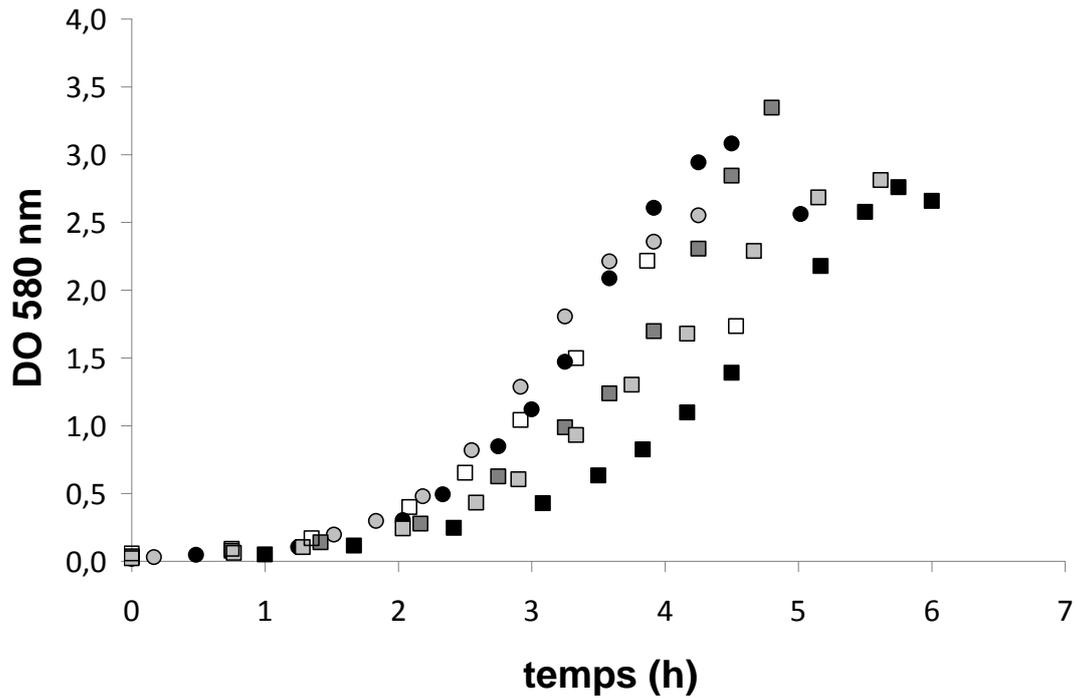
2.3. Cultures anaérobies

Les mêmes fermentations ont été répétées cette fois sous balayage d'azote et avec un milieu de culture préalablement dégazé, donc en condition anaérobie.

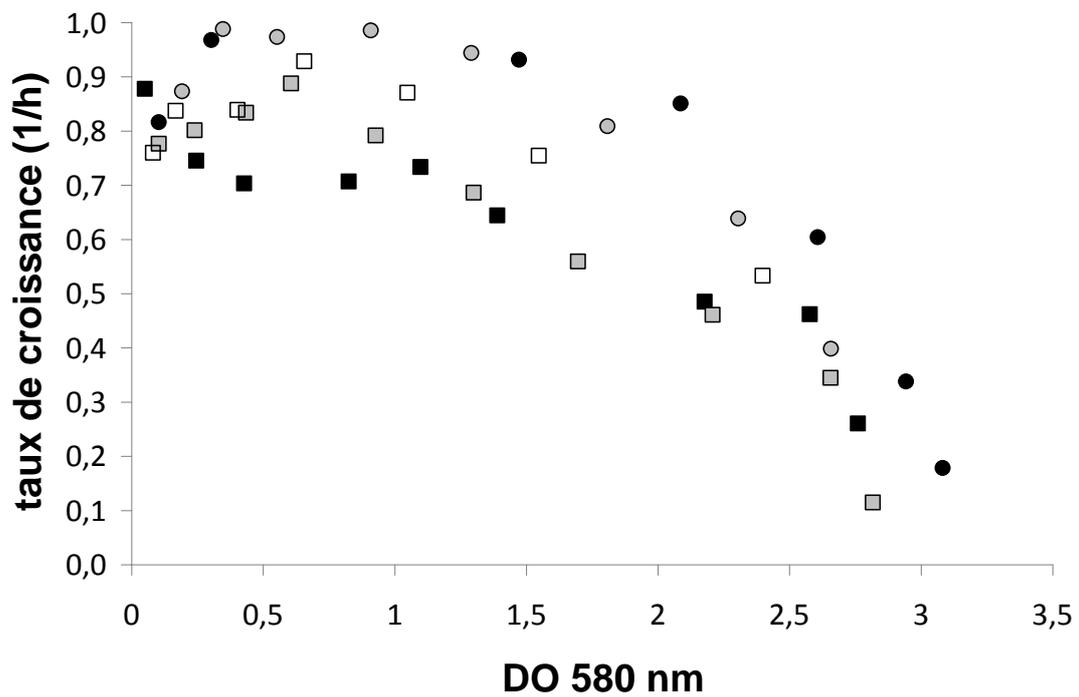
2.3.1. Croissance

Les courbes de croissance sont présentées ci-dessous (graphe II.8). Si on observe une bonne reproductibilité des expériences réalisées à 114 RPM, ce n'est pas le cas pour les cultures à 20 RPM. Le même phénotype qu'en conditions microaérophiles, caractérisé par la constitution de filaments résultant d'une agrégation cellulaire, est systématiquement observé en anaérobiose à 20 RPM, quel que soit le profil de croissance.

L'évolution du taux de croissance en fonction de la biomasse (graphe II.9) présente un caractère erratique pour les cultures à 20 RPM. Néanmoins, l'évolution des taux de croissance à 114 RPM semble reproductible, et incluse dans la gamme de taux de croissance observés pour les cultures à 20 RPM.



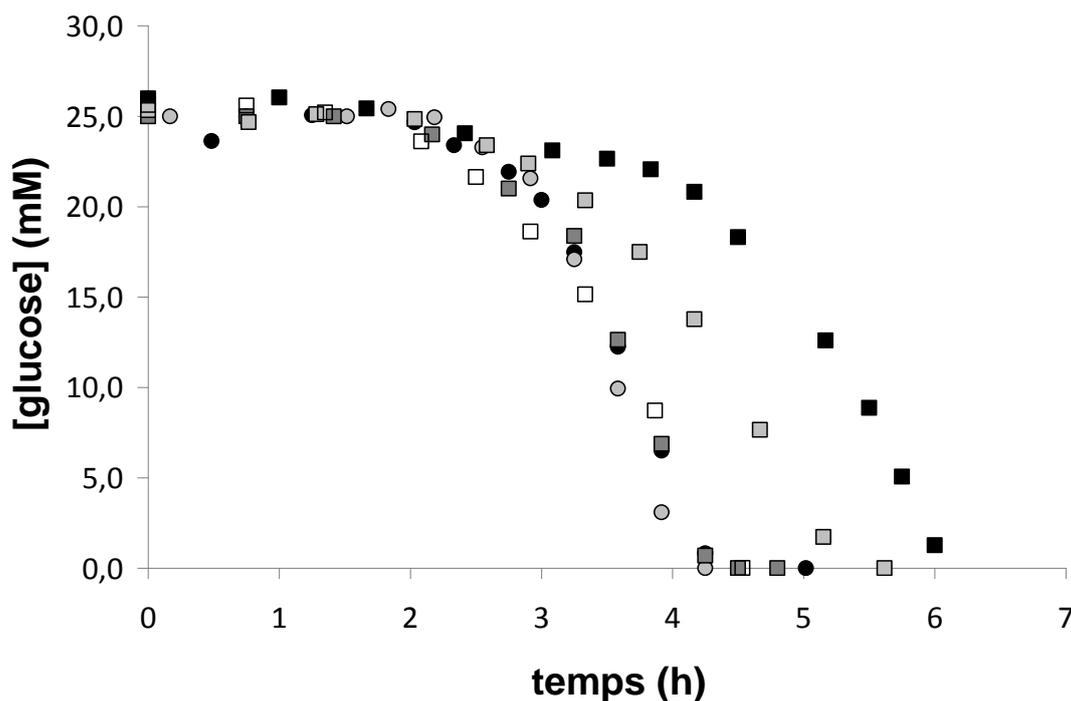
Graph II.8 : évolution de la densité optique pour des cultures à 20 RPM (□, différentes nuances de gris) et 114 RPM (○, différentes nuances de gris).



Graph II.9 : taux de croissance de *Lactococcus lactis* NCDO 2118 en fonction de la biomasse (évaluée en termes de densité optique à 580 nm) pour des cultures à 20 RPM (□, différentes nuances de gris) et 114 RPM (○, différentes nuances de gris).

2.3.2. Métabolisme

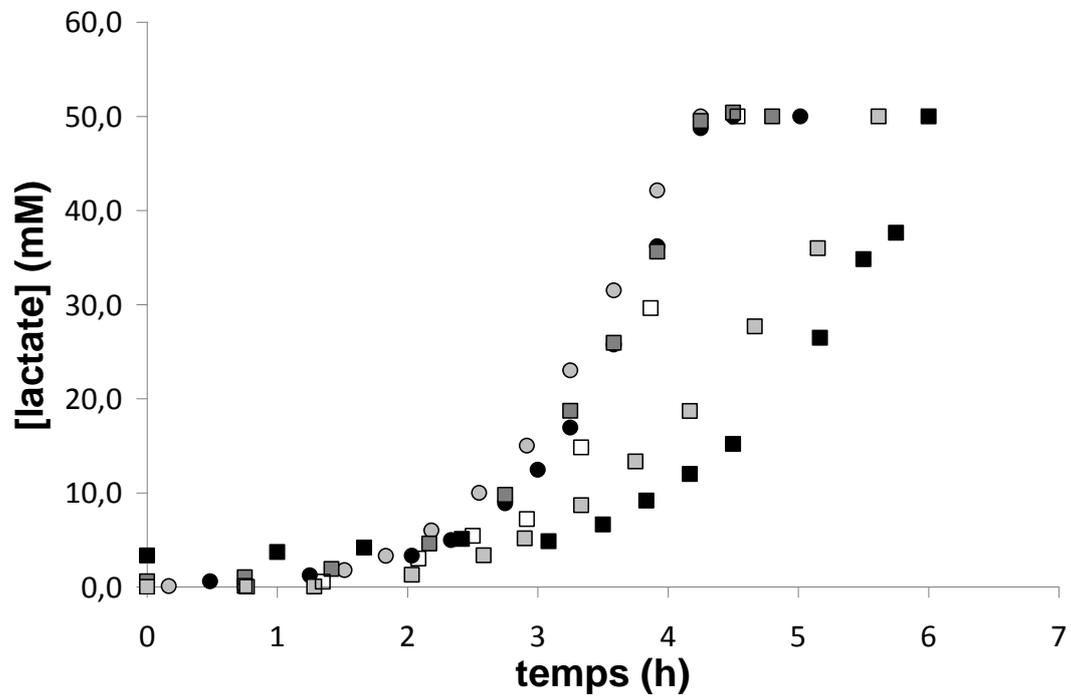
Comme en témoignent les courbes de croissance, les évolutions des concentrations de métabolites en fonction du temps sont peu reproductibles à 20 RPM. Les résultats montrent cependant que tout « retard » dans la croissance se traduit par le même retard en termes de consommation de glucose (graphe II.10) de production de lactate (graphe II.11) ou de formiate (graphe II.12).



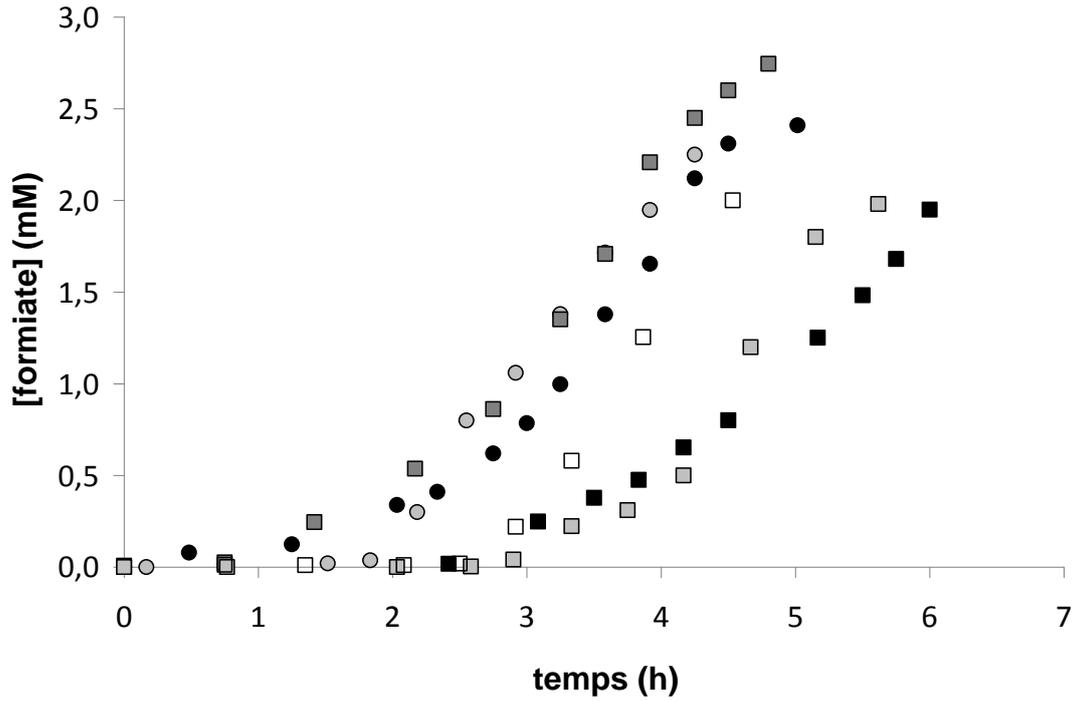
Graphe II.10 : évolution de la concentration en glucose pour des cultures à 20 RPM (\square , différentes nuances de gris) et 114 RPM (\circ , différentes nuances de gris).

Le rendement de conversion du glucose en formiate est visualisé sur le graphique représentant l'évolution de la concentration en formiate en fonction de celle du glucose (graphe II.13). Malgré le léger bruit au niveau des résultats, on observe que les pentes des droites de régression, ($d_{\text{formiate}}/d_{\text{glucose}}$), présentées sur le graphe sont similaires à 20 et 114 RPM. Ce résultat suggère un même comportement métabolique, avec un rendement moyen de $0,085 \pm 0,05$ mole de formiate par mole de glucose. En effet, les vitesses spécifiques de production de formiate sont semblables quelle que soit la vitesse de rotation, autour de $2 \text{ mmol de formiate} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ (graphe II.14). De même, les

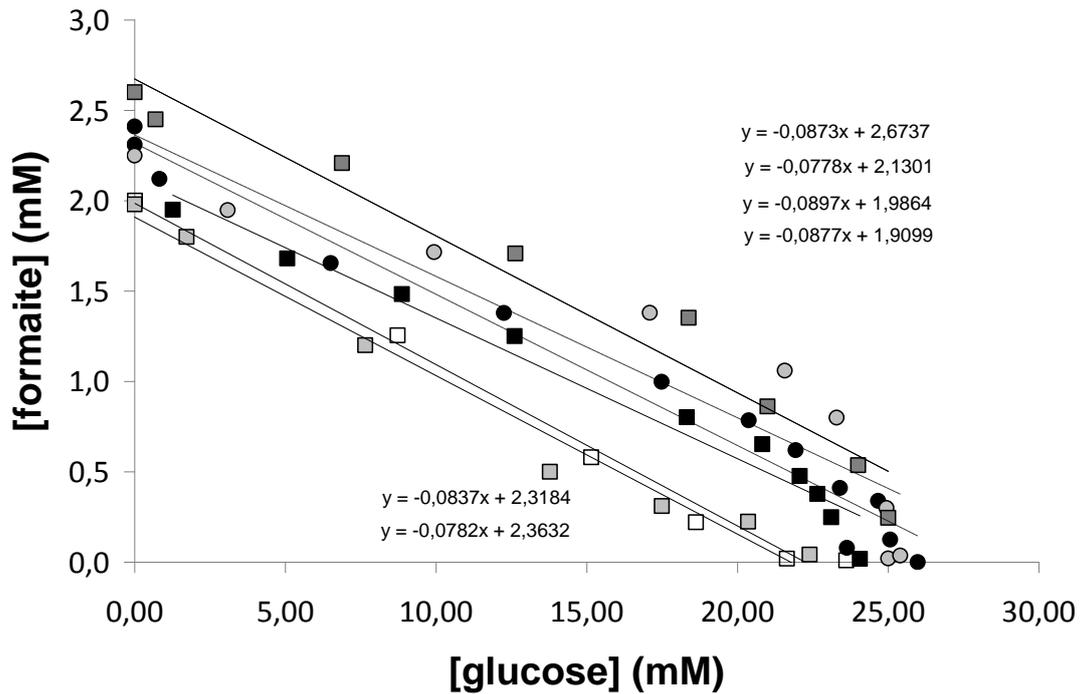
rendements lactate/glucose sont semblables : $1,88 \pm 0,06$ mol lactate/mol glucose à 114 RPM et $1,84 \pm 0,07$ mol lactate/mol glucose à 20 RPM.



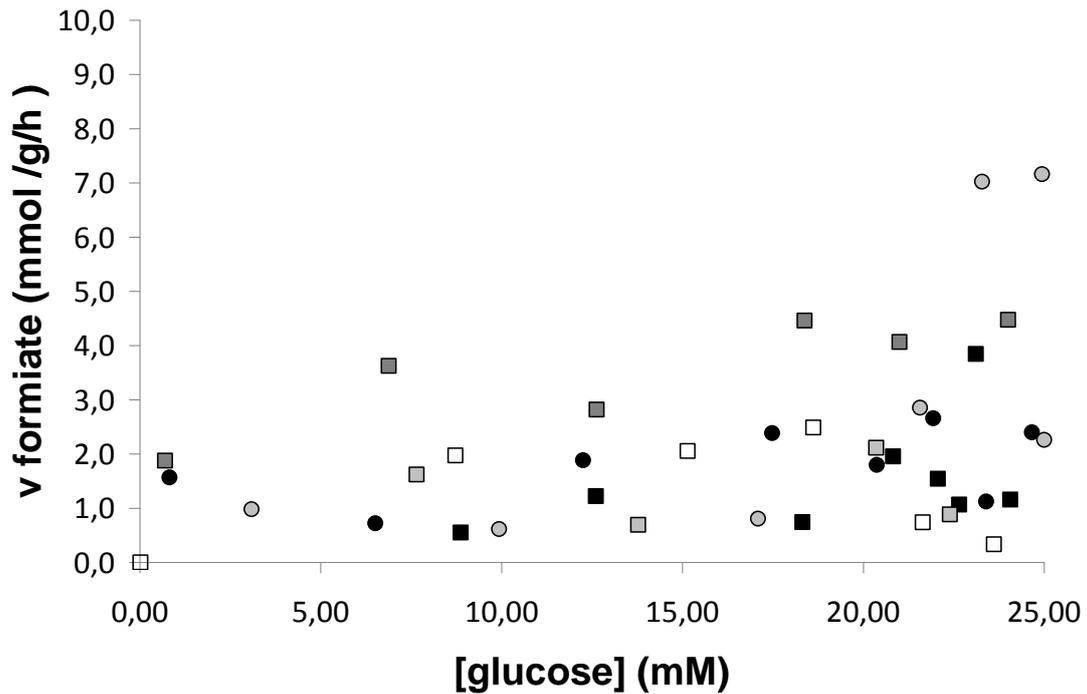
Graphe II.11: évolution de la concentration en lactate pour des cultures à 20 RPM (□, différentes nuances de gris) et 114 RPM (○, différentes nuances de gris).



Graphe II.12 : évolution de la concentration en formiate pour des cultures à 20 RPM (□, différentes nuances de gris) et 114 RPM (○, différentes nuances de gris).



Graphe II.13 : évolution de la concentration en formiate en fonction de la concentration en glucose résiduelle pour des cultures à 20 RPM (□, différentes nuances de gris) et 114 RPM (○, différentes nuances de gris) et courbes de régression linéaire 20 RPM (-) et 114 RPM (--).



Graphe II.14 : vitesse spécifique de production de formiate en fonction de la concentration en glucose résiduelle pour des cultures à 20 RPM (■ □) et 114 RPM (● ○).

3 DISCUSSION

3.1. Production de formiate et conditions de culture

Les rendements moyens de conversion de glucose en formiate sont comparés dans les différentes conditions de culture de *L. lactis* NCDO 2118 en réacteur Couette (tableau II.2).

	Vitesse de rotation	Rendement moyen formiate/glucose (mol/mol x100)	Ecart type
anaérobiose	20 RPM	8,56	0,53
	114 RPM	8,09	0,39
microaérophilie	20 RPM	8,51	0,33
	114 RPM	4,92	0,28

Tableau II.2 : valeur moyenne du rendement formiate/glucose et écart type pour des cultures à 20 RPM (■ □) et 114 RPM (● ○)

Pour déterminer si le comportement métabolique dans les deux conditions est affecté, les moyennes pour chaque condition de culture sont comparées grâce au test de Student de comparaison de moyennes. La valeur du coefficient t de Student permet d'évaluer si les deux populations sont significativement différentes en renvoyant la probabilité que deux moyennes appartiennent à une même population : on considère qu'une différence est significative si t est inférieur à 5 %. Pour la comparaison des séries à 20 et 114 RPM réalisées en anaérobiose, $t = 24$ %, indiquant que la production de formiate n'est pas significativement différente entre ces deux conditions. En revanche, les séries réalisées en microaérophilie à 20 et 114 RPM sont significativement différentes ($t = 0,3$ %). Les cultures réalisées en microaérophilie à 114 RPM se distinguent des autres par le rendement formiate sur glucose plus bas, alors que les rendements obtenus dans les cultures sans balayage d'azote à 20 RPM sont semblables à ceux obtenus en anaérobiose.

En condition anaérobiose, la vitesse spécifique de production de formiate se situe autour de $2 \text{ mmol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$, soit des valeurs de vitesse standard pour un métabolisme homolactique (Garrigues *et al.* 1997), indiquant qu'il n'y a pas de shift métabolique entre les deux conditions d'agitation. Lorsque les cultures sont réalisées en microaérophilie, la vitesse de production de formiate est inchangée à 20 RPM par rapport à l'anaérobiose, mais elle est plus faible, autour de $1 \text{ mmol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$, à 114 RPM. Ce profil de production de formiate peut être discuté en regard, soit de l'apport de glucose qui peut augmenter la synthèse de formiate s'il est limitant, soit de l'apport d'oxygène qui inhibe la synthèse de formiate. Ces deux hypothèses sont discutées respectivement en 3.2. et 3.3.

3.2. Effet du mélange au niveau de l'apport de glucose

Comme cela a été expliqué précédemment, *L. lactis* NCDO 2118 répond à une diminution du flux de substrat reçu par un shift entre les métabolismes homolactique et mixte. Parmi les métabolites produits dans le cas d'un métabolisme mixte, l'évolution de la concentration en formiate a été suivie comme indicateur de ce shift. Les résultats

indiquent que, pour des cultures réalisées en anaérobiose, les deux conditions d'agitation conduisent à des taux de conversion du glucose en formiate similaires, en d'autres termes, aucun shift n'est observé dans ces conditions (les conditions microaérophiles sont discutées ci-dessous, en 3.3). L'absence de shift métabolique indique que, du point de vue de la cellule, le flux de substrat reçu n'est pas affecté par la vitesse de rotation du cylindre. En considérant l'analyse décrite dans l'introduction, cela montre que sur la durée de la culture batch, nous sommes dans les conditions décrites en (iii) : le temps de réaction d'assimilation du substrat est supérieur aux temps de mélange réalisés dans le réacteur.

Le temps caractéristique de l'assimilation du substrat ($t_{R,S}$) peut être évalué selon l'équation II.1 (Delafosse 2008) :

$$t_{R,S} = \frac{S}{q_S X} = \frac{S}{\mu Y_{S/X} X} \quad \text{Eq II.1}$$

Ce temps dépend de la quantité de substrat disponible et de la concentration cellulaire (en plus de l'état physiologique des cellules considérées dont vont dépendre les termes μ et q_S). En début de fermentation, la concentration en glucose est importante alors que la biomasse est faible, alors qu'en fin de culture, c'est l'opposé. Le temps caractéristique de l'assimilation de substrat est donc inférieur en fin de culture si on considère les concentrations moyennes. Par conséquent, la compétition mélange - réaction est bien plus critique en fin de fermentation de ce point de vue. Donc, les effets sont normalement plus sensibles en fin de culture (la concentration en substrat moyennée est plus faible, ayant pour conséquence une diminution du flux de substrat apporté aux cellules par la diffusion, figure II.1). Malheureusement, les données récoltées ne nous permettent pas de conclure sur ce point. Le dosage des faibles concentrations en glucose en fin de culture est peu précis et il est fort probable que ces effets se manifestent sur une plage de temps restreinte (les derniers instants de la culture) durant laquelle il est délicat d'observer une quelconque modification du métabolisme.

Nos résultats n'illustrent que les effets du couplage mélange-réaction à l'échelle de la fermentation.

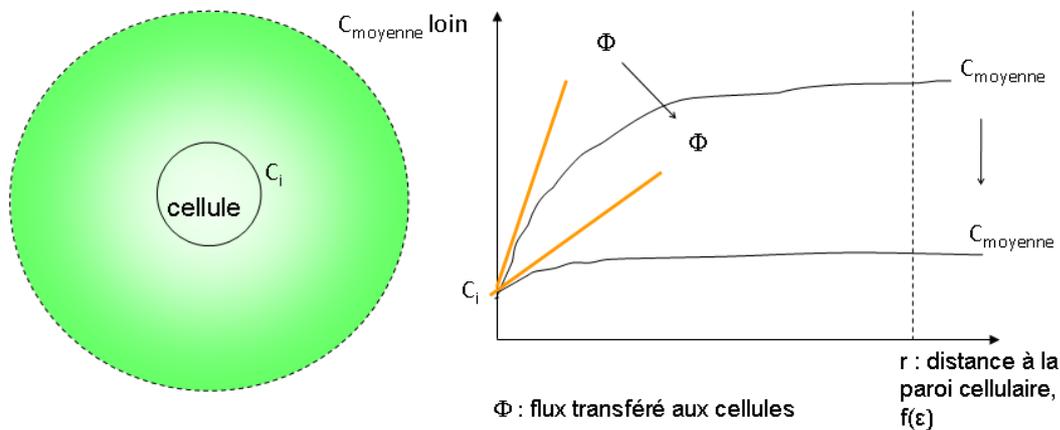


Figure II.1 : Illustration du transfert de matière par diffusion vers les cellules et influence de la concentration moyenne sur le flux transféré.

3.3. Effet du mélange au niveau de l'apport d'oxygène

Les résultats en termes de production de formiate sont comparés pour chaque vitesse de rotation en fonction des conditions d'oxygénation du milieu. Si les rendements formiate/glucose sont identiques pour les cultures à 20 RPM quelles que soient les conditions vis-à-vis de l'oxygène, les cultures à 114 RPM présentent une différence significative :

- En anaérobiose, les cultures aboutissent à une concentration en formiate semblable à celle obtenue avec des cultures à 20 RPM dans les mêmes conditions.
- En microaérophilie les quantités produites sont significativement moindres.

La présence d'oxygène explique ces résultats. En effet, l'enzyme responsable de la production de formiate, la pyruvate formiate lyase (PFL), est inhibée en présence d'oxygène. Le fait de travailler sous une atmosphère non inerte autorise le transfert d'oxygène dans le milieu de culture. La vitesse de ce transfert dépend de la vitesse du fluide sous l'interface. Elle est donc significativement plus importante à 114 RPM qu'à 20 RPM. De plus, l'oxygène transféré est alors rapidement mélangé, ce qui expose

l'ensemble de la population cellulaire à une quantité d'oxygène suffisante pour inhiber la PFL.

En revanche, la production de formiate à 20 RPM dans les conditions de microaérophile est équivalente à celle obtenue en condition anaérobie. Pourtant le transfert d'oxygène a également lieu mais la production de formiate n'est pas affectée. Ici que le transport axial 'macromélange' et l'homogénéisation à l'échelle cellulaire 'micromélange' sont tous deux moins efficaces qu'à 114 RPM.

Dans le cas des cultures à 114 RPM, il est délicat d'évaluer le poids relatifs de la vitesse de transfert d'oxygène et de la vitesse de micromélange vis à vis du phénomène décrit car l'augmentation de la vitesse de rotation modifie ces deux paramètres. Une étude poussée du transfert d'oxygène du ciel gazeux à la phase liquide dans ces conditions est nécessaire, afin de pouvoir ensuite comparer les temps de transfert, de mélange et de réaction. Le choix de ne pas pousser cette analyse mais de privilégier la simplification du problème en travaillant dans des conditions s'affranchissant du transfert gazeux a été fait pour la suite de ce travail.

Néanmoins, il nous est apparu intéressant de rapprocher ces observations des expériences de Dunlop (Dunlop and Ye 1990), dans lesquelles des cellules circulent dans un réacteur *scale-down* constitué d'un réacteur piston dans lequel a lieu l'alimentation en glucose, et d'un réacteur parfaitement agité représentant le volume réactionnel. Le comportement métabolique des cellules est modifié par l'intensité de mélange dans le réacteur piston ; tout comme le mélange rapide de l'oxygène transféré à 114 RPM fait en sorte que ce dernier affecte une plus grande partie de la population cellulaire dans nos conditions expérimentales. Le paragraphe 4 reprend ces résultats et propose une modélisation de ce phénomène en couplant un modèle de mélange par incorporation et la réaction biologique.

3.4. Conditions d'écoulement et croissance de *L. lactis* NCDO 2118

L'analyse d'un éventuel shift métabolique de *L. lactis* NCDO 2118 en fonction de la vitesse d'agitation dans le réacteur Couette a révélé qu'aucune limitation de glucose

n'était ressentie par les cellules, mais qu'elles étaient sensibles au transfert d'oxygène dans le milieu. Par ailleurs, un phénotype remarquable a été observé au cours de ces différentes cultures, caractérisé par un retard de croissance et par l'apparition d'agrégats cellulaires (cet aspect est décrit et discuté au chapitre 3) à 20 RPM par rapport à 114 RPM. Il semble cependant que ces deux phénomènes soient dissociés puisque l'agrégation à 20 RPM est systématique alors qu'en anaérobiose, le retard de croissance est variable, et que même sans retard de croissance (l'une des cultures à 20 RPM en anaérobiose) par rapport à 114 RPM, l'agrégation a lieu néanmoins.

Ce retard de croissance témoigne du fait que les conditions de croissance à 20 RPM sont non optimales. De ce fait, le temps de réponse des cellules au stress (adaptation aux conditions particulières de l'écoulement) peut expliquer le retard dans la croissance. Néanmoins, le manque de reproductibilité des courbes obtenues en conditions d'anaérobiose à 5 g/L soulève quelques interrogations. Ces résultats suggèrent une forte variation apparente du temps de réponse au stress, ce qui est peu probable étant donné qu'initialement, les cellules sont toutes dans le même état physiologique. En revanche, l'écoulement qui s'établit à 20 RPM (Modulated Wavy vortex flow) peut varier selon les conditions de mise en régime du réacteur et il convient d'y accorder une importance particulière. De ce fait, les conditions hydrodynamiques rencontrées peuvent varier pour une même vitesse de rotation, modifiant ainsi le niveau de stress rencontré par les cellules. A l'heure actuelle notre hypothèse est donc que la variabilité observée est liée à un manque de reproductibilité de l'écoulement.

4 MODELISATION DES EFFETS DE MICROMELANGE

Ce paragraphe se propose de présenter le couplage d'un modèle de micromélange et d'une réaction d'assimilation de substrat. A la suite de ce chapitre, le lecteur pourra trouver le texte complet d'un article traitant de cette problématique, publié dans les proceedings of the *13th European Conference on Mixing*, London 2009. Dans cette section, la partie traitant de la revue bibliographique mettant en exergue la problématique des effets de mélange dans les bioréacteurs ne sera pas présentée car redondante avec le chapitre de bibliographie précédent. Nous nous contenterons donc

ici d'expliquer les résultats expérimentaux de Dunlop à l'aide d'un modèle couplant micromélange et réaction, et de mettre en perspective ces données avec les résultats de nos expériences.

4.1. Présentation du modèle utilisé et de l'expérience de Dunlop

4.1.1. Expérience : mise en œuvre et résultats expérimentaux

L'expérience de Dunlop que nous nous proposons d'expliquer à l'aide de ce modèle est réalisée dans un réacteur de type *scale down* (figure II.2). La levure *Saccharomyces cerevisiae* est cultivée dans ce réacteur dans lequel l'injection est réalisée en différents points du réacteur :

- Cuve agitée (cas 1)
- Entrée du réacteur tubulaire (cas 2)
- Entrée du réacteur tubulaire munie d'une grille, ce qui a pour conséquence d'améliorer le mélange (cas 3).

En fonction de la qualité du mélange à l'injection, différents comportements métaboliques sont observés au niveau de la population, reliés à la concentration en substrat à laquelle sont soumises les cellules. En effet, les levures répondent à une concentration en substrat dans leur environnement immédiat supérieure à une concentration critique par un métabolisme *overflow*. Les résultats expérimentaux sont résumés dans le tableau suivant (tableau II.3).

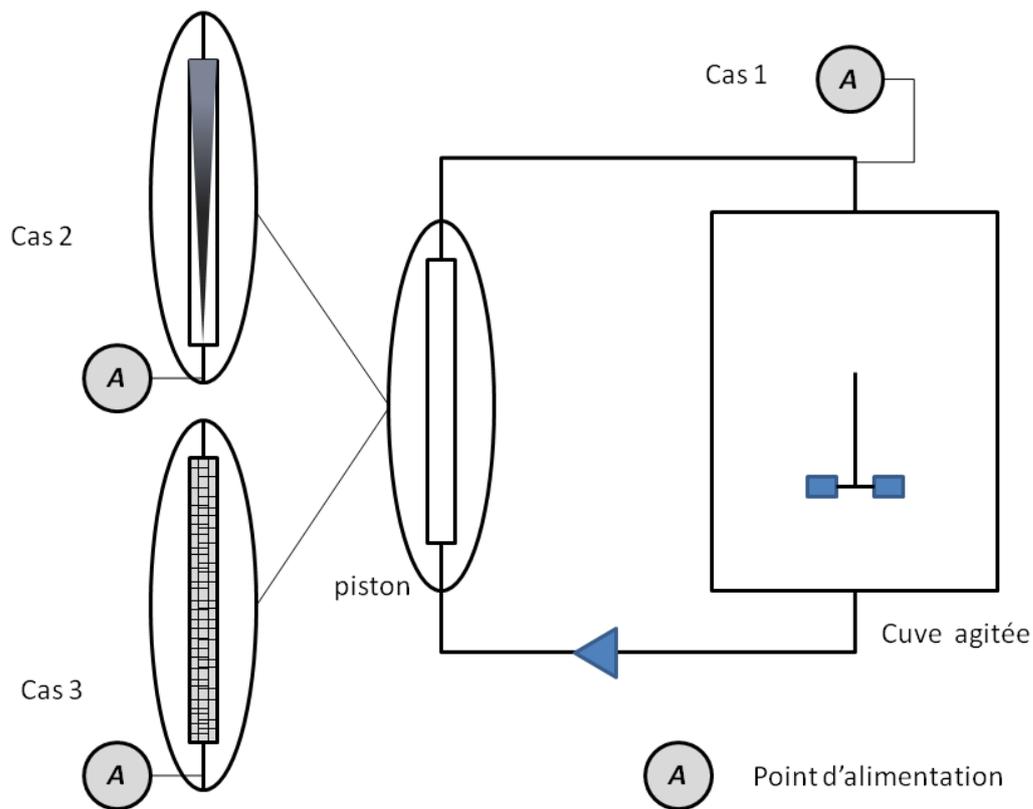


Figure II.2 : représentation schématique du réacteur *scale down* utilisé par Dunlop.

Cette expérience montre l'importance de la qualité du mélange à l'injection sur les performances biologiques (méso et micro mélange). C'est en effet ce dernier qui va contrôler le couple quantité de cellule - concentration en substrat à laquelle ces dernières sont exposées.

Peu de cellules subissant une concentration largement supérieure à la concentration critique renvoient des résultats similaires (en termes de comportement global de la population) à ceux obtenus dans le cas 1 où le substrat est mélangé rapidement. Au contraire, si le mélange est rapide et efficace (cas 3), une proportion plus importante de cellules sera exposée à une concentration légèrement supérieure à la concentration critique entraînant un métabolisme *overflow*. Les conséquences sur le comportement global seront alors sensibles.

Position de l'alimentation	Conséquence sur le mélange	Résultat en terme de métabolisme
Cas 1 : cuve agitée	Mélange rapide, les cellules voient la concentration moyenne résultante de la dispersion du substrat dans le volume de la cuve agitée	Pas d'overflow
Cas 2 : entrée du réacteur tubulaire	Mélange lent (peu d'incorporation de milieu contenant des cellules dans le substrat).	Pas/peu d'overflow
Cas 3 : entrée du réacteur tubulaire avec grille	Mélange rapide, amélioré par la présence de la grille : les cellules voient une concentration contrôlée par le rapport entre les débits d'alimentation et de recirculation	overflow

Tableau II.3 : synthèse des résultats de l'expérience de Dunlop.

4.1.2. Modèle de micromélange

Le modèle utilisé ici est un modèle de micromélange par incorporation (ou engulfment) développé par Baldyga. Comme son nom l'indique, il prend en compte le mécanisme de micromélange par diffusion à l'intérieur des tourbillons responsables de l'incorporation. Une représentation schématique de ce modèle est proposée sur la figure II.3 ; Le mélange d'un volume V_1 de fluide frais ajouté au volume initial V_2 est décrit. Au cours du mélange, le volume total est conservé. Le mécanisme d'incorporation conduit à l'accroissement du volume V_1 au détriment du volume V_2 . Le volume V_1 augmente alors que sa concentration diminue au fur et à mesure de l'incorporation. Par ailleurs, la réaction ne se produit que dans le volume V_1 . Il permet de décrire en particulier la cas où un petit volume fortement concentré en réactif est ajouté à un gros volume contenant l'autre réactif.

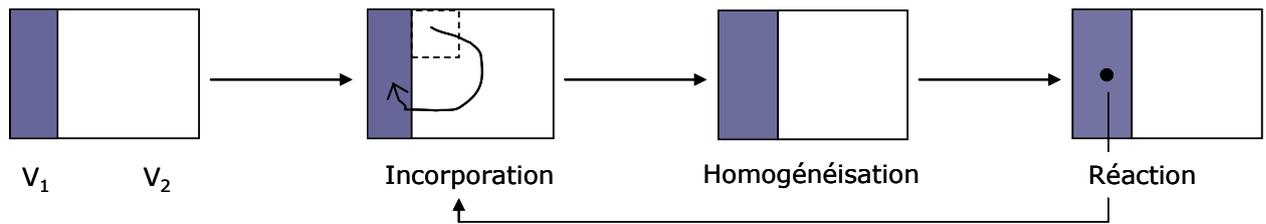


Figure II.3 : représentation schématique du modèle de micromélange par incorporation.

L'évolution du volume de la zone de réaction est décrite par la relation suivante (équation II.2) :

$$\frac{dV_1}{dt} = EPV_1 \quad \text{Eq II.2}$$

P représente la probabilité d'auto incorporation $P = 1 - \frac{V_1}{V_{tot}}$

E est le paramètre d'incorporation. Il est lié au temps de mélange par incorporation (noté t_k dans ce travail) et décrit comme suit (équation II.3):

$$E \approx \frac{1}{t_k} \approx 0,058 \left(\frac{\langle \varepsilon \rangle}{\nu} \right)^{\frac{1}{2}} \quad \text{Eq II.3}$$

t_k est le temps de mélange par incorporation

Le bilan matière sur un composé α mélangé puis consommé par une réaction s'écrit alors ainsi (équation II.4):

$$\frac{d(V_1 \cdot c_\alpha)}{dt} = EPV_1 \langle c_\alpha \rangle + r_\alpha V_1 \quad \text{Eq II.4}$$

$\langle c_\alpha \rangle$ est la concentration moyenne à l'échelle du volume total

$$\langle c_\alpha \rangle = \frac{C1.V1 + C2.V2}{V1 + V2}$$

c_α représente la concentration du composé α dans la zone de réaction V1

r_α est le terme de réaction. Il s'exprime à partir des concentrations des réactifs dans le volume V1.

On considère par la suite une réaction biologique suivant une loi de Monod pour la croissance et la consommation de substrat (équation II.5).

$$q_S = Y_{XS}^{-1} \cdot \mu = Y_{XS}^{-1} \cdot \mu_{\max} \frac{\langle S \rangle}{K_S + \langle S \rangle} = q_{S \max} \frac{\langle S \rangle}{K_S + \langle S \rangle} \quad \text{Eq II.5}$$

q_S , $q_{S \max}$ représentent la vitesse spécifique de consommation du substrat et la vitesse spécifique ($g_S \cdot g_X^{-1} \cdot h^{-1}$)

Y_{XS} est le rendement de conversion du substrat en biomasse ($g_X \cdot g_S^{-1}$)

μ , μ_{\max} sont les vitesses spécifique et maximales de croissance (h^{-1})

$\langle S \rangle$ représente la concentration moyenne en substrat dans le réacteur ($g \cdot L^{-1}$)

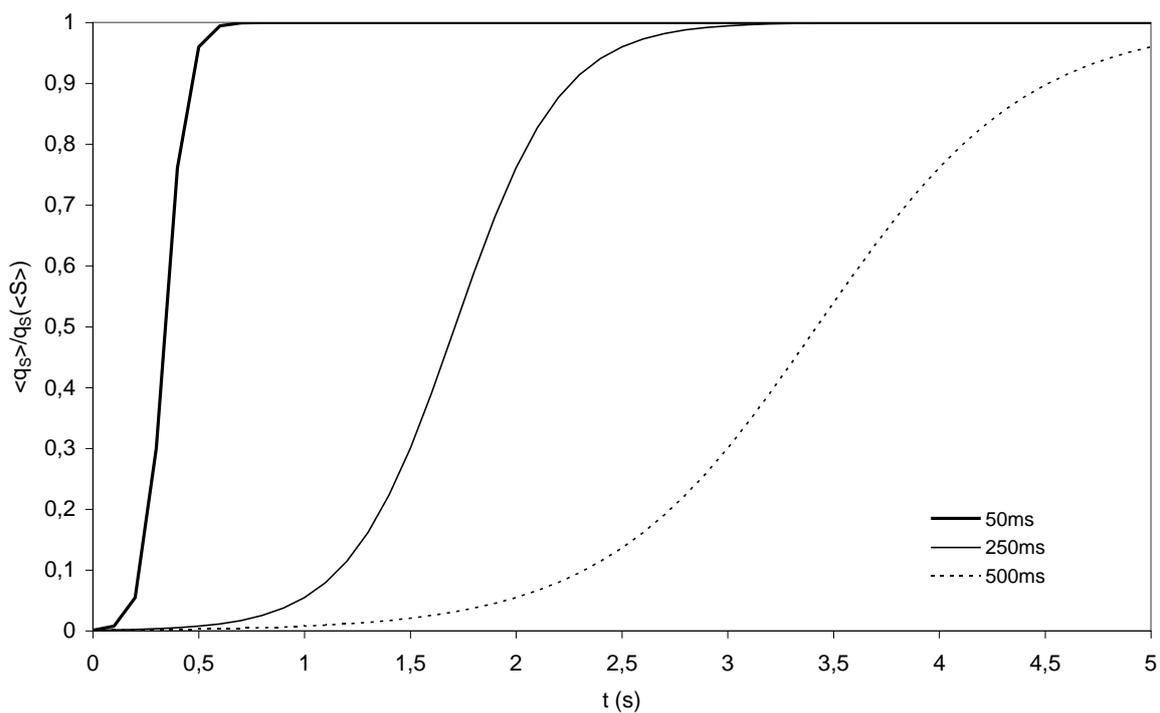
K_S est la constante d'affinité pour le substrat ($mg \cdot L^{-1}$)

4.2. Simulation du couplage mélange – réaction biologique

Ce modèle est tout d'abord utilisé pour représenter l'effet de la ségrégation sur la vitesse apparente d'assimilation de substrat lorsque la concentration du substrat ajouté est élevée. Pour cette modélisation, nous avons utilisé une concentration en substrat ($0,2 g \cdot L^{-1}$) très largement supérieure au K_S .

Le modèle utilisé pour la réaction d'assimilation considère ladite assimilation comme une fonction de la concentration en substrat. Ainsi, si la concentration vue par les

cellules est différente de la concentration moyenne résultant d'un processus de mélange complet, ce qui est le cas si le réacteur est ségrégué, les vitesses d'assimilation s'en ressentiront. Pour visualiser les effets de la ségrégation sur l'assimilation de substrat, celle-ci est représentée sous la forme du ratio entre la vitesse d'assimilation moyenne ($\langle q_s \rangle$) et la vitesse d'assimilation calculée sous l'hypothèse d'un mélange instantané ($q_s(\langle S \rangle)$) (graphe II.15). Les différentes courbes sont obtenues pour des temps caractéristiques de micromélange allant de 50 à 500 ms.



Graphe II.15 : Effet de la ségrégation sur l'assimilation de substrat à concentration en substrat élevée

Si le micromélange est rapide (50 ms), les cellules sont rapidement confrontées à des concentrations élevées. De ce fait, la vitesse consommation du substrat de l'ensemble des cellules ($\langle q_s \rangle$) atteint rapidement la vitesse $q_s(\langle S \rangle)$ prédite sous l'hypothèse d'un mélange parfait. Dans le cas de l'expérience menée par Dunlop, ces conditions conduisent à l'expression d'un métabolisme *overflow* (réacteur tubulaire muni d'une grille). Au contraire, si le micromélange est lent (constante arbitrairement choisie ici à 500ms), la vitesse d'assimilation de l'ensemble des cellules est inférieure à la vitesse atteinte dans le cas d'un mélange rapide. Dans ce cas, la consommation de substrat est inférieure à la vitesse $q_s(\langle S \rangle)$ prédite sous l'hypothèse d'un mélange parfait, expliquant

l'absence de métabolisme *overflow*. Elle augmente progressivement et n'atteint cette vitesse qu'après 5s, soit en sortie du réacteur. Notons que le retour dans la cuve agitée a pour effet de diluer l'excès de substrat dans l'ensemble de la cuve et donc de mettre fin à l'exposition à de fortes concentrations.

Le graphe II.16 présente des résultats de modélisation lorsque la concentration moyenne est faible (0.02 g.L^{-1}), soit seulement le double de la valeur de K_s , et le temps de micromélange relativement lent. En supposant un mélange instantané, la vitesse spécifique d'assimilation du substrat représenterait seulement $2/3$ de la vitesse maximale (équation II.6). Cette information est représentée par la courbe en trait pointillé.

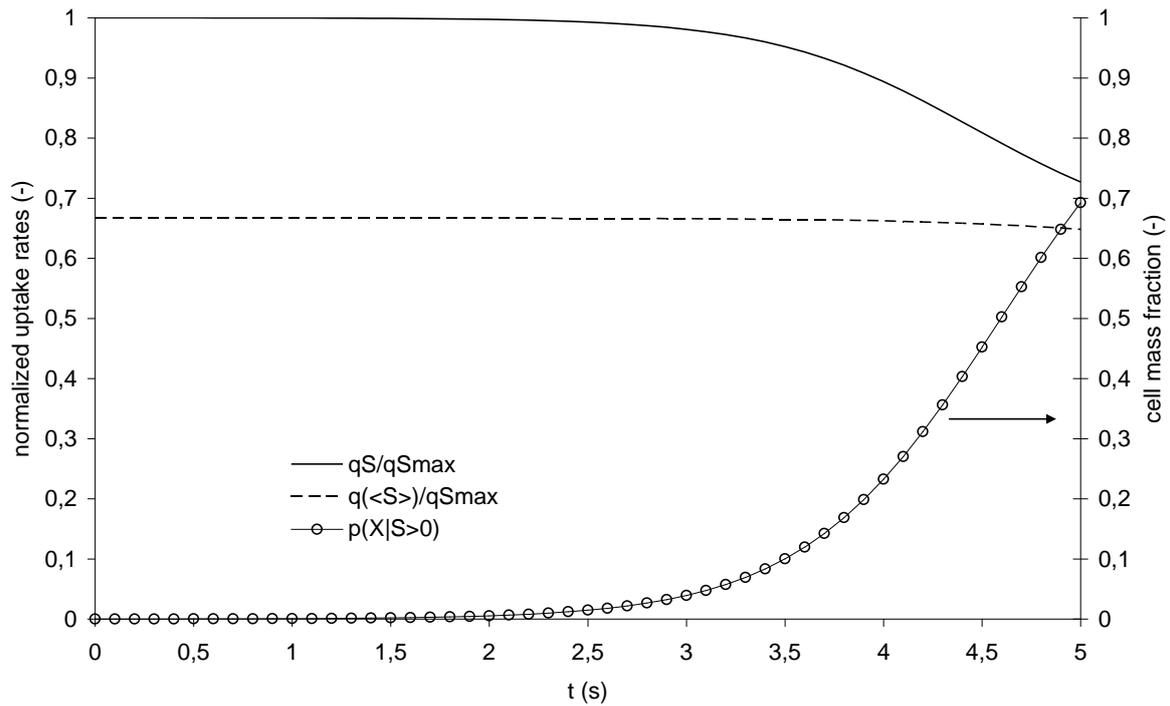
$$q_s(\langle S \rangle) = 0.66q_{s \max} \quad \text{Eq II.6}$$

Sur ce graphique est également présenté la vitesse d'assimilation dans la zone de réaction normalisée par la vitesse maximale d'assimilation. Pour les cellules présentes dans un environnement riche en substrat, on observe ainsi que la vitesse d'assimilation est supérieure à celle attendue si l'on considère le volume de réaction parfaitement mélangé.

Ce graphe présente également la fraction massique des cellules dans la zone de réaction (notée $p(X|S>0)$). Rappelons que seules ces dernières sont exposées au substrat. La proportion de la population cellulaire concernée atteint 70% de la population totale à la sortie du réacteur tubulaire. Au fur et à mesure que le mélange s'opère, la concentration vue par les cellules diminue alors que de plus en plus de cellules se trouvent en présence de substrat, et la vitesse d'assimilation normalisée se rapproche de la vitesse attendue.

Cette représentation met en exergue le fait que, même dans le cas d'une concentration moyenne en substrat trop faible pour entraîner un quelconque *overflow*, les effets de la ségrégation dans le réacteur ont pour conséquence de confronter une partie de la population à des concentrations bien supérieures, entraînant de fait l'expression de

l'overflow. Négliger la ségrégation dans le réacteur conduit alors à une erreur d'interprétation en considérant que toutes les cellules voient la concentration moyenne résultante. Pour des mêmes conditions de concentration moyenne, la diminution de la vitesse de micromélange aura pour effet de réduire la proportion de cellules présentes dans un environnement riche en substrat. Le réacteur sera plus ségrégué et la différence entre les niveaux de concentration sera plus importante.



Graph II.16 : effet de la ségrégation lorsque la concentration moyenne en substrat est faible ($t_k=500ms$)

4.3. Conclusion

De part son mécanisme, le micromélange peut interagir avec la réaction biologique à différents niveaux.

Dans le cas de réacteurs non alimentés, le flux de substrat apporté aux cellules est contrôlé par le niveau de micromélange (figure II.1). Si ces faits sont bien établis dans la théorie du mélange, leur effet sur le comportement bactérien n'a pas été démontré au cours de cette étude.

Si au contraire, le réacteur est alimenté (alimentation en glucose dans les expériences de Dunlop ou en oxygène dans notre cas), la vitesse d'incorporation de fluide « frais » dans le milieu de culture va influencer la concentration de l'environnement proche des cellules et ainsi affecter les vitesses moyennes de réaction. C'est ce qu'illustre la modélisation du couplage entre réaction biologique et micromélange. Les résultats montrent comment la qualité de ce dernier peut conduire à différents états de ségrégation au sein d'une population cellulaire. Nous avons entre autre montré, grâce à ce modèle, comment la concentration vue et la proportion de la population bactérienne concernée peut varier en fonction de la qualité du micromélange, et ainsi expliqué les résultats obtenus par Dunlop. Lorsque le micromélange est efficace (temps de micromélange court), le substrat apporté est distribué de façon plus homogène. Si la concentration en substrat résultante est supérieure à la concentration critique, toutes les cellules présenteront un métabolisme *overflow*. Au contraire, pour des quantités de substrat ajoutées identiques, un temps caractéristique d'incorporation plus lent entraîne que la sous-proportion de cellules ayant du substrat dans leur environnement diminue, la concentration vue par les cellules étant bien plus importante (figure II.3). Au niveau de la population, les effets du métabolisme *overflow* ne sont pas visibles car ne sont le fait que d'une faible proportion de cellules.

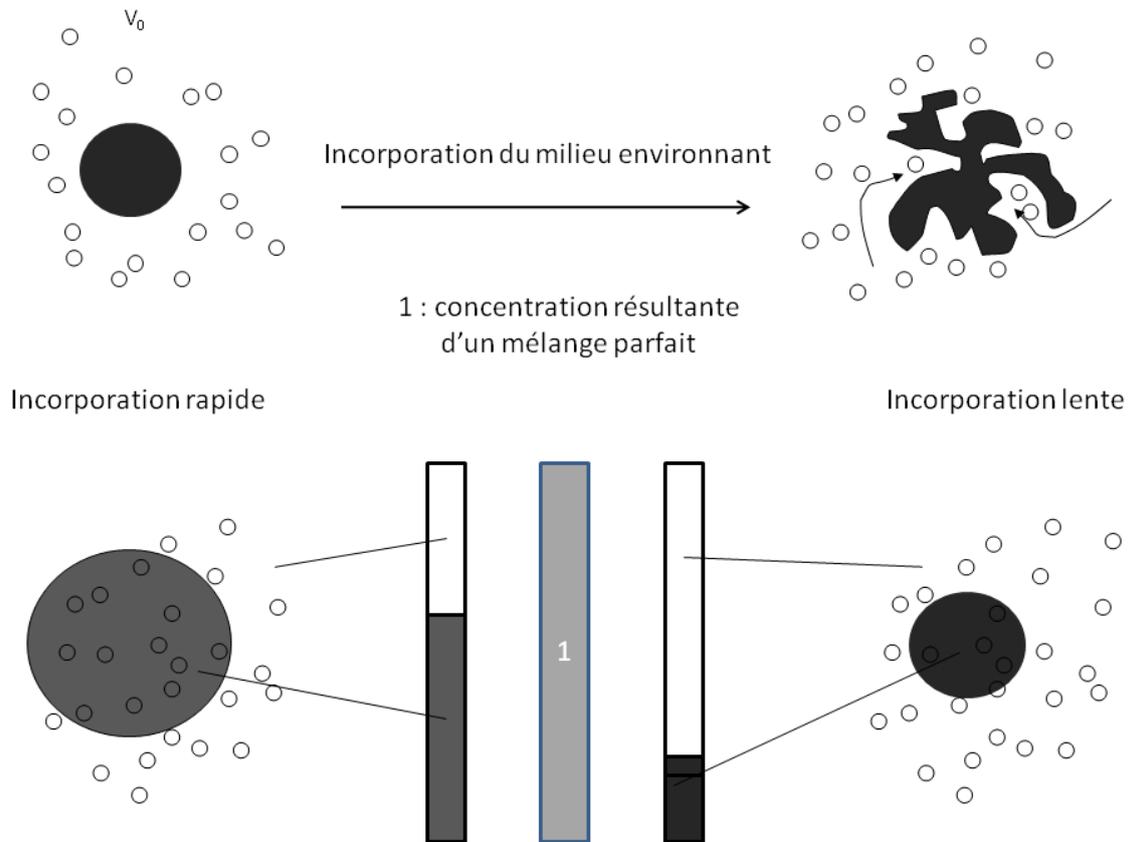


Figure II.3 : Illustration du micromélange par incorporation et de son effet sur le couple concentration/proportion de la population concernée.

L'importance de la prise en compte des effets de micromélange est ainsi mise en exergue, en particulier si la vitesse d'assimilation du substrat est directement proportionnelle à la concentration à la surface de la cellule, comme le suggèrent les travaux de Ferenci (1999a;1999b).

Ces résultats illustrent également en partie nos observations quant aux concentrations en oxygène subies par les cellules. Si une vitesse de rotation élevée permet de transférer une plus grande quantité d'oxygène dans le réacteur et donc d'inhiber la pyruvate formiate lyase (responsable de la synthèse de formiate), elle permet également un meilleur mélange de l'oxygène dissout. Ainsi, la proportion de cellules affectée par l'exposition à l'oxygène est plus importante lors d'une culture à vitesse de rotation élevée de part un meilleur transfert, mais aussi un meilleur mélange de l'oxygène. Ces

conclusions quant à la répartition de l'oxygène rejoignent les résultats de Dunlop en matière d'exposition à des concentrations en substrat sub-critiques. Un mélange plus efficace conduit à faire subir à l'ensemble de la population des concentrations sub-critiques, entraînant un métabolisme *overflow*.

5 CONCLUSION

Ce chapitre consacré à l'analyse du mécanisme d'interaction entre mélange et réaction biologique et à l'étude des effets de mélange sur des cultures de *L. lactis* NCDO 2118 nous a permis de montrer que le phénomène de mélange à l'échelle locale a peu d'influence sur le métabolisme cellulaire via le contrôle du flux de substrat reçu dans les conditions batch. En effet, quelles que soient les conditions de mélange (taux de dissipation de l'énergie) imposées via la vitesse de rotation du cylindre interne, les cellules présentent un métabolisme homolactique. Cela signifie que du point de vue des cellules, le flux de substrat reçu ne varie pas de façon significative avec la vitesse de rotation. Au contraire, les deux vitesses de rotation permettent le transfert de quantités d'oxygène significativement différentes conduisant à l'inhibition partielle de la PFL dans le cas où mélange et transfert sont les plus efficaces. Cette problématique du couplage transfert-mélange-réaction nécessiterait de plus amples investigations, mais le choix a été fait de s'affranchir des effets de transferts et donc d'inertier le réacteur pour la suite de ce travail.

A l'aide d'un modèle de micromélange, nous avons modélisé le couplage entre réaction biologique et micromélange. Les résultats montrent comment la qualité de ce dernier peut conduire à différents états de ségrégation au sein d'une population cellulaire. Nous avons entre autre expliqué, grâce à ce modèle, comment la concentration vue et la proportion de la population bactérienne concernée peuvent varier en fonction de la qualité du micromélange. Cette approche associant intensité du stress et fraction de la population exposée fournit une base théorique permettant d'expliquer les résultats obtenus par Dunlop. Un temps de mélange long a pour conséquence, pour les cellules incorporées, un temps de séjour dans des concentrations élevées relativement long, alors qu'au contraire, une autre population cellulaire issue de la même culture sera dans

des conditions limitantes en substrat. La prise en compte des effets de mélange aux petites échelles permet de considérer les effets de ségrégation et le fait que toutes les cellules cultivées au sein d'un bioréacteur ne font pas face aux mêmes niveaux de concentration. L'importance de la prise en compte des concentrations locales plutôt qu'une concentration moyenne lors de la prédiction du comportement cellulaire est alors mise en exergue.

Si ces premiers résultats montrent qu'en anaérobiose, la variation du taux de dissipation de l'énergie cinétique turbulente ne modifie pas de manière significative le métabolisme du glucose chez *L. lactis* NCDO 2118, il semble que ces variations en affectent le phénotype. D'une part, un défaut de reproductibilité, non clairement expliqué à ce stade, dans la croissance et le métabolisme de la souche est observé spécifiquement lors des cultures à 20 RPM en anaérobiose. De plus, les cultures à 20 RPM présentent un retard de croissance par rapport à celles à 114 RPM, ainsi que l'apparition de minces fils traduisant des agrégats cellulaires lors de la culture. Le chapitre suivant s'attache à statuer sur ce phénotype et à éclaircir son origine.

MINI REVIEW : RELATIONSHIP BETWEEN HYDRODYNAMIC CONDITIONS AND SUBSTRATE INFLUX TOWARD CELLS.

M. Douaire, J. Morchain*, A. Liné

Université de Toulouse; INSA,UPS,INP; LISBP, 135 Avenue de Rangueil, F-31077 Toulouse, France

INRA, UMR792 Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés, F-31400 Toulouse, France

CNRS, UMR5504, F-31400 Toulouse, France

e-mail: jerome.morchain@insa-toulouse.fr

Abstract. This paper proposes a review of studies investigating the coupling of hydrodynamics and bioreaction and highlights the complex relationship between energy dissipation, substrates uptake rate and cell physiology. Many lab-scale studies were conducted to understand the effect of substrate heterogeneities on the cell metabolism caused by insufficient mixing. Beyond large scale heterogeneities, small scale turbulent motion which controls the substrate distribution at the microscale also seriously modifies the behaviour of the population. Since these studies tend to demonstrate that mixing at small scales plays an important role, segregation (especially in the feed zone) should be therefore taken into consideration in models used for the scale up of bioprocesses. As an illustration of this, the Engulfment mixing model coupled with a model for bioreaction is used to study the effects of imperfect mixing. Results are in good agreement with the experimental observations from the literature.

Key words: Bioreactors; Substrate transfer; Biological reaction; Micromixing; local hydrodynamic.

1. INTRODUCTION

The modelling of biological reaction at different scales is a real challenge for the research community. Despite many efforts, numerous questions among which the

integration of micromixing in turbulent flow with biokinetics and the dynamics of the metabolism triggered by concentration fluctuations are still opened [1]. The study of the interaction between mixing and biological reactions is complicated by the fact that cells adapt their behaviour to the environmental condition they encounter. In particular for fed-batch cultivations the residence time of cells is sufficiently important for physiological adaptation to take place. As noted by Bailey and Ollis, [2] “effects imposed at a certain length scale can influence the observed kinetics of cell population in different ways”. It is important to recognize this connection so that kinetic measurements and models can be developed under conditions which will resemble in some senses those encountered in the large scale reactor.” Recent investigations in this domain include on the one hand the understanding of the mechanisms provoking reduced yields and on the other hand, the possibilities to obtain a better modelling of such large scale processes and heterogeneities. In this paper we will focus on the latter aspects.

1.1. Experimental evidence of mixing issue in bioreactors

Large scale bioreactors have been shown to exhibit heterogeneous concentration fields : cells circulating through such reactors are submitted to an extracellular fluctuating environment [3, 4]. As a result, large scale cultivations exhibit lower carbon conversion yields on biomass than expected from lab-scale experiments : Bylund *et al.* [3] observed a reduced yield of 20% for cultures of *Escherichia coli*; same results were reported by Enfors *et al.* [5] for the production a Baker’s yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Generally, substrate is fed at the top of the reactor and air is injected at the bottom. Because of imperfect macromixing both oxygen and substrate gradients are formed (low oxygen and high substrate concentrations at the top and low substrate and high oxygen concentration at the bottom). The effects of such heterogeneities on microbial metabolism were studied in scale down reactors, composed of a continuous stirred tank and a plug flow reactor with a view of periodically exposing cells to sudden variation of the substrate concentration in their environment [3-8]. Insufficient macromixing represented as periodic exposure to excessive substrate concentration induces some modifications on the cell metabolism, leading to the formation of by-products and

decreasing the overall reactor performance. Dunlop and co workers pointed out the influence of intermediate mixing scales (i.e. mesomixing) on continuous cultures of *S. cerevisiae* [9, 10]. The conversion yield of substrate into biomass is found to be dependent on the number and position of injection point in a 3L aerated bioreactor.

1.2. The coupling between hydrodynamic and bioréaction

Bioreactors are characterized by a complex three phase flow (liquid, gas, biomass). The modelling of a bioreactor requires a model for the flow field, a model for the reactions taking place in the biomass and a model for the mass transfer between phases (from gas to liquid and from liquid to biomass). Despite the fact that biological reactions are conditioned by the mass transfer between the liquid and the biomass, hydrodynamics and bioreactions are generally coupled through conservation equations for the dissolved species. Only a few examples exist where the population of microorganisms is treated with a Lagrangian approach [7, 11, 12]. The conservation equation for the scalar α , written over a control volume, accounts for convective, diffusive, turbulent transport and reaction:

$$\frac{\partial \overline{C_\alpha}}{\partial t} + \overline{u_j} \frac{\partial \overline{C_\alpha}}{\partial x_j} = \frac{\partial}{\partial x_j} \left[D_\alpha \frac{\partial \overline{C_\alpha}}{\partial x_j} + \overline{u'_j C'_\alpha} \right] + R_\alpha$$

The scalar transport can be described using compartment models or Computational Fluid Dynamics (CFD) codes. Compartment models are very popular in the domain of bioreactor simulation because multiphase aspects and metabolic models can be easily implemented in the overall model for the bioreactor [13-15]. However, when a compartment model is used for the hydrodynamics, all transport terms in equation (1) have to be modelled. Recent progress in computer power now allows for the computation of the 3D turbulent, multiphase flow by CFD calculations [1, 4, 5, 16]. Whatever the approach (Eulerian or Lagrangian) two assumptions are made: - the control volume is homogeneous; a possible occurrence of segregation under the resolved scale is not considered. - the reaction rate is computed from kinetic laws that

are strictly valid for steady state conditions with a high degree of mixing (small scale reactor). More details are presented in the next section.

Yet, it is well established that the applicability of the biokinetic models to temporally changing conditions experienced by microorganisms in large scale bioreactors is not guaranteed [15]. Frequently, the parameters of the biokinetic model (including metabolic model) obtained at the lab scale have to be adapted in order to fit the results in large scale bioreactors [14]. It has already been pointed out that the interaction between mixing and biological reaction (physiological response to imperfect mixing) has to be taken into account in order to improve the predictive capabilities of the models [1]. To begin with, recent progresses in the description of the substrate assimilation capacity of the microorganisms are presented. This brief presentation is important since the substrate assimilation is not characterized by a constant rate but depend on the cell physiology which is conditioned by the encountered fluctuating concentrations. This is a significant increase in complexity by comparison to turbulent reacting flows.

2. THE IMPACT OF MIXING ON BIOREACTION

2.1 Consequences of imperfect mixing on the metabolism

Considering that cells growing in bioreactors are exposed to two kinds of fluctuating concentrations, rapidly changing concentration due to small mixing scales and low frequency fluctuation inhering in the circulation time in the bioreactor, the aim of this paragraph is to highlight the impact of periodic fluctuations on bacterial metabolism. Microbiologists all agree with the fact that starvation and suboptimal levels of substrate induce non negligible consequences on bacterial metabolism [17]. Among them, one can note the fact that bacterial cells adapt their substrate uptake capacities to the concentration fields they undergo [18]. In other words when the substrate concentration changes abruptly in time, or equivalently when cells are transported through a gradient of substrate, relation (2) is not applicable locally because it is a law of equilibrium. Neubauer *et al.* [6, 8] showed that heterogeneous conditions caused by insufficient mixing influences cell physiology. They noticed that cells cultivated under

limiting conditions (starvation period during 27 minutes) but regularly exposed to substrate excess (for 2 minutes) respond by an increase of their substrate uptake capacity. As a result the instantaneous uptake rate measured after the limitation relief is up to six times higher than the maximum uptake rate measured in a batch culture. This faculty to exhibit instantaneous uptake rate that are not correlated to the growth rate was also reported by Leegwater *et al.*[19]. Natarajan and Srienc [20, 21] confirmed by recent techniques that growth rate and substrate uptake rate were decoupled in the range of growth rates studied. Ferenci explains that when exposed to limiting concentration cells develop additional systems for the transport of glucose characterized by a high affinity for the substrate (very low K_s value) [17, 18, 22]. From these experimental results, it is possible to conclude that cells can develop an extra assimilation capacity, suggesting that they assimilate a certain amount of excess substrate when suddenly exposed to high substrate concentration. The actual instantaneous uptake rate of the cell population is therefore a consequence of the culture history [8]. Thus, the maximum uptake rate cannot be readily set to a constant independently from the scale of the reactor if imperfect mixing conditions occur. Then, the instantaneous uptake rate in heterogeneous concentration field cannot be calculated from the average growth rate. However in most papers the evaluation of R in equation (1) is obtained from a Monod type law described in all microbiology textbook, which relates bacterial growth rate μ to the substrate concentration S . This relationship is obtained from steady state experiments and perfect mixing is assumed. Therefore the local value $S(x,t)$ around each cell, the temporal average $\overline{S(t)}$ and the volume average $\langle S \rangle$ are all equal. The substrate uptake rate q_s is defined by equation (2) where K_s is defined as the affinity constant for the substrate (a few mg.l^{-1}), Y_{XS} the conversion yield of substrate into biomass (around $0.5 \text{ g}_X.\text{g}_S^{-1}$) and μ_{\max} the maximal growth rate.

$$q_s = Y_{XS}^{-1} \cdot \mu = Y_{XS}^{-1} \cdot \mu_{\max} \frac{\langle S \rangle}{K_s + \langle S \rangle} = q_{s \max} \frac{\langle S \rangle}{K_s + \langle S \rangle} \quad (2)$$

By definition this relation is valid for cells that are adapted to their environment, i.e. that have been facing a constant concentration $S(t)$ for a long time. At steady state, the

uptake rate is found to be proportional to the growth rate, which is itself related to the averaged volume concentration in the bioreactor. Because it is related to growth, the substrate assimilation rate as defined in (2) is indeed an averaged value over the time scale for growth. Yet, the literature reported above clearly indicates that the maximum uptake rate is not constant but is a function of the culture history. Therefore, equation (3) should be preferred.

$$q_{S \max}(t) = f\left(\frac{1}{\tau} \int_{t-\tau}^t q_S(u) du\right) \quad (3)$$

In order to account for such a memory effect, the most natural approach is to treat the biomass as a dispersed phase. Recently, Lapin *et al.* [11, 12] have integrated a dynamic metabolic model for the glucose uptake (adapted from Chassagnole *et al.* [23]) in an Euler- Lagrange simulation of a bioreactor in order to compute the local substrate uptake rate as a function of the cell composition. This modelling approach allows for the decoupling of the substrate uptake rate from the local concentration. It must be noted however that the local concentration here is still an averaged value over the control volume which size is determined by the spatial resolution of the hydrodynamic model.

2.2. Turbulent mixing and substrate influx

The mixing phenomena in turbulent flows can be decomposed into three steps (macro-, mesoand micromixing) occurring simultaneously, whose characteristic time and length scales are summarized in table 1 [24, 25]. For usual reactor configurations, the Kolmogorov scale varies from 50 to 300 μm , thus being far larger than bacterial cell (2 μm) or yeast (10 μm) [9]. Microbial cells are placed in molecular diffusion controlled environment and the phenomenon responsible for providing substrate to the cell remains the molecular diffusivity. However the concentration in the environment of cells is controlled by mesomixing. Al Homoud and Hondzo studied the effect of very low turbulent dissipation rate ε on the rate of assimilation of oxygen and glucose [26, 27]. They described an experimental device which consisted in a batch reactor with an oscillating grid, whose frequency varied from 0 to 6Hz resulting in an averaged

ε ranging from 0 to $4.6 \cdot 10^{-5} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-3}$. The measured assimilation rates are always below the maximum uptake rate which means that the uptake is limited by the transport towards the cell. In such conditions, i.e. no segregation at the macroscopic scale, very low ε , limiting substrate concentration, they found that the Sherwood number was correlated to ε . However, such low values are not encountered in industrial bioreactors and therefore, diffusion is not the limiting step for assimilation in stirred bioreactors. Merchuk and Asenjo [28] proposed a reinterpretation of the Monod's law as the result of the competition between fast reaction at the cell interface and limiting transport. They showed that the K_S value is indeed an apparent constant that depends on the rate of mass transport. As a consequence, the parameter K_S also should not be set independently from mixing conditions.

3. INFLUENCE OF ENERGY DISSIPATION RATE, LOCAL HYDRODYNAMIC CONDITION ON SUBSTRATE INFLUX: BIBLIOGRAPHICAL ELEMENTS

3.2. Influx controlled by mixing effects

	Macromixing	Mesomixing Reduction of integral length scale	Micromixing by engulfment	Micromixing by diffusion
Time scales	$t_c = \frac{V}{N_{Qc} \cdot N \cdot d^3}$	$t_s = 2 \left(\frac{L_c^2}{\varepsilon} \right)^{\frac{1}{3}}$	$t_k = \left(\frac{\nu}{\varepsilon} \right)^{\frac{1}{2}}$	$t_D = 2 \left(\frac{\nu}{\varepsilon} \right)^{\frac{1}{2}} \arcsin h \left(0.05 \frac{\nu}{D} \right)$
Length scales		$\Lambda = \frac{1}{2} \frac{k^{\frac{3}{2}}}{\varepsilon}$	$\lambda_k = \left(\frac{\nu^3}{\varepsilon} \right)^{\frac{1}{4}}$	$\lambda_B = \left(\frac{D^2 \nu}{\varepsilon} \right)^{\frac{1}{4}}$

Table 1 : time and length scales of mixing in homogeneous turbulent flow

In fed reactors, substrate is transported from the feeding zone through macro and mesomixing down to the Kolmogorov scale. Besides macromixing, which is correlated to

circulation time in the reactor and the averaged dissipated energy, the local energy dissipation rate is a key element for determining the substrate influx to cells. Indeed, local segregation can occur whereas the reactor is perfectly macro mixed. Dunlop and co-workers [29] have shown that feeding substrate from zones with high energy dissipation rate causes an increase of substrate flux towards cells. Some of their experiments were conducted using a stirred tank reactor with a recirculation loop through a static mixer with a removable grid. Substrate is fed either in the stirred or plug flow zone to *S.cerevisiae*. This yeast presents the capacity to develop overflow metabolism when exposed to substrate concentration above a critical value (growth repression). When the substrate is fed into the well mixed stirred tank bioreactor no overflow is observed, indicating that most of the cells experiment a concentration that remains below the critical value. But, when the substrate is fed through the static mixer the averaged concentration in the PFR zone controlled by the relative mass flow rates of the feed and the recirculation, exceeds the critical value. When the grid is removed, mixing in the mixer body is poor ($Re=940$) and only few cells face a high concentration and are consequently repressed. In the grid-equipped static mixer ($\epsilon=1kW.m^{-3}$) all cells experience the sub critical substrate concentration which causes overflow and a significant decrease in the reactor performance. This study clearly shows the impact of mixing intensity at the feed point, in a way that it conditions the cell population for further cultivation in the stirred tank. In another lab scale study [9], conducted in well agitated continuous fermentor, overflow metabolism was observed when the feed point is located in a zone of low ϵ . According to the methodology proposed by Bourne [25] for the investigation of mixing effects in chemical reactors, this suggests an effect of mesomixing. These studies show the importance of considering both the local ϵ and substrate concentration values to calculate the substrate flux to cells.

3.2. Micromixing model for the investigation of substrate concentration distribution during first mixing times

We will now examine the source of errors using equation (2) to compute the source term in equation (1) when some segregation in the control volume exists. This was done by using the E model with self engulfment [30]. This model distinguishes two zones in

the mixture, reaction only takes place in the substrate rich zone in which cells are incorporated at a rate defined by the parameter $E=1/t_k$. The PFR zone from Dunlop's experiments is studied [29]. In figure 1, the averaged concentration in the mixture (0.2 g.L^{-1}) is far above K_s , and results are examined in terms of the ratio between the averaged assimilation rate and the assimilation rate based on the averaged concentration (perfectly mixed hypothesis). When mixing is slow, the ratio smoothly increases with time. In such case the fraction of cells in the glucose rich zone, where they assimilate the substrate at the maximum rate, is small. When mixing is fast, the fraction of cells facing high concentration reaches 1 after 0.5 s.

Then, the entire population assimilates the substrate at the maximum rate for the time remaining in the PFR zone (set to 5 s in the simulations as in [29]). In case of $q(<S>)$ causing overflow, a perfect mixing will be prejudicial to the overall performance of the bioreactor as reported by Dunlop.

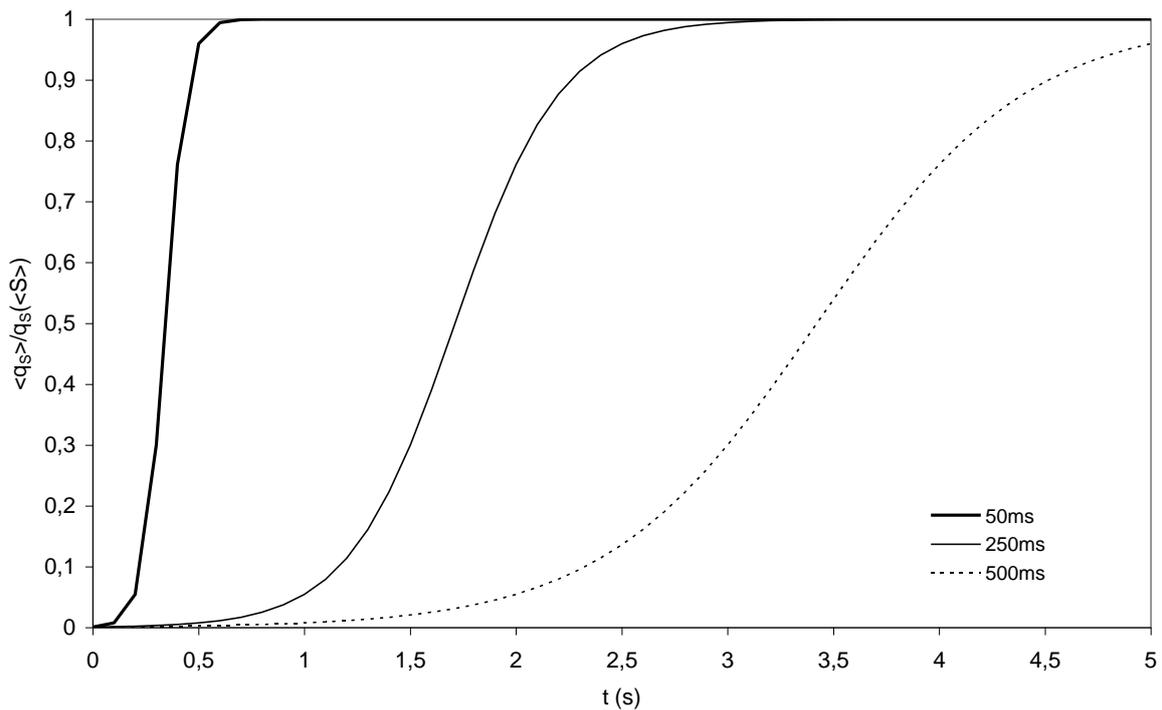


Figure 1: Effect of segregation on the substrate assimilation rate at high $\langle S \rangle$ value

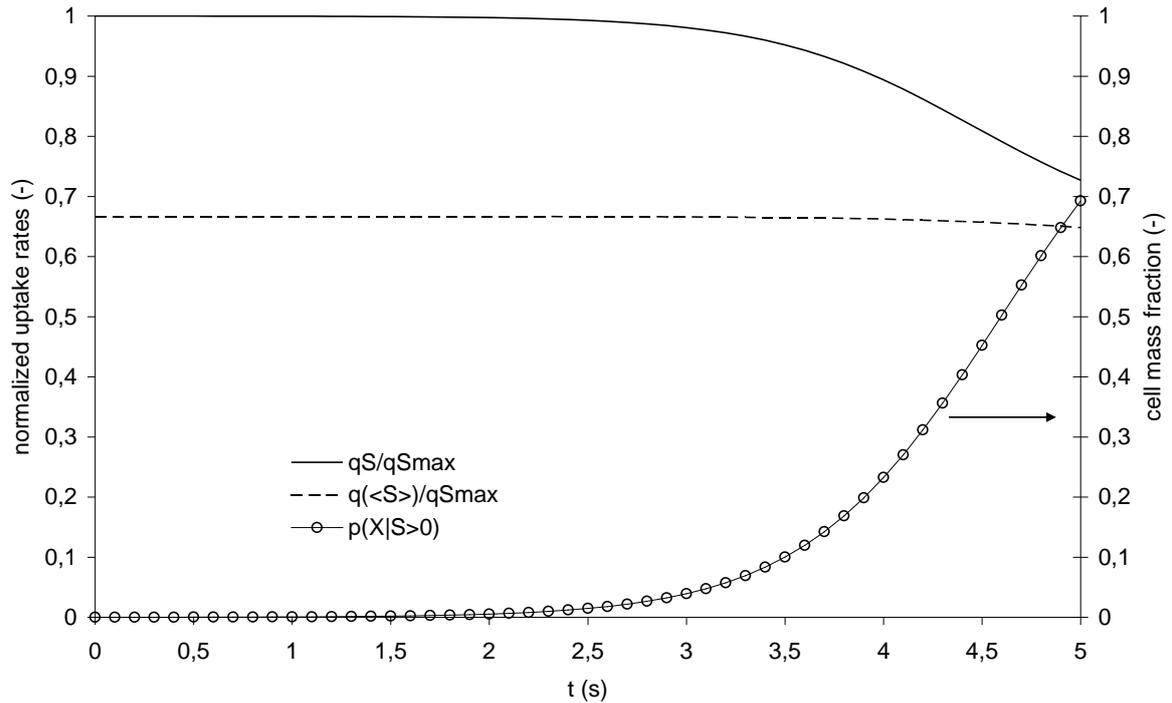


Figure 2: Effect of segregation at low $\langle S \rangle$ value. $t_k=500\text{ms}$

In figure 2 (graphe II.13), the average concentration (0.02 g.L^{-1}) is only twice the value of K_s , resulting in $q_s(\langle S \rangle) = 0.66q_{s_{\max}}$. The normalised uptake rate for the fraction of cells in the glucose rich environment (solid line) exceeds the normalized uptake rate based on the average value (dashed line). The fraction of cells in the glucose rich zone (line with symbols), increases as mixing proceeds and finally reaches 70% of the whole population at the end of the mixer. From this it is clear that using equation (2) instead of considering segregation would over estimate the fraction of reacting cells and underestimate the actual uptake rate of cells that assimilate the substrate. In case of $q(\langle S \rangle)$ under the overflow threshold, the model accounting for segregation is the only one to predict that a subpopulation of cells actually facing high concentrations may shift to an overflow metabolism.

4. CONCLUSION

Cells cultivated in large scale bioreactors are transported through a heterogeneous environment. Their behaviour is an integrated consequence of all the fluctuations they encounter. The impact of these fluctuations on microbial metabolism and therefore the

prediction of microbial compartment remains a crucial issue for microbiologists and engineers. Experiments reviewed clearly establish connections between mixing and biological reaction but the effects of sub-grid segregation are ignored in the modelling of bioreactors. Coupling biological reaction to a mixing model gave a sound explanation of experimental observations. This review points out the need to consider mesomixing for the prediction of local biological reaction rates in models used for the scale up of bioprocesses.

NOMENCLATURE

K_S	affinity constant for the substrate (mg.l^{-1})
q_S	substrate uptake rate (g.s. gx. h^{-1})
$q_{S\text{max}}$	maximum substrate uptake rate (g.s. gx. h^{-1})
S	substrate concentration
Y_{XS}	biomass yield on substrate (gx.gx^{-1})
μ	specific growth rate (h^{-1})
μ_{max}	maximal specific growth rate (h^{-1})

REFERENCES

1. Schmalzriedt S., Jenne M., Mauch K., Reuss M., "Integration of Physiology and Fluid Dynamics," in Process Integration in Biochemical Engineering, 2003, pp. 19.
2. Bailey J. E., Ollis D. F., 1986, Biochemical Engineering fundamentals. Mc-Graw Hill Book Compagny, Singapore.
3. Bylund F., Collet E., Enfors S. O., Larsson G., 1998, "Substrate gradient formation in the large-scale bioreactor lowers cell yield and increases by-product formation", Bioprocess and Biosystems Engineering, **18**, pp. 171.

4. Larsson G., Törnkvist M., Wernersson E. S., Trägårdh C., Noorman H., Enfors S. O., 1996, "Substrate gradients in bioreactors: origin and consequences", *Bioprocess and Biosystems Engineering*, **14**, pp. 281.
5. Enfors S. O., Jahic M., Rozkov A., Xu B., Hecker M., Jürgen B., Krüger E., Schweder T., Hamer G., O'beirne D., Noisommit-Rizzi N., Reuss M., Boone L., Hewitt C., Mcfarlane C., Nienow A., Kovacs T., Trägårdh C., Fuchs L., Revstedt J., Friberg P. C., Hjertager B., Blomsten G., Skogman H., Hjort S., Hoeks F., Lin H. Y., Neubauer P., Van Der Lans R., Luyben K., Vrabel P., Manelius Å., 2001, "Physiological responses to mixing in large scale bioreactors", *Journal of Biotechnology*, **85**, pp. 175.
6. P. Neubauer L. H. S. O. E., 1995, "Influence of substrate oscillations on acetate formation and growth yield in *Escherichia coli* glucose limited fed-batch cultivations", *Biotechnology and Bioengineering*, **47**, pp. 139-146.
7. Delvigne F., Destain J., Thonart P., 2005, "Bioreactor hydrodynamic effect on *Escherichia coli* physiology: experimental results and stochastic simulations", *Bioprocess and Biosystems Engineering*, **28**, pp. 131.
8. Ying Lin H., Neubauer P., 2000, "Influence of controlled glucose oscillations on a fedbatch process of recombinant *Escherichia coli*", *Journal of Biotechnology*, **79**, pp. 27.
9. E. H. Dunlop S. J. Y., 1990, "Micromixing in fermentors: Metabolic changes in *Saccharomyces cerevisiae* and their relationship to fluid turbulence", *Biotechnology and Bioengineering*, **36**, pp. 854-864.
10. Wenger K. S., Dunlop E. H., "Coupling of micromixing, macromixing and the glucose effect in continuous culture of *Saccharomyces cerevisiae*", *Industrial mixing technology - AIChE symposium series*, **90**, pp. 166-174.
11. Lapin A., Muller D., Reuss M., 2004, "Dynamic Behavior of Microbial Populations in Stirred Bioreactors Simulated with Euler-Lagrange Methods: Traveling along the Lifelines of Single Cells", *Ind. Eng. Chem. Res.*, **43**, pp. 4647-4656.

12. Lapin A., Schmid J., Reuss M., 2006, "Modeling the dynamics of E. coli populations in the three-dimensional turbulent field of a stirred-tank bioreactor--A structuredsegregated approach", *Chemical Engineering Science*, **61**, pp. 4783.
13. Mayr B., Moser A., Nagy E., Horvat P., 1994, "Scale-up on basis of structured mixing models: A new concept", *Biotechnology and Bioengineering*, **43**, pp. 195-206.
14. Vrábel P., Van Der Lans R. G. J. M., Van Der Schot F. N., Luyben K. C. A. M., Xu B., Enfors S.-O., 2001, "CMA: integration of fluid dynamics and microbial kinetics in modelling of large-scale fermentations", *Chemical Engineering Journal*, **84**, pp. 463.
15. Guillard F., Trägårdh. C., 1999, "Modeling of the Performance of Industrial Bioreactors with a Dynamic Microenvironmental Approach: A Critical Review", *Chemical Engineering & Technology*, **22**, pp. 187-195.
16. Schütze J., J. H., "Assessing aerated bioreactor performance using CFD," presented at 12th European conference on mixing, Bologna, Italia, 2006.
17. Ferenci T., 1999, "'Growth of bacterial cultures' 50 years on: towards an uncertainty principle instead of constants in bacterial growth kinetics", *Research in Microbiology*, **150**, pp. 431.
18. Ferenci T., 1999, "Regulation by nutrient limitation", *Current Opinion in Microbiology*, **2**, pp. 208-213.
19. Leegwater M. P. M., Neijssel O. M., Tempest D. W., 1982, "Apects of microbial physiology in relation to process control", *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, **32**, pp. 92-99.
20. Natarajan A., Srienc F., 2000, "Glucose uptake rates of single E. coli cells grown in glucose-limited chemostat cultures", *Journal of Microbiological Methods*, **42**, pp. 87.
21. Natarajan A., Srienc F., 1999, "Dynamics of Glucose Uptake by Single Escherichia coli Cells", *Metabolic Engineering*, **1**, pp. 320.

22. Ferenci T., 1996, "Adaptation to life at micromolar nutrient levels: the regulation of *Escherichia coli* glucose transport by endoinduction and cAMP", *FEMS Microbiology Reviews*, **18**, pp. 301.
23. Chassagnole Christophe, Naruemol Noisommit-Rizzi, Joachim W. Schmid, Klaus Mauch, Reuss. M., 2002, "Dynamic modeling of the central carbon metabolism of *Escherichia coli*", *Biotechnology and Bioengineering*, **79**, pp. 53-73.
24. Baldyga J., Bourne J. R., Hearn S. J., 1997, "Interaction between chemical reactions and mixing on various scales", *Chemical Engineering Science*, **52**, pp. 457.
25. Bourne J. R., 2003, "Mixing and the Selectivity of Chemical Reactions", *Org. Process Res. Dev.*, **7**, pp. 471-508.
26. Al-Homoud Amer, Hondzo Miki, Timothy L., 2007, "Fluid dynamics impact on bacterial physiology: biochemical oxygen demand", *Journal of environmental engineering*, **133**, pp. 226-236.
27. Hondzo M., Al-Homoud A., 2007, "Model development and verification for mass transport to *Escherichia coli* cells in a turbulent flow", *Water resources research*, **43**, pp. W08413, doi:10.1029/2006WR005613, 2007.
28. J. C. Merchuk J. A. A., 1995, "The Monod equation and mass transfer", *Biotechnology and Bioengineering*, **45**, pp. 91-94.
29. Fowler J. D., Dunlop E. H., 1989, "Effect of reactant heterogeneity and mixing on catabolite repression in cultures of *Saccharomyces cerevisiae*", *Biotechnology Bioengineering*, **33**, pp. 1039-1046.
30. Baldyga J., Bourne J. R., 2003, *Turbulent mixing and chemical reactions*. John Wiley and Sons, Chichester.

CULTURE DE *LACTOCOCCUS LACTIS* NCDO 2118 DANS UN REACTEUR COUETTE

Les résultats du chapitre précédent montrent l'apparition d'un phénotype jamais rapporté à notre connaissance, caractérisé par l'apparition, spécifiquement en réacteur Couette à 20 RPM, d'agrégats de cellules de *L. lactis*. Afin d'approfondir ce point, nous avons réalisé les mêmes cultures avec une concentration initiale en glucose de 25 g/L au lieu de 5 g/L afin d'obtenir plus de biomasse et d'amplifier ce phénomène. Les fermentations conduisent à la création de filaments macroscopiques que nous avons identifiés comme étant constitués de cellules emprisonnées dans une matrice polymérique. Nos travaux montrent que si ce phénotype est indépendant des conditions de mélange, il est induit par les conditions hydrodynamiques autour des cellules.

Les résultats ainsi que la discussion s'y apparentant sont présentés sous forme d'un article accepté dans *Biotechnology and Bioengineering* dans une première partie. La seconde partie présente une analyse complémentaire de la composition de la matrice obtenue et offre quelques hypothèses quant aux mécanismes biochimiques de structuration de la matrice.

1 APPARITION D'UN PHENOTYPE PARTICULIER ET NOUVEAU.

A unique phenotypic modification of *Lactococcus lactis* cultivated in a Couette bioreactor

Maëlle Douaire, Myriam Mercade, Jérôme Morchain*, Pascal Loubière

Université de Toulouse; INSA, UPS, INP; LISBP, 135 Avenue de Rangueil, F-31077 Toulouse, France;

INRA, UMR792 Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés, F-31400 Toulouse, France;

CNRS, UMR5504, F-31400 Toulouse, France

*corresponding author: e-mail: jerome.morchain@insa-toulouse.fr

Abstract

Batch cultures of *Lactococcus lactis* NCDO 2118 and IL 1403 were performed in a Couette bioreactor operated in the Modulated Wavy Vortex flow and the turbulent regimes. This study provides an overall analysis taking into account both mechanical stress and mixing in a Couette bioreactor. A unique phenotypic aspect has been proved to occur only in the Modulated Wavy Vortex flow regime for the two studied strains, namely that the cells become entrapped in a filamentous form. No change in the metabolic behaviour of the cells has been observed. The polymeric matrix has been microscopically observed through FISH and fluorescent lectin binding, showing cells entrapped in a glycoconjugate matrix. All hypotheses regarding insufficient mixing as a cause of this phenotype have been discarded, leading to the conclusion that this particular phenotypic feature is essentially due a combined effect of mechanical stress and flow structure. Particle size measurement during the fermentation course indicates that formation of filamentous form results from a continuous aggregation started in the early stages of the cultivation. According to our results a minimum shear is required to induce the ability for cells to aggregate. Then, it appears that both flow structure and mechanical stress (shear) are responsible for the appearance of such a filamentous form. As far as the authors know, this is the first experimental evidence of a bio polymerisation induced by the flow structure.

1.1. Introduction

(Introduction)

Biological response to hydrodynamic stresses has been widely investigated during the past decades. From a theoretical point of view, one can distinguish between two kinds of stresses induced by hydrodynamic conditions: mechanical stress and chemical stress, which are both associated with mixing. Substantial evidence of the interactions between mixing and/or mechanical stress and bioreactions is available (Lara *et al.* 2006). While mechanical stress is a critical issue regarding cell damage (e.g. for animal cells (O'Connor *et al.* 2002), (Curran and Black 2004) and filamentous fungi (Amanullah *et al.* 2000; Jüsten *et al.* 1996)), insufficient mixing also impacts cell metabolism because it

exposes cells to nutrient concentration fluctuations in their environment. Mixing issues can lead to lower (bioreactions) yields in large scale bioreactors (Bylund *et al.* 1998; Enfors *et al.* 2001; George *et al.* 1998; Larsson *et al.* 1996) and also in scaled-down bioreactors (Amanullah *et al.* 2001; Delvigne *et al.* 2006; Hewitt *et al.* 2000; Lara *et al.* 2006; Namdev *et al.* 1992; Oosterhuis *et al.* 1983). The influence of insufficient mixing at very low agitation levels has also been studied, mainly in the environmental biology field (Al-Homoud *et al.* 2007; Bergstedt *et al.* 2004; Hondzo and Al-Homoud 2007). In the range of power input studied $[0.6 - 46.3] \cdot 10^{-6} \text{ W} \cdot \text{kg}^{-1}$ the oxygen uptake rate was shown to be facilitated by small-scale fluid motion (Al-Homoud *et al.* 2007). Whatever flow-related phenomenon is considered (mixing or mechanical stress), one key parameter is the power input: both total value and the spatial distribution of the local energy dissipation rate.

In stirred bioreactors, the power input is generally high ($1 \text{ W} \cdot \text{kg}^{-1}$), the flow field is highly heterogeneous in terms of local energy dissipation rate (Delafosse 2008; Delafosse *et al.* 2009) and the 3D flow structure is very complex. So, it is likely that both mechanical and chemical stresses are present and the analysis of the biological response to environmental fluctuations is therefore rather complicated. The situation is exacerbated when some gas sparging must be incorporated into the bioreactor, as highlighted by a study which revealed that local oxygen limitations occurred in a presumably perfectly mixed gas-liquid bioreactor (Garcia *et al.* 2009).

As alternatives to the stirred vessels, bioreactors have been developed which utilise simpler flow configurations. In this study, the axisymmetric flow in the annular gap between two coaxial cylinders is considered. When the inner cylinder rotates and the outer one is immobile a laminar flow, known as Couette flow, is first observed. Above a critical rotational speed, the flow becomes unstable and axially-stacked vortices appear in the annulus, a phenomenon known as Taylor vortex flow (Kataoka 1986). Since the original work of Taylor to those of Kataoka, Rudman (Rudman 1998; Rudman *et al.* 2008) or Climent (Climent *et al.* 2007) this type of flow has received a lot of attention from the fluid mechanics community as it represents a fundamental problem for studying flow instability. This is also true in the chemical engineering field, where this

flow was mainly used in the frame of mixing and precipitation studies (Desmet *et al.* 1996; Desmet *et al.* 1996; Liu and Lee D.J. 1999; Marchisio *et al.* 2001; Ohmura *et al.* 1997; Ohmura *et al.* 1998; Wang *et al.* 2005). Couette reactors are of particular interest for such studies because the flow field can be either laminar or fully turbulent whilst maintaining coherent structures named Taylor vortices. In the turbulent regime, the flow structure is stable, spatially homogeneous and exhibits a narrow range of mixing control parameters (narrow distribution of local energy dissipation) (Racina and Kind 2006). Between the laminar and turbulent regimes, a complex transition sequence occurs, including the development of so called Modulated Wavy Vortex flow. A complete characterisation of these regimes as well as transition limits in terms of Reynolds and Taylor number can be found in Kataoka (Kataoka 1986).

As far as biological applications are concerned, the classification and analysis of the previously published works is quite complex because of the diversity of strains, operating conditions and flow regimes studied. Arnaud and co-workers (Arnaud *et al.* 1993) studied the effect of a controlled shear between 0 and 72 Pa, on the bacteria *Lactobacillus bulgaricus* in a laminar Couette flow. In order to maintain the laminar flow whilst increasing the rotation speed, CMC (carboxymethyl cellulose) was added to increase the viscosity. Growth rate, lactose consumption and lactic acid production were improved by intermediate shear stress levels (between 30 and 50 Pa). However the observed cell lengthening might have introduced a bias in the biomass concentration measurement, which was undertaken using an optical density technique. The authors also pointed out that besides the reduced mass transfer due to the increased viscosity, the CMC itself has a chemical effect on the biological activity. Cussatlegras and Le Gal studied the effect of mechanical stresses on the bioluminescence of the dinoflagellate *Pyrocystis noctiluca* in a laminar Couette reactor (Cussatlegras and Le Gal 2004). They showed that a constant shear (in laminar conditions) only induces a weak response whereas rapid changes in the shear produce a strong light emission. Sahoo *et al.* (Sahoo *et al.* 2003) reported cells size modification, enzymatic activity and transcriptomic response to shear stress of *B. subtilis* cultivated under laminar flow conditions.

Recently, Patel and co-workers presented experimental evidence of a relationship between the shear rate, the growth rate, the protein production and the morphology of *Trichoderma reesei* (Patel *et al.* 2010). The 5 L Couette reactor was equipped with a membrane on the inner cylinder for oxygen supply and was operated either in batch or continuous mode. The cultivations were performed under laminar conditions with a shear rate ranging from 78,2 to 326 s⁻¹. Unfortunately, both mixing and oxygen mass transfer varied with the rotation speed, hence the biological response was probably due to multiple effects.

Barbouche studied the effect of mechanical stress on mammalian cells in an oxygen perfused Taylor-Couette reactor (Barbouche 2008). In order to alleviate the interactions between agitation and gas-liquid mass transfer, oxygen was provided through a membrane covering the inner cylinder. Since the oxygen demand by mammalian cells is much lower than that of bacteria or yeasts, changing the rotation speed had little influence on the dissolved oxygen concentration and a better correlation was obtained between the magnitude of the stresses and the fraction of damaged cells (apoptosis).

If one excludes the works of Curran and Black (Curran and Black 2004; Curran and Black 2005), and that of Dunlop *et al.* dedicated to plant cells (Dunlop *et al.* 1994), then very few experimental studies on the relationship between the flow structure in a Couette reactor and the cell physiology are available. Curran and Black demonstrated the impact of shear stresses on mammalian cells, in terms of metabolism enhancement and phenotypic properties. Dunlop *et al.* showed that a correlation exists between the total energy dissipation and the biological activities (e.g. regrowth ability after an exposure to mechanical stress, membrane integrity, mitochondrial activity, aggregate break-up and lysis) in both laminar and turbulent flow regime. In particular, the ability for cells to grow is restricted well below the critical limit required to lyse the cells. Plant cells (20-100 µm) spontaneously grow in suspension culture as aggregates of hundreds of cells. The size of the plant cell aggregates formed decreases with an increase in the total energy dissipation.

This paper describes the results obtained in anaerobic batch culture of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* performed in a Couette reactor at two rotation speeds corresponding to the modulated wavy and the turbulent flow regimes. *Lactococcus lactis* is chosen because it exhibits a sensitivity toward substrate influx (Garrigues *et al.* 2001). Depending on substrate flux through the glycolytic pathway, homolactic or mixed-acid metabolism can occur. The analysis of the produced metabolites represents an interesting biological approach for observing the impact of mixing at the cell scale (which governs the external mass transfer toward cells) and provides valuable information on whether the cells' metabolism is influenced by the features of the flow. All cultures have been performed under anaerobic conditions so as to avoid complicating issues due to gas-liquid two phases flow or oxygen transfer through a membrane. Cultures have been repeated in two different Couette reactors using either commercial M17 medium or a chemically defined medium. It is found that a specific behaviour is triggered by the modulated wavy flow structure: whenever a culture is performed under this flow condition, a filamentous form is induced by an aggregation of cells entrapped in a polymeric substance. However the overall metabolism is not seriously affected. As far as the authors know, this is the first experimental evidence of a bio polymerisation induced by the flow structure. No such evidence of macroscopic phenotypic difference has even been demonstrated in a Couette bioreactor for bacteria. The possible links between these observations and the recent work of Chapot-Chartier *et al.* (2010) are discussed in the final part of the paper.

1.2. Matériel et méthodes

(Experimental set-up and methods)

1. Couette reactor characterisation

Most cultures are performed in a 2 L Couette reactor composed of two concentric cylinders (Height $H = 0.2$ m, inner radius $R_i = 0.100$ m and outer radius $R_o = 0.115$ m). Complementary cultures were performed in a slightly different Couette reactor (Height $H = 0.2$ m, inner radius $R_i = 0.10$ m and outer radius $R_o = 0.12$ m) with a view to

eliminate the possibility of bias due to other properties of the reactor, e.g. construction material.

For the main reactor, the resulting radius ratio, $\eta = R_i/R_o$ is 0.87. The inner cylinder is rotating, the outer one is immobile. The rotation speed, Ω can be varied from 2.1 to 12 rad.s^{-1} ($N = 20$ to 114 Revolutions Per Minute RPM). The flow field in this device was measured experimentally and simulated numerically by Coufort (Coufort 2004). In the velocity range studied by Coufort ($N \in [30-90]$ RPM), the flow was shown to be fully turbulent. A mean value of the specific power input, ε (W.kg^{-1}), was obtained from a volumetric integration of the local turbulent energy dissipation rate derived from 2D, 3 components, axisymmetric, RANS- $k-\varepsilon$ RSM numerical simulations (Coufort, 2004). It was found that these values were in good agreement with the energy dissipation estimated from the torque on the inner cylinder as well as with the experimental correlation of Wendt, reported by. (Lathrop *et al.* 1992).

$$\begin{aligned} \frac{T}{\rho \nu^2 H} &= 1.45 \frac{\eta^{3/2}}{(1-\eta)^{7/4}} \text{Re}^{1.445} \quad 400 < \text{Re} < 10.000 \\ \frac{T}{\rho \nu^2 H} &= 0.23 \frac{\eta^{3/2}}{(1-\eta)^{7/4}} \text{Re}^{1.7} \quad 10.000 < \text{Re} < 100.000 \end{aligned} \quad (1)$$

In this equation, T is the torque on the inner cylinder, (N.m), ν is the cinematic viscosity of the liquid phase (water properties are used) and Re is the Reynolds number defined as

$$\text{Re} = \frac{R_i \Omega (R_o - R_i)}{\nu} \quad (2)$$

In the present study, experiments were carried out at the maximum (114 RPM) and minimum (20 RPM) stable rotation speeds with a view to maximising the difference in specific power input. At the lowest rotation speed, the reduced Reynolds number ($\text{Re}/\text{Re}_{\text{crit}}$) is 27 which is slightly above the critical value above which instabilities occur ($\text{Re}/\text{Re}_{\text{crit}} = 20$) as explained by Esser and Grossmann (Esser and Grossmann 1995). The critical Reynolds number, Re_{crit} , is defined by these authors as:

$$\text{Re}_c = \frac{1}{\alpha^2} \frac{(1+\eta)^2}{2\eta\sqrt{(1-\eta)(3+\eta)}} \text{ with characteristic constant } \alpha \text{ being equal to } 0.1556$$

In our case its value is 117. It should be stressed that the flow structure differs notably between these two extreme conditions: at 20 RPM the flow structure corresponds to the Modulated Wavy Vortex Flow whereas it is Turbulent Vortex Flow at 114 RPM. In the latter case, the flow structure consists in a stack of stable counter-rotating toroidal vortices, called Taylor vortices. Visualisations of the corresponding flow structures can be found in Kataoka (1986) and Rudman (Rudman *et al.* 2008). In any case however, the specific power input, ε in W.kg^{-1} , can be estimated from the experimental correlation due to Wendt.

$$\varepsilon = \frac{P}{\rho V} = \frac{T\Omega}{\rho V} \quad (3)$$

In its non dimensional form, the specific power input corresponds to a power number, N_p , given by :

$$N_p = \frac{P(R_o - R_i)}{\rho V R_i^3 \Omega^3} \quad (4)$$

Figure 1 presents the power number and the specific power input dependence on the Reynolds number of the flow. This type of representation, $N_p=f(Re)$, is common in the field of mechanical agitation. In the laminar regime the power number is proportional to Re^{-1} , it is constant in the fully turbulent regime and varies continuously in the transitional regimes (Harnby *et al.* 1997). It can be seen that our experiments were conducted in this transition zone between strictly laminar and fully turbulent flow. The experiment at 20 RPM is close to the laminar regime ($Re < 2300$). The experiment at 114 RPM approaches the region of constant power number associated with fully turbulent flow.

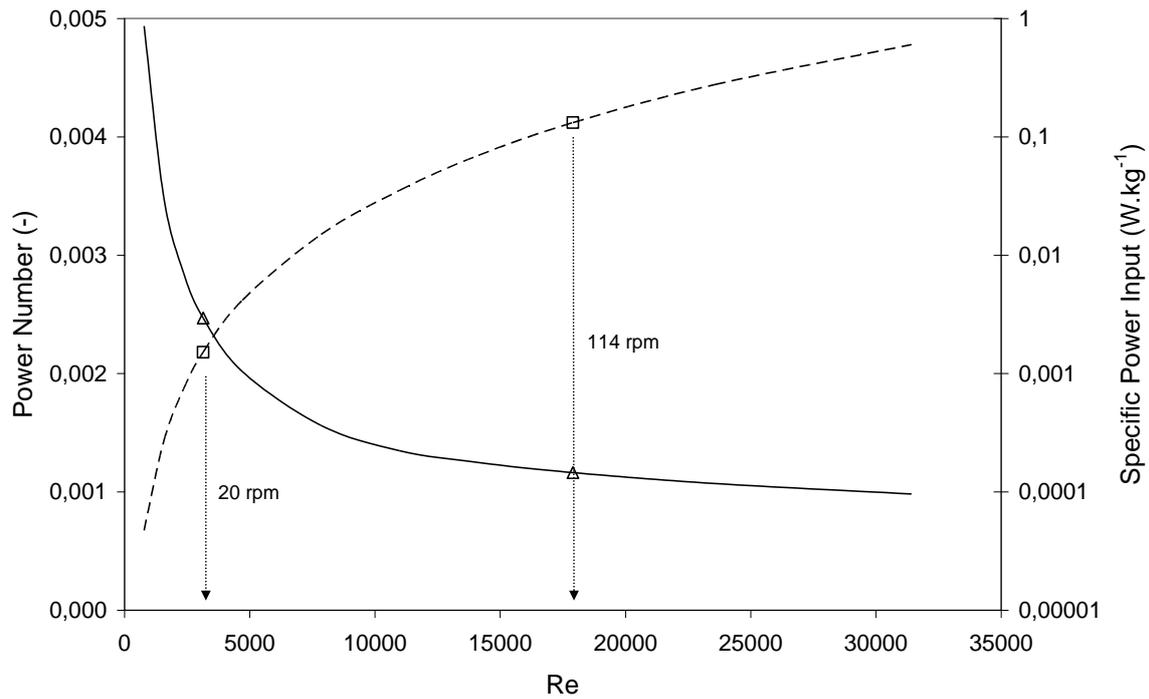


Figure 1: Power number (Δ) and specific power input (\square) as a function of the Reynolds number. Estimated values from eq. (4)

The experimental points are marked by symbols and the corresponding values are reported in Table 1. The specific power input is a hundred times greater at 114 RPM than at 20 RPM.

N (rpm)	20	114
$Re = \frac{R_i \Omega (R_o - R_i)}{\nu}$	3140	17900
N_p	$2,47 \cdot 10^{-3}$	$1,16 \cdot 10^{-3}$
ε (W.kg ⁻¹)	$1,51 \cdot 10^{-3}$	0,1318

Table 1: quantities of relevance for the Couette reactor used

2. Microorganisms and media

Batch cultures of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* NCDO 2118, or of *L. lactis* IL 1403 for control experiments, were produced in the 2-liter Couette reactor described above, in

cylindrical 60mL shaken flasks, and in 2-L fermentor (Setric Génie Industriel, Toulouse, France) for comparison. Cultures were made under anaerobic conditions, at 30 °C, in M17 medium (Oxoid LTD., Basingstoke, Hampshire, England) or in a chemically defined medium designed for *Lactococcus lactis* cultures as described previously (Poolman and Konings 1988). The initial glucose concentration was 5 or 25 g.L⁻¹, as stated in the text, and some experiments were performed with yeast extract enriched media (12.5 g.L⁻¹ added to M17 media). Potassium hydroxide (5 M) was automatically added through a needle in order to maintain the cultures at pH 6.6. A single point injection was used at 114 RPM whereas two injection points were used at 20 RPM. This strategy was adopted in order to reduce potential mixing issues arising from the pulse addition of KOH (Baldyga and Bourne 2003). Inoculation was at 2.5 % with exponential phase cells, from pre-cultures grown in the same medium and conditions (with the exception of pH regulation).

3. Analytical methods

Bacterial growth was monitored by measuring the optical density at 580 nm (1 OD unit is equivalent to 0.3 g.L⁻¹ of dried biomass). Glucose and fermentation products were determined by HPLC analysis (Agilent Technologies 1200 Series, Waldbronn, Germany) using a HPX87H⁺ Biorad column and the following conditions: a temperature of 50 °C, a solvent (H₂SO₄ 5 mM) flow rate of 0.5 ml.min⁻¹, and dual refractometer and UV detection. The exopolysaccharides (EPS) isolation and quantification protocol was adapted from (Jung *et al.* 2008) and applied to stationary phase cells (at the end of broth acidification). Trichloroacetic acid (TCA) was added to fermented cultures (4 % W/V) which were then heated (100 °C / 20 min) to denature proteins and improve detachment of EPS from the bacterial cell walls. Samples were then centrifuged (4000 RPM / 4 °C / 15 min) to remove precipitated proteins and dead cells. Ethanol was added to the supernatants (50 % V/V) and the samples were gently agitated at 4 °C for 48 h. The precipitated EPS were then filtrated (0.45 µm), dried (24 h / 60 °C / 0.2 atm), and weighed.

4. FISH and lectin binding

At the end of the fermentation, once media acidification stopped, a needle was placed in the bioreactor in order to collect the filamentous aggregates. After a few seconds the needle was carefully removed and the material wrapped around it transferred into a sampling tube.

4.1. Sample preparation

An appropriate sampling protocol was chosen to avoid the presence of residual glucose. Samples treatment was adapted from Böckelmann *et al.* (2002). Once collected, cells were fixed with 200 μ L of paraformaldehyde (PFA) solution (4 % in PBS) for 2 h at 4 °C, then washed 3 times with PBS buffer 1X before dehydration with increasing ethanol concentration (50 %; 80 % and 96 % V/V) and oven-dried to eliminate residual ethanol.

4.2. Fluorescent in situ hybridization

Fixed samples were hybridized with 100 μ L of hybridizing mixture (0.9 M NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 8, 25 % formamide, 0.02 % SDS) and 10 μ L of probe solution (EUB338-cy3 50 ng/ μ L, Aman *et al.* 1990) for 1.5 h, at 46 °C in the dark. After hybridization the sample was immersed for 10 min at 48 °C in washing mixture (0.15 M NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 8.5 mM EDTA, 0.01 % SDS – kept at 46 °C) and rinsed twice with pre-warmed washing buffer (20 mM tTris / HCl, 0.01 % SDS, 88 mM NaCl) prior to lectin binding assays.

4.3. Lectin-binding assays

Each lectin (Sigma Aldrich inc.) used in this study was commercially labelled with FITC. Source, common name, sugar specificity (according to the manufacturer specification) and concentration of the lectins used are summarized in table 2. The hybridized samples were stained with 100 μ L fluorescently labelled lectins for 30 min, at room temperature, in the dark and washed 5 times with the washing buffer to remove unbound lectins. The so-treated samples were then carefully applied on multi-well glass slides and oven-dried prior to confocal epifluorescent microscopy observation.

<i>Common name</i>	<i>Taxonomic name</i>	<i>Sugar specificity</i>	<i>Concentration used</i>
--------------------	-----------------------	--------------------------	---------------------------

Carnivalia ensiformis	Concanavalin A	α -glucose, α -mannose	0.12 mg/ml
Lentil	Lens culinaris	α -D-mannosyl and α -D-glucosyl residues	<i>not specified</i>
Griffonia simplicifolia	Bandeiraea simplicifolia	α -D-galactosyl residues and N-acetyl- α -D-galactosaminylnyl residues	<i>not specified</i>
Coral tree	Erythina cristagalli	D-galactose and D-galactosides	0.04 mg/ml

Table 2: characteristics of the lectins used in the lectin-binding assays of *L. lactis* NCDO 2118

5. Microscopy

The sample was mounted with cytifluor for the visualisation and viewed under oil immersion with a confocal laser scanning microscope (Leica TCS SP2 with argon, GreNe and HeNe laser). Pictures and three-dimensional reconstruction of images were then created together using Volocity software (PerkinElmer).

6. Granulometry

Volumetric particle distributions were obtained with a Mastersizer (Malvern Instruments) based on laser light dispersion. The signal was analysed assuming a spherical shape for the aggregates and a single mode distribution. At the initiation of the aggregation process, the particle sizes are rather small and the hypothesis regarding the shape has no significant impact on the results. The filamentous form only occurs at the end of the cultures. Different post processing options were tested (multimodal analysis) with minor changes on the general observations. Moreover the main objective is to compare the changes in the agglomerate size under different flow conditions. Therefore, the unavoidable bias introduced by the post processing of the raw signal does not affect the conclusion of this comparative study. The size characterisation itself is qualitative and must be considered as such

1.3. Résultats

(Results)

Kinetic analyses of fermentations at constant rotation speed in the Couette reactor

Cultures of *Lactococcus lactis* NCDO 2118 were performed in a Couette reactor at two rotation speeds in M17 medium with initial glucose concentration set at 5 g.L⁻¹. Surprisingly, cultures exhibited filamentous forms composed of cell aggregates at 20 RPM but not at 114 RPM. The hypothesis of a local glucose limitation due to insufficient mixing, i. e. very low glucose concentration around the cells at low agitation level, was analysed in similar cultures containing 25 g.L⁻¹ glucose. As previously, a ropy phenotype was clearly identified at 20 RPM in these conditions, as illustrated in Figure 2. Similar batch experiments were conducted with 25 g.L⁻¹ glucose with yeast extract supplementation (12.5 g.L⁻¹) to prevent any local nitrogen limitation. Those cultures exhibited the same mucoïd phenotype at 20 RPM while the 114 RPM fermentation remained planktonic.

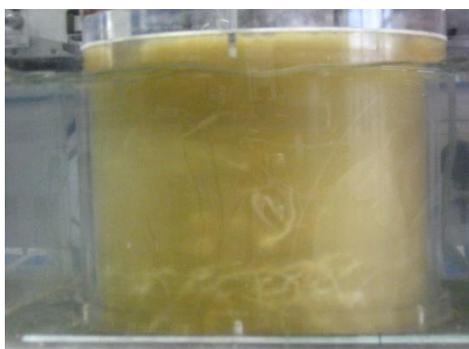


Figure 2: Picture of the Couette reactor taken at 6h30min of culture of *L. lactis* NCDO 2118 performed at 20 RPM in M17 medium containing 25 g.L⁻¹ glucose

In order to investigate the possibility of an insufficient mixing of the added KOH, inducing local pH gradients as an origin of the cell aggregation, fermentation was repeated with buffer enriched media. With the buffered medium, no addition of KOH was necessary during the first four hours of culture. The appearance of a filamentous form occurred three hours after bioreactor inoculation, i.e. before KOH addition, and

only at 20 RPM, proving that such a phenotype is not a consequence of local pH gradients due to insufficient mixing.

Duplicate growth and metabolic profiles were analysed in fermentations conducted at 20 and 114 RPM with initial glucose concentration set at 25 g.L⁻¹. A good reproducibility of biomass formation was obtained (Figure 3) and the maximum growth rate was roughly the same (Figure 4). However, it seems that maximal exponential growth was slightly delayed at 20 RPM (Figure 3). The same trend is also observable in the glucose and fermentation products curves (Figure 5), so one can conclude that the observed delay is not due to an artefact in the optical density measurement.

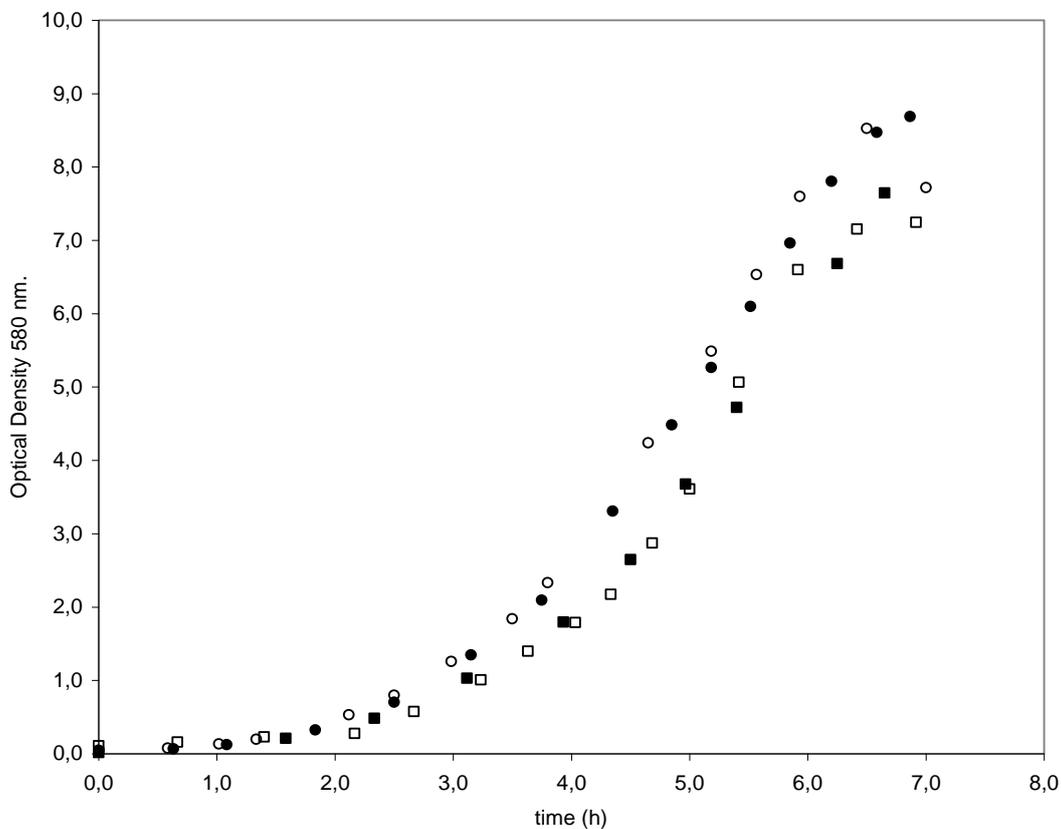


Figure 3: Fermentation time course for *L. lactis* NCDO 2118 growing on glucose-containing M17 medium. Data points represent biomass evaluated as optical density (○, ● : 114, □, ■ : 20 RPM)

Whatever the rotating condition, lactate represented 90 to 95 % of the converted carbon from glucose, whereas formate, acetate and ethanol accounted for only 2.4 to 2.9 %, indicating a homolactic metabolism and no significant metabolic differences in both

conditions. The total catabolic carbon recovery ranged between 93 and 97 %, as expected for lactic acid bacteria cultures. Total polysaccharide content after polysaccharide extraction and quantification (according to Jung *et al.*) was not significantly different : 509 mg/L +/- 102 mg/L and 563 mg/L +/- 103 mg/L for 114 RPM and 20 RPM fermentations respectively. . In order to investigate the strain dependent character of the phenotype, *L. lactis* IL 1403 was cultivated in the Couette reactor using M17 medium containing 25 g.L⁻¹ glucose. As occurred for the NCDO 2118 strain aggregates were formed at 20 RPM but not at 114 RPM.

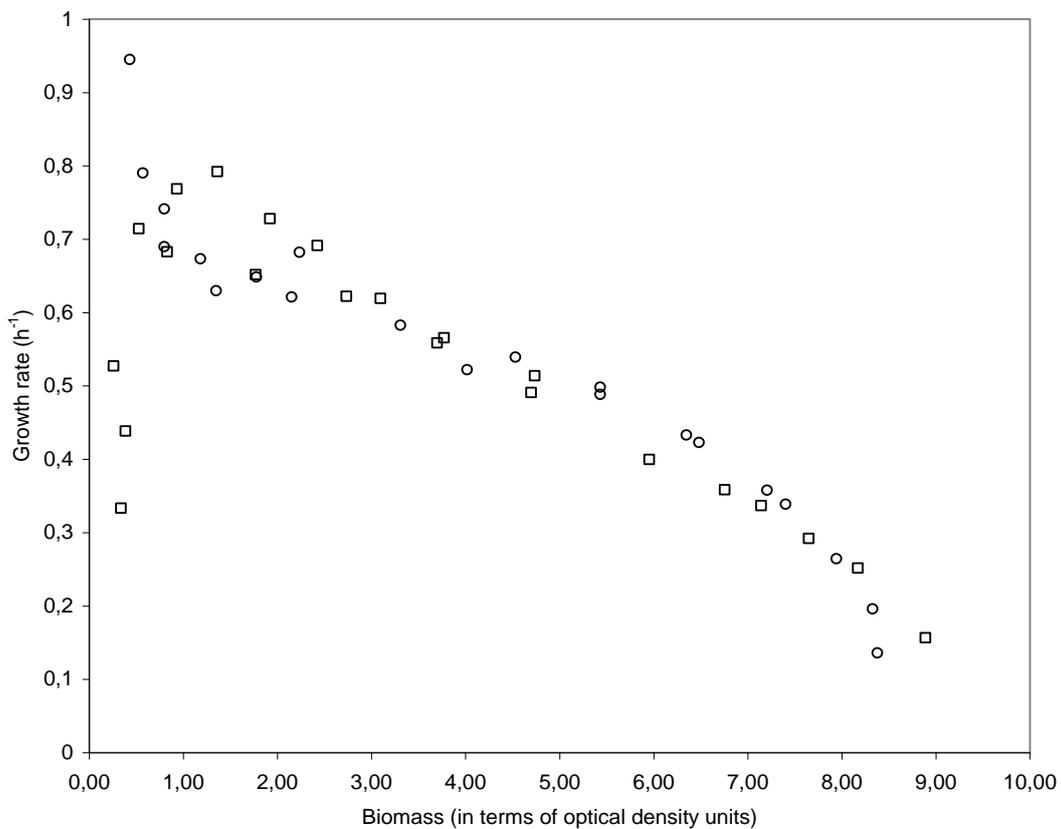


Figure 4: Evolution of specific growth rate as a function of biomass (evaluated as OD units), for 114 RPM (○) and 20 RPM (□) cultures of *L. lactis* NCDO 2118

Investigation of the power input effect

All fermentations conducted at 114 RPM remained in a planktonic form until the end of bacterial growth. The same observation was made for the so called “static cultures” performed in flasks without agitation at a pH=6.6, which was kept constant by the

buffered enriched medium until the 4th hour of growth. Hence the observed mucoid form is not caused by the total power input solely. Indeed, it was observed that changing the rotation speed from 114 to 20 RPM, either during exponential growth or stationary phase, led to the formation of ropy aggregates within 40 min. This indicates that not only the amount of energy, but also the flow structure, are involved in the occurrence of the filamentous form.

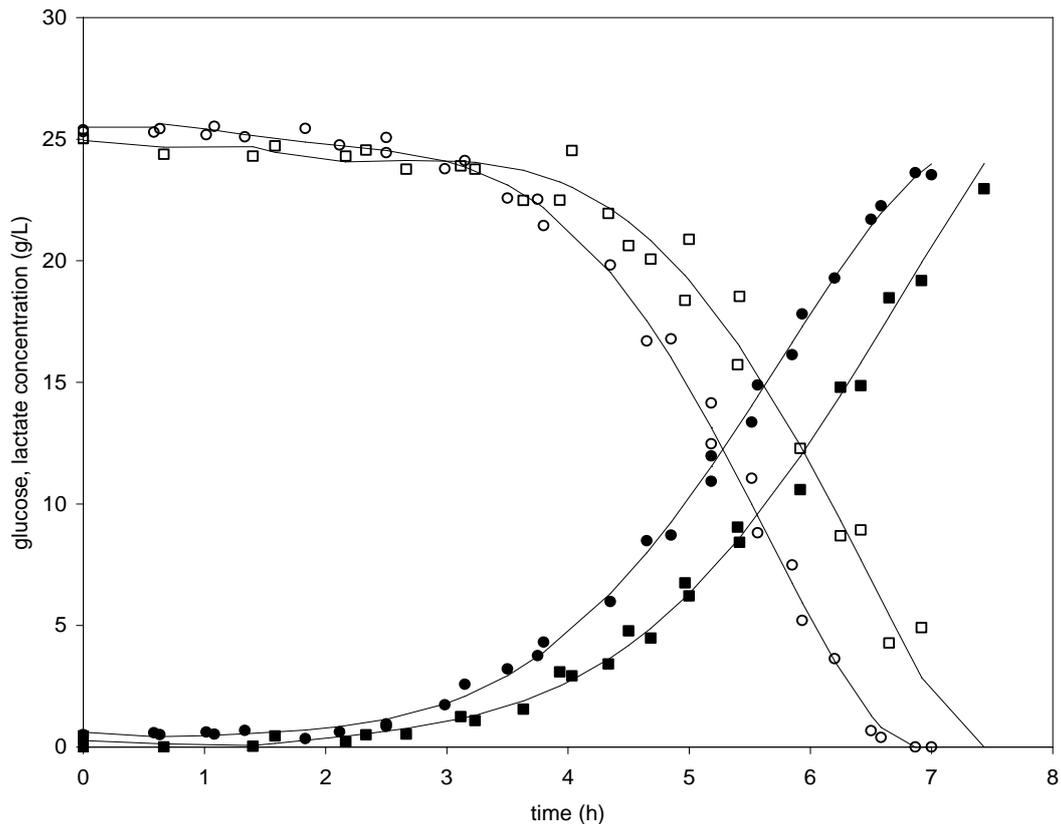


Figure 5: Fermentation time course for *L. lactis* growing on glucose-containing M17 medium. Data points represent glucose (○ : 114 RPM, □ : 20 RPM) and lactate (● : 114 RPM, ■ : 20 RPM)

Particle size distributions

In order to add more insight into quantitative aspects of aggregate formation, an analysis of changes in the particle size distribution (PSD) was performed following fermentations processed at 20 and 114 RPM. The results obtained are presented in terms of volumetric distribution. This type of representation gives a higher weight to

the biggest particles and the presence of only a few big inclusions (aggregate or bubble) results in a peak in the range of large particles size. This kind of event also produces an apparent flattening of the distribution in the range of small particle size. Oppositely, since the large majority of particles are constituted by isolated cells, a number distribution would mask the presence of big agglomerates.

A comparison of the PSD obtained after 4h45min of cultivation at 20 and 114 RPM is shown in Figure 6. The behaviour is markedly different for the two cultures: the particle size distribution at 114 RPM is monomodal and remains centred around a micrometer which is approximately the cell size, whereas a bimodal distribution appears at 20 RPM, with the highest volumetric percentage of particles in the range 10-20 μm .

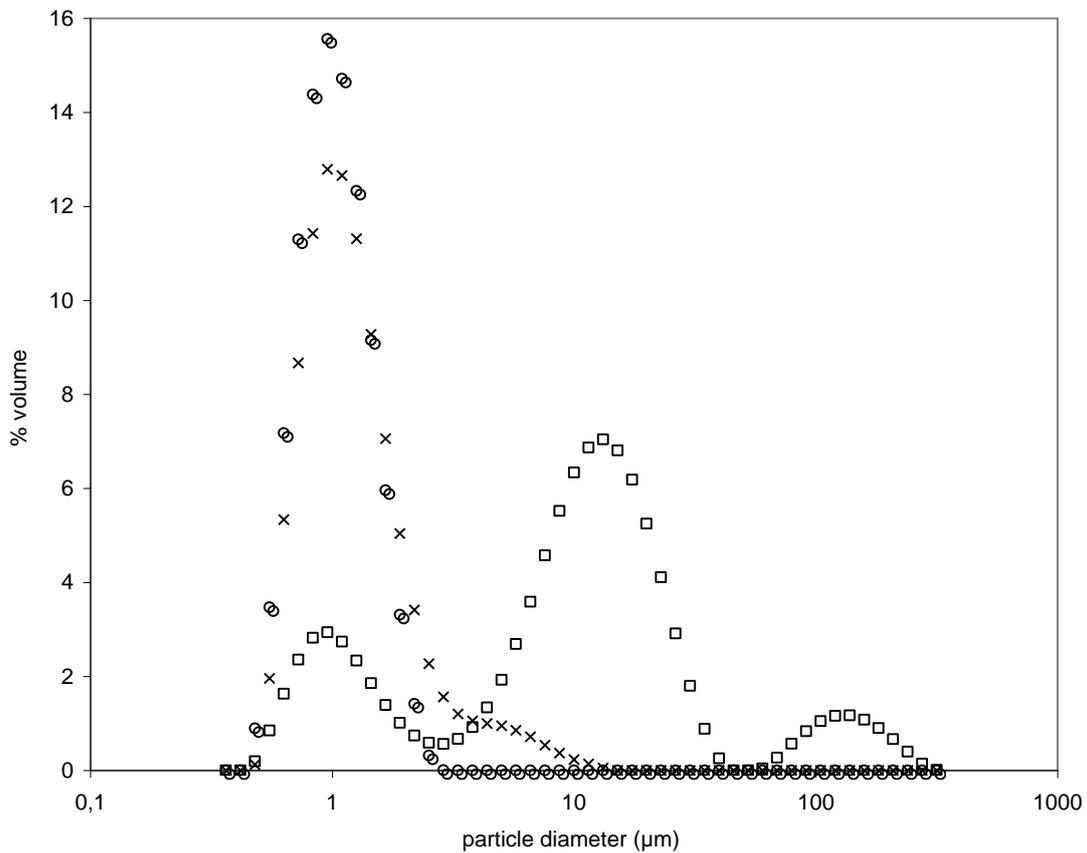


Figure 6: Comparison of volume particle distribution between cultures conducted at 114 RPM (\circ) and at 20 RPM (\square). The x symbols represent distribution at t=0, identical for 114 and 20 RPM

The changes with time in the particle size distributions at 20 RPM are presented in Figure 7. The initial distribution is centred around 1 μm which corresponds to a planktonic state of the dispersion. As the fermentation proceeds, a bi-modal distribution [1-10 μm] clearly appears and finally turns into a three mode distribution [1-10-100 μm] at 6h15min of cultivation. From that point in time, it is no longer possible to perform reliable measurements of the particle size distribution because the suspension becomes heterogeneous due to the formation of millimetric aggregates. However, these measurements in the early stages of the cultivation provide insight into the dynamic aggregation that precedes the formation of macroscopic aggregates. It is noteworthy that the first stages of the aggregation, leading to particles of about 10 μm in size, had already commenced after 2 hour of cultivation.

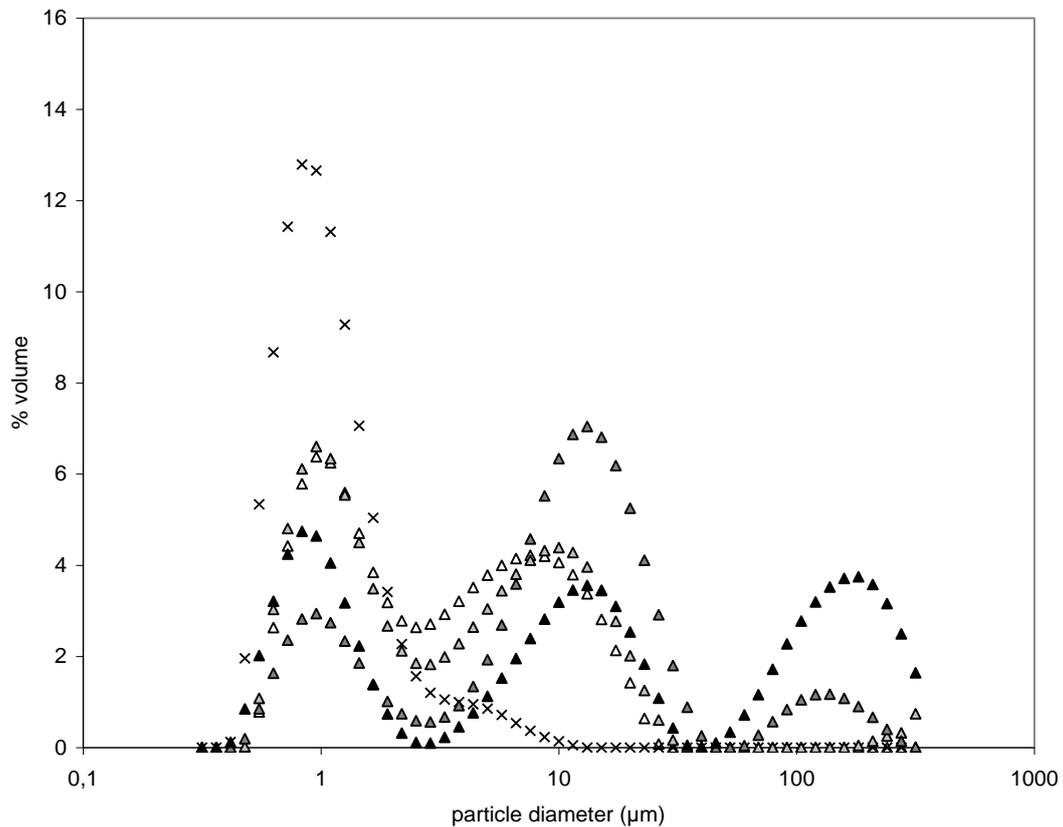
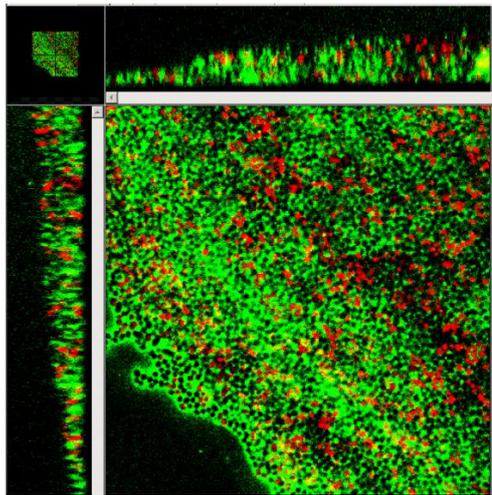


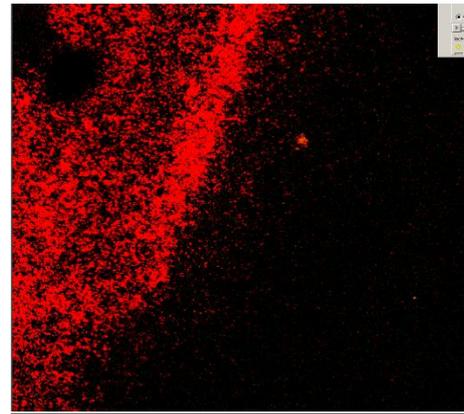
Figure 7: Volumetric particle distribution as a function of diameter during 20 RPM culture (visible filamentous form occurred 5 hours and 30 min after inoculation). Time – dependant evolution (data shown for x t=0 ; Δ t=1h50 ; \blacktriangle -gray 25% t=2h40 ; \blacktriangle gray 50% t=4h45 ; \blacktriangle t=6h15)

Microscopic visualizations

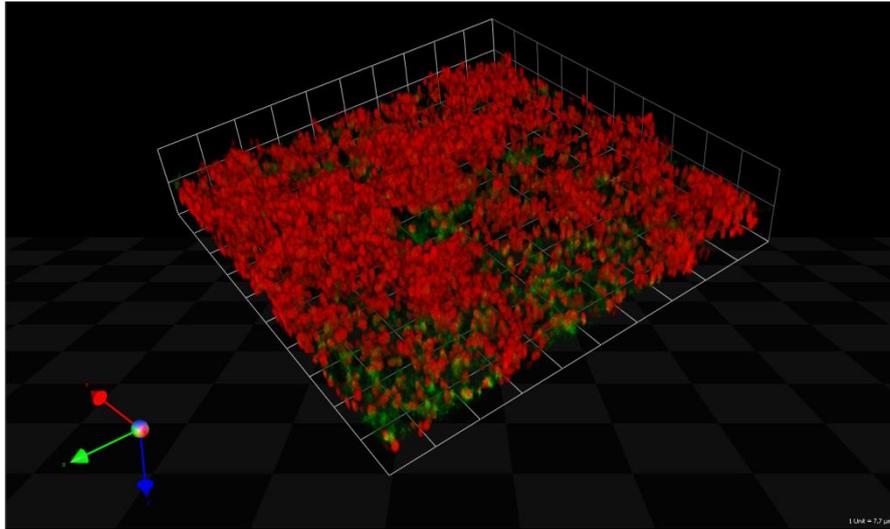
Qualitative analyses of the filamentous form have been undertaken through FISH and lectin binding experiments. FISH method allows specific visualisation of bacterial cells while lectin binding of glycoconjugate residues facilitates analysis. Results show cells entrapped in a glycoconjugate matrix. Concanavalin A (Figure 8A) and lectin from *Lens culinaris* stained the overall matrix area, while coral tree lectin stained only small regions of the samples (Figure 6B). In contrast, no staining was obtained with *Griffonia simplicifolia* (Figure 6C). These data suggest that glucose (or glucosyl residues) and/or mannose (or mannosyl residues), and to a lesser extent galactose, are constitutive of the matrix linking the cells, but not α -D-galactosyl residues and N-acetyl- α -D-galactosaminyl residues. It is remarkable that the inter-cell distance is about a cell diameter or more. This indicates that the matrix is an assembly of cells that could disperse after division.



A



C



B

Figure 8: Pictures of *L. lactis* NCDO 2118 aggregates collected during a culture in Couette reactor at 20 RPM, stained in red by FISH and in green by A) concanavalin A, or B) coral tree lectin, or C) Griffonia simplicifolia.

The same staining experiment conducted on a sample issued from the 114 RPM culture revealed isolated cells visualized by FISH but no staining by lectin, regardless of the type of lectin (data not shown).

Ruthenium Red stained cells

Figure 9 shows an isolated cell from a 20 RPM culture stained with ruthenium red, which binds surface glycoproteins (Waller *et al.* 2004), observed with TEM. coarse whereas static cells' surface remains dense and smooth.

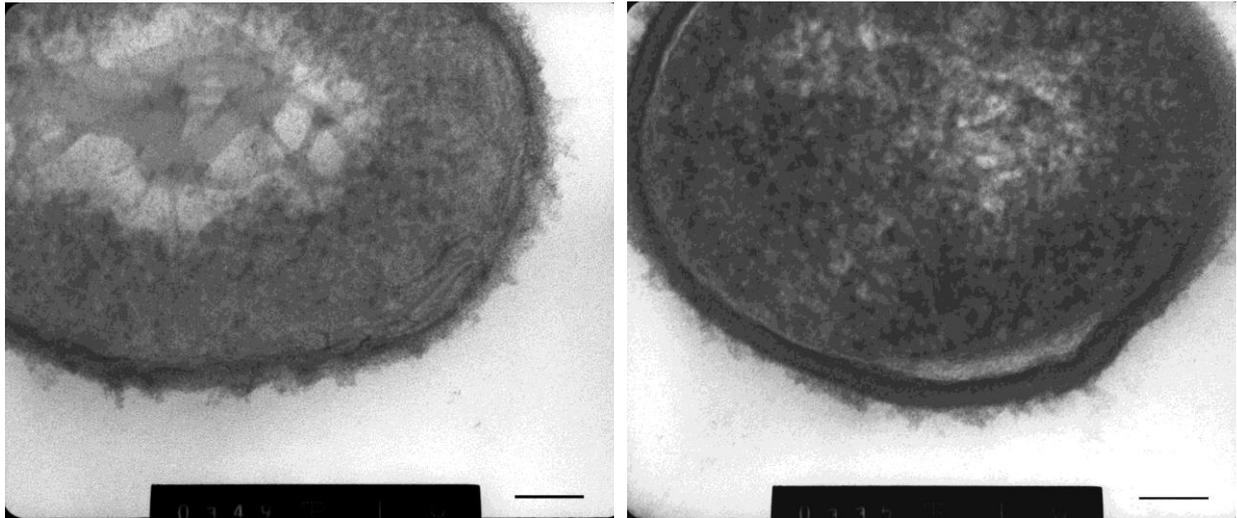


Figure 9 : Picture of *L. lactis* NCDO 2118 cell isolated from a 20 RPM (left) and shake flask (right) fermentation, stained with ruthenium red and observed with TEM (gr. x 170 000)

1.4. Discussion

(Discussion)

The results are discussed here in terms of specific power input which determines (i) the local mixing conditions, i. e. external mass transfer rates for the substrate, (ii) mechanical stresses, and (iii) flow field structure.

These three parameters are discussed below in relation to the observations.

At low rotation speed, the *Lactococcus lactis* cultures exhibited an unexpected and impressive phenotype characterized by macroscopic aggregates. To our knowledge, this particular phenotype has never been observed before for *L. lactis* cultures.

(i) *Mixing issue.*

The first hypothesis proposed to explain this behaviour was associated with mixing issue. Specifically, at low agitation speed, local nutrient limitations around the cells could provoke a limited substrate intake, which possibly reduces the growth rate.

L. lactis is known to be sensitive to the glucose flux through its metabolic pathway, since it can achieve a mixed acid metabolism when the sugar uptake is limited, i. e. when the

central catabolic flux is limited at the level of substrate transport into the cell (Garrigues *et al.* 1997; 2001). In our two mixing conditions, the mixed acid yield on glucose shows that metabolism remains homolactic, indicating that no glucose limitation occurred at the cell scale. This conclusion was reinforced by the observation that the cultures harboured an identical phenotype with five times more glucose in the medium.

The qualitative analysis of the matrix clearly indicated the presence of surface and inter-cell polysaccharides, visualized by ruthenium red and lectin staining respectively. A limitation in nitrogen, i.e. a high C/N ratio, is often considered as a stimulus for polysaccharide production by bacteria but the increase in nitrogen supply through yeast extract - supplemented media did not inhibit the cell aggregation, so the hypothesis of N-source limitation toward cells was also rejected.

An eventual pH gradient linked to KOH addition was considered but, since such phenotype was also reported for non regulated cultures performed in a buffered medium, this hypothesis could be discarded. Therefore, through those experiments, every hypothesis regarding substrate limitation or insufficient mixing as the origin of such a phenotype has been eliminated. Similarly, while the evacuation of cell products (e.g. metabolites) could be theoretically considered as an issue, it is unlikely to be involved in the primary steps leading to the phenotype as no mixing problems were demonstrated. Indeed, if the accumulation of excreted products in the vicinity of the cell was the key phenomenon, one would expect to observe quantitative aggregation in static culture because the power input is minimal. However, these cultures always remained planktonic. From these observations, it is considered that insufficient mixing is not the original cause of aggregation.

(ii) *Mechanical stresses.*

For the aggregation to proceed, two conditions must be satisfied: (i) cells must be able to attach to each other, and (ii) cells must encounter one another.

No aggregation took place when cultures were performed in the Couette reactor without agitation or in shaken flasks. On the contrary, all cultures performed at 20 RPM

produced aggregates. Cells which were initially cultivated in shaken flasks (until the stationary phase) did not agglomerate when transferred into the Couette reactor rotating at 20 RPM. Furthermore cells that were cultivated first at 114 RPM in the Couette reactor or in a stirred bioreactor, and then placed at 20 RPM in the Couette reactor also flocculated. Whether this adhesion property is due to a minimum amount of extracellular matrix or to a modification of the cell surface polysaccharides is discussed in the next paragraph. Nevertheless, it seems that there is a minimum level of mechanical stress necessary to induce the cell's ability to agglomerate. A quantification of the mechanical stresses acting on the cells can be obtained from fluid mechanical considerations. The force acting on a spherical particle subject to a pure shear has been numerically calculated by Coufort and Liné (Coufort and Line 2003). Integrating the force distribution on the particle leads to the stress acting on the particle, σ in N.m⁻², due to the shear rate G .

$$\sigma = \frac{5}{2} \eta G \quad (5)$$

The shear rate in the viscous sub-range is given by Camp and Stein (Camp and Stein 1943).

$$G = \sqrt{\frac{\varepsilon}{\nu}} \quad (6)$$

At 20 RPM and 114 RPM, the specific power input, ε , was calculated from equations (1) and (3) (values are given in Table1). The corresponding shear rates from equation (6) are equal to 39 and 363 s⁻¹ respectively. Considering the fluid viscosity $\eta=10^{-3}$ Pa.s, the stress experienced by the cells can be evaluated as 0.097 and 0.908 N.m⁻² at 20 and 114 RPM respectively.

These calculation are based on the assumption that the particle size is much smaller than the the size of the smallest energy dissipating eddies (λ , the Kolmogorov length scale)

$$\lambda = \left(\frac{v^3}{\varepsilon} \right)^{1/4} \quad (7)$$

At the highest rotation speed, the Kolmogorov length scale based on the specific power input calculated in Table 1 is 56 μm . Thus it can be concluded that individual cells are subject to a viscous “laminar stress” whatever the flow regime, because they are much smaller in size than the energy dissipating eddies.

At 114 RPM the flow is turbulent, and the energy is dissipated locally at much finer length scale than at 20 RPM. A higher total power input increases the stresses on aggregates in turbulent flow and causes the break-up of aggregates larger than the smallest turbulent eddies. In the particular device studied, Coufort *et al.* showed that the mean size of mineral flocs is calibrated by the Kolmogorov length scale (Coufort *et al.* 2005). The same phenomenon might explain the absence of filamentous form at 114 RPM. It could be suggested that agitation is so low in static culture that cells rarely encounter each other and therefore can not form agglomerates. However, in the mechanism of cell division, mother and daughter cells are initially contacting each other. Therefore, they would tend to aggregate if they were able to. Besides, this kind of constitutive agglomeration (or growth related aggregation) has been described by Dunlop *et al.* for plant cells. Millimetric aggregates of hundreds of cells are formed in suspension culture and share cytoplasmic fluid due to incomplete separation of cells (Dunlop *et al.* 1994). Our conclusions are therefore that (i) the absence of agglomeration in static cultures can be related to an insufficient mechanical stress, (ii) a shear stress on the particle of 0.097 $\text{N}\cdot\text{m}^{-2}$ is sufficient to induce a significant change in the collision efficiency.

(iii) *Flow field structure.*

Since cells transferred from 114 RPM to 20 RPM flow conditions led to aggregates in a few minutes, it can be assumed that the different initial conditions produced cells with similar aggregation potentiality. In other words, it's not a particular physiological or biochemical state of the cells cultivated at 20 RPM which provokes aggregation.

Moreover, the aggregation process does not depend on whether the cells come from growth or stationary phase. This indicates that neither growth, nor cell division, nor *de novo* synthesis of cell components are required for aggregation. The total amount of polysaccharides (PS) produced was not significantly different in the cultures at 20 and 114 RPM. Hence, it seems that the particular flow structure in the Couette bioreactor at 20 RPM, characterized by non turbulent, organized vortices favours aggregation. However, it is first necessary that cells are exposed to a minimal level of mechanical stresses.

Since the matrix was made of sugars, at least in part, it is tempting to consider that these sugars are EPS produced by the bacteria. The genome of *L. lactis* NCDO 2118 is not sequenced, so its ability to produce EPS is undetermined, albeit there is no strict correlation between the presence or absence of *eps* genes and of PS (Van der Meulen *et al.* 2007). However, the culture of the IL1403 strain, which is devoted to the *eps* plasmidic locus and thus unable to produce EPS, harboured a similar filamentous phenotype, so it can be assumed that no EPS *stricto sensu* are involved. This is surprising because the cells in the aggregate seemed to be entrapped in a filamentous form rather than stuck together. Hence, one can consider that a PS, but not an EPS, produced by *L. lactis* NCDO 2118 as well as IL 1403, is involved in the cell aggregation, regardless of mixing conditions.

The qualitative analysis of the polysaccharidic matrix using lectin binding revealed that galactose (Gal) was rarely present in the aggregates. On the contrary, glucose (Glc) and/or mannose appeared to be the major constituents of the matrix. In general, a glucose to galactose molar ratio of 2:1 is found in the repeating units of EPS produced by LAB, with other sugars like rhamnose (Rha) also being possibly involved in the structure (Kleerebezem *et al.* 1999; Dabour *et al.* 2005). A quite similar ratio has recently been determined for the novel cell wall PS pellicle on the surface of *L. lactis* IL 1403 (Chapot- (Chapot-Chartier *et al.* 2010). Monosaccharide analysis of this pellicle revealed the presence of Rha, Glc, Gal and GlcN, in an approximate molar ratio of 0.8: 2: 1.4: 2. Due to this similarity, the lectin binding approach could not discriminate between

EPS and cell wall PS. Nevertheless, this pellicle has been proposed as a new cell envelope structural component of Gram-positive bacteria.

Taking into account these new data, we postulate that the pellicle-like layer of *L. lactis*, in the particular flow conditions of the Couette reactor at 20 RPM, could be structurally modified or re-organised in such a way that leads to the creation of a filamentous form-like matrix confining the cell. Structural changes in cell wall polysaccharides due to shear stresses have been previously demonstrated for algae (Hackney *et al.* 1994). To date, however, the possible involvement of cell-wall or extracellular molecules other than PS cannot be discarded.

1.5. Conclusion

(Conclusion)

Batch cultures of *L. lactis* NCDO 2118 and *L. lactis* IL 1403 performed in two different Couette bioreactors operated in the Modulated Wavy Flow regime systematically led to the formation of filamentous aggregates, although the overall metabolism remained unchanged. The phenotype was never observed in cultures performed in shaken flasks. In contrast, cells initially cultivated in a turbulent flow turn out to form aggregates in the Couette reactor. It is concluded that a minimum level of mechanical stress is necessary to induce the adhesion property at the cell level but that higher values of local energy dissipation are detrimental to the aggregation process itself. Observations with a confocal microscope reveal individual cells entrapped in a polymeric matrix. The biochemical analysis of the matrix shows that it contains polysaccharides. Their origin, either EPS or PS, is not elucidated at the moment but the recent works regarding the cell wall pellicle of *L. lactis* offer an interesting explanation for the fact that both the IL 1403, which does not produce EPS, and NCDO 2118, are able to agglomerate in appropriate flow conditions.

References

- Al-Homoud A, Hondzo M, LaPara T. 2007. Fluid dynamics impact on bacterial physiology: biochemical oxygen demand. *Journal of Environmental Engineering* 133(2):226-236.
- Amanullah A, Jüsten P, Davies A, Paul GC, Nienow AW, Thomas CR. 2000. Agitation induced mycelial fragmentation of *Aspergillus oryzae* and *Penicillium chrysogenum*. *Biochemical Engineering Journal* 5(2):109.
- Amanullah A, McFarlane CM, Emery AN, Nienow AW. 2001. Scale-down model to simulate spatial pH variations in large-scale bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering* 73(5):390-399.
- Arnaud JP, Lacroix C, Foussereau C, Choplin L. 1993. Shear stress effects on growth and activity of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Journal of Biotechnology* 29(1-2):157.
- Baldyga J, Bourne JR. 2003. Turbulent mixing and chemical reactions. Sons Wa, editor. Chichester: John Wiley and Sons.
- Barbouche N. 2008. Reponse biologique de cellules animales a des contraintes hydrodynamiques: simulation numerique, experimentation et modelisation en bioreacteurs de laboratoire: INPL NANCY.
- Bergstedt MS, Hondzo MM, Cotner JB. 2004. Effects of small scale fluid motion on bacterial growth and respiration. *Freshwater Biology* 49(1):28-40.
- Bylund F, Collet E, Enfors S-O, Larsson G. 1998. Substrate gradient formation in the large-scale bioreactor lowers cell yield and increases by-product formation. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 18(3):171-180.
- Camp TR, Stein PC. 1943. Velocity gradients and internal work in fluid motion. *J. Boston Soc. Civ. Engrs* 30:219-237.
- Chapot-Chartier MP, Vinogradov E, Sadovskaya I, Andre G, Mistou MY, Trieu-Cuot P, Furlan S, Bidnenko E, Courtin P, Pechoux C, Hols P, Dufrene YF, Kulakauskas S. 2010. The cell surface of *Lactococcus lactis* is covered by a protective polysaccharide pellicle. *The journal of biological chemistry*:In Press.
- Climent E, Simonnet M, Magnaudet J. 2007. Preferential accumulation of bubbles in Couette-Taylor flow patterns. *Physics of Fluids* 19(8):083301.
- Coufort C. 2004. Analyse expérimentale de la floculation en reacteur de Taylor-Couette: influence de l'hydrodynamique sur les phénomènes d'agglomération et de rupture: INSA Toulouse.

- Coufort C, Bouyer D, Liné A. 2005. Flocculation related to local hydrodynamics in a Taylor-Couette reactor and in a jar. *Chemical Engineering Science* 60(8-9):2179.
- Coufort C, Line A. 2003. Forces on Spherical Particles in Terms of Upstream Flow Characteristics. *Chemical Engineering Research and Design* 81(9):1206-1211.
- Curran SJ, Black RA. 2004. Quantitative experimental study of shear stresses and mixing in progressive flow regimes within annular-flow bioreactors. *Chemical Engineering Science* 59(24):5859-5868.
- Curran SJ, Black RA. 2005. Oxygen transport and cell viability in an annular flow bioreactor: Comparison of laminar Couette and Taylor-vortex flow regimes. *Biotechnology and Bioengineering* 89(7):766-774.
- Cussatlegras A-S, Le Gal P. 2004. Bioluminescence of the dinoflagellate *Pyrocystis noctiluca* induced by laminar and turbulent Couette flow. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 310(2):227-246.
- Dabour N, LaPointe G, Benhamou N, Fliss I, Kheadr EE. 2005. Application of ruthenium red and colloidal gold-labeled lectin for the visualization of bacterial exopolysaccharides in Cheddar cheese matrix using transmission electron microscopy. *International Dairy Journal* 15(10):1044-1055.
- Delafosse A. 2008. Analyse et étude numérique des effets de mélange dans un bioréacteur [PhD Thesis]. Toulouse: Institut National des Sciences Appliquées. 209 p.
- Delafosse A, Morchain J, Guiraud P, Liné A. 2009. Trailing vortices generated by a Rushton turbine: Assessment of URANS and Large Eddy Simulations. *Chemical Engineering Research and Design* 87(4):401-411.
- Delvigne F, Lejeune A, Destain J, Thonart P. 2006. Modelling of the substrate heterogeneities experienced by a limited microbial population in scale-down and in large-scale bioreactors. *Chemical Engineering Journal* 120(3):157.
- Desmet G, Verelst H, Baron GV. 1996. Local and global dispersion effects in Couette-Taylor flow--I. Description and modeling of the dispersion effects. *Chemical Engineering Science* 51(8):1287-1298.
- Desmet G, Verelst H, Baron GV. 1996. Local and global dispersion effects in Couette-Taylor flow--II. Quantitative measurements and discussion of the reactor performance. *Chemical Engineering Science* 51(8):1299-1309.
- Dunlop EH, Namdev PK, Rosenberg MZ. 1994. Effect of fluid shear forces on plant cell suspensions. *Chemical Engineering Science* 49(14):2263-2276.
- Enfors SO, Jahic M, Rozkov A, Xu B, Hecker M, Jürgen B, Krüger E, Schweder T, Hamer G, O'Beirne D, Noisommit-Rizzi N, Reuss M, Boone L, Hewitt C, McFarlane C, Nienow

- A, Kovacs T, Trägårdh C, Fuchs L, Revstedt J, Friberg PC, Hjertager B, Blomsten G, Skogman H, Hjort S, Hoeks F, Lin HY, Neubauer P, van der Lans R, Luyben K, Vrabel P, Manelius Å. 2001. Physiological responses to mixing in large scale bioreactors. *Journal of Biotechnology* 85(2):175.
- Esser A, Grossmann S. 1995. Analytic expression for Taylor-Couette stability boundary. *Physics of Fluids* 8:1814-1819.
- Garcia JR, Cha HJ, Rao G, Marten MR, Bentley WE. 2009. Microbial nar-GFP cell sensors reveal oxygen limitations in highly agitated and aerated laboratory-scale fermentors. *Microb. Cell. Fact.* 8.
- Garrigues C, Loubiere P, Lindley ND, Cocaign-Bousquet M. 1997. Control of the shift from homolactic acid to mixed-acid fermentation in *Lactococcus lactis*: predominant role of the NADH/NAD⁺ ratio. *J. Bacteriol.* 179(17):5282-5287.
- Garrigues C, Mercade M, Cocaign-Bousquet M, Lindley ND, Loubiere P. 2001. Regulation of pyruvate metabolism in *Lactococcus lactis* depends on the imbalance between catabolism and anabolism. *Biotechnology and Bioengineering* 74(2):108-115.
- George S, Larsson G, Olsson K, Enfors S-O. 1998. Comparison of the baker's yeast process performance in laboratory and production scale. *Bioprocess Engineering* 18:135-142.
- Hackney JM, Kraemer GP, Atalla RH, Vanderhart DL, Chapman DJ. 1994. Influence Of Hydrodynamic Environment On Composition And Macromolecular Organization Of Structural Polysaccharides In *Egrecia-Menziesii* Cell-Walls. *Planta* 192(4):461-472.
- Harnby N, Edwards MF, Nienow AW. 1997. *Mixing in the process industries*. Harnby N, Edwards MF, Nienow AW, editors. New York: Academic Press.
- Hewitt CJ, Caron GN-V, Axelsson B, McFarlane CM, Nienow AW. 2000. Studies related to the scale-up of high-cell-density *E. coli* fed-batch fermentations using multiparameter flow cytometry: Effect of a changing microenvironment with respect to glucose and dissolved oxygen concentration. *Biotechnology and Bioengineering* 70(4):381-390.
- Hondzo M, Al-Homoud A. 2007. Model development and verification for mass transport to *Escherichia coli* cells in a turbulent flow. *Water Resources Research* 43:W08413, doi:10.1029/2006WR005613, 2007.
- Jung SW, Kim WJ, Lee KG, Kim CW, Noh WC. 2008. Fermentation characteristics of exopolysaccharides-producing lactic acid bacteria from sourdough and assessment of the isolates for industrial potential. *J. Microbial. Biotechnol.* 18(7):1266-1273.

- Jüsten P, Paul GC, Nienow AW, Thomas CR. 1996. Dependence of mycelial morphology on impeller type and agitation intensity. *Biotechnology and Bioengineering* 52(6):672-684.
- Kataoka K. 1986. Taylor Vortices and Instabilities in Circular Couette Flows. In: Cheremisinoff NP, editor. *Encyclopedia of Fluid Mechanics*. Houston: Gulf. p 236-274.
- Kleerebezem M, van Kranenburg R, Tuinier R, Boels IC, Zoon P, Looijesteijn E, Hugenholtz J, de Vos WM. 1999. Exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis*: from genetic engineering to improved rheological properties? *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal Of General And Molecular Microbiology* 76(1-4):357-365.
- Lara AR, Galindo E, Palomares LA, O.T. R. 2006. Living with heterogeneous bioreactors: understanding the effect of environmental gradients in cells. *Molecular Biotechnology* 34(3):355-381.
- Lara AR, Leal L, Flores N, Gosset G, Bolívar F, Ramírez OT. 2006. Transcriptional and metabolic response of recombinant *Escherichia coli* to spatial dissolved oxygen tension gradients simulated in a scale-down system. *Biotechnology and Bioengineering* 93(2):372-385.
- Larsson G, Törnkvist M, Wernersson ES, Trägårdh C, Noorman H, Enfors SO. 1996. Substrate gradients in bioreactors: origin and consequences. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 14(6):281.
- Lathrop DP, Fineberg J, Swinney HL. 1992. Transition to shear-driven turbulence in Couette-Taylor flow. *Physical Review A* 46(10):6390-6405.
- Liu CI, Lee D.J. 1999. Micromixing effects in a couette flow reactor. *Chemical Engineering Science* 54:2883-2888.
- Marchisio DL, Barresi AA, Fox RO. 2001. Simulation of turbulent precipitation in a semi-batch Taylor-Couette reactor using CFD. *AIChE Journal* 47(3):664-676.
- Namdev PK, Thompson BG, Gray MR. 1992. Effect of feed zone in fed-batch fermentations of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering* 40(2):235-246.
- O'Connor KC, Cowger NL, De Kee DCR, Schwarz RP. 2002. Prolonged shearing of insect cells in a couette bioreactor. *Enzyme And Microbial Technology* 31(5):600-608.
- Ohmura N, Kataoka K, Shibata Y, Makino T. 1997. Effective mass diffusion over cell boundaries in a Taylor-Couette flow system. *Chemical Engineering Science* 52(11):1757-1765.

- Ohmura N, Makino T, Motomura A, Shibata Y, Kataoka K. 1998. Intercellular mass transfer in wavy/turbulent Taylor vortex flow. *International Journal of Heat and Fluid Flow* 19(2):159-166.
- Oosterhuis NMG, Groesbeek NM, Olivier APC, Kossen MWF. 1983. Scale down aspects of the gluconic acid fermentation. *Biotechnology Letters* 5(3):141-146.
- Patel N, Choy V, White T, Munkvold G, Thibault J. 2010. Design of a novel Couette flow bioreactor to study the growth of fungal microorganism. *Journal of Biotechnology* 145(3):264-272.
- Poolman B, Konings WN. 1988. Relation of growth of *Streptococcus lactis* and *Streptococcus cremoris* to amino acid transport. *J. Bacteriol.* 170(2):700-707.
- Racina A, Kind M. 2006. Specific power input and local micromixing times in turbulent Taylor-Couette flow. *Experiments in Fluids* 41(3):513-522.
- Rudman M. 1998. Mixing and particle dispersion in the wavy vortex regime of Taylor-Couette flow. *AIChE Journal* 44(5):1015-1026.
- Rudman M, Metcalfe G, Graham LJW. 2008. Nonmixing vortex cores in wavy Taylor vortex flow. *Physics of Fluids* 20(6):063602.
- Sahoo S, Verma RK, Suresh AK, Rao KK, Bellare J, Suraishkumar GK. 2003. Macro-level and genetic-level responses of *Bacillus subtilis* to shear stress. *Biotechnology Progress* 19(6):1689-1696.
- Van der Meulen R, Grosu-Tudor S, Mozzi F, Vaningelgem F, Zamfir M, de Valdez GF, de Vuyst L. 2007. Screening of lactic acid bacteria isolates from dairy and cereal products for exopolysaccharide production and genes involved. *Int. J. Food Microbiol.* 118(3):250-258.
- Waller LN, Fox N, Fox KF, Fox A, Price RL. 2004. Ruthenium red staining for ultrastructural visualization of a glycoprotein layer surrounding the spore of *Bacillus anthracis* and *Bacillus subtilis*. *Journal of Microbiological Methods* 58(1):23.
- Wang L, Marchisio DL, Vigil RD, Fox RO. 2005. CFD simulation of aggregation and breakage processes in laminar Taylor-Couette flow. *Journal of Colloid and Interface Science* 282(2):380-396.

2 ANALYSES COMPLEMENTAIRES SUR LA MATRICE PRODUITE

Pour aller un peu plus loin dans l'analyse et la compréhension de ce phénotype, nous avons tenté de caractériser plus précisément la matrice entourant les cellules. L'hétérogénéité du milieu en fin de culture et les difficultés à procéder à un échantillonnage représentatif, la difficulté à séparer la matrice et les cellules et à évaluer cette séparation, entre autres, rendent les résultats de cette analyse essentiellement qualitatifs et semi quantitatifs. Cependant, l'analyse biochimique des composés de la matrice fournit des indications précieuses. Un traitement aux ultrasons a donc été mis au point afin d'extraire grossièrement des composés de la matrice et quelques dosages simples ont été pratiqués pour une évaluation semi quantitative. Afin d'éviter toute interférence entre les dosages des composés extraits et les constituants du milieu de culture M17, cette analyse a été réalisée sur des cellules cultivées sur un milieu chimiquement défini (MDC) dont la composition est résumée en annexe 1. Croissance, métabolisme et phénotype des cultures réalisées sur milieu MCD sont similaires avec les descriptions précédentes.

2.1. Matériel et méthodes

Les protocoles d'extraction et de chaque dosage sont détaillés en annexe, dans cette partie ne sont indiqués que les principes pour chaque méthode.

2.1.1. Extraction aux ultrasons

Un traitement aux ultrasons a été choisi afin d'extraire les composés de la matrice enveloppant les cellules. Ce traitement inclut les étapes suivantes résumées ici (le protocole complet est détaillé en annexe 3):

- Echantillonnage :

Du fait de la très forte hétérogénéité du milieu de culture en fin de fermentation, il convient de collecter un gros volume d'échantillon afin de limiter les erreurs liées à une

mauvaise représentativité de l'échantillon. A l'issue de chaque culture, 2 x 800 ml ont été récoltés.

- Lavage des cellules :

Afin d'éviter toute interaction entre les composés du milieu de culture et les cellules, il est nécessaire de laver l'ensemble cellules + matrice dans un tampon PBS. Pour cela, les échantillons, répartis dans des flacons, sont centrifugés 20 min à 4000 RPM et à 4 °C afin de limiter les réactions. Après élimination du surnageant, le culot est repris dans du tampon PBS. L'opération est réalisée 3 fois.

- Concentration :

Les échantillons d'agrégats cellulaires sont ensuite concentrés 8 fois à l'issue de la dernière centrifugation, afin d'obtenir une masse suffisante.

- Traitement aux ultrasons :

Chaque cycle comprend une phase de traitement (20 s, 2,4 W/ml dans de la glace) et une phase de refroidissement de 1 min. Après 4 cycles, l'échantillon est centrifugé et le surnageant conservé à -18 °C.

Lors de la mise au point de ce protocole, l'absence de lyse cellulaire a été vérifiée à l'aide du dosage de l'activité Lactate déshydrogénase (LDH) après un traitement de 1 à 6 cycles. Les résultats montrent qu'il n'y a pas de lyse cellulaire significative jusqu'à 4 cycles (voir annexe 3).

2.1.2. Dosages

Les polysaccharides ont été dosés par la méthode à l'anthrone. Après hydrolyse des polymères, les sucres réducteurs forment un complexe coloré avec le réactif à l'anthrone (cf annexe 2).

La quantité de protéines présente a été évaluée par un dosage à l'acide bicinchonique (BCA). Le BCA forme un complexe avec les liaisons peptidiques en présence de cuivre.

En formant de tels complexes, il prend une couleur pourpre dont l'intensité peut être évaluée par dosage spectrophotométrique contre une gamme étalon en sérumalbumine bovine (BSA, Bovin Serum Albumin). Les résultats sont donc exprimés en équivalents BSA.

Pour des raisons de commodité, ces dosages (anthrone et BCA), utilisés en routine au laboratoire, ont été réalisés en microplaques.

La masse sèche totale est grossièrement estimée par pesée d'un culot de centrifugation préalablement séché à l'étude à vide.

L'évaluation de l'hydrophobicité de surface a été réalisée via un test d'affinité pour les solvants (MATS, voir annexe3).

2.2. Résultats

Tout d'abord, commençons par des remarques d'ordre général. Tous les culots de centrifugation présentent deux phases, qu'il s'agisse de cultures de *L. lactis* NCDO 2118 à 20 ou 114 RPM ou de *L. lactis* IL1403 à 20 RPM. Les différences résident dans l'aspect et le volume de ces phases. La phase supérieure des culots de centrifugation des cultures de *L. lactis* NCDO 2118 est constituée d'une masse gluante formant un gel peu resserré autour de cellules alors que la phase inférieure est principalement constituée de cellules. Si cette phase représente environ la moitié du culot (en volume) pour les cultures à 20 RPM, elle est beaucoup plus fine pour les cultures à 114 RPM. Quant aux culots de *L. lactis* IL1403, leur phase supérieure a un aspect plus solide et dense, ressemblant plus à un amas cotonneux qu'à un gel.

Malheureusement, du fait du faible volume récolté et de la difficulté à séparer ces deux phases, aucune caractérisation rhéologique n'a pu être effectuée.

2.2.1. Dosages et caractérisation biochimique

Les résultats des dosages de polysaccharides et de protéines sont présentés dans les tableaux III.1 et III.2. Pour chaque souche et condition de culture, les concentrations en

polysaccharides (exprimées en équivalent glucose) et protéines (en équivalent BSA) extraits sont indiquées pour des échantillons concentrés 8 fois. Les valeurs entre parenthèses sont les concentrations équivalentes pour un échantillon non concentré. Si les dosages sont répétables, l'échantillonnage et les étapes préliminaires sont source d'une plus grande variabilité, avec pour conséquence des écarts types importants sur les mesures.

La quantité de matière extraite par ce traitement dépend des conditions de culture et de la souche considérée. Pour la souche NCDO 2118, la concentration (en polysaccharides et protéines) des extraits issus de la matrice filamenteuse (20 RPM) est plus importante que de ceux issus d'une suspension cellulaire planctonique (114 RPM). Cependant, ce même traitement d'extraction appliqué à la matrice obtenue avec la souche IL 1403 permet l'extraction d'une quantité moindre de composés.

Echantillon	Equivalent glucose moyen (g/L)	Ecart type	Nombre de répétition
NCDO 2118 20 RPM	0,242 (0,030)	0,043	2 cultures x 3 dosages
NCDO 2118 114RPM	0,199 (0,025)	0,048	Idem
IL 1403 20 RPM	0,104 (0,013)	0,038	Idem

Tableau III.1 : résultats du dosage des polysaccharides liés aux cellules par la méthode à l'antrone

D'un point de vue semi quantitatif, on remarque que quel que soit l'état de l'échantillon initial (matrice filamenteuse ou cellules libres), les extraits contiennent plus de protéines que de polysaccharides. Ces derniers, en équivalent glucose, ne représentent que 0.1% du glucose initialement présent dans le milieu de culture.

Echantillon	Equivalent BSA moyen (g/L)	Ecart type	Nombre de répétition
NCDO 2118	2,07	0,33	2 cultures x 2

20 RPM	(0,259)		dosages
NCDO 2118	1,34	0,13	Idem
114RPM	(0,167)		
IL 1403	0,82	0,13	2 cultures x 3 dosages
20 RPM	(0,102)		

Tableau III.2 : résultats du dosage des protéines liées aux cellules par la méthode BCA

Matières extraites

L'analyse des composés extraits permet une description qualitative de la matrice, cependant, l'estimation du rendement d'extraction des polymères est nécessaire pour obtenir une information sur la quantité de matrice produite, notamment à 20 RPM. Expérimentalement, on observe qu'une grande proportion de la matrice reste en l'état et n'est pas dispersée, ni dissoute par le traitement aux ultrasons. Malheureusement, il est impossible actuellement d'estimer ce rendement, l'estimation nécessitant de connaître précisément le ratio massique cellule/matrice dans le filament.

2.2.2. Microbial Adsorption To Solvents

Des essais selon la méthode MATS (« Microbial Adsorption To Solvents »), décrite par Bellon-Fontaine *et al.* (1996), ont été réalisés selon le protocole décrit en annexe 3. L'objectif d'une telle mise en œuvre est de déterminer si l'agrégation des cellules est d'une façon ou d'une autre corrélée à des différences quantifiables des propriétés de surface (caractère hydrophile/hydrophobe) des cellules provenant des différentes conditions de culture. Les résultats concernant l'affinité des cellules pour les solvants testés sont présentés dans le tableau III.3 ci-dessous. Le caractère hydrophobe ou hydrophile de la surface bactérienne est évalué via l'affinité des cellules pour les différents solvants. L'affinité pour les solvants polaires comme le chloroforme (accepteur d'électrons) et l'acétate d'éthyle (donneur d'électrons) indique un caractère hydrophile (soit donneur soit accepteur d'électrons, respectivement) de la surface, alors que l'affinité pour l'hexadécane ou le décane (solvants apolaires) reflète un caractère hydrophobe.

On constate que, quelles que soient les souches et les conditions de culture, les cellules présentent toutes des propriétés de surface plutôt hydrophiles (affinité maximale pour les solvants polaires et adhésion minime aux solvants apolaires). L'affinité plus importante pour le chloroforme indique de plus un caractère majoritairement donneur d'électrons (base au sens de Lewis). Giaouris *et al.* (2009) ont testé l'affinité des souches NCDO 2118 et IL 1403 pour le chloroforme et l'hexadécane. L'affinité des souches est inférieure à 10% quel que soit le solvant. Cette différence pourrait venir du fait que, contrairement à Giaouris *et al.*, nous avons testé des cellules en phase exponentielle de croissance.

Solvant :		Chloroforme	Hexadécane	Acétate d'éthyle	Décane
NCDO 2118 114 RPM (n=2)	moyenne	69%	0	19%	27%
	<i>Ecart type</i>	1%		1%	13%
NCDO 2118 20 RPM (n=3)	moyenne	30%	0	11%	13%
	<i>Ecart type</i>	17%		9%	1%
IL 1403 20 RPM	moyenne	35%	0	2%	0

Tableau III.3 : affinité pour les solvants selon la méthode MATS .

Les résultats entre souches et/ou conditions de culture ne sont pas significativement différents au sens du test statistique de Student.

Quoi qu'il en soit, les cellules sont plutôt hydrophiles (affinité pour le chloroforme) et l'agrégation ne semble pas pouvoir être expliquée par une augmentation de l'hydrophobicité de surface.

De ce fait, il est difficile de tirer une conclusion définitive quant à une modification nette des propriétés physico-chimiques de la surface bactérienne et son éventuelle implication dans le processus d'agrégation observé à 114 RPM.

2.3. Discussion et conclusion

Effet de la vitesse de rotation

Les résultats de dosage des polysaccharides sur les cultures de *L. lactis* NCDO 2118 à 20 et 114 RPM sont très surprenants au regard des marquages précédemment réalisés. Alors que des cellules cultivées à 114 RPM ne fixent aucune des lectines testées, elles semblent néanmoins être pourvues de polysaccharides liés à leur paroi. Les quantités extraites par le traitement aux ultrasons sont peu différentes dans les deux conditions de culture. Différentes hypothèses peuvent expliquer ce comportement.

- Les polysaccharides présents peuvent être qualitativement différents de ceux produits par des cellules cultivées à 20 RPM. En ce cas, cela témoigne d'une modification importante au niveau du métabolisme et de la synthèse des polysaccharides excrétés et/ou de la synthèse de la paroi. Cependant, les lectines testées permettent de scanner les unités osidiques les plus communes chez *Lactococcus lactis* et il est donc relativement peu probable que les polysaccharides extraits à 114 RPM soient composés de monomères non spécifiques des lectines utilisées.
- On peut également avancer que la matrice présente autour des cellules cultivées à 20 RPM joue un rôle protecteur envers les polysaccharides vis-à-vis d'un éventuel arrachement au cours des différentes étapes du marquage. Cette hypothèse est cependant exclue ici car si c'était le cas, les polysaccharides seraient également dispersés et éliminés par les étapes de lavage préliminaires au traitement par les ultrasons.
- Enfin, et c'est l'hypothèse la plus probable, il est possible que la concentration en polysaccharide autour des cellules cultivées à 114 RPM ne soit pas suffisante pour obtenir un signal visible en épifluorescence. En effet, si les quantités extraites sont similaires, elles ne représentent qu'une partie (non quantifiable) de la matrice totale. Il est donc très probable que la concentration en polysaccharides dans la matrice soit

largement supérieure à celle autour de cellules planctoniques. D'autre part, il est possible que la densité (compactage) des molécules exocellulaires soit différente entre ces deux conditions et, dans le cas d'une faible densité, conduisent à un signal fluorescent trop faible.

Effet de la souche cultivée

Le dosage des polysaccharides extraits pour *L. lactis* NCDO 2118 et IL1403 montre une différence significative de concentration entre ces deux souches. Il convient néanmoins d'être très prudent pour l'analyse de ces résultats. En effet, ces dosages sont effectués sur des extraits. Conclure que IL 1403 présente moins de PS que NCDO 2118 implique que les rendements d'extraction sont similaires pour ces deux souches, Cependant, le filament obtenu avec IL 1403 semble plus solide et moins aérien, suggérant que la matrice est plus difficile à déstructurer.

Composition de la matrice

Quelle que soit la souche à l'origine de la matrice, le traitement d'extraction permet d'extraire environ 8 fois plus de protéines que de matière glucidique (tableau III.4). Cette prédominance des protéines sur les polysaccharides ne semble pas être un artéfact lié au choix du moyen d'extraction utilisé. Si le traitement par ultrasons tend à privilégier l'extraction de grosses molécules (≈ 100 kDa), il permet une extraction représentative de la matrice initiale, sans privilégier l'extraction d'un type de molécule par rapport à un autre (Comte *et al.* 2006; 2007). On remarque également que ces résultats sont semblables aux observations menées sur des substances extrapolymeriques extraites de boues activées, dans lesquelles il y a une prédominance des protéines sur les polysaccharides dans les compositions.

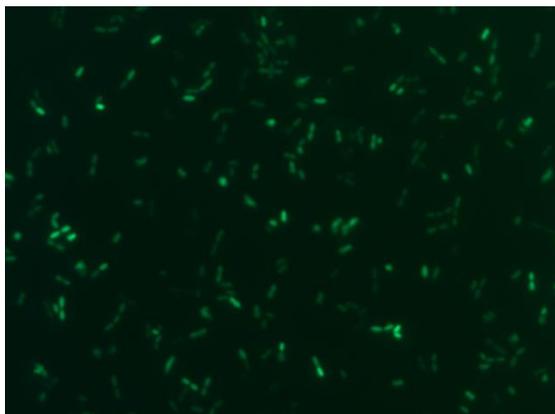
Le fait que la matrice contienne des protéines en proportions plus importantes laisse à penser que ce sont ces dernières qui interviennent principalement dans la cohésion et la structure de la matrice, les polysaccharides étant éventuellement piégés dans le réseau créé par les protéines. Cette hypothèse est cohérente avec les observations de cultures à pH non régulé dans un milieu enrichi en tampon. Le phénotype apparaît tant que le pH

est autour de 6,6. Lorsque la culture se poursuit et que le pH diminue, le phénotype disparaît. Cela indique que le phénotype est contrôlé par une molécule sensible au pH. Si les polysaccharides présentent souvent des groupements carboxyles amphotères, le pK_a de ces fonctions est situé autour de 3-4, et par conséquent ces fonctions ne changent pas de charge au début de l'acidification du milieu de culture. Cependant, les protéines présentent une gamme de pH_i (points isoélectriques) très variés, il est donc probable que le réseau de base de la matrice comprenne des substances protéiques pour lesquelles une diminution trop importante du pH entraîne la perte de la capacité à créer des liaisons ioniques. Dans des domaines voisins du champ de cette étude, il a été prouvé que les protéines jouent un rôle important dans le processus d'agrégation (Lazarova and Manem 1995) et l'augmentation d'adhérence des biofilms. Il a été aussi démontré qu'il y a une corrélation positive entre la teneur en protéines et la capacité de floculation (Wilén *et al.* 2003).

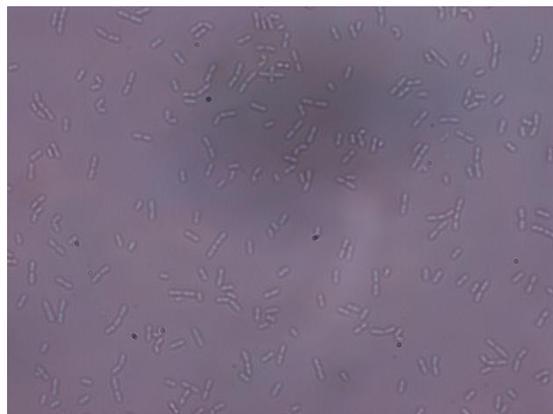
Essai (souche et vitesse de rotation)	NCDO 2118 20 RPM	NCDO 2118 114 RPM	IL 1403 20 RPM
Ratio protéines/polysaccharide	8,6	6,7	7,9

Tableau III.4 : ratios protéines/polysaccharides

Les marquages par des lectines ont montré la présence de polysaccharides dans la matrice cellulaire. Des dosages complémentaires après destruction partielle de la matrice par un traitement aux ultrasons ont aussi révélé la présence d'ADN et de protéines en quantité non négligeable. Cette composition est assez caractéristique de la composition de la matrice extracellulaire présente autour de biofilms (Nielsen *et al.* 1997). L'ADN pourrait jouer un rôle d'agent de cohésion (Briandet, communication personnelle). Cette présence d'ADN pourrait indiquer une forte proportion de cellules lysées. Cependant, des observations comparatives sur des champs microscopiques identiques de cellules marquées (live) et de cellules observées en contraste de phase n'indiquent pas de mort cellulaire significative (figure III.1).



marquage Live Dead



Cellules observées en contraste de phase

Figure III.1 photographie de cellules emprisonnées dans un filament. A cellules vivantes, B cellules totales. Cette approche permet un début de caractérisation de la matrice cellulaire. Néanmoins, il reste encore beaucoup à faire pour obtenir une caractérisation précise. Composition exacte et structure doivent être élucidées. Différents traitement d'extraction sont à même de permettre une description qualitative, mais en ce qui concerne la description quantitative, il convient aussi de déterminer les rendements d'extraction (globaux et aussi spécifiques aux types moléculaires). D'autre part, la forte teneur en protéines extraites laisse suspecter une forte activité enzymatique qu'il conviendra de mesurer.

Enfin, le mécanisme d'adhésion reste à éclaircir. Le fait que des cultures cultivées à 114 RPM et transférées dans un écoulement ondulatoire forment des filaments dans un intervalle de temps court (40 min) suggère que les cellules ont acquis la capacité à adhérer entre elles préalablement. Il est fort probable que les propriétés surfaciques des cellules soient impliquées dans le processus d'agrégation ; ces propriétés, analysées uniquement par un test d'affinité pour des solvants (MATS), semblent similaires quelles que soient les cellules testées et les conditions de culture. D'autres méthodes, notamment de caractérisation biochimique de la surface cellulaire, seront à mettre en œuvre pour comprendre les mécanismes d'agrégation.

3 CONCLUSION GENERALE

Cultivé en batch dans un réacteur Couette, *Lactococcus lactis* NCDO 2118 présente un caractère phénotypique unique lorsque le réacteur est opéré en régime ondulatoire modulé. Ce caractère phénotypique est amplifié lorsque la fermentation conduit à produire plus de biomasse, en augmentant la concentration initiale de glucose. Il semble également que, quelle que soit la géométrie du réacteur Couette, toute fermentation réalisée dans ce régime d'écoulement particulier (Modulated Vortex Flow) conduise à ce phénotype.

La principale différence entre les deux conditions opératoires testées étant le niveau d'énergie dissipée dans le réacteur, les premières hypothèses visant à expliquer ce phénotype sont liées à un défaut de mélange. Cependant, l'analyse du comportement métabolique de *L. lactis* NCDO 2118 a montré qu'aucun shift métabolique n'apparaissait lors des fermentations. Or, cette souche présente la particularité de présenter deux comportements métaboliques (homolactique et métabolisme mixte) selon le flux de substrat reçu. Il apparaît alors évident que les différentes conditions opératoires n'affectent pas le flux de substrat reçu puisque sans effet sur le métabolisme, ce qui témoigne de conditions non significativement différentes en termes de mélange. Les cultures étant régulées pour maintenir un pH optimal, un défaut de mélange de la potasse peut également constituer un point critique. Ici encore, cette hypothèse a été écartée puisque les cultures réalisées dans un milieu sur-tamponné, permettant de retarder l'acidification et donc l'ajout de potasse, présentent le même phénotype tant que le pH n'est pas trop bas, indiquant que ce dernier n'est pas causé par un quelconque défaut de mélange de la potasse.

Le marquage par des lectines et des dosages réalisés sur des extraits de la matrice témoignent de la présence de polysaccharides. Cependant, la production d'exopolysaccharides au sens strict par la souche ne semble pas requise pour l'obtention du phénotype. En effet, les cultures de *L. lactis* IL1403 présentent le même phénotype. De plus, la quantité d'EPS produite est bien souvent corrélée au rapport

entre substrat carboné et azoté assimilé par la cellule. Cependant, les cultures dans un milieu avec un ratio N/C modifié présentent le même phénotype.

Des analyses complémentaires sur la composition de la matrice révèlent la présence d'ADN et protéines, sans que les cellules emprisonnées dans la matrice ne soient lysées. Ces caractéristiques sont semblables aux caractéristiques de communautés cellulaires vivant en biofilms. D'autre part, la présence de protéines peut expliquer le rôle du pH dans la cohésion de la matrice. L'analyse MATS quant à elle, semble suggérer que quelles que soient les conditions de cultures, les cellules présentent les mêmes caractéristiques en termes d'affinités pour les différents solvants, suggérant une capacité préalablement acquise. La préalable acquisition de la capacité d'adhésion est confirmée par le fait que le transfert de cellules en phase stationnaire dans un écoulement toroïdal ondulatoire conduit rapidement à la formation de filaments.

Le suivi granulométrique des cultures dans les premières étapes conduisant au phénotype révèle un processus d'agrégation. Ce phénomène ne peut avoir lieu que si les cellules se rencontrent à une fréquence suffisante et si les forces de cohésion sont supérieures aux contraintes mécaniques subies. Plusieurs questions découlent de cette remarque.

Qui dit forces de cohésion dit cohésion, quel en est le mécanisme? Est-ce un mécanisme induit? Si les mécanismes d'adhésion sont liés aux caractéristiques biochimiques et biophysiques des constituants de la matrice, sujet qu'il faudra approfondir, il semble que les caractéristiques des cellules aptes à s'agréger soient identiques quelle que soit la vitesse de rotation. Cette déduction est renforcée par le fait que le transfert de cellules d'une condition planctonique à une condition provoquant l'agrégation conduit effectivement à une agrégation rapide, même pour des cellules en phase stationnaire de croissance. Il en découle que : (i) aucune modification (bio)chimique des cellules, notamment une expression de gènes modifiée qui conduirait à une composition différente en métabolites (de surface), n'est à invoquer pour observer le phénotype ; (ii) une concentration particulière, ou critique, de molécules exocellulaires (polysaccharides et protéines) ne semble pas un pré-requis pour observer l'agrégation.

Il est alors probable que cette concentration est non différente dans les deux conditions de culture, avec ou sans agrégation, même si nos essais de quantification sont encore trop imprécis pour le démontrer. Ces observations permettent de penser que la nature des molécules, de surface ou exocellulaires, impliquées ou pas dans l'agrégation, n'est pas non plus différente dans les deux conditions. Il faut donc envisager que leur disposition, ou leur conformation, varie avec l'écoulement, et permette un « accrochage » de structures moléculaires entre elles dans une condition d'écoulement particulière. Cette caractérisation fine du mécanisme d'agrégation reste un challenge pour l'avenir.

Quelles sont les contraintes mécaniques subies ? En considérant simplement le rapport entre contraintes mécaniques et forces de cohésion, il est évident que des cultures « statiques » dans lesquelles l'énergie dissipée est faible, devraient selon cette logique, elles aussi présenter ce phénotype filamenteux. Ce n'est pas le cas ici, peut-être est-il nécessaire d'intégrer à nos hypothèses la notion de contrainte seuil requise pour induire une capacité de cohésion.

Les expériences concernant le transfert de cultures d'un réacteur présentant un écoulement turbulent (fermenteur de laboratoire classique ou réacteur Couette en régime turbulent) vers un régime ondulatoire modulé montrent que non seulement les contraintes mécaniques subies, mais aussi la structure de l'écoulement jouent un rôle important. Il convient alors de caractériser de façon plus fine les contraintes subies par les cellules dans les différents écoulements générés dans le réacteur Couette.

C'est donc l'objectif du chapitre suivant, qui va s'attacher à décrire et caractériser les différences au niveau de l'écoulement et les contraintes subies par des cellules circulant dans ces environnements.

DESCRIPTION DES CONTRAINTES LOCALES PAR SIMULATION NUMERIQUE DE L'ÉCOULEMENT

L'hypothèse d'un défaut lié au mélange pour expliquer le phénotype ayant été exclue dans le chapitre précédant, nous allons nous attacher ici à identifier les caractères spécifiques de l'écoulement menant à nos observations. L'objectif de ce chapitre est de réaliser une caractérisation détaillée des contraintes hydrodynamiques subies par des cellules en culture dans un réacteur de Couette et ce dans les différents régimes d'écoulement précédemment évoqués. L'analyse des données de la littérature a montré que l'intensité d'un stress n'est pas la seule information à considérer mais que les variations temporelles contribuent également à déterminer la réponse biologique.

Il a également été souligné que parmi les paramètres clés de l'écoulement, le taux de dissipation de l'énergie jouait un rôle central. L'évaluation globale de cette grandeur n'est pas problématique mais sa détermination à l'échelle de la cellule ainsi que les variations spatio-temporelles sont en pratique très difficiles à mesurer (Huchet *et al.* 2009). Un moyen d'accéder à ces informations consiste à mettre en œuvre une simulation numérique de l'écoulement

Nous avons ainsi réalisé la simulation numérique directe (DNS) de l'écoulement dans le réacteur dans différentes conditions. La simulation de tels écoulement n'est pas triviale et une analyse théorique préliminaire s'impose afin de guider les choix lors du paramétrage. Une fois les simulations validées par comparaison avec des données expérimentales ou théoriques, l'écoulement est décrit dans son ensemble. Des valeurs de contraintes moyennes ainsi que leurs répartitions volumiques sont calculées et une cartographie du réacteur est ainsi réalisée. Un lâcher de particule a également été effectué afin de recueillir des informations sur l'historique des contraintes subies par les cellules. L'analyse des contraintes le long de la trajectoire d'une cellule dans le réacteur relève de l'approche dite Lagrangienne. En conclusion de ce chapitre et grâce à l'éclairage des données numériques récoltées, nous tenterons d'affiner les hypothèses expliquant le lien entre phénotype et conditions hydrodynamiques locales et globales.

1 DESCRIPTION DE L'ÉCOULEMENT DANS LE REACTEUR COUETTE

1.1. Caractérisation du régime d'écoulement

Comme il a été évoqué dans la partie bibliographique consacrée à la description des transitions dans un réacteur Couette, l'écoulement dans cette géométrie confinée peut revêtir de nombreuses formes (laminaire, modulé, turbulent). Si le nombre de Taylor est largement utilisé dans le domaine du génie des procédés pour qualifier le niveau de turbulence dans le réacteur Couette, l'approche mécanique des fluides préfère souvent le nombre de Reynolds défini comme suit.

$$\text{Re} = \frac{Ri\Omega(Ro - Ri)}{\nu} \quad \text{Eq IV.1}$$

On définit de la même façon un nombre de Reynolds critique au-delà duquel le régime laminaire disparaît et l'écoulement, devenu instable, s'organise en donnant naissance aux vortex de Taylor (Esser and Grossmann 1995).

$$\text{Re}_c = \frac{1}{\alpha^2} \frac{(1 + \eta)^2}{2\eta\sqrt{(1 - \eta)(3 + \eta)}} \quad \text{Eq IV.2}$$

Avec $\eta = \frac{Ri}{Ro}$ et $\alpha = 0,1556$

La définition du nombre de Reynolds critique donnée par ces auteurs découle d'une analyse linéaire de stabilité. Elle est de fait théorique et donne la limite approximative au-delà de laquelle l'écoulement ne peut plus être laminaire. Pour le réacteur étudié ici, on calcule donc $\text{Re}_c = 117$.

Au cours de cette étude, nous avons travaillé avec des vitesses allant de 20 à 114 RPM. Le tableau IV.1 ci-dessous résume les différents régimes d'écoulement attendus en fonction de la vitesse de rotation du cylindre interne.

Vitesse de rotation (RPM)	Reynolds	Reynolds réduit ($Re^*=Re/Re_c$)	Régime d'écoulement
10	1751	13,4	Tourbillonnaire ondulant / éventuellement modulé
20	3142	26,9	
30	4712	40,3	
70	10996	94,1	Turbulent vortex flow
114	17907	153,3	
200	31416	268,9	

Tableau IV.1: détermination des régimes d'écoulement rencontrés

Les différents régimes en fonction de Re^* sont cohérents avec les résultats de simulation numérique directe (DNS) de Dong (Dong 2007) selon lesquels les vortex de Taylor sont laminaires pour $Re^*=14$ puis turbulents pour $Re^*= 42 - 114$ dans un réacteur de ratio $\eta=0,5$. Par une approche de Simulation Numérique Directe de l'écoulement et expérimentale, Rudman (Rudman *et al.* 2008) trouve que la transition entre le régime ondulant et un régime relativement chaotique a lieu pour un Re compris entre 120 et 160 dans un réacteur dont la géométrie est telle que $\eta=0,856$ soit $Re_c=111$ et Re^* entre 1,4 et 1,6.

Ces remarques indiquent que la transition est très rapide entre ces différents régimes (régime vortex ondulatoires, modulés et turbulents). D'autre part, il semble que dans le régime modulé, l'obtention d'une structure d'écoulement donnée soit de plus dépendante de l'histoire de l'écoulement (Climent, communication personnelle). C'est cette existence de solutions expérimentales multiples qui a été avancée au chapitre 2 pour expliquer une partie de la variabilité des cultures réalisées à 20 RPM.

De ces descriptions, quelques remarques sont à prendre en compte afin de réaliser une résolution numérique la plus exacte possible. Du régime laminaire à l'apparition de vortex de Taylor, l'écoulement est axisymétrique. Par la suite, l'augmentation de la vitesse de rotation du cylindre interne entraîne l'apparition de nouvelles instabilités : on observe alors des vortex ondulants. L'écoulement perd de ce fait son caractère axisymétrique et devient pseudo périodique : la valeur de vitesse en un point varie au cours du temps mais cette variation est périodique. L'augmentation du nombre de

Reynolds entraîne ensuite une modulation : une deuxième onde vient se superposer à la première. L'écoulement devient alors peu à peu chaotique et par conséquent, difficile à prédire, modéliser et observer. Par la suite, les vortex deviennent turbulents mais stables en moyenne et l'écoulement moyen retrouve son caractère axisymétrique dans le régime turbulent.

1.2. Puissance dissipée et contraintes

Des corrélations permettent de prédire des valeurs de couple, puissance dissipée, taux de dissipation et cisaillement dans le réacteur Couette. Le couple exercé par le fluide sur le cylindre en rotation est estimé selon la corrélation de Wendt (équations IV.3 à IV.5), dont la validité a été plus récemment confirmée par les travaux expérimentaux de (Lathrop *et al.* 1992).

$$C = G_{a\text{dim}} \rho v^2 H \quad \text{Eq IV.3}$$

$G_{a\text{dim}}$ correspond au couple adimensionnalisé, son expression varie selon l'écoulement considéré (équations IV.4 et IV.5) :

$$400 \leq \text{Re} \leq 10\,000 \quad G_{a\text{dim}} = 1,45 \frac{\eta^{\frac{3}{2}}}{(1-\eta)^{\frac{7}{4}}} \text{Re}^{\frac{3}{2}} \quad \text{Eq IV.4}$$

$$\text{Re} \geq 10\,000 \quad G_{a\text{dim}} = 0,23 \frac{\eta^{\frac{3}{2}}}{(1-\eta)^{\frac{7}{4}}} \text{Re}^{1,7} \quad \text{Eq IV.5}$$

On en déduit la puissance dissipée P égale au produit du couple par la vitesse angulaire de rotation du cylindre interne. Le taux de dissipation de l'énergie (en W.kg^{-1}) correspond à l'énergie dissipée par unité de temps et de masse du fluide (équation IV.6) Le taux de cisaillement moyen basé sur la puissance dissipée totale est calculé selon la relation IV.7.

$$\langle \varepsilon \rangle = \frac{P}{\rho V} \quad \text{Eq IV.6}$$

$$\langle \dot{\gamma} \rangle = \sqrt{\frac{\langle \varepsilon \rangle}{\nu}} \quad \text{Eq IV.7}$$

Les valeurs de ces grandeurs globales ont été calculées pour la géométrie du réacteur Couette utilisé dans cette étude. Elles sont résumées dans le tableau IV.2 ci-dessous et vont permettre par la suite d'évaluer la convergence de la solution trouvée numériquement.

Vitesse de rotation (RPM)	Couple (N.m)	Puissance dissipée (10^{-3} W)	Taux de dissipation $\langle \varepsilon \rangle$ (W.kg^{-1})	Taux de cisaillement $\langle \dot{\gamma} \rangle$ (s^{-1})
10	0,44	0,46	0,00027	16,4
20	1,24	2,6	0,00153	39,1
30	2,28	7,2	0,00451	64,9
70	8,29	60,8	0,03574	189,1
114	18,99	226,7	0,13336	365,0
200	49,38	$1,03 \cdot 10^3$	0,60838	780,0

Tableau IV.2: Valeurs caractéristiques pour différentes vitesses de rotation.

1.3. Conséquences pour la mise en œuvre des simulations

Si des résultats de simulations de ces écoulements en 2D, RANS-k-epsilon sont disponibles (Coufort, 2004), nous avons choisi de résoudre ces écoulements en 3D par de la DNS qui offre une meilleure résolution spatiale et permet, à terme, de faire du suivi Lagrangien de particules. Par ailleurs, à 20 et 30 RPM, des ondulations instationnaires se développent et l'écoulement n'est pas forcément axisymétrique ni turbulent ce qui nécessite une simulation 3D et instationnaire.

En effet, l'écoulement qui s'établit à 20 RPM est très proche de la zone dans laquelle apparaît le régime ondulatoire modulé (Modulated Wavy Vortex Flow). Cela signifie qu'une onde modulée se superpose aux vortex de Taylor. Ces derniers oscillent de façon

axiale selon une période et une amplitude donnée et l'onde ne se déplace pas à la même vitesse que le fluide. Cependant, le caractère modulé, que l'on peut décrire comme un enchaînement de constriction et d'expansion des vortex de Taylor, entraîne une double instabilité qui rend la résolution numérique de ce type d'écoulement très périlleuse. Si l'écoulement dans un réacteur Couette suscite l'intérêt des scientifiques depuis de nombreuses années, la description et la simulation des régimes périodiques et modulés ne sont pas pleinement résolus. Parmi les récents travaux en mécanique des fluides numériques s'attachant à résoudre ce type particulier d'écoulement, citons Dong (Dong 2007) et Bilson et Bremhorst (Bilson and Bremhorst 2007). Une autre illustration de la difficulté à décrire les phénomènes ayant lieu autour de ces transitions est la problématique du mélange intravortex et son lien avec les vitesses de rotation qui suscite de nombreuses controverses.

Dans ce cas particulier, il convient de traiter les résultats numériques avec une très grande attention, la simulation pouvant mener à plusieurs solutions stables différentes. Dong (Dong 2007) remarque que plus le rapport hauteur/rayon interne est élevé, plus il y a de chances (ou de risques) d'obtenir des écoulements résolus multiples (par exemple, des écoulements ondulatoires de période différentes). Cette multiplicité n'est cependant pas un artefact et rejoint certaines observations expérimentales (Coles 1965).

La présence de l'onde axiale rend l'écoulement non axisymétrique et instationnaire dans un repère fixe. Cependant, dans un repère mobile selon l'onde, l'écoulement wavy vortex flow redevient stationnaire, ce qui n'est pas le cas du régime en onde modulée. Le cas particulier de l'écoulement se produisant à 20 RPM est d'autant plus difficile à résoudre numériquement qu'il n'est pas complètement turbulent. Il est donc très délicat d'utiliser des équations de fermeture modélisant la turbulence car les hypothèses sous-jacentes ne sont pas satisfaites.

2 DESCRIPTION DE L'ÉCOULEMENT À L'AIDE DE LA MÉCANIQUE DES FLUIDES NUMÉRIQUE

2.1. Mise en œuvre de la simulation numérique directe (DNS)

Le code de calcul commercial Fluent permet d'obtenir une solution numérique de

l'écoulement dans le réacteur Couette pour différentes vitesses de rotation par simulation numérique directe (DNS).

2.1.1. Description de la DNS

- Equations de Navier Stokes (fluide newtonien incompressible) : conservation de la masse et de la quantité de mouvement (Eq. IV.8) :

$$\left\{ \begin{array}{l} \sum_i \frac{\partial U_i}{\partial x_i} = 0 \\ \frac{\partial U_i}{\partial t} + \sum_j U_j \frac{\partial U_i}{\partial x_j} = -\frac{1}{\rho} \frac{\partial p}{\partial x_i} + \frac{\mu}{\rho} \sum_j \frac{\partial^2 U_i}{\partial x_j^2} \end{array} \right. \quad \text{Eq IV.8}$$

Dans le cas de la Simulation Numérique Directe (ou DNS), les équations de Navier-Stokes, exactes, sont discrétisées et résolues sans formuler aucune hypothèse sur la nature turbulente de l'écoulement. En d'autres termes, toutes les échelles de temps et de longueur sont résolues ce qui conduit à une description spatiale et temporelle de l'écoulement très détaillée. En contrepartie, la résolution spatiale et temporelle doit être suffisamment fine afin de décrire effectivement l'ensemble des échelles présentes dans l'écoulement. Ceci impose une taille maximale de maille et un pas de temps judicieusement choisis. En pratique, il est souhaitable de raffiner jusqu'à la taille des plus petites structures turbulentes, définies par l'échelle de Kolmogorov. Les valeurs des échelles spatiales et temporelles de Kolmogorov (échelle sous laquelle la dissipation visqueuse domine) sont données dans le tableau IV.3. Ces deux grandeurs ont été fixées a priori, en se basant sur la théorie de la turbulence, à partir de la valeur de la puissance spécifique moyenne donnée par la corrélation de Wendt. Puisqu'il s'agit d'une méthode a priori, et en particulier pour les écoulements peu turbulents (pour lesquels on ne peut pas parler d'échelle de Kolmogorov *stricto sensu*), il conviendra de valider les simulations en examinant la qualité des résultats notamment en comparant l'intégrale de puissance dissipée localement à la puissance spécifique moyenne donnée par la corrélation de Wendt.

- Maillage

Un maillage de type cylindrique a été réalisé. Il contient 3.145.728 mailles hexaédriques soit 64*196*256 dans un repère (r,θ,z). En terme de taille les mailles font en moyenne 0,230*1,150*0,660 mm.

- Conditions limites

Type : « Wall » (≡ condition d'adhérence + loi de paroi) pour les cylindres interne, externe et le fond, « Symetry » pour la frontière supérieure (≡ vitesse normale nulle et gradients normaux nuls pour les autres composantes : vitesses dans le plan). La surface supérieure ne se déforme pas mais possède les propriétés d'une surface libre : frottement nul.

- Paramètres de la simulation

Les équations de Navier Stokes ont été discrétisées à l'ordre 3 en espace et 2 en temps, et résolues en double précision, 3D, instationnaire.

Schéma de discrétisation spatiale: ordre 3 MUSCL, ordre 2 pression.

Schéma d'intégration temporelle : ordre 2 implicite, « non iterative time advancement ». Le pas de temps constant est fixé à un ordre de grandeur plus faible que le temps caractéristique des plus petites échelles turbulentes calculé en considérant la puissance dissipée moyenne issue de la corrélation de Wendt (voir tableau IV.3).

RPM	$\eta_k = \left(\frac{v^3}{\langle \varepsilon \rangle} \right)^{1/4}$ (μm)	$t_k = \left(\frac{v}{\langle \varepsilon \rangle} \right)^{1/2}$ (s)	dt (s)
20	160	0,0279 *	0,01
30	125	0,0155	0,001
70	73	0,0053	0,0005
120	50	0,0028	0,0001

*** le caractère pleinement turbulent n'est pas établi à 20 rpm**

Tableau IV.3 : échelles caractéristiques turbulentes pour les différentes vitesses de rotation utilisées à partir de la dissipation moyenne

- Algorithme de couplage vitesse pression :
 - Couplé pour les simulations à 20 -30 RPM
 - PISO imposé par l'option « non iterative time advancement » à 70 RPM et 114 RPM
- Critère de convergence numérique
 - Résidus inférieurs à 10^{-4} . En pratique les résidus sur les vitesses tombaient sous 10^{-6} quand la continuité passe sous 10^{-4}
- Critère de convergence physique : l'examen de la valeur du couple sur les cylindres intérieur et extérieur renseigne sur le caractère établi de l'écoulement. L'intégrale de la puissance dissipée localement est comparée à la puissance totale.
- Le suivi de particules est réalisée sur des particules microniques, sans interactions avec l'écoulement sur un champ de vitesse instantané. Les options par défaut proposées par FLUENT sont utilisées. Le temps total de suivi est fixé de manière à suivre les particules pendant environ 40 tours.

2.1.2. Convergence des écoulements résolus en DNS

Critères

La convergence des résultats de simulations est estimée à travers le suivi du couple exercé sur le cylindre interne et externe en fonction du temps (stabilité de la résolution) et par comparaison des valeurs de couples et de puissances dissipées avec des valeurs issues des corrélations, comme expliqué précédemment. La concordance des valeurs de couples exercés sur les cylindres internes et externes renseignent sur l'établissement de l'écoulement dans l'entrefer. Les résultats de simulation sont également validés par une double approche macro-micro :

- Intégrale des contraintes sur le cylindre intérieur qui permet de calculer le couple puis la puissance fournie et la dissipation globale (dissipation moyenne volumique calculée selon les équations IV.4 à IV.6 (à partir de la puissance totale dissipée dans le réacteur),
- Intégrale volumique de la dissipation locale (Eq. IV.9 et IV.10). Celle-ci n'étant pas calculée explicitement lors d'une simulation numérique directe, une fonction utilisateur a été utilisée. Le taux de dissipation local instantané est donné par l'équation IV.9.

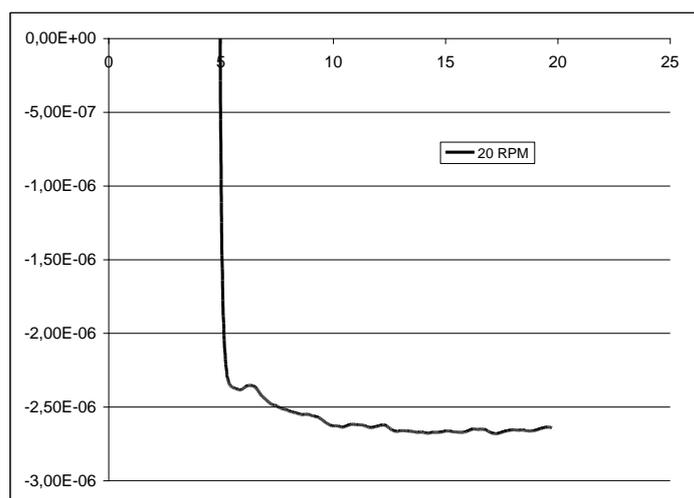
$$\varepsilon = \mu \cdot \left[2 \cdot \left(\left(\frac{\partial u}{\partial x} \right)^2 + \left(\frac{\partial v}{\partial y} \right)^2 + \left(\frac{\partial w}{\partial z} \right)^2 \right) + \left(\left(\frac{\partial u}{\partial y} + \frac{\partial v}{\partial x} \right)^2 + \left(\frac{\partial v}{\partial z} + \frac{\partial w}{\partial y} \right)^2 + \left(\frac{\partial u}{\partial z} + \frac{\partial w}{\partial x} \right)^2 \right) \right] \quad \text{Eq IV.9}$$

$$\langle \varepsilon \rangle_v = \frac{1}{V} \int_v \varepsilon dV \quad \text{Eq IV.10}$$

Examen de la convergence

Le graphe IV.1 ci-dessous présente l'évolution d'un critère choisi par Fluent représentatif du couple exercé sur le cylindre dans l'écoulement à 20 RPM.

Les coefficients sont stables au delà de $t = 10s$ et sur une durée de 10 s supplémentaires, on peut donc affirmer que l'écoulement est établi à 20 RPM sur cette durée, ce qui représente 3 révolutions du cylindre interne.

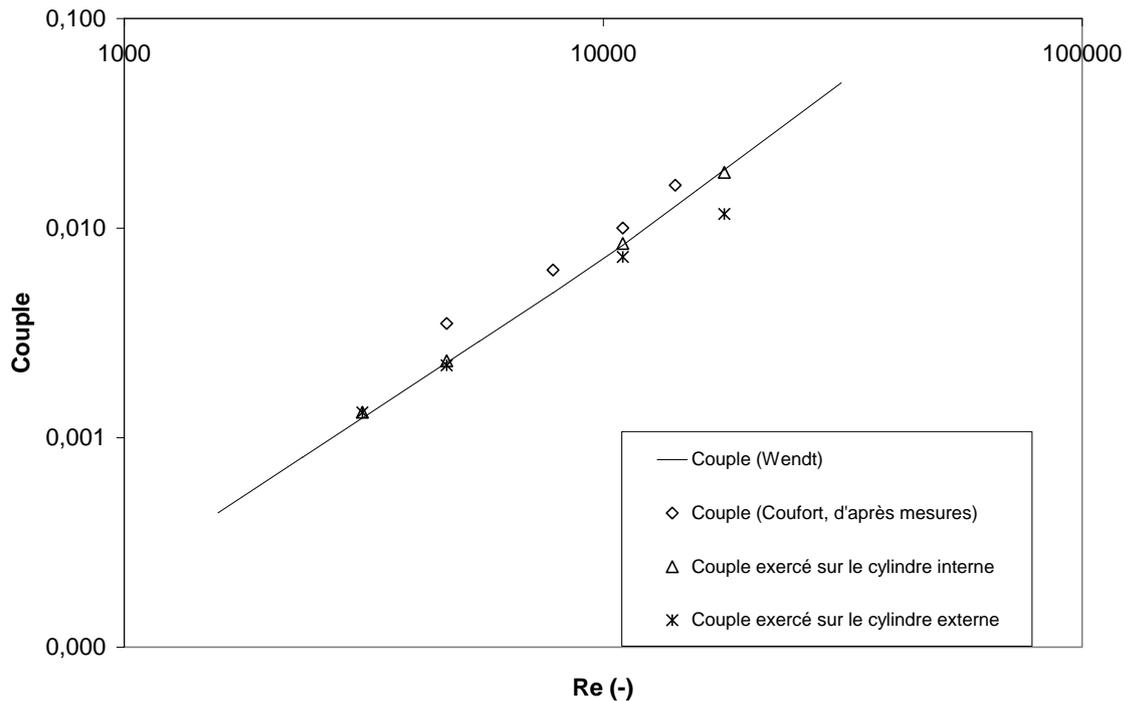


Graph IV.1 : stabilisation du couple pour des simulations à 20 RPM (l'axe des ordonnées correspond à un coefficient de calcul proportionnel au couple)

Les valeurs du couple exercé sur les cylindres interne et externe sont représentées sur le graphe IV.2. Ce graphique compare, pour les simulations de l'écoulement à 20, 30, 70 et 114 RPM, les valeurs de couple relevés par Fluent avec celles calculées à l'aide de la corrélation de Wendt ou mesurées par Coufort (Coufort 2004). Ces valeurs sont très proches, ce qui confirme le caractère établi de l'écoulement. De plus, ces valeurs coïncident avec la corrélation de Wendt (Tableau IV.4). Pour l'écoulement établi à 114 RPM cependant, il demeure un écart entre les valeurs des couples exercés sur les cylindres externe et interne, indiquant que la résolution pourrait encore être améliorée (ce qui nécessite un temps de calcul important). Cependant, on verra que les conséquences sont négligeables sur l'évaluation de la dissipation.

Vitesse de rotation (RPM)	Taux de dissipation moyen calculé à partir du couple (Eq. IV.6) $\langle \varepsilon \rangle$ (W.kg ⁻¹)	Taux de dissipation moyen volumique (Eq. IV.10) $\langle \varepsilon \rangle_v$ (W.kg ⁻¹)
20	1,7.10 ⁻³	1,6.10 ⁻³
30	4,2.10 ⁻³	3,7.10 ⁻³
70	36.10 ⁻³	52.10 ⁻³
114	128.10 ⁻³	165.10 ⁻³

Tableau IV.4 : Valeurs moyenne et moyenne volumique de la dissipation

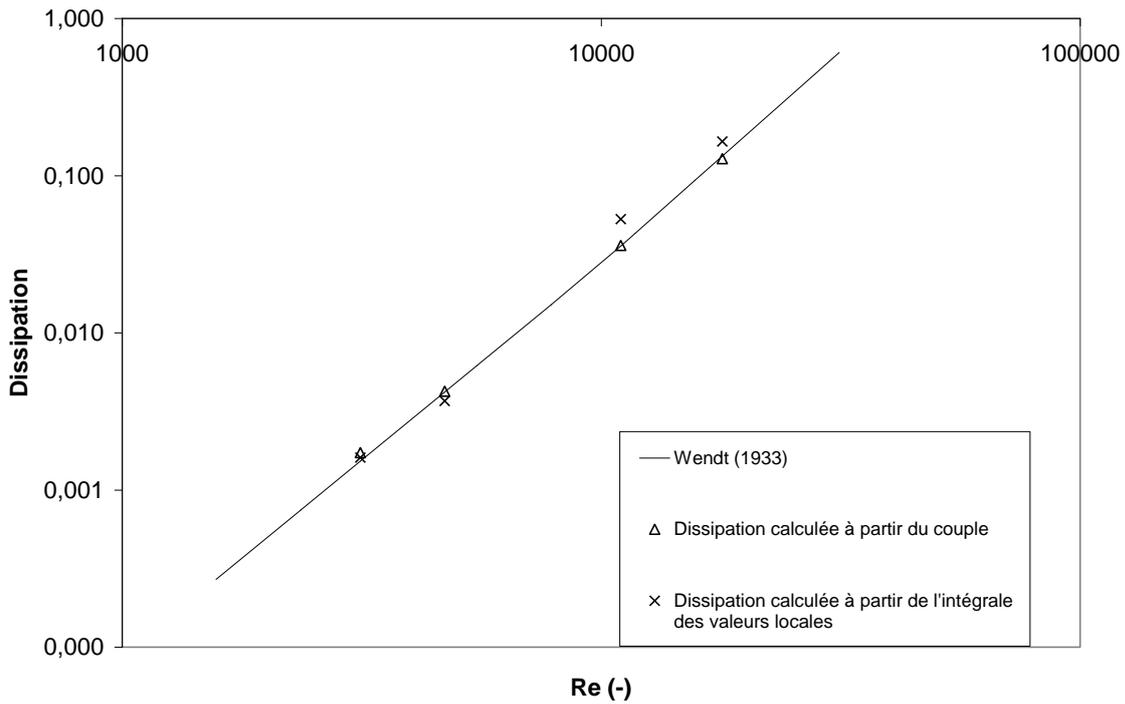


Graph IV.2 : Valeur du couple en fonction du nombre de Reynolds d'après Wendt (empirique), Coufort (mesure) et les valeurs calculées lors des simulations.

De la même manière, le graphe IV.3 compare la valeur du taux dissipation de l'énergie :

- Calculée à partir des gradients de vitesses locaux via une custom field function Fluent (équation IV.9) et obtenue en intégrant sur l'ensemble du volume du réacteur la dissipation locale.
- Calculée d'après la corrélation de Wendt
- Calculée à partir de la valeur du couple mesurée dans la simulation (équation IV.10 et présentées dans le tableau IV.2).

On observe une très bonne concordance entre ces valeurs pour toutes les simulations. Les écarts observables pour les simulations à 70 et 114 RPM peuvent s'expliquer par la réduction de l'échelle de dissipation liée à l'augmentation de la vitesse. Le maillage étant identique, le calcul de la dissipation à partir des gradients de vitesse locaux est susceptible de perdre en précision lorsque la vitesse de rotation augmente.



Graphe IV.3 : dissipation en fonction du Reynolds, obtenue par calcul et numériquement

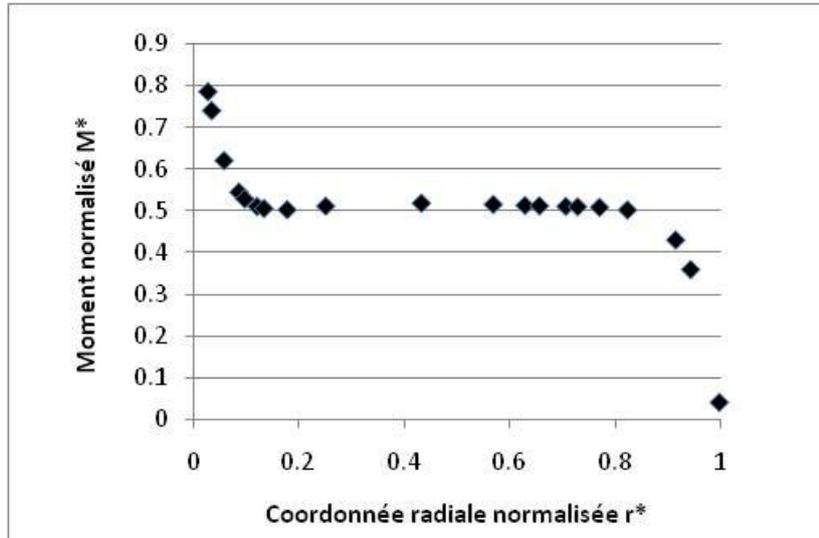
Le point fort des calculs est que ces deux approches surfaciques et volumiques (couple et dissipation) coïncident assez bien entre elles et avec les prédictions de la corrélation de Wendt.

Examen local : profil de vitesse tangentielle sur un plan horizontal $z = 10 \text{ cm}$

Le graphe IV.4 montre le profil de la valeur moyenne des moments angulaires normalisés. Le moment angulaire M^* et coordonnée radiale r^* sont normalisés comme suit :

$$M^* = \frac{r \times u_{\theta}}{R_1 \times U_0} \quad \text{Eq IV.11}$$

$$r^* = \frac{r - R_1}{R_2 - R_1} \quad \text{Eq IV.12}$$



Graph IV.4 : Profil du moment angulaire normalisé pour des simulation en DNS de l'écoulement à 20 RPM.

Ce graphe montre que le moment angulaire pour le fluide évoluant au centre de l'entrefer (r^* compris entre 0,1 et 0,8) est constant (autour de $0,5 \times R_1 \times U_0$), en accord avec les simulations de Dong *et al.* et les mesures de Coufort (Coufort 2004). Un petit bémol peut cependant être relevé en ce qui concerne la pente du profil, légèrement positive pour les simulations de Dong *et al.* et les valeurs expérimentales auxquelles ils les ont comparées, bombées dans le cas de nos simulations.

2.2. Description de l'écoulement grâce aux résultats obtenus en DNS

2.2.1. Ecoulement à 20 RPM

Parmi les écoulements résolus numériquement dans cette étude, l'écoulement à 20 RPM (Modulated WVF) est le plus délicat à résoudre numériquement. Aussi, les résultats décrivant cet écoulement font l'objet d'une attention particulière.

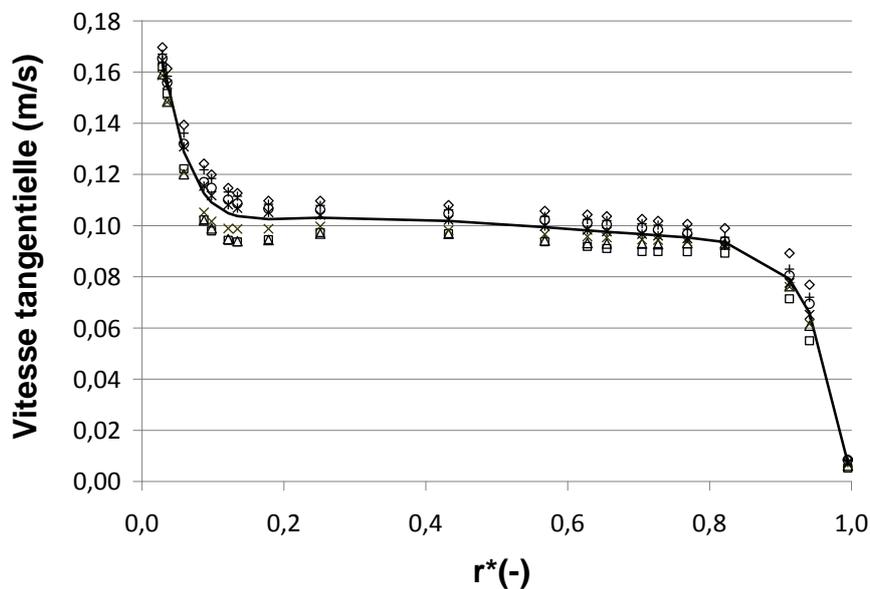
Profils de vitesse moyenne à différents instants

Les graphes ci-dessous représentent les profils des trois composantes de la vitesse (u_r , u_θ et u_z) dans un plan horizontal en fonction de la coordonnée radiale adimensionnée (équation IV.11). 7 champs instantanés de l'écoulement établi à 20 RPM ont été enregistrés. Chaque profil correspond à un instant particulier . Les valeurs

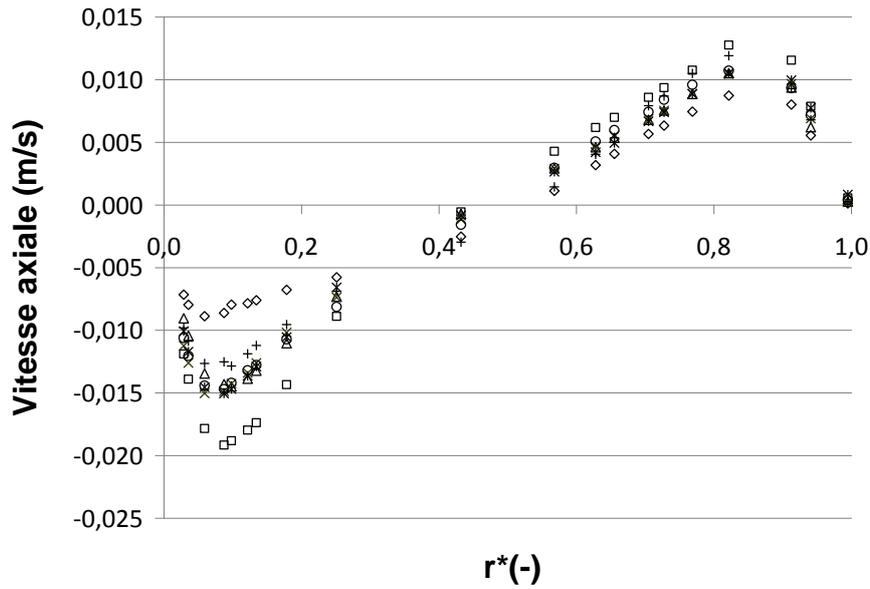
en un point sont issues d'une moyenne sur un cercle de rayon constant à hauteur $z = 10$ cm fixée. La moyenne d'ensemble correspondant à la valeur moyenne de la vitesse tangentielle sur tous les instants considérés est représentée en gras.

La direction principale de l'écoulement étant tangentielle (graphe IV.5), on remarque que c'est la composante tangentielle de la vitesse u_θ qui prend les valeurs les plus élevées. La vitesse est maximale en $r^*=0$, le fluide est entraîné par la rotation du cylindre interne. Elle décroît rapidement et présente un profil plat sur toute la largeur de l'entrefer. De plus, le profil de cette composante de la vitesse est relativement stable au cours du temps ($\pm 10\%$ dans l'entrefer)

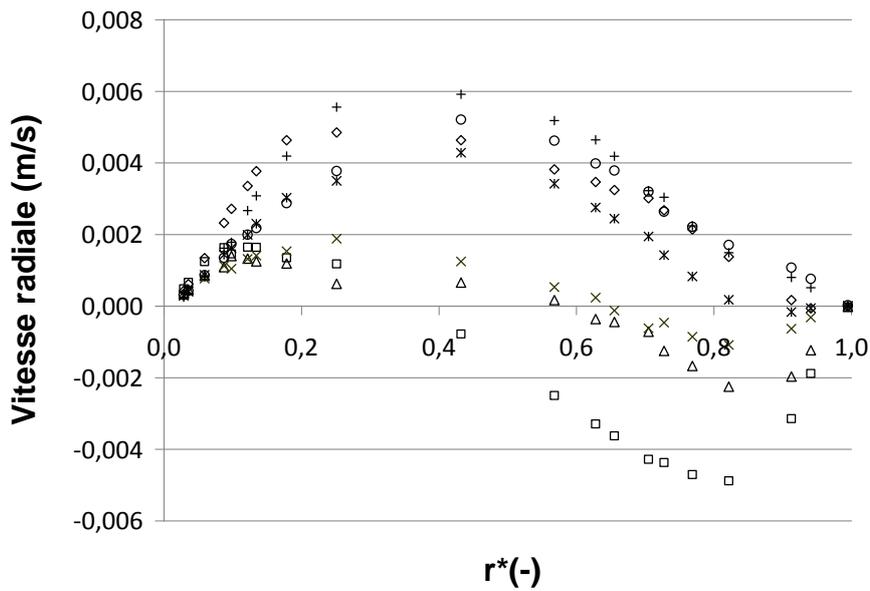
Le profil de vitesse axiale (graphe IV.6) présente une amplitude inférieure au profil de vitesse tangentielle. Les ordres de grandeur sont inférieurs d'un facteur 10 à celui de la vitesse tangentielle et sont similaire à celui de la vitesse radiale. Elle renseigne sur le sens de rotation du vortex. S'agissant de vortex en rotation dans un plan vertical et de section égale à l'entrefer, la vitesse axiale est donc nulle à l'inflexion, soit au centre de l'entrefer (extrémités hautes et basses du vortex). Ici, le plan horizontal d'altitude z traverse un vortex tournant dans le sens trigonométrique.



Graphe IV.5 : Profil de la composante tangentielle de la vitesse en moyenne spatiale et temporelle (en gras) dans un plan horizontal $z=10$ pour différents champs instantanés : t_0 (\diamond), $t_1= t_0+2s$ (\square), $t_2= t_0+4s$ (\triangle), $t_3= t_0+6s$ (\times), $t_4= t_0+8s$ ($*$), $t_5= t_0+10s$ (\circ), $t_6= t_0+12s$ ($+$).



Graphe IV.6 : Profil de la composante axiale de la vitesse en moyenne spatiale dans un plan horizontal $z=10$ pour différents champs instantanés : t_0 (\diamond), $t_1 = t_0 + 2s$ (\square), $t_2 = t_0 + 4s$ (Δ), $t_3 = t_0 + 6s$ (\times), $t_4 = t_0 + 8s$ ($*$), $t_5 = t_0 + 10s$ (\circ), $t_6 = t_0 + 12s$ ($+$).



Graphe IV.7 : Profil de la composante radiale de la vitesse en moyenne spatiale dans un plan horizontal $z=10$ pour différents champs instantanés : t_0 (\diamond), $t_1 = t_0 + 2s$ (\square), $t_2 = t_0 + 4s$ (Δ), $t_3 = t_0 + 6s$ (\times), $t_4 = t_0 + 8s$ ($*$), $t_5 = t_0 + 10s$ (\circ), $t_6 = t_0 + 12s$ ($+$).

La vitesse radiale quant à elle est nulle aux extrémités latérales du vortex et les valeurs sont opposées selon un plan de symétrie horizontal coupant le vortex en son centre. Son profil, qui renseigne sur la position du plan de mesure par rapport au tourbillon, est

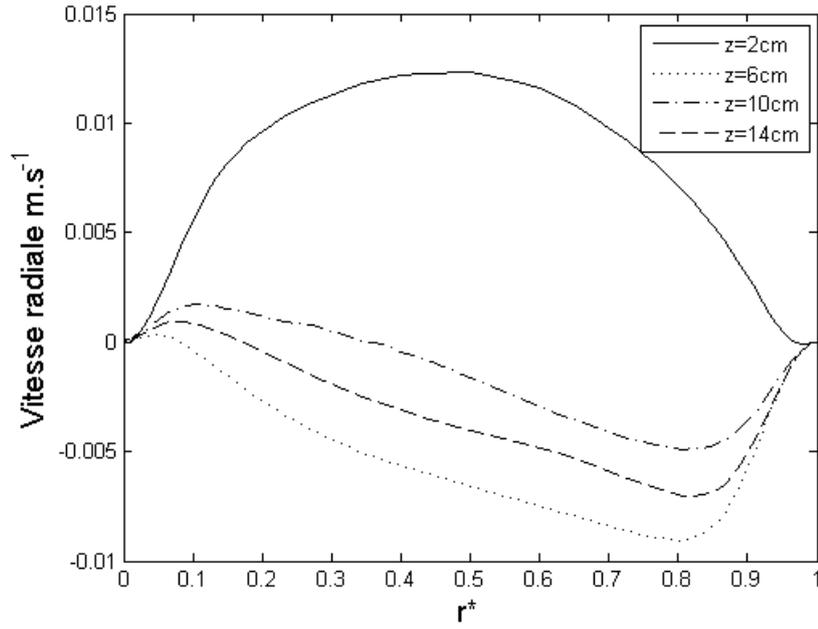
visualisé sur le graphe IV.7. On observe une alternance de valeurs positives et négatives selon l'instant considéré. Ceci est le reflet de l'instationarité de l'écoulement à 20 RPM (onde superposée aux vortex). Ces trois profils nous montrent ainsi, dans un plan fixe, la trace d'un vortex qui oscille verticalement au cours du temps.

Le rapport entre les composantes radiales et tangentielles u_r et u_θ est de l'ordre de 0,1, ce qui correspond aux observations expérimentales de Coufort. Les profils de vitesses tangentielle et axiale semblent relativement stables dans le temps et varient peu relativement à la moyenne. Cependant, les profils de vitesse radiale varient avec la même amplitude absolue et relativement plus que les deux profils précédents.

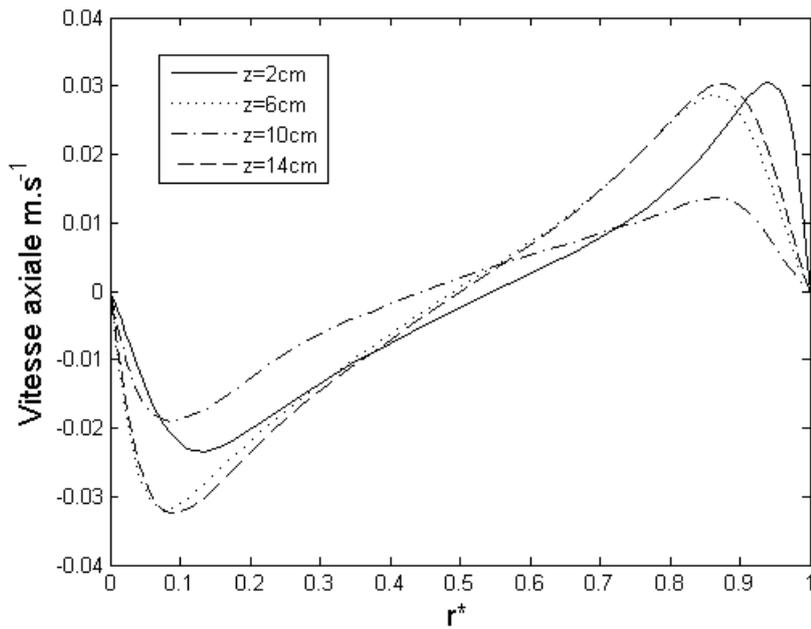
Profils de vitesse moyenne à différentes altitudes dans un champ figé

Sur un même champ instantané, nous avons également comparé les profils de vitesses pour différentes hauteurs dans le réacteur, c'est ce qui est illustré par les graphes IV.8 à IV.10. Les vitesses sont moyennées sur un tour (points de coordonnées radiales et axiales fixes).

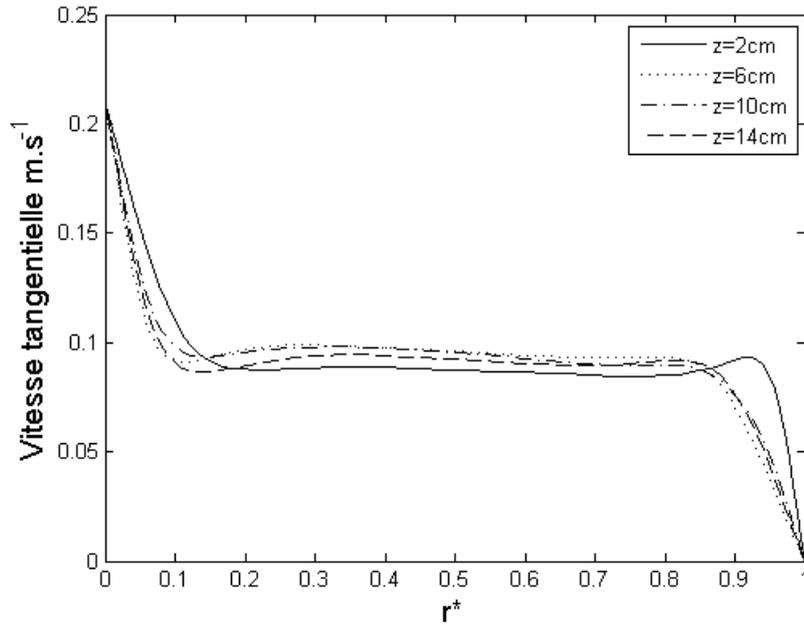
Comme décrit précédemment, le profil de vitesse tangentielle est similaire quelle que soit la hauteur dans le réacteur. La vitesse tangentielle n'est soumise à aucune instabilité spatiale ou temporelle.



Graphe IV.8 : Profil de vitesse radiale à 20 RPM pour des plans horizontaux de hauteur $z=2, 6, 12$ et 14 cm



Graphe IV.9 : Profil de vitesse axiale à 20 RPM pour des plans horizontaux de hauteur $z=2, 6, 12$ et 14 cm



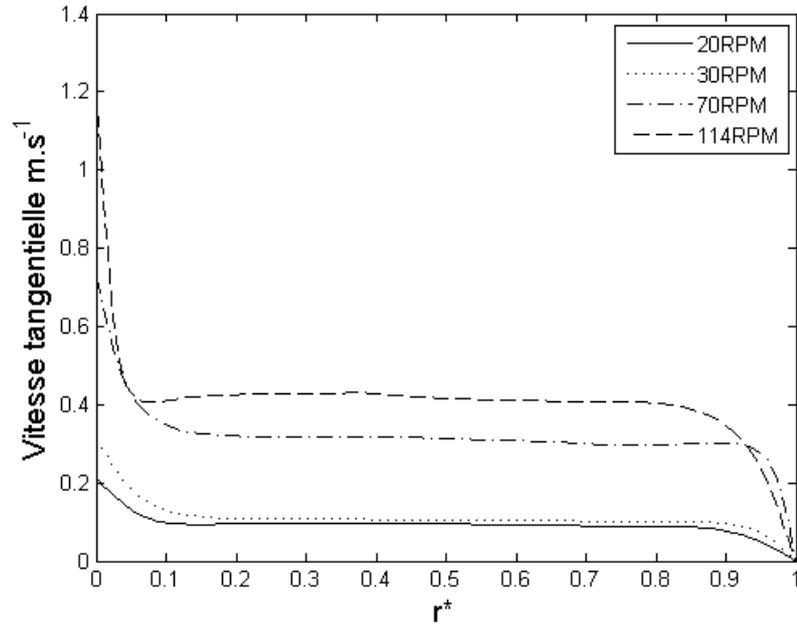
Graphe IV.10 : Profil de vitesse tangentielle à 20 RPM pour des plans horizontaux de hauteur $z=2, 6, 12$ et 14 cm

On remarque que les profils de vitesses radiales et axiales varient en fonction de la position du plan de mesure. Ceci dépend en pratique de la position du plan de mesure par rapport aux vortex.

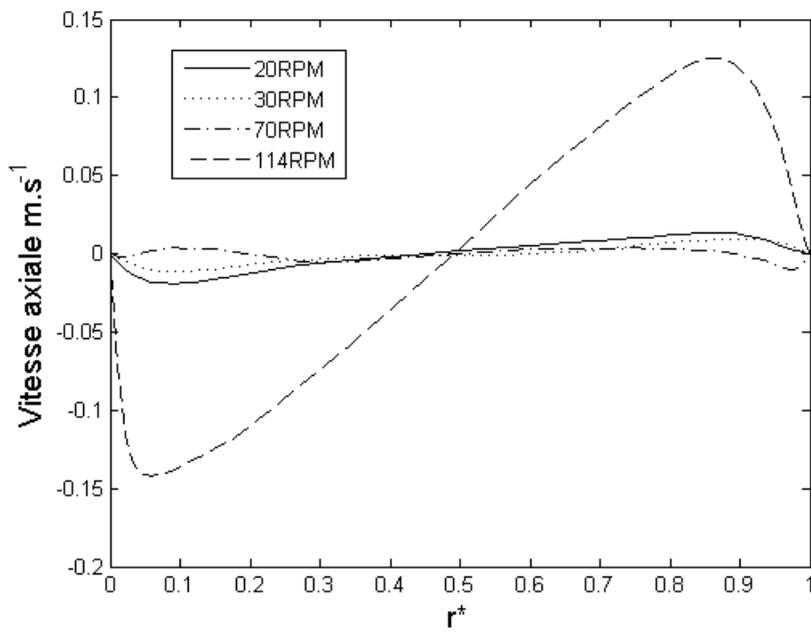
2.2.2. Comparaison des profils de vitesse pour différentes vitesses de rotation

Les profils de vitesse radiale, tangentielle et axiale sont présentés pour différents plans horizontaux (coordonnée axiale $z=10$ cm) sur les graphes IV.11 à IV.13. Comme précédemment, les valeurs des composantes de la vitesse en différents points de coordonnée radiale fixée arbitrairement sont moyennées.

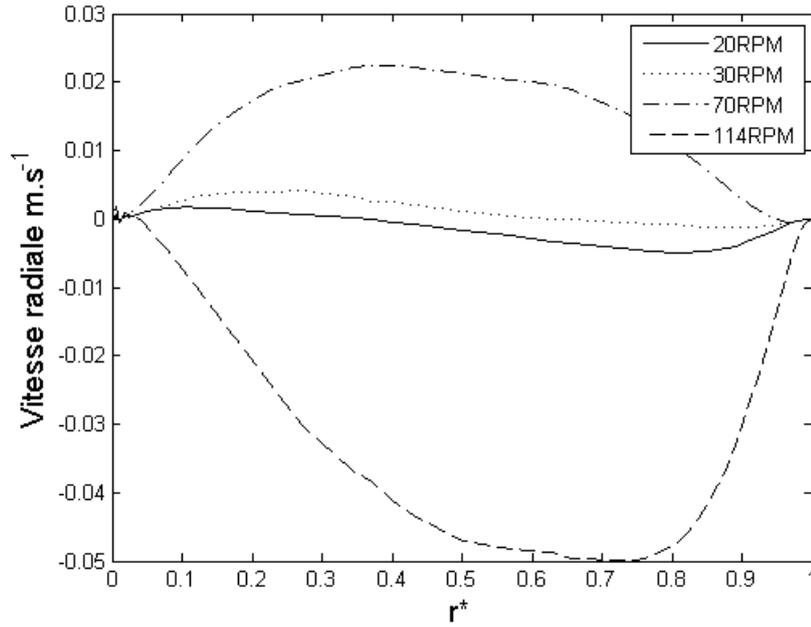
Les profils de vitesse tangentielle ont l'allure décrite précédemment : la vitesse dans cette zone décroît avec la vitesse de rotation du cylindre. Enfin, lorsqu'on s'approche du cylindre externe, la vitesse décroît rapidement et atteint une valeur nulle à la paroi. Les profils de vitesse radiale, comme les profils de vitesse axiale, indiquent que la position verticale des vortex varie en fonction de la vitesse de rotation du cylindre.



Graphe IV.11 : Profil de la vitesse tangentielle moyennée sur un plan vertical ($z = 14$ cm) pour différentes vitesses de rotation



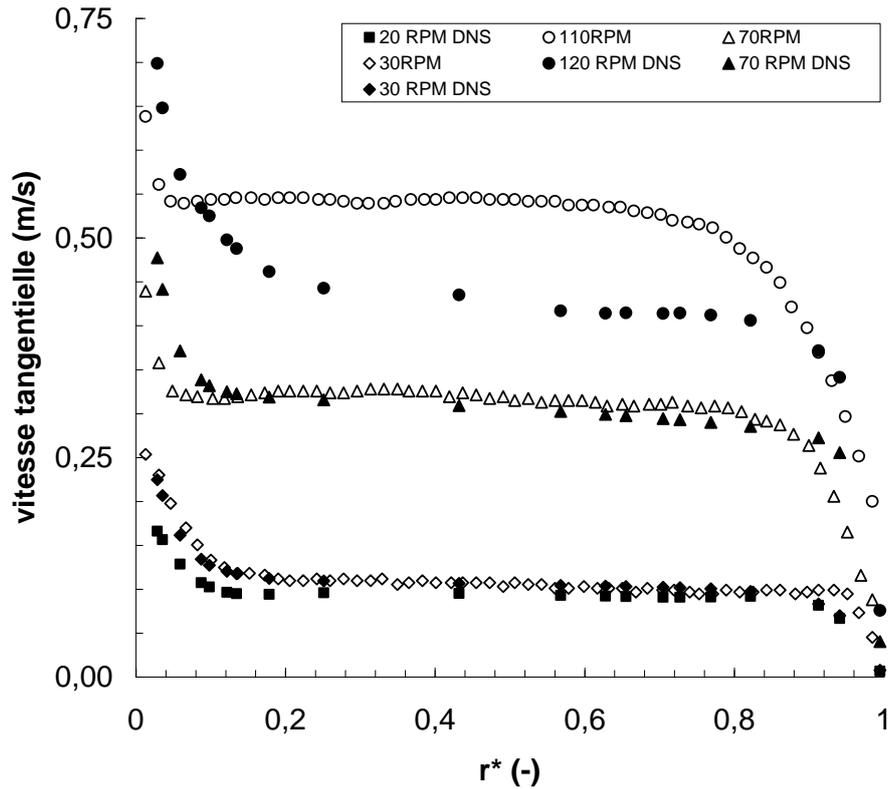
Graphe IV.12 : Profil de la vitesse axiale moyennée sur un plan vertical ($z = 14$ cm) pour différentes vitesses de rotation



Graphe IV.13 : Profil de la vitesse radiale moyennée sur un plan vertical ($z = 14 \text{ cm}$) pour différentes vitesses de rotation

2.3. Confrontation avec les résultats expérimentaux

Le graphe IV.14 représente les profils de vitesse tangentielle de la vitesse moyenne obtenus expérimentalement (Coufort 2004) en fonction de la coordonnée radiale adimensionnée r^* . Ces profils ainsi que les valeurs moyennes correspondent aux résultats obtenus numériquement dans cette étude. La concordance obtenue dans deux études expérimentales et numériques menées indépendamment est remarquable. Toutefois, les résultats de la simulation à 114RPM semblent devoir encore être affinés.



Grphe IV.14 : les profils de vitesse tangentielle de la vitesse moyenne obtenus expérimentalement par Coufort à 30 RPM (◆),50 RPM (□),70 RPM (▲),90 RPM (○) et 110 RPM (●).

2.4. Conclusion

Les simulations numériques semblent avoir convergé vers des solutions raisonnables et les bilans sur la dissipation de l'énergie sont très convaincants. Les valeurs de couple et de dissipation sont proches des corrélations de la littérature et les profils de vitesse sont cohérents et similaires à ceux obtenus expérimentalement par Coufort sur ce même réacteur.

3 OBSERVATION DES CHAMPS INSTANTANES – APPROCHE PHENOMENOLOGIQUE

Sur la figure IV. 1 présentant les champs instantané de dissipation calculés par Fluent à 20 RPM, on observe des vortex de position et de diamètres différents, caractéristiques de l'écoulement tourbillonnaire modulé. Ces vortex sont en nombre impair, ce qui peut s'expliquer par la hauteur simulée dans notre cas (seulement 17 cm) et d'un nombre variable, la disparition puis la disparition d'une paire de vortex correspondant à un

régime pseudo stationnaire de l'écoulement réalisé dans ces conditions. Ici encore, les observations de Dong *et al.* sont d'une aide précieuse à l'interprétation de nos résultats. Si l'écoulement VF présente des vortex de Taylor occupant tout l'espace de l'entrefer avec une distinction claire entre les vortex, ce n'est pas le cas pour les écoulements à Reynolds plus élevé. Ainsi, pour des écoulements à Reynolds réduit proche de 40 (WVF et MWVF), on peut observer des vortex moins bien délimités, avec des cellules tourbillonnaires « élémentaires » en réalité constituées de deux vortex contrarotatifs

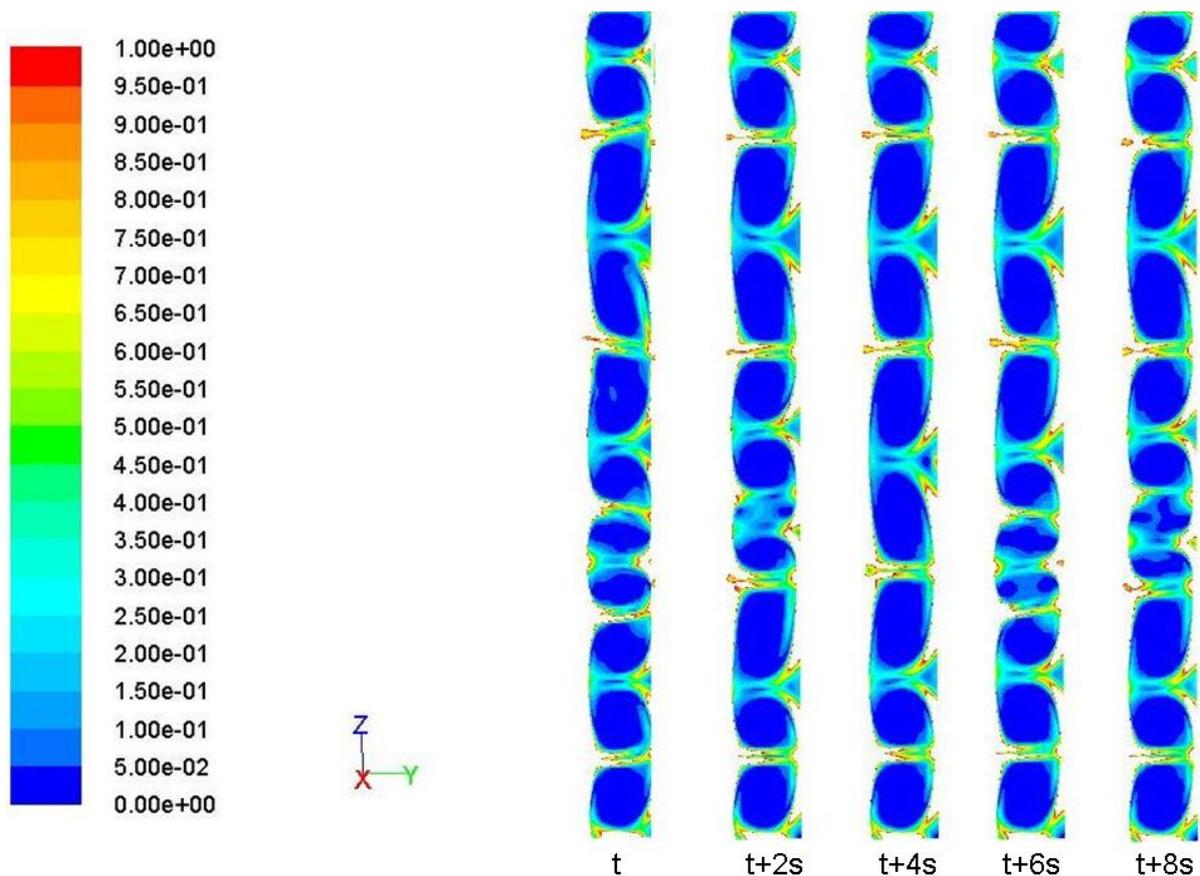
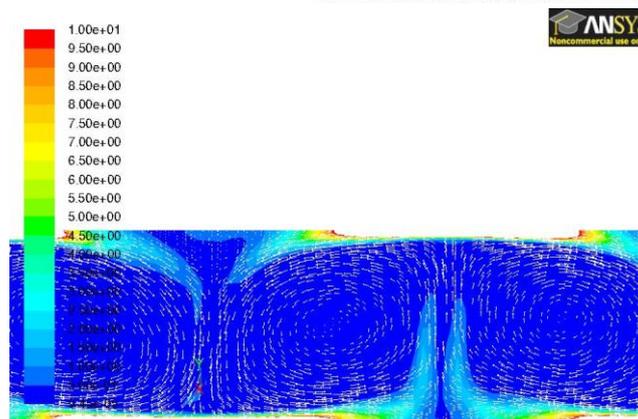
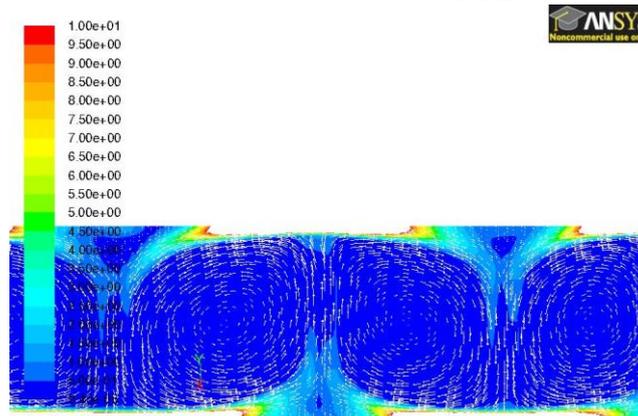
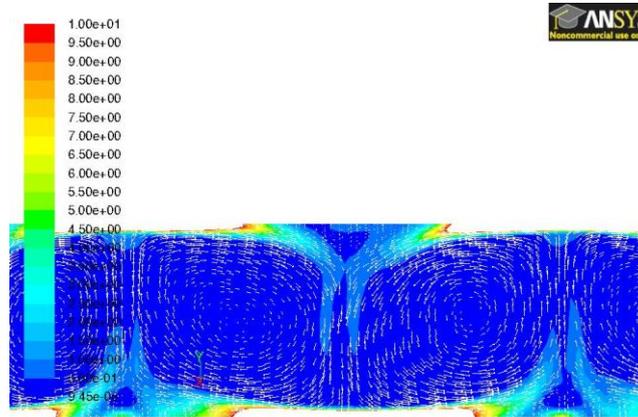
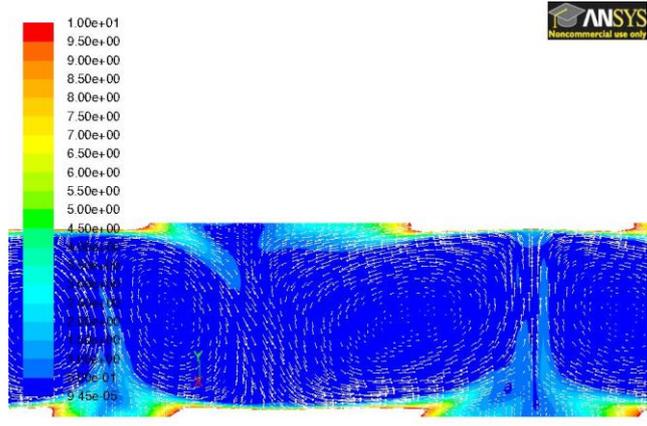


Figure IV. 1: champs instantanés de dissipation pour une section verticale de l'écoulement à 20 RPM

Les figures IV.1 et IV.2 montrent une cartographie d'une section verticale du réacteur Couette présentant l'intensité de la dissipation et les champs de vitesse. La valeur maximale de la dissipation a été limitée à 1 pour permettre une meilleure observation de ses variations dans l'entrefer.

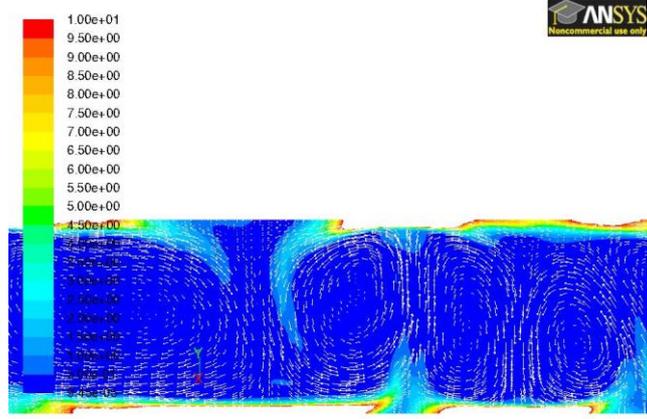
De manière qualitative, on observe des zones où l'intensité de la dissipation est élevée, aux extrémités des vortex près des parois et des zones de plus faible intensité dissipatrice, correspondant au cœur des vortex. On observe que la dissipation est forte en paroi et dans les zones de rencontre des vortex.





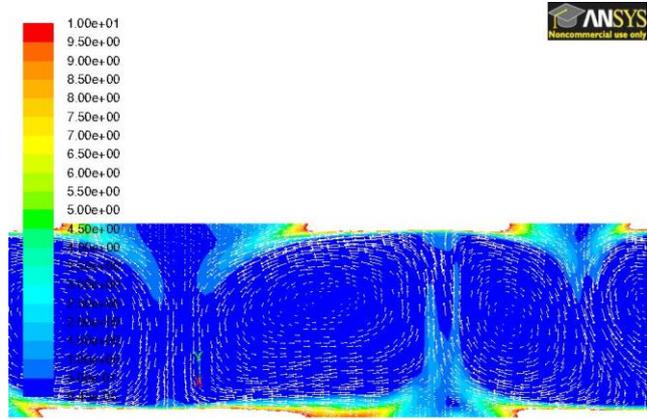
Contours of dissipation (Time=1.3898e+01)

Jul 21, 2010
ANSYS FLUENT 12.1 (3d, dp, pbns, lam, transient)



Contours of dissipation (Time=1.5898e+01)

Jul 21, 2010
ANSYS FLUENT 12.1 (3d, dp, pbns, lam, transient)



Contours of dissipation (Time=1.7898e+01)

Jul 21, 2010
ANSYS FLUENT 12.1 (3d, dp, pbns, lam, transient)



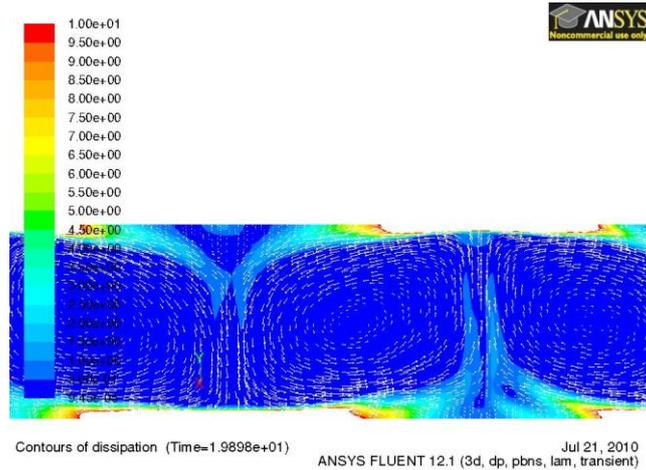


Figure IV.2 : champs de dissipation locale et champs de vitesse pour un plan vertical de l'écoulement à 20RPM

Les champs de vitesse quand à eux, témoignent correctement de la présence de tourbillons contrarotatifs dans l'entrefer. Les champs de vitesse en sortie de tourbillon, faisant penser à un jet sont semblables aux observations de Rudman (Rudman 1998; Rudman *et al.* 2008). On remarque néanmoins la présence de boucles de recirculation (figure IV.3).

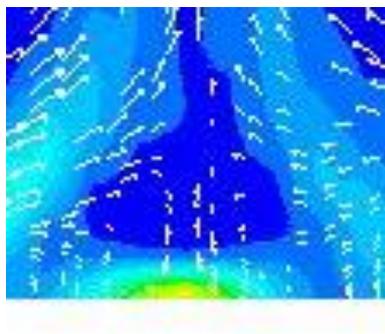


Figure IV.3 : zoom sur une boucle de recirculation

4 UTILISATION DE LA CFD POUR DECRIRE LES CONTRAINTES

Les résultats de simulation numérique étant correctement validés, nous pouvons donc exploiter les bases de données générées pour tenter d'expliquer les différences de comportement des cellules dans ces écoulements. Nous allons entre autre exploiter :

- Les distributions volumiques (de dissipation, contraintes...)

- Le suivi Lagrangien d'une particule lancée dans l'écoulement qui permet en outre de caractériser de manière plus fine les fluctuations subies et la nature des contraintes.

4.1. Amplitude et distributions des contraintes – cartographie de l'écoulement

Comme en témoignent les champs de dissipation locale, celle-ci est assez hétérogène dans le réacteur. Il en est donc de même pour les valeurs de la microéchelle de Kolmogorov et du taux de cisaillement. Les distributions volumiques sont représentées sous la forme d'une distribution de probabilité. La valeur lue en ordonnée exprime la probabilité $p(x)$ de trouver un volume élémentaire dV à la valeur x lue en abscisse. A partir de ces distributions, trois grandeurs sont calculées :

- La valeur moyenne $\langle x \rangle = \int_0^{\infty} p(x) \cdot x \cdot dx$ Eq IV.13

- La valeur médiane x_m , telle que $\int_0^{x_m} p(x) \cdot dx = \int_{x_m}^{\infty} p(x) \cdot dx = 0,5$ Eq IV.14

- La valeur la plus probable, qui correspond à la valeur au sommet du pic de la distribution.

4.1.1. Représentativité des valeurs

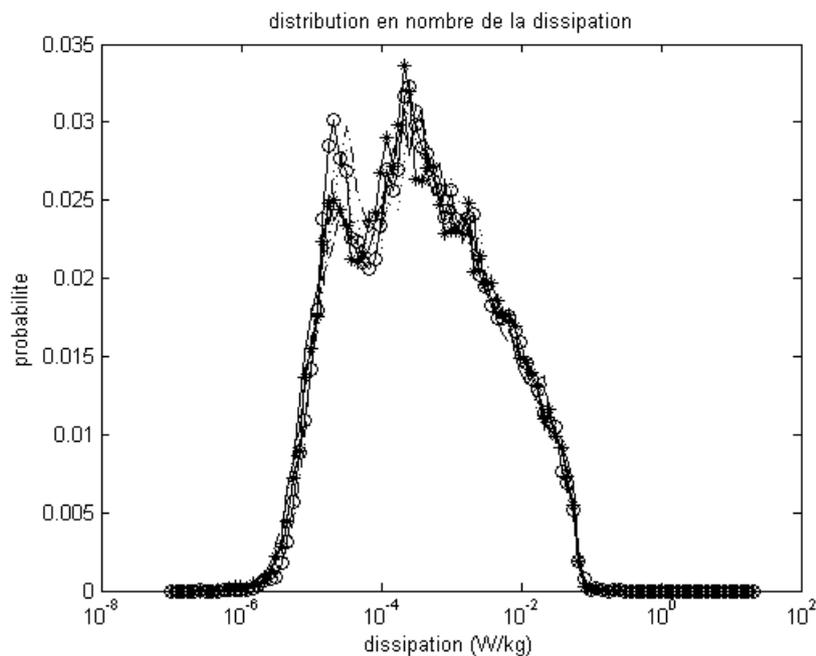
Paramètres de description

Ces distributions de probabilité sont issues de l'analyse des données collectées dans un plan vertical, ce qui représente au total environ 15000 points. Dans le cas d'une distribution non normale, au sens statistique du terme, la moyenne (équation IV.13) seule ne permet pas de caractériser le niveau d'intensité du paramètre, la valeur médiane (équation IV.14) a elle aussi été calculée.

Représentativité des distributions à 20 RPM

Les distributions volumiques de la dissipation, du gradient de vitesse et de l'échelle de Kolmogorov sont calculées à partir d'un plan vertical dans l'écoulement résolu. Si les écoulements à 30, 70 et 120 RPM peuvent être considérés comme axisymétriques, et de ce fait la distribution sur un plan vertical peut être considérée comme représentative, l'écoulement à 20 RPM lui, est instationnaire. Il convient donc de vérifier que la distribution sur un unique plan vertical représente correctement l'ensemble. Pour ce faire, le graphe IV.15 compare les distributions en nombre (qui ne prend donc pas en compte le volume de chaque maille) de la dissipation pour un plan vertical $x=0$ en 7 instants séparés chacun de 2s.

Le profil des distributions varie peu avec le temps. Les échelles qui varient correspondent à des dissipations de l'ordre de 10^{-4} W/kg. Il s'agit des faibles échelles de dissipation, probablement au cœur des vortex. La variation s'explique par l'apparition aléatoire de bouffées turbulentes dans l'écoulement. De ce fait, dans la suite de ce chapitre, on considère que les distributions sur un plan vertical sont représentatives de l'ensemble du volume considéré et ce quelle que soit la vitesse de rotation.

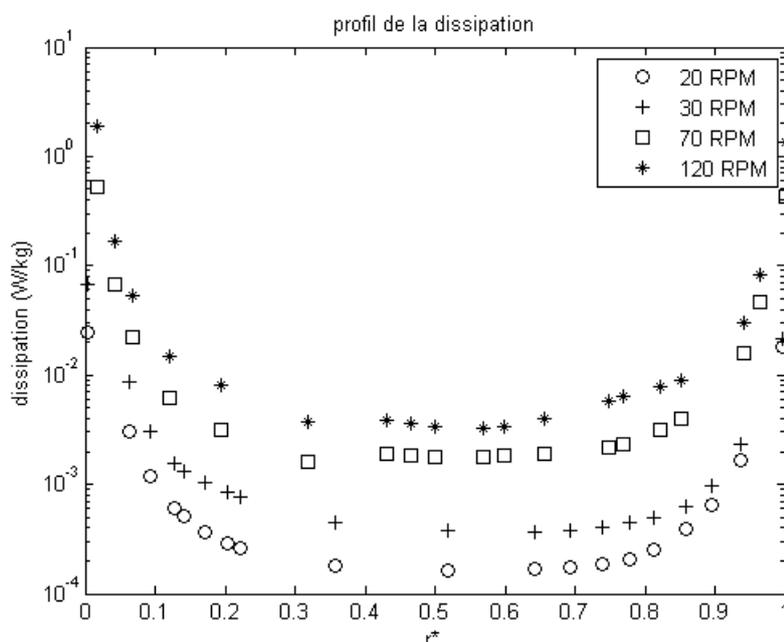


Graphe IV.15 : Distribution en nombre de la dissipation sur un plan $x=0$ à différents instants pour l'écoulement à 20 RPM.

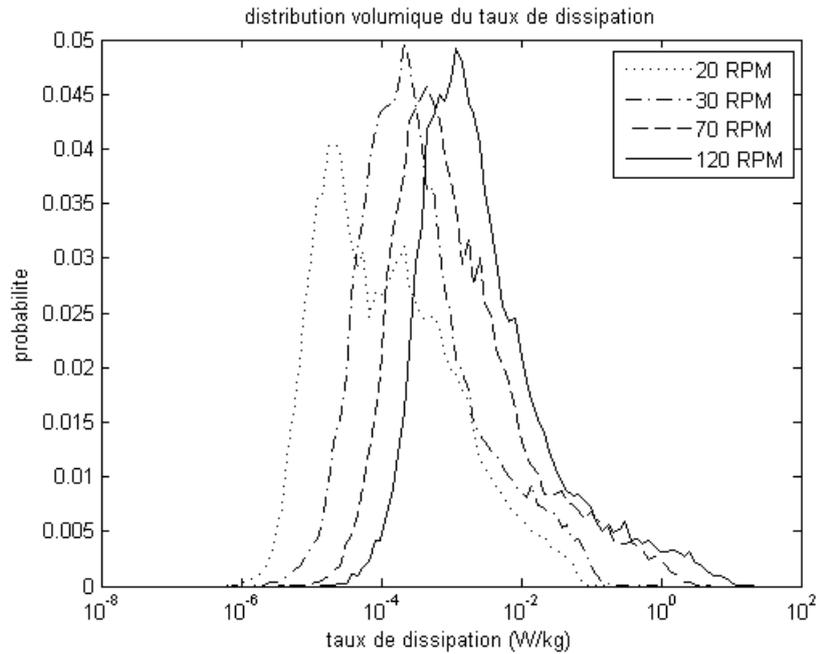
4.1.2. Dissipation

La distribution radiale du taux de dissipation dans l'entrefer est représentée sur le graphe IV.16. Celle-ci, élevée aux parois, atteint un minimum au centre de l'entrefer. C'est en effet à cet endroit que se situent les cœurs des vortex, où la dissipation est la plus faible. De manière logique, on observe que plus la vitesse de rotation (et donc l'énergie apportée au système) augmente, plus la dissipation est élevée.

Les distributions volumiques à différentes vitesses sont ensuite comparées sur le graphe IV.17 et les valeurs de dissipation moyennes et médianes obtenues sont récapitulées dans le tableau IV.5. Sans surprise, l'augmentation de la vitesse de rotation a pour conséquence l'augmentation de la dissipation d'énergie globalement et localement, mais aussi de conduire à une distribution moins étalée : on observe un pic beaucoup plus resserré pour la dissipation à 30 RPM qu'à 20 RPM. Les distributions à 30, 70 et 120 RPM sont autosemblables.



Graphe IV.16 : profil de dissipation moyennée dans un plan vertical dans l'entrefer à 20 RPM (\circ), 30 RPM ($+$), 70 RPM (\square) et 120 RPM ($*$)



Graphe IV.17 : distribution volumique de la dissipation sur un plan x=0 pour des écoulements à 20, 30, 70 et 114 RPM.

Vitesse de rotation (RPM)	Taux de dissipation médian ϵ_m (W.kg ⁻¹)	Taux de dissipation moyen $\langle \epsilon \rangle$ (W.kg ⁻¹)
20	0,01 .10 ⁻³	1,7.10 ⁻³
30	0,26 .10 ⁻³	3,7.10 ⁻³
70	0,81 .10 ⁻³	32 .10 ⁻³
114	1,8 .10 ⁻³	108.10 ⁻³

Tableau IV.5 : valeurs moyennes et médianes de la dissipation pour les différents écoulements considérés

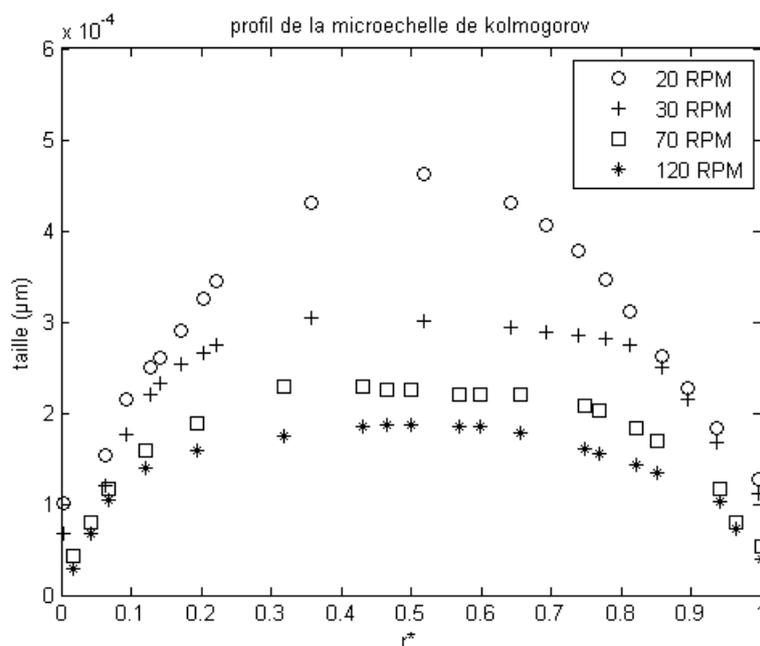
Le ratio moyenne/médiane indique que la dissipation s'étale jusqu'à des valeurs relativement élevées, mais qui ne concernent qu'une faible proportion du volume. C'est ce qui sera visualisé sur les graphiques.

4.1.3. Echelle de Kolmogorov

Pour chaque vitesse de rotation, la microéchelle de Kolmogorov a été calculée. Profils, distribution et valeurs caractéristiques sont représentés sur les graphes IV.18 et le tableau IV.6. Il est possible que la turbulence dans l'écoulement à 20 RPM ne soit pas complètement établie. De ce fait, il est délicat de calculer une échelle de Kolmogorov pour ce cas précis.

La distribution de la taille caractéristique $(\nu^3/\varepsilon)^{1/4}$ (équivalente à l'échelle de Kolmogorov pour les écoulements turbulents) dans l'entrefer est représentée sur le graphe IV.18. Dans les zones proches des parois, celle-ci est faible. Il s'agit de zones dans lesquelles le niveau de turbulence est important. Au centre de l'entrefer, là où la probabilité de se trouver au milieu d'un vortex (zone de faible turbulence) est plus importante, la taille de la microéchelle de Kolmogorov augmente sensiblement. De manière logique, on observe que plus la vitesse de rotation (et donc l'énergie apportée au système) augmente, plus la taille de la microéchelle diminue. On notera une valeur de l'ordre de 200 μm au centre de l'entrefer à 114 RPM. Cette valeur de l'ordre de la dimension radiale des mailles (220mm), mais plus petit que leur dimension axiale (660mm).

La distribution de l'échelle de $(\nu^3/\varepsilon)^{1/4}$ à 20 RPM présente deux pics, correspondant très certainement aux zones intra-vortex d'une part, là où l'écoulement est plutôt laminaire (centre de l'entrefer) et aux zones de contact entre les vortex et aux parois, là où l'énergie est principalement dissipée.



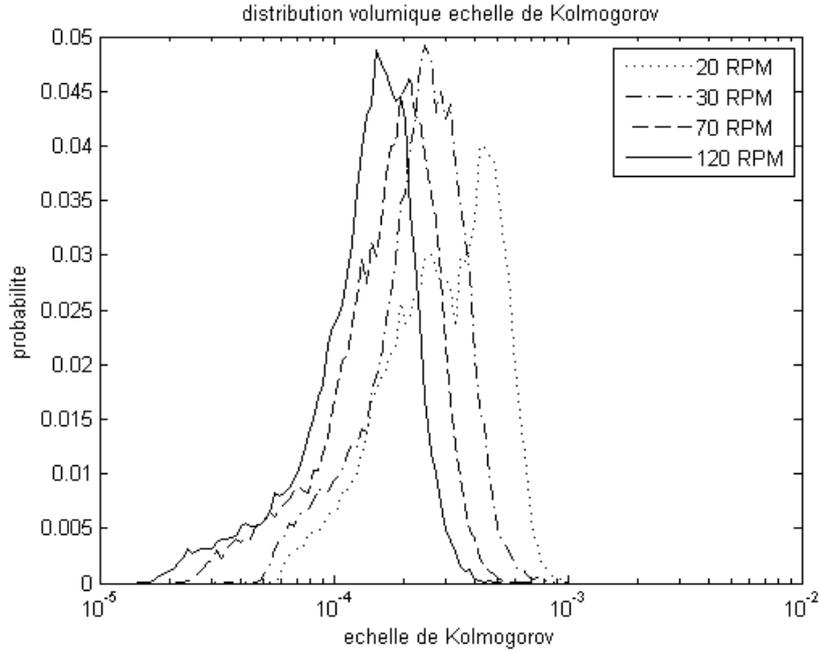
Graph IV.18 : profil de l'échelle de Kolmogorov* moyennée dans un plan vertical dans l'entefier à 20 RPM (○), 30 RPM (+), 70 RPM (□) et 120 RPM (*)
 * : seule une estimation est donnée à 20 RPM

Le tableau IV.6 présente les valeurs médianes et moyennes de l'échelle de Kolmogorov calculées pour différentes vitesses de rotation. On remarque que plus l'agitation est importante, plus ces deux valeurs se rapprochent : l'écoulement devient turbulent et homogène.

Le graph IV.19 ci-dessous présente les profils de distribution volumique de l'échelle de Kolmogorov pour différentes vitesses de rotation.

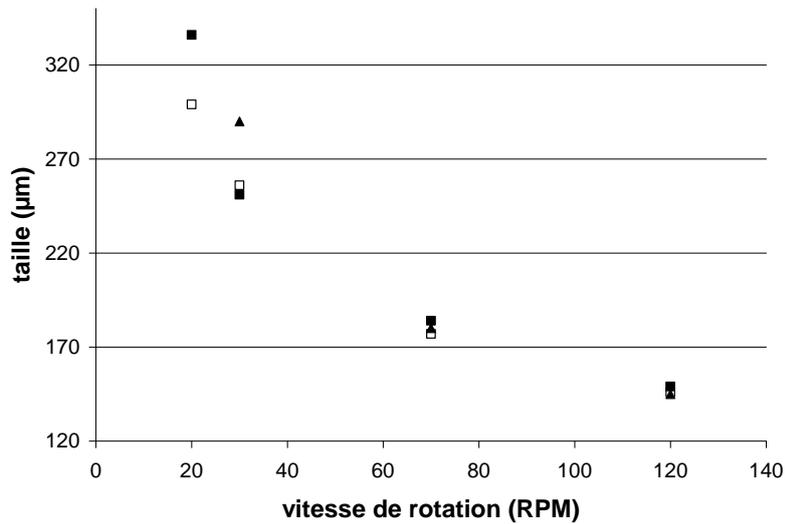
Vitesse de rotation (RPM)	Echelle de Kolmogorov médiane (µm)	Echelle de Kolmogorov moyenne (µm)
20	299	336
30	256	251
70	177	184
114	146	149

Tableau IV.6: valeurs moyennes et médianes de l'échelle de Kolmogorov (µm)



Grphe IV.19 : distribution volumique de l'échelle de Kolmogorov sur un plan $x=0$ pour des écoulements à 20, 30, 70 et 114 RPM.

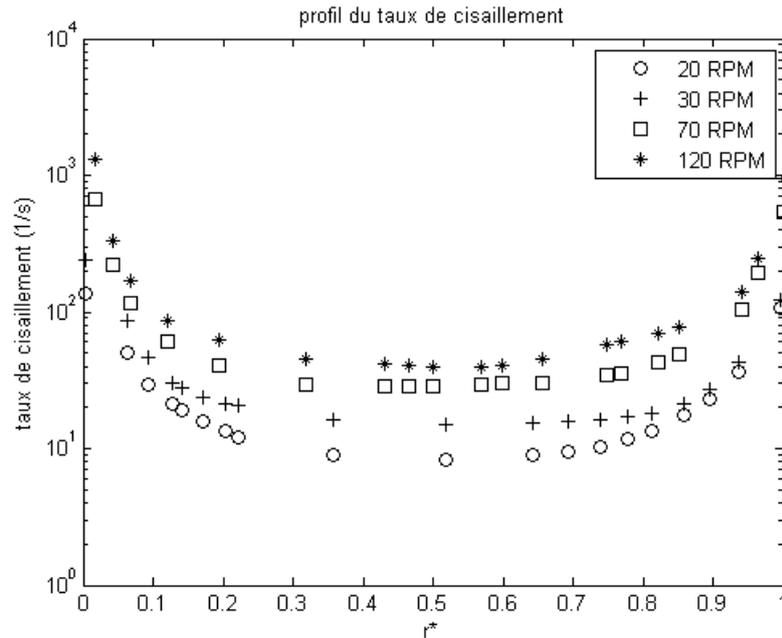
Le graphe IV.20 ci-dessous présente la comparaison entre les tailles les plus probables de la microéchelle de Kolmogorov obtenues expérimentalement par Coufort (Coufort 2004) et les valeurs moyennes et médianes tirées des simulations numériques. Ces valeurs sont proches, d'autant plus proches que l'écoulement devient turbulent.



Grphe IV.20 valeurs médiane (□), moyenne (■) et la plus probable selon Coufort (▲) de l'échelle de Kolmogorov en fonction de la vitesse de rotation du cylindre interne

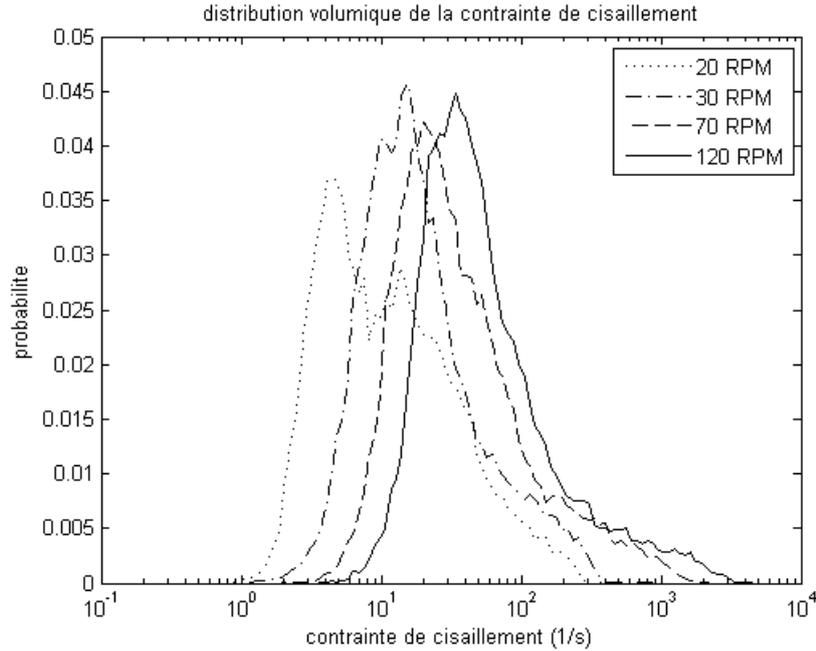
4.1.4. Contrainte de cisaillement

Le profil du taux de cisaillement (graphe IV.21), qui est une fonction de la dissipation est donc similaire au profil de cette dernière. Ici encore, l'augmentation de la vitesse de rotation conduit à une augmentation globale du cisaillement dans le réacteur, augmentation accentuée aux parois.



Grphe IV.21 : profil du taux de cisaillement moyenné dans un plan vertical dans l'entéfer à 20 RPM (○), 30 RPM (+), 70 RPM (□) et 120 RPM (*)

Fluent propose d'extraire un *strain rate*, correspondant au cisaillement dont les distributions sont présentées dans le graphe IV.22 et les valeurs caractéristiques sont reprises dans le tableau IV.7.



Graph IV.22 : Distribution volumique du taux de cisaillement sur un plan $x=0$ pour des écoulements à 20, 30, 70 et 114 RPM.

Vitesse de rotation (RPM)	Taux de cisaillement médian (s^{-1})	Taux de cisaillement moyen (s^{-1})
20	10	23
30	16	37
70	30	82
114	44	134

Tableau IV.7: valeurs moyennes et médianes du taux de cisaillement (s^{-1})

On peut remarquer ici encore la différence notable entre la valeur de la moyenne volumique de cette grandeur et la valeur calculée à partir du taux de dissipation moyen.

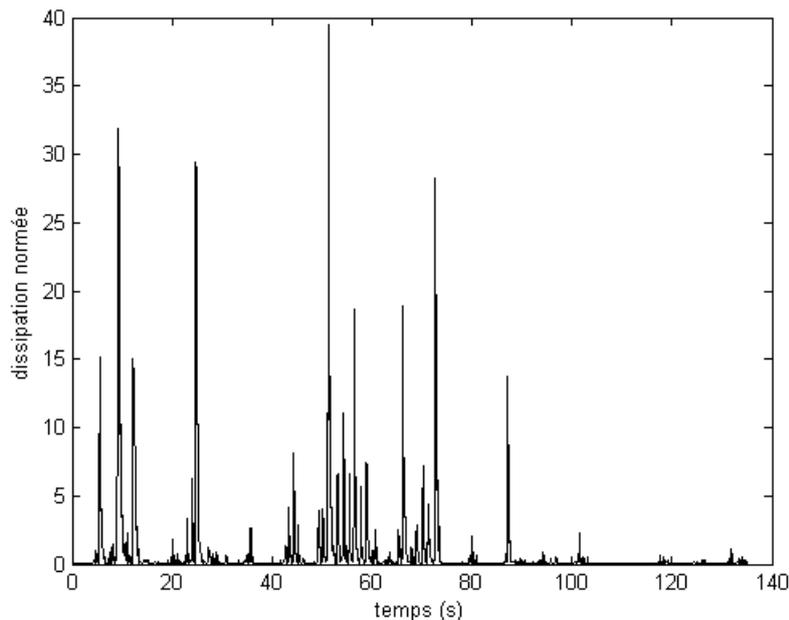
4.2. Suivi Lagrangien de particule : nature et fluctuation des contraintes

Une particule a été lancée dans l'écoulement afin d'enregistrer les gradients de vitesse rencontrés le long de sa trajectoire. Ces gradients permettent de reconstituer le tenseur des contraintes et de calculer la dissipation localement. Nous n'avons suivi pour cette

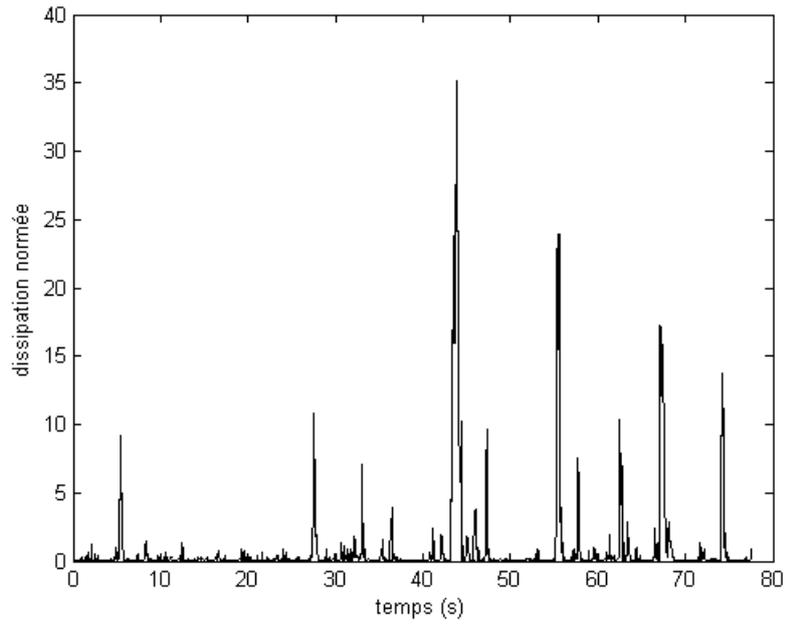
étude qu'une seule particule et n'avons donc pas la prétention de décrire statistiquement le niveau de fluctuations mais d'apporter une contribution à la description des perturbations rencontrées par les cellules. Par la suite, le suivi instationnaire de trajectoire d'un plus grand nombre de particules permettra cette analyse plus fine.

4.2.1. Amplitude et fluctuation

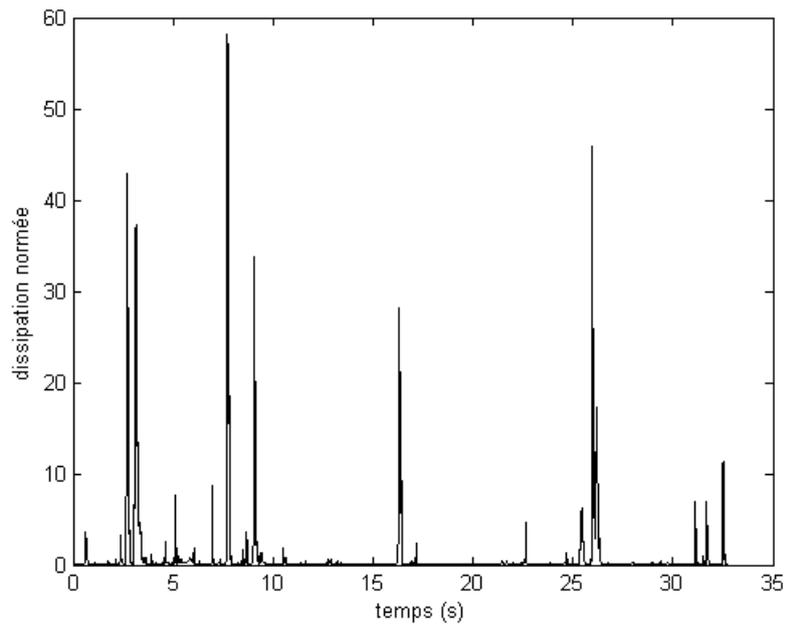
Les graphes IV.23 à IV.26 permettent de visualiser le niveau de dissipation rencontrée par la particule le long de sa trajectoire dans des écoulements à 20, 30, 70 et 114 RPM. La durée du suivi de particule a été imposée de façon à ce que cela corresponde à un nombre de tour équivalent pour les quatre vitesses de rotation, soit environ 40 tours. La dissipation est ici normée par la dissipation moyenne calculée précédemment.



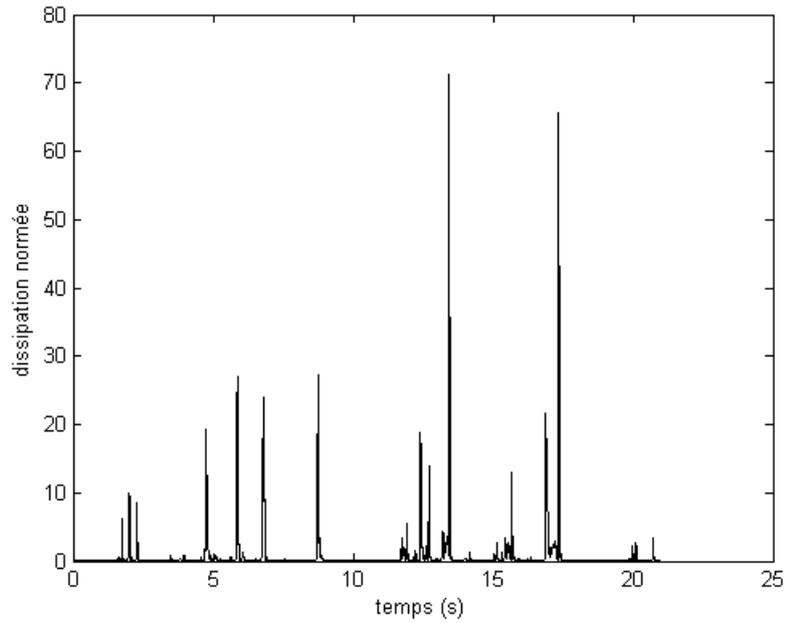
Graphe IV.23 : Niveau de dissipation normée par la dissipation moyenne vue par une particule le long de sa trajectoire à 20 RPM



Grphe IV.24 : Niveau de dissipation normée par la dissipation moyenne vue par une particule le long de sa trajectoire à 30 RPM



Grphe IV.25 : Niveau de dissipation normée par la dissipation moyenne vue par une particule le long de sa trajectoire à 70 RPM



Graphe IV.26 : Niveau de dissipation normée par la dissipation moyenne vue par une particule le long de sa trajectoire à 114 RPM

Quel que soit l'écoulement considéré, la particule est exposée de façon ponctuelle à des niveaux de dissipation importants. La fréquence de ces perturbations est estimée à partir du nombre de pics tels que $\varepsilon/\varepsilon_{\text{moy}} > 10$ sur la durée du suivi (tableau IV.8). Plus la vitesse de rotation augmente, plus l'amplitude et la fréquence des perturbations sont importantes. L'amplitude relative maximale croît également avec la vitesse de rotation, tout comme la valeur moyenne de la dissipation (paragraphe 4.3.2). Nous verrons les effets quantitatifs lors de l'analyse détaillée des contraintes.

Vitesse de rotation (RPM)	Nombre de pics tels que $\varepsilon/\varepsilon_{\text{moy}} > 10$	Durée du suivi (s)	Nombre estimé de perturbation /100s
20	10	140	7
30	6	80	7,5
70	8	35	23
114	11	25	44

Tableau IV.8 : fréquence des perturbations

Cette analyse nous informe sur l'intensité et la fréquence des évènements stressants rencontrés mais l'analyse peut être poussée un peu plus loin en examinant la nature des contraintes.

4.2.2. Nature des contraintes

L'ensemble des composants du tenseur des contraintes (équation IV.15) est accessible par la simulation directe. Les termes diagonaux représentent les contraintes normales, alors que les termes non diagonaux représentent les termes de cisaillement. La comparaison des termes diagonaux et non diagonaux renseigne sur les contraintes dominantes.

$$S_{v,ij} = \begin{pmatrix} 2\mu \frac{du}{dx} & \mu \left(\frac{du}{dy} + \frac{dv}{dy} \right) & \mu \left(\frac{du}{dz} + \frac{dw}{dx} \right) \\ \mu \left(\frac{dv}{dx} + \frac{du}{dy} \right) & 2\mu \frac{dv}{dy} & \mu \left(\frac{dv}{dx} + \frac{dw}{dy} \right) \\ \mu \left(\frac{du}{dz} + \frac{dw}{dx} \right) & \mu \left(\frac{dv}{dz} + \frac{dw}{dy} \right) & 2\mu \frac{dw}{dz} \end{pmatrix} \quad \text{Eq IV.15}$$

La diagonalisation du tenseur des contraintes permet d'extraire une matrice des valeurs propres (diagonale) et une matrice des vecteurs propres (représentant les coordonnées des vecteurs propres dans la base de départ x, y, z). La matrice diagonale obtenue par la diagonalisation du tenseur représente les contraintes normales dans le repère des vecteurs propres (équation IV.16).

$$S_{propre} = \begin{pmatrix} S_I & 0 & 0 \\ 0 & S_{II} & 0 \\ 0 & 0 & S_{III} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \frac{\partial u^+}{\partial x^+} & 0 & 0 \\ 0 & \frac{\partial v^+}{\partial y^+} & 0 \\ 0 & 0 & \frac{\partial w^+}{\partial z^+} \end{pmatrix} \quad \text{Eq IV.16}$$

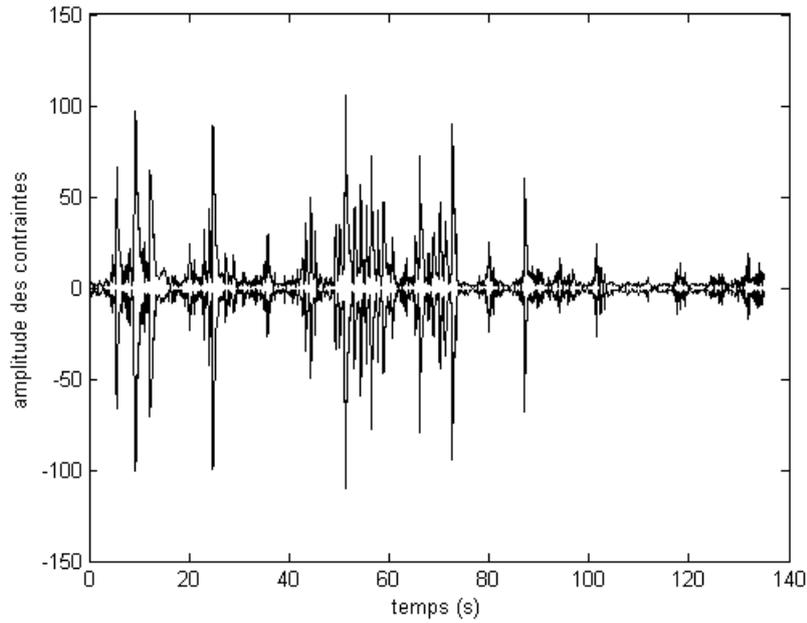
La trace de cette matrice (équation IV.17) correspond à la divergence de la vitesse et le déterminant correspond au produit des valeurs propres.

$$\frac{\partial u^+}{\partial x^+} + \frac{\partial v^+}{\partial y^+} + \frac{\partial w^+}{\partial z^+} = 0 \quad \text{Eq IV.17}$$

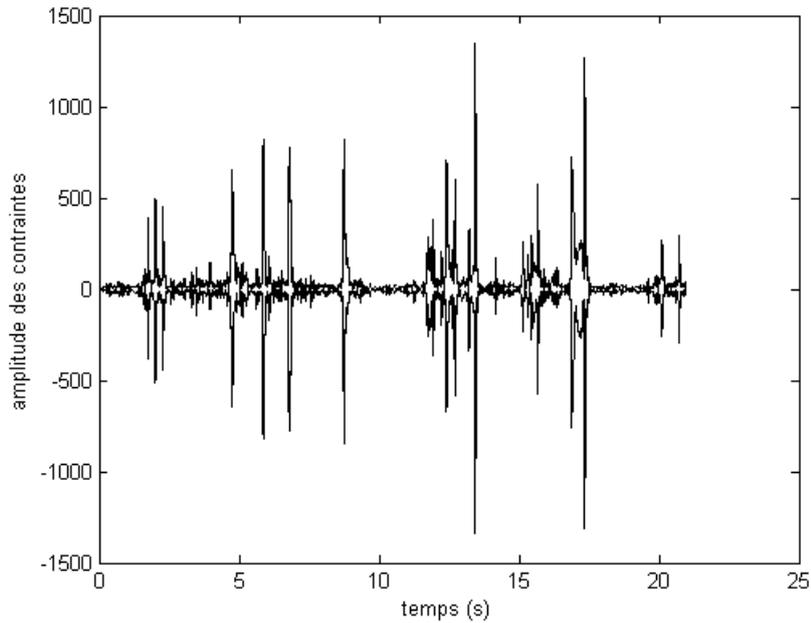
L'amplitude des contraintes est proportionnelle au module des valeurs propres alors que leur signe renseigne sur la nature des contraintes subies : si la valeur propre est négative, il y a compression dans la direction associée, élongation dans le cas d'une valeur positive. On notera qu'au moins l'une de ces valeurs propres doit être négative car leur somme est nulle. Ainsi, si le déterminant de la matrice diagonale (produit des valeurs propres) est négatif, il s'agit d'une bi-élongation alors que s'il est positif, il s'agit d'une bi-compression. La direction dans laquelle s'exercent ces contraintes est donnée par les vecteurs propres.

Après avoir vérifié que le calcul de la dissipation basé sur les gradients de vitesse extraits le long de la trajectoire de la particule renvoyait des valeurs identiques à celles calculées dans Fluent, nous avons tracé l'évolution de l'amplitude des contraintes (valeurs minimales et maximales de la matrice des valeurs propres à chaque instant) vues par une particule au cours de son trajet dans l'écoulement (graphes IV.27 et IV.28). Le temps de suivi de particule étant différent pour chaque vitesse de rotation, nous attirons l'attention du lecteur sur le changement d'échelle sur l'axe des abscisses.

Au cours de son passage dans le réacteur, la particule est donc soumise à une alternance de contraintes élongationnelles et de compression d'amplitudes variables. La fréquence de ces alternances et l'amplitude de ces contraintes est proportionnelle à la vitesse de rotation.



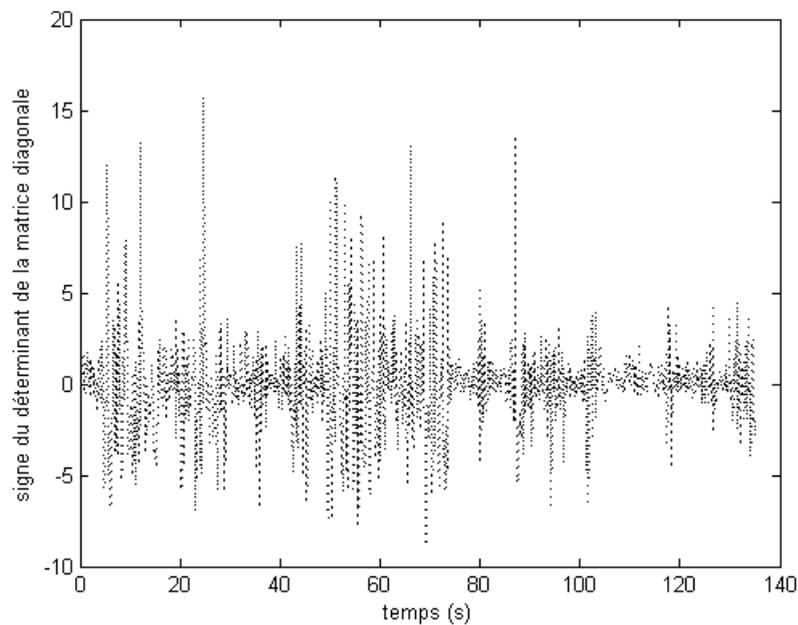
Grphe IV.27 : Amplitude des contraintes vues par une particule le long de sa trajectoire à 20 RPM



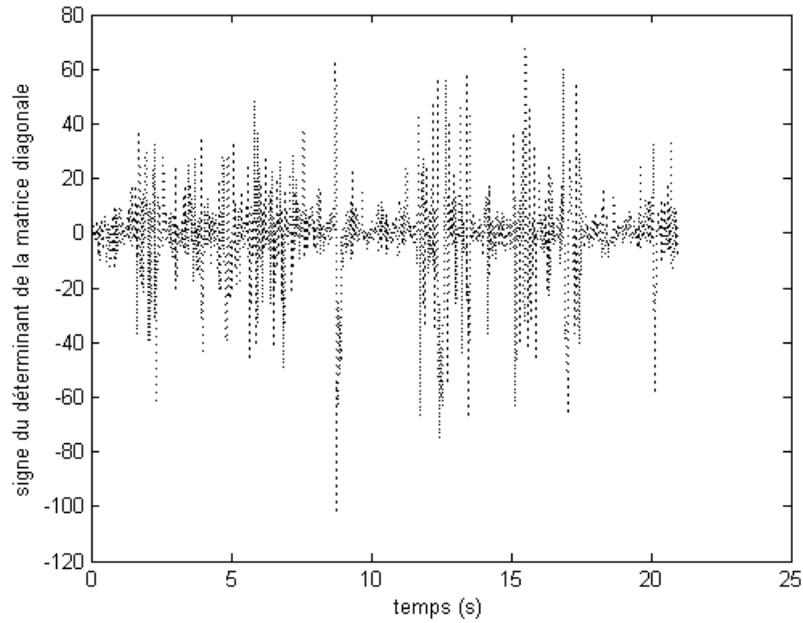
Grphe IV.28 : Amplitude des contraintes vues par une particule le long de sa trajectoire à 120 RPM

Comme expliqué plus haut, le déterminant représente le produit des valeurs propres. Les valeurs propres les plus grandes en valeur absolue sont tracées sur les graphes précédents : à chaque fois, une valeur positive et une valeur négative. C'est donc le signe

de la valeur propre de valeur absolue la plus faible qui va déterminer le signe du déterminant. Les graphes IV.29 et IV.30 représentent, via l'évolution de la plus petite valeur propre (en valeur absolue), l'alternance entre contraintes de compression et d'élongation pour des écoulements à 20 et à 120 RPM. L'amplitude du signal est environ 10 fois plus faible que précédemment, indiquant que les contraintes dominantes sont plutôt en deux dimensions. De plus, on visualise très bien l'alternance entre les zones de compression et celles d'élongation. La fréquence des fluctuations augmente avec la vitesse de rotation.



Graphe IV.29: Alternance des contraintes de compression et d'élongation vue par une particule le long de sa trajectoire à 20 RPM



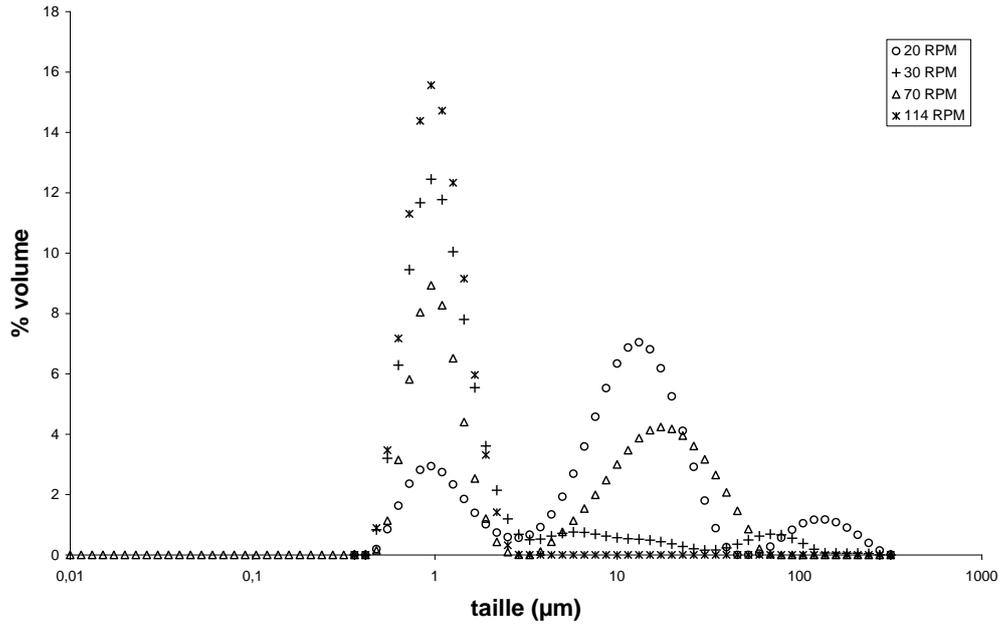
Graphe IV.30 : Alternance des contraintes de compression et d'élongation vue par une particule le long de sa trajectoire à 114 RPM

L'analyse du tenseur des contraintes dans les cas où la dissipation subie est importante révèle que le cisaillement γ est moins important que les contraintes normales. De même, l'analyse des vecteurs propres a montré que les efforts s'exerçaient dans deux directions préférentielles : une droite verticale (Oz) et une droite contenue dans le plan horizontal ($r\theta$).

5 APPLICATION AUX CULTURES DE *LACTOCOCCUS LACTIS* EN REACTEUR COUETTE

5.1. Effet des contraintes sur la taille des agrégats

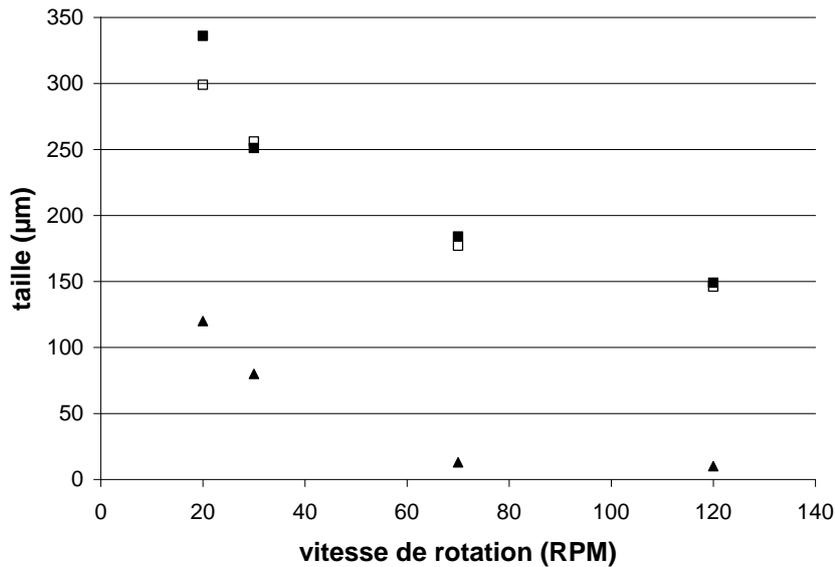
Les profils de distribution de taille des agrégats sont représentés sur le graphe IV.31



Graphe IV.31 : Distribution volumique de la taille des agrégats à 20 RPM (○), 30 RPM (+), 70 RPM (△) et 120 RPM (*).

Le graphe IV.32 permet de comparer la taille des agrégats compris entre 0 et 1 mm (avant la formation d'agrégats de taille supérieure) avec les échelles de Kolmogorov moyennes et médianes. Dans la gamme de taille d'agrégat considérée, celle-ci est toujours bien inférieure à l'échelle de Kolmogorov. Ces remarques sont similaires aux observations de tailles de floccs minéraux (Coufort 2004) ou biologiques (Stricot *et al.* 2010).

Le tableau IV.9 permet de comparer la taille des agrégats aux paramètres de l'écoulement.



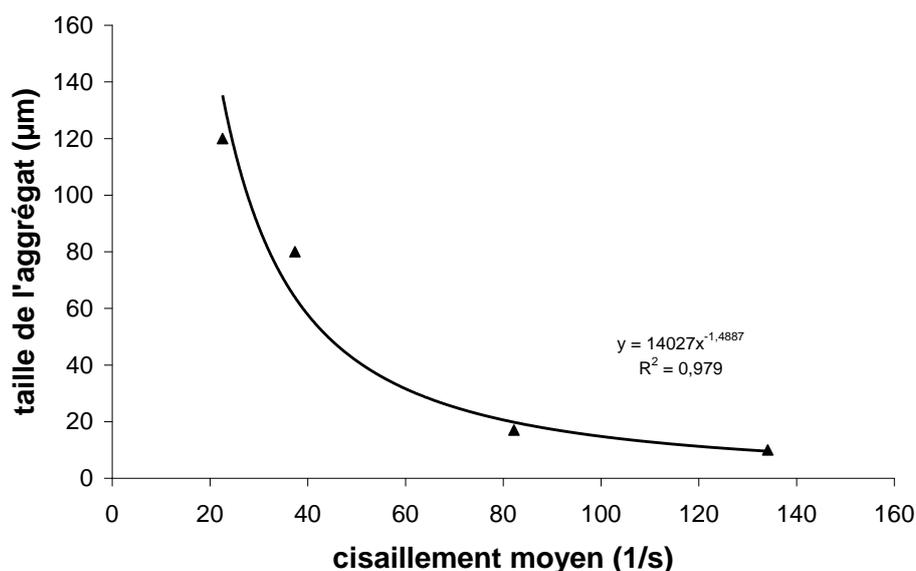
Graphe IV.32 : comparaison entre la taille des agrégats(▲) et les échelles de Kolmogorov médiane (□) et moyennes (■)

Vitesse de rotation (RPM)	Taille agrégats/ $(\epsilon_{med})^{-1/4}$	Taille agrégats/(cisaillement _{moy})
20	12	5,3
30	10	2,1
70	2,2	0,16
114	2,1	0,07

Tableau IV.9 : taille des agrégats rapportés à la dissipation et au cisaillement

Le ratio taille agrégats/ $(\epsilon_{med})^{-1/4}$ (ce dernier termes évoluant de la même manière que l'échelle de Kolmogorov) est égal à 2 à 70 et 114 RPM, ce qui semble indiquer que la taille des agrégats dont la croissance est limitée est contrôlée par le niveau de dissipation localement rencontrée.

Le taux de cisaillement semble contrôler la taille des agrégats formés à 70 et 114 RPM. En revanche, dans les écoulements établis à 20 et 30 RPM, celui-ci ne semble pas suffisant pour contrôler la taille de l'agrégat. On observe sur le graphe IV.33, qui représente la taille des agrégats en fonction du cisaillement moyen, une limite (située entre 40 et 80 s^{-1}) en deçà de laquelle la croissance du filament n'est plus limitée.



Graph IV.33 : Evolution de la taille des agrégats de taille inférieure à 1mm en fonction du taux de cisaillement.

Les gammes de taux de cisaillement subi (15-134 s⁻¹ environ) sont bien inférieures aux cisaillement au-delà duquel Sahoo et ses collaborateurs (Sahoo *et al.* 2003) observent une modification significative des profils de croissance (741 s⁻¹).

5.2. Contraintes, structure de l'écoulement et agrégation

5.2.1. Aspect quantitatif des contraintes

Le phénotype particulier et atypique décrit dans le chapitre précédent n'apparaît que pour les cultures à faibles vitesses de rotation. Pour ces cultures, les niveaux de contraintes s'exerçant sur les cellules sont résumés dans le tableau IV.10.

La contrainte exercée sur les petits agrégats est calculée d'après Henzler (Schügerl *et al.* 2000) à l'aide de l'équation IV.18 (contrainte due à la dissipation visqueuse) et sur les gros agrégats, on calcule la contrainte turbulente (équation IV.19). Le calcul de la contrainte à partir de l'estimation du gradient de vitesse (équation IV.20) est donné à titre indicatif. Cette approche de la contrainte tend à surestimer les niveaux de

contrainte exercés aux petites échelles et à sous estimer celles subies par des particules de taille supérieure à l'échelle de Kolmogorov.

$$\tau_t = 0,0676\rho \cdot d_p^2 \frac{\varepsilon}{\nu} \quad \text{Eq IV.18}$$

$$\tau_t = 1,9\rho(\varepsilon d_p)^{\frac{2}{3}} \quad \text{Eq IV.19}$$

$$\tau = \mu \times G \quad \text{Eq IV.20}$$

Vitesse de rotation (RPM)	Echelle de Kolmogorov (λ_k) médiane (μm)	Taille de l'agrégat (μm)	Contrainte sur l'agrégat de diamètre $d_p=1/6 \lambda_k$ (Pa)	Contrainte sur l'agrégat de diamètre $> 12 \lambda_k$ $d_p = 4 \text{ mm}$ (Pa)	Contrainte calculée à partir du gradient de vitesse local (Pa)
20	299	120	$0,3 \cdot 10^{-3}$	0,7	$23 \cdot 10^{-3}$
30	256	80	$0,4 \cdot 10^{-3}$	1,1	$37 \cdot 10^{-3}$
70	177	13	$1,9 \cdot 10^{-3}$	4,9	$82 \cdot 10^{-3}$
114	146	10	$4,3 \cdot 10^{-3}$	10,8	$134 \cdot 10^{-3}$

Tableau IV.10 : Contraintes s'exerçant sur des bactéries ou ensembles de bactéries dans les zones inertielle diffusive et inertielle convective

On calcule une contrainte subie entre 0,3 et 4 mPa, ce qui est loin des valeurs dommageables pour les cellules bactériennes (Schügerl *et al.* 2000; Yim and Shamlou 2000).

Si les contraintes ne sont pas létales pour les cellules (ce qui a d'ailleurs été confirmé par des marquages type live/dead sur des cultures) ; il n'est pas à exclure que ces contraintes entraînent des modifications plus subtiles au niveau des composés

membranaires (sur un plan qualitatif: confirmation des molécules ou type de molécules) ou sur un plan quantitatif.

Les contraintes exercées sur les agrégats à 70 et 120 RPM sont supérieures à la force de cohésion de l'ensemble. Elles sont de l'ordre de 10^{-3} Pa. La contrainte exercée sur les agrégats formés à 70 RPM est inférieure à celle causée par l'écoulement à 120 RPM, suggérant que la taille de l'agrégat peut augmenter si on considère que seul le niveau de contrainte limite la croissance. En revanche, ces contraintes sont inférieures pour l'écoulement à 20 et 30 RPM, d'où la liberté pour la matrice de se former.

Cependant, le filament placé dans des écoulements peu turbulents grossit et subit donc des contraintes plus importantes (tableau IV.10), supérieures aux contraintes qui limitaient leur taille dans les écoulements à 70 et 120 RPM. Le maintien de la structure peut être expliqué par différentes hypothèses :

- propriétés viscoélastique de la matrice, qu'il conviendra par la suite de mesurer,
- évolution de la force de cohésion, permettant une meilleure résistance.

Le passage de 20 à 114 RPM ne permet pas la déstructuration du filament, tout comme le traitement aux ultrasons (voir chapitre 3). Ceci nous renseigne sur le caractère évolutif de la matrice. Si le niveau de contrainte et ses fluctuations à 114 RPM préviennent l'agrégation (donc supérieur à la force de cohésion initiale), elle ne permet pas la destruction du filament final.

5.2.2. Aspect qualitatif des contraintes

Comme soulevé à l'issu du chapitre 3 consacré à la description du phénotype, il est fort probable que la nature particulière de l'écoulement joue un rôle important dans l'établissement de ce phénotype.

Suivi de l'évolution des vecteurs propres indique que les agrégats subissent des contraintes dans un écoulement que l'on peut considérer comme bi-dimensionnel : jet en sortie de vortex (Rudman).

Le suivi de trajectoire d'un point matériel n'est pas adapté pour le suivi des contraintes exercées sur des filaments car leur taille est bien supérieure et leur mouvement est sensiblement différent de celui d'une particule microscopique. En effet, le filament, plus gros est aussi soumis aux effets des forces centrifuges (d'ailleurs, on observe expérimentalement le filament de placer de manière préférentielle à l'extérieur) et des fluctuations de vitesses aux plus grandes échelles.

De plus, le suivi des contraintes s'exerçant sur la particule indique qu'il s'agit d'une alternance de contraintes d'élongation et de compression. On rejoint ici les conclusions de Rudman sur l'advection de fluide entre les vortex dans les écoulements WVF avec la présence de jets en sortie de vortex.

6 CONCLUSION

La résolution des écoulements en DNS permet d'accéder aux paramètres descriptifs des contraintes localement rencontrées par les cellules.

Le suivi de la distribution de taille de particules semble indiquer que les cellules s'agrègent quelle que soit la vitesse de rotation, mais que la taille finale des agrégats est limitée pour les fortes vitesses de rotation. Dans les écoulements très turbulents, la taille des agrégats est contrôlée par le niveau de dissipation et celle-ci ne dépasse pas la valeur de l'échelle de Kolmogorov. Il existe un seuil de cisaillement au-delà duquel la contrainte exercée est supérieure à la force de cohésion de la matrice que l'on peut alors estimer. Cependant, celle-ci présente un caractère évolutif et sa résistance aux contraintes semble augmenter au fur et à mesure de sa structuration d'une part, et grâce à ses propriétés élastiques d'autre part.

Au regard des résultats de la CFD, la nature des écoulements entre faible et fort Reynolds se distingue par la présence de zones à faible dissipation dans lesquelles les

cellules ou agrégats peuvent rester un temps relativement long puisque l'intérieur des vortex n'est pas soumis à l'écoulement chaotique., en cohérence avec les travaux de Rudman (Rudman 1998; Rudman *et al.* 2008).

Le suivi d'une particule (qu'il conviendra d'étendre à plusieurs particules et sur des durées plus longues) nous renseigne sur les fluctuations et la nature des contraintes. Mais Rusconi *et al.* (2009) ont également observé ce type de phénotype dans des écoulements purement laminaires.

CONCLUSION

L'origine de ce travail reposait sur la question des interactions entre réaction biologique et procédé. Largement étudiés aux grandes échelles, les effets des contraintes hydrodynamiques sont moins critiques aux petites échelles et ont été l'objet de peu d'études, mais sont néanmoins à prendre en compte lors de l'extrapolation des bioréacteurs. En s'intéressant plus particulièrement aux phénomènes agissant aux petites échelles, nous avons donc cherché à identifier, caractériser et quantifier les couplages hydro-bio à l'échelle de la cellule.

La revue bibliographique met en exergue deux types de stress induits par les conditions hydrodynamiques sur les cellules : un stress mécanique et un stress chimique. Ces deux types de contraintes sont contrôlés par le niveau de l'un des paramètres hydrodynamique caractéristique de l'écoulement : le taux de dissipation de l'énergie cinétique turbulente (ϵ). C'est pourquoi le choix d'un réacteur de type Couette s'est rapidement imposé, offrant l'avantage de présenter une dissipation relativement homogène dans tout le volume.

Si des contraintes d'ordre mécanique (cisaillement, structure de l'écoulement, dissipation de l'énergie cinétique) peuvent modifier le comportement de cellules en bioréacteurs, nous avons surtout ciblé celles d'ordre chimique (contraintes liées au mélange du substrat). Les régimes d'écoulement étudiés ici n'ont aucunement la prétention de mimer les écoulements usuellement rencontrés dans les bioréacteurs industriels mais peuvent néanmoins aider à comprendre quels sont les mécanismes de couplage en jeu.

Pour étudier la contrainte liée au mélange, nous avons choisi la souche *Lactococcus lactis* NCDO 2118 pour sa capacité à orienter son métabolisme en fonction du flux de substrat reçu. En effet, l'analyse préliminaire des interactions mélange-réaction et des mécanismes du mélange turbulent montre que ce dernier peut affecter la manière dont le substrat est transféré aux cellules. Cependant, nos résultats expérimentaux indiquent que le niveau de dissipation de l'énergie dans le réacteur n'a pas d'effet sur le

métabolisme cellulaire. Si l'hypothèse d'une différence dans l'intensité du mélange à l'échelle cellulaire peut expliquer certains comportements biologiques dans des réacteurs de type *scale down*, celle-ci est négligeable dans les conditions expérimentales étudiées.

En revanche, l'inhibition par l'oxygène de la pyruvate formiate lyase, enzyme responsable de la production de formiate, dans le cas où la culture n'est pas inertée et réalisée à forte vitesse (114 RPM) met en évidence un couplage transfert – mélange – réaction. L'étude de la compétition entre ces trois mécanismes, écartés dans cette étude, n'est pas dénuée d'intérêt dans le domaine des bioprocédés dans la mesure où la plupart des bioréactions nécessite un apport en oxygène. L'étude du couplage transfert – mélange – réaction dans ce type de configuration expérimentale (inhibition de la PFL de *L. lactis* NCDO 2118 cultivé en réacteur Couette en microaérophilie) constitue donc une première perspective intéressante.

Cependant, si les contraintes chimiques semblent négligeables, il semble que la structure de l'écoulement en elle-même ait une influence sur la physiologie microbienne. Les cultures réalisées dans les régimes d'écoulements Wavy Vortex Flow et Modulated Wavy Vortex Flow présentent toutes un retard de croissance, traduisant des conditions non optimales auxquelles les cellules doivent s'adapter. De plus, dans ces configurations d'écoulements, les cellules sont emprisonnées dans une matrice protéopolysaccharidique dont la formation ne semble pas initiée par un stress de type chimique (limitation en composés nutritifs induite par un défaut de mélange) mais par la nature de l'écoulement. Par la suite, il sera intéressant de vérifier si la prolongation du temps de séjour de la matrice dans la suspension cellulaire a pour conséquence d'augmenter la proportion de cellules agrégées, auquel cas cette configuration pourrait être transposée à la séparation de cellules. Une autre option pour cette éventuelle application pourrait être de réduire encore la vitesse de rotation (< 20 RPM) pour diminuer les contraintes appliquées aux agrégats.

La matrice obtenue présente des caractéristiques communes avec les biofilms : composition biochimique, présence d'ADN, cellules vivantes. Ses propriétés

viscoélastiques, qu'il conviendra de caractériser, permettent aux filaments longs de résister aux contraintes imposées par les écoulements à faible vitesse de rotation. La composition exacte, les propriétés physico-chimiques ainsi que la caractérisation rhéologique de la matrice manquent à ce travail. Avec la caractérisation de l'état de surface des cellules, ces propriétés permettraient de mieux appréhender les mécanismes d'adhésion d'une souche bactérienne, tant sous l'aspect de la biochimie que de la microbiologie dans des conditions hydrodynamiques contrôlées. La caractérisation de l'état de surface des cellules cultivées dans différentes conditions d'écoulement permettra également d'infirmer ou de valider l'hypothèse privilégiée à l'heure actuelle concernant l'origine de l'agrégation cellulaire, à savoir une modification de la structure des molécules de surface. Une autre approche consiste également à étudier la réponse transcriptomique des cellules cultivées dans les différents écoulements, notamment concernant les gènes codant pour la production de polysaccharides, afin de vérifier si l'agrégation résulte d'une adaptation cellulaire nécessitant une expression différenciée de certains gènes. A ce stade de nos travaux, l'élucidation du mécanisme biochimique de l'adhésion, en lien avec l'écoulement et l'état de surface des cellules, est une perspective essentielle.

Les conditions hydrodynamiques locales auxquelles sont soumises les cellules jouent donc un rôle important dans l'établissement du phénotype. La simulation numérique directe des écoulements a permis d'établir une description qualitative et quantitative des contraintes exercées par l'écoulement sur les particules.

Il apparaît alors que, comme pour les flocs minéraux, la taille des agrégats est limitée par les échelles de la turbulence (écoulements turbulents, 70 et 114 RPM). Dans des écoulements peu turbulents (Wavy Vortex Flows, 20 et 30 RPM), en revanche, l'agrégat peut grossir librement jusqu'à la formation de filaments.

L'analyse des contraintes exercées sur des particules de différentes tailles via l'analyse de données de simulation numérique montre qu'un cisaillement supérieur à quelque dizaines de s^{-1} affecte la croissance du filament mais n'entraîne pas la déstructuration de la matrice une fois formée. Ceci indique que la cohésion de la matrice augmente dans

les écoulements à faible vitesse de rotation, lui conférant une meilleure résistance aux contraintes. Les données numériques montrent, d'autre part, que le cœur des vortex dans les écoulements tourbillonnaires et tourbillonnaires modulés est le siège d'une très faible dissipation. Cela explique également le caractère phénotypique observé : transporté dans de telles structures, l'agrégat a toute la liberté de croître. La nature, l'intensité et le niveau de fluctuation des contraintes ont pu être évalués par le suivi d'une particule lancée dans l'écoulement. Il apparaît alors que les cellules subissent des fluctuations plus faibles en fréquence et en intensité dans les écoulements à 20 et 30 RPM que dans des écoulements à 70 et 114 RPM. Dans ces conditions, la matrice peut se former et atteindre un niveau de cohésion lui permettant de résister aux contraintes.

Comme nous l'avons précédemment évoqué, le niveau de contrainte mécanique subi par les cellules est sans doute à l'origine de l'apparition de la matrice, via une modification de la conformation des molécules décorant la surface (ce qui modifie l'affinité des cellules entre elles), hypothèse privilégiée à l'heure actuelle, ou bien via l'induction de la synthèse de molécules. L'outil de simulation numérique offre la possibilité d'évaluer les niveaux de contraintes subies localement. La cartographie de la dissipation permet d'accéder au niveau de contrainte moyenne mais ne constitue qu'une description à l'échelle de la population cellulaire. Le suivi de trajectoire de particule est en revanche très prometteur. L'apport de ce travail sur ce point est relativement modeste (suivi d'une seule particule en Euler-Lagrange) et une des premières perspectives est d'envisager le suivi d'un plus grand nombre de particules afin d'obtenir une meilleure représentativité.

Enfin, le réacteur Couette, très utile pour cette étude car son hydrodynamique relativement homogène est bien décrite, n'est pas un réacteur standard pour les cultures bactériennes. Forts des résultats obtenus en réacteur Couette, il faut les mettre en perspective avec un réacteur plus classique dans lesquels les écoulements sont bien souvent plus turbulents et couvrent des niveaux de dissipation d'énergie plus larges. De ce fait, les conditions hydrodynamiques de ces bioréacteurs sont peu susceptibles d'engendrer un phénotype tel que nous l'avons observé et sont à l'origine de contraintes fluctuantes d'amplitude plus importantes pour les cellules. Cependant, nos résultats

montrent que, si les niveaux de contraintes subies sont inférieurs à ceux rencontrés dans les bioréacteurs de type cuve agitée, ces contraintes provoquent une réponse à l'échelle cellulaire.

REFERENCES

- Abbe K, Takahashi S, Yamada T. 1982. Involvement of oxygen-sensitive pyruvate formate-lyase in mixed-acid fermentation by *Streptococcus mutans* under strictly anaerobic conditions. *J. Bacteriol.* 152(1):175-182.
- Agger T, Spohr AB, Nielsen J. 2001. α -Amylase production in high cell density submerged cultivation of *Aspergillus oryzae* and *A. nidulans*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 55(1):81.
- Akiti O., Armenante P. M. 2004. Experimentally-validated micromixing-based CFD model for fed-batch stirred-tank reactors. *AIChE Journal* 50(3):566-577.
- Al-Homoud A, Hondzo M. 2008. Enhanced uptake of dissolved oxygen and glucose by *Escherichia coli* in a turbulent flow. *Applied Microbiology and Biotechnology* 79(4):643.
- Al-Homoud A, Hondzo M, LaPara T. 2007. Fluid dynamics impact on bacterial physiology: biochemical oxygen demand. *Journal of Environmental Engineering* 133(2):226-236.
- Alpkvist E, Klapper I. 2007. Description of mechanical response including detachment using a novel particle model of biofilm/flow interaction. *Water Science And Technology* 55(8-9):265-273.
- Amanullah A, Jüsten P, Davies A, Paul GC, Nienow AW, Thomas CR. 2000. Agitation induced mycelial fragmentation of *Aspergillus oryzae* and *Penicillium chrysogenum*. *Biochemical Engineering Journal* 5(2):109.
- Amanullah A, McFarlane CM, Emery AN, Nienow AW. 2001. Scale-down model to simulate spatial pH variations in large-scale bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering* 73(5):390-399.
- Arnaud JP, Lacroix C, Fousse C, Choplin L. 1993. Shear stress effects on growth and activity of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Journal of Biotechnology* 29(1-2):157.
- Ashton L, Dusting J, Imomoh E, Balabani S, Blanch EW. 2009. Shear-Induced Unfolding of Lysozyme Monitored In Situ. *Biophysical Journal* 96(10):4231.
- Bailey JE, Ollis DF. 1986. *Biochemical Engineering fundamentals*. EDITIONS M-HI, editor. Singapore: Mc-Graw Hill Book Compagny.
- Baldyga J, Bourne JR. 2003. *Turbulent mixing and chemical reactions*. Sons Wa, editor. Chichester: John Wiley and Sons.

- Baldyga J, Bourne JR, Hearn SJ. 1997. Interaction between chemical reactions and mixing on various scales. *Chemical Engineering Science* 52(4):457-466.
- Baldyga J, Pohorecki R. 1995. Turbulent micromixing in chemical reactors - a review. *The Chemical Engineering Journal and the Biochemical Engineering Journal* 58(2):183.
- Barbouche N. 2008. Reponse biologique de cellules animales a des contraintes hydrodynamiques: simulation numerique, experimentation et modelisation en bioreacteurs de laboratoire: INPL NANCY.
- Barbouche N, Olmos E, Guedon E, Marc A. Coupling Between Cell Kinetics and CFD to Establish Physio-Hydrodynamic Correlations in Various Stirred Culture Systems. *Cells and Culture: Springer Netherlands*. p 213.
- Battin TJ, Kaplan LA, Newbold JD, Cheng X, Hansen C. 2003. Effects of Current Velocity on the Nascent Architecture of Stream Microbial Biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(9):5443-5452.
- Bellon-Fontaine MN, Rault J, van Oss CJ. 1996. Microbial adhesion to solvents: a novel method to determine the electron-donor/electron-acceptor or Lewis acid-base properties of microbial cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 7(1-2):47.
- Bergstedt MS, Hondzo MM, Cotner JB. 2004. Effects of small scale fluid motion on bacterial growth and respiration. *Freshwater Biology* 49(1):28-40.
- Berzins A, Toma M, Rikmanis M, Vesturs U. 2001. Influence of micromixing on microorganisms and products. *Acta Biotechnol.* 21(2):155-170.
- Bilson M, Bremhorst K. 2007. Direct numerical simulation of turbulent Taylor-Couette flow. *Journal of Fluid Mechanics* 579(-1):227-270.
- Boller M, Blaser S. 1998. Particles under stress. *Water Science and Technology* 37(10):9.
- Bourne JR. 2003. Mixing and the Selectivity of Chemical Reactions. *Org. Process Res. Dev.* 7(4):471-508.
- Bourne JR, Kozicki F, Rys P. 1981. Mixing and fast chemical reaction--I: Test reactions to determine segregation. *Chemical Engineering Science* 36(10):1643.
- Bryant J. 1977. The characterization of mixing in fermenters. *Advances in Biochemical Engineering, Volume 5*. p 101.
- Bylund F, Collet E, Enfors S-O, Larsson G. 1998. Substrate gradient formation in the large-scale bioreactor lowers cell yield and increases by-product formation. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 18(3):171-180.

- Camp TR, Stein PC. 1943. Velocity gradients and internal work in fluid motion. *J. Boston Soc. Civ. Engrs* 30:219-237.
- Cerning J. 1990. Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters* 87(1-2):113.
- Cerning J. 1995. Production of exopolysaccharides by lactic acid bacteria and dairy propionibacteria. *Lait* 75(4-5):463-472.
- Cerning J, Bouillanne C, Desmazeaud MJ, Landon M. 1986. Isolation And Characterization Of Exocellular Polysaccharide Produced By *Lactobacillus-Bulgaricus*. *Biotechnology Letters* 8(9):625-628.
- Cerning J, Bouillanne C, Landon M, Desmazeaud M. 1992. Isolation and Characterization of Exopolysaccharides from Slime-Forming Mesophilic Lactic Acid Bacteria. *Journal of Dairy Science* 75(3):692.
- Chapot-Chartier MP, Vinogradov E, Sadovskaya I, Andre G, Mistou MY, Trieu-Cuot P, Furlan S, Bidnenko E, Courtin P, Pechoux C, Hols P, Dufrene YF, Kulakauskas S. 2010. The cell surface of *Lactococcus lactis* is covered by a protective polysaccharide pellicle. *The journal of biological chemistry*:In Press.
- Chassagnole Christophe, Naruemol Noisommit-Rizzi, Joachim W. Schmid, Klaus Mauch, Reuss. M. 2002. Dynamic modeling of the central carbon metabolism of *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering* 79(1):53-73.
- Christian Vadeboncoeur MF, Lortie aL-A. 2000. Regulation of the pts Operon in Low G+C. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 2(4):483-490.
- Climent E, Simonnet M, Magnaudet J. 2007. Preferential accumulation of bubbles in Couette-Taylor flow patterns. *Physics of Fluids* 19(8):083301.
- Cocaign-Bousquet M, Garrigues C, Loubiere P, Lindley ND. 1996. Physiology of pyruvate metabolism in *Lactococcus lactis*. *Antonie van Leeuwenhoek* 70(2):253.
- Coles D. 1965. Transition in circular Couette flow. *Journal of Fluid Mechanics* 21(03):385-425.
- Comte S, Guibaud G, Baudu M. 2006. Relations between extraction protocols for activated sludge extracellular polymeric substances (EPS) and EPS complexation properties: Part I. Comparison of the efficiency of eight EPS extraction methods. *Enzyme and Microbial Technology* 38(1-2):237.
- Comte S, Guibaud G, Baudu M. 2007. Effect of extraction method on EPS from activated sludge: An HPSEC investigation. *Journal of Hazardous Materials* 140(1-2):129.

- Confer DR, Logan BE. 1991. Increased Bacterial Uptake of Macromolecular Substrates with Fluid Shear. *Appl. Environ. Microbiol.* 57(11):3093-3100.
- Coufort C. 2004. Analyse expérimentale de la floculation en reacteur de Taylor-Couette: influence de l'hydrodynamique sur les phénomènes d'agglomération et de rupture: INSA Toulouse.
- Coufort C, Bouyer D, Liné A. 2005. Flocculation related to local hydrodynamics in a Taylor-Couette reactor and in a jar. *Chemical Engineering Science* 60(8-9):2179.
- Coufort C, Line A. 2003. Forces on Spherical Particles in Terms of Upstream Flow Characteristics. *Chemical Engineering Research and Design* 81(9):1206-1211.
- Curran SJ, Black RA. 2004. Quantitative experimental study of shear stresses and mixing in progressive flow regimes within annular-flow bioreactors. *Chemical Engineering Science* 59(24):5859-5868.
- Curran SJ, Black RA. 2005. Oxygen transport and cell viability in an annular flow bioreactor: Comparison of laminar Couette and Taylor-vortex flow regimes. *Biotechnology and Bioengineering* 89(7):766-774.
- Cussatlegas A-S, Le Gal P. 2004. Bioluminescence of the dinoflagellate *Pyrocystis noctiluca* induced by laminar and turbulent Couette flow. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 310(2):227-246.
- Dabour N, LaPointe G, Benhamou N, Fliss I, Kheadr EE. 2005. Application of ruthenium red and colloidal gold-labeled lectin for the visualization of bacterial exopolysaccharides in Cheddar cheese matrix using transmission electron microscopy. *International Dairy Journal* 15(10):1044-1055.
- De Vuyst L, Vanderveken, Van de V, Degeest. 1998. Production by and isolation of exopolysaccharides from *Streptococcus thermophilus* grown in a milk medium and evidence for their growth-associated biosynthesis. *Journal of Applied Microbiology* 84(6):1059.
- Degeest B, de Vuyst L. 1999. Indication that the nitrogen source influences both amount and size of exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* LY03 and modelling of the bacterial growth and exopolysaccharide production in a complex medium. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(7):2863-2870.
- Delafosse A. 2008. Analyse et étude numérique des effets de mélange dans un bioréacteur [PhD Thesis]. Toulouse: Institut National des Sciences Appliquées. 209 p.
- Delafosse A, Morchain J, Guiraud P, Liné A. 2009. Trailing vortices generated by a Rushton turbine: Assessment of URANS and Large Eddy Simulations. *Chemical Engineering Research and Design* 87(4):401-411.

- Delcour J, Ferain T, Deghorain M, Palumbo E, Hols P. 1999. The biosynthesis and functionality of the cell-wall of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 76(1):159.
- Delvigne F, Boxus M, Ingels S, P. T. 2009. Bioreactor mixing efficiency modulates the activity of a *prpoS*:GFP reporter gene in *E. coli*. *Microb. Cell. Fact.*
- Delvigne F, Lejeune A, Destain J, Thonart P. 2006. Modelling of the substrate heterogeneities experienced by a limited microbial population in scale-down and in large-scale bioreactors. *Chemical Engineering Journal* 120(3):157.
- Desmet G, Verelst H, Baron GV. 1996. Local and global dispersion effects in Couette-Taylor flow--I. Description and modeling of the dispersion effects. *Chemical Engineering Science* 51(8):1287-1298.
- Desmet G, Verelst H, Baron GV. 1996. Local and global dispersion effects in Couette-Taylor flow--II. Quantitative measurements and discussion of the reactor performance. *Chemical Engineering Science* 51(8):1299-1309.
- Desmet G, Verelst H, Baron GV. 1997. Transient and stationary axial dispersion in vortex array flows--I. Axial scan measurements and modeling of transient dispersion effects. *Chemical Engineering Science* 52(14):2383-2401.
- Desmet G, Verelst H, Baron GV. 1997. Transient and stationary axial dispersion in vortex array flows--II. Decoupling of inter- and intra-vortex transport phenomena. *Chemical Engineering Science* 52(14):2403-2419.
- Doco T, Wieruszkeski J-M, Fournet B, Carcano D, Ramos P, Loones A. 1990. Structure of an exocellular polysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus*. *Carbohydrate Research* 198(2):313.
- Dong S. 2007. Direct numerical simulation of turbulent Taylor Couette flow. *Journal of Fluid Mechanics* 587(-1):373-393.
- Doublier JL, Garnier C, Renard D, Sanchez C. 2000. Protein-polysaccharide interactions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 5(3-4):202.
- Ducci, Yianneskis M. 2005. Direct determination of energy dissipation in stirred vessels with two-point LDA. *AIChE Journal* 51(8):2133-2149.
- Dunlop EH, Namdev PK, Rosenberg MZ. 1994. Effect of fluid shear forces on plant cell suspensions. *Chemical Engineering Science* 49(14):2263-2276.
- Dunlop EH, Ye SJ. 1990. Micromixing in fermentors: Metabolic changes in *Saccharomyces cerevisiae* and their relationship to fluid turbulence. *Biotechnology and Bioengineering* 36(8):854-864.

- Dusting J, Balabani S. 2009. Mixing in a Taylor-Couette reactor in the non-wavy flow regime. *Chemical Engineering Science* 64(13):3103.
- Enfors SO, Jahic M, Rozkov A, Xu B, Hecker M, Jürgen B, Krüger E, Schweder T, Hamer G, O'Beirne D, Noisommit-Rizzi N, Reuss M, Boone L, Hewitt C, McFarlane C, Nienow A, Kovacs T, Trägårdh C, Fuchs L, Revstedt J, Friberg PC, Hjertager B, Blomsten G, Skogman H, Hjort S, Hoeks F, Lin HY, Neubauer P, van der Lans R, Luyben K, Vrabel P, Manelius Å. 2001. Physiological responses to mixing in large scale bioreactors. *Journal of Biotechnology* 85(2):175-185.
- Enfors SO, Jahic M, Rozkov A, Xu B, Hecker M, Jürgen B, Krüger E, Schweder T, Hamer G, O'Beirne D, Noisommit-Rizzi N, Reuss M, Boone L, Hewitt C, McFarlane C, Nienow A, Kovacs T, Trägårdh C, Fuchs L, Revstedt J, Friberg PC, Hjertager B, Blomsten G, Skogman H, Hjort S, Hoeks F, Lin HY, Neubauer P, van der Lans R, Luyben K, Vrabel P, Manelius Å. 2001. Physiological responses to mixing in large scale bioreactors. *Journal of Biotechnology* 85(2):175.
- Esser A, Grossmann S. 1995. Analytic expression for Taylor-Couette stability boundary. *Physics of Fluids* 8:1814-1819.
- Ferenci T. 1996. Adaptation to life at micromolar nutrient levels: the regulation of *Escherichia coli* glucose transport by endoinduction and cAMP. *FEMS Microbiology Reviews* 18(4):301-317.
- Ferenci T. 1999a. Regulation by nutrient limitation. *Current Opinion in Microbiology* 2(2):208-213.
- Ferenci T. 1999b. 'Growth of bacterial cultures' 50 years on: towards an uncertainty principle instead of constants in bacterial growth kinetics. *Research in Microbiology* 150(7):431-438.
- Ferenci T, Robert KP. 2007. Bacterial Physiology, Regulation and Mutational Adaptation in a Chemostat Environment. *Advances in Microbial Physiology: Academic Press.* p 169-229.
- Fournier MC, Falk L, Villermaux J. 1996. A new parallel competing reaction system for assessing micromixing efficiency--Experimental approach. *Chemical Engineering Science* 51(22):5053.
- Gao Q, Fang A, Pierson DL, Mishra SK, Demain AL. 2001. Shear stress enhances microcin B17 production in a rotating wall bioreactor, but ethanol stress does not. *Applied Microbiology And Biotechnology* 56(3-4):384-387.
- Garcia JR, Cha HJ, Rao G, Marten MR, Bentley WE. 2009. Microbial nar-GFP cell sensors reveal oxygen limitations in highly agitated and aerated laboratory-scale fermentors. *Microb. Cell. Fact.* 8.

- Garrigues C, Loubiere P, Lindley ND, Cocaign-Bousquet M. 1997. Control of the shift from homolactic acid to mixed-acid fermentation in *Lactococcus lactis*: predominant role of the NADH/NAD⁺ ratio. *J. Bacteriol.* 179(17):5282-5287.
- Garrigues C, Mercade M, Cocaign-Bousquet M, Lindley ND, Loubiere P. 2001. Regulation of pyruvate metabolism in *Lactococcus lactis* depends on the imbalance between catabolism and anabolism. *Biotechnology and Bioengineering* 74(2):108-115.
- George S, Larsson G, Olsson K, Enfors S-O. 1998. Comparison of the baker's yeast process performance in laboratory and production scale. *Bioprocess Engineering* 18:135-142.
- Ghadge RS, Patwardhan AW, Sawant SB, Joshi JB. 2005. Effect of flow pattern on cellulase deactivation in stirred tank bioreactors. *Chemical Engineering Science* 60(4):1067.
- Giaouris E, Chapot-Chartier M-P, Briandet R. 2009. Surface physicochemical analysis of natural *Lactococcus lactis* strains reveals the existence of hydrophobic and low charged strains with altered adhesive properties. *Int. J. Food Microbiol.* 131(1):2.
- Goldenberg D, Azar I, Oppenheim AB. 1996. Differential mRNA stability of the *cspA* gene in the cold-shock response of *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* 19(2):241-248.
- Grobben G, Sikkema J, Smith M, de Bont J. 1995. Production of extracellular polysaccharides by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* NCFB 2772 grown in a chemically defined medium. *Journal of Applied Microbiology* 79(1):103.
- Hackney JM, Kraemer GP, Atalla RH, Vanderhart DL, Chapman DJ. 1994. Influence Of Hydrodynamic Environment On Composition And Macromolecular Organization Of Structural Polysaccharides In *Egremia-Menziesii* Cell-Walls. *Planta* 192(4):461-472.
- Harnby N, Edwards MF, Nienow AW. 1997. *Mixing in the process industries*. Harnby N, Edwards MF, Nienow AW, editors. New York: Academic Press.
- Hartke A, Bouché S, Giard J-C, Benachour A, Boutibonnes P, Auffray Y. 1996. The Lactic Acid Stress Response of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Current Microbiology* 33(3):194.
- Haut B, Amor HB, Coulon L, Jacquet A, Halloin V. 2003. Hydrodynamics and mass transfer in a Couette-Taylor bioreactor for the culture of animal cells. *Chemical Engineering Science* 58:777-784.
- Haut B, Ben Amor H, Coulon L, Jacquet A, Halloin V. 2003. Hydrodynamics and mass transfer in a Couette-Taylor bioreactor for the culture of animal cells. *Chemical Engineering Science* 58(3-6):777-784.

- Hewitt CJ, Caron GN-V, Axelsson B, McFarlane CM, Nienow AW. 2000. Studies related to the scale-up of high-cell-density *E. coli* fed-batch fermentations using multiparameter flow cytometry: Effect of a changing microenvironment with respect to glucose and dissolved oxygen concentration. *Biotechnology and Bioengineering* 70(4):381-390.
- Hewitt CJ, Nebe-Von Caron G, Nienow AW, McFarlane CM. 1999. The use of multiparameter flow cytometry to compare the physiological response of *Escherichia coli* W3110 to glucose limitation during batch, fed-batch and continuous culture cultivations. *Journal of Biotechnology* 75(2-3):251.
- Hondzo M, Al-Homoud A. 2007. Model development and verification for mass transport to *Escherichia coli* cells in a turbulent flow. *Water Resources Research* 43:W08413, doi:10.1029/2006WR005613, 2007.
- Huchet F, Liné A, Morchain J. 2009. Evaluation of local kinetic energy dissipation rate in the impeller stream of a Rushton turbine by time-resolved PIV. *Chemical Engineering Research and Design* 87(4):369.
- Janmey PA, Kinnunen PKJ. 2006. Biophysical properties of lipids and dynamic membranes. *Trends in Cell Biology* 16(10):538.
- Janmey PA, Weitz DA. 2004. Dealing with mechanics: mechanisms of force transduction in cells. *Trends Biochem.Sci.* 29(7):364-370.
- Jung SW, Kim WJ, Lee KG, Kim CW, Noh WC. 2008. Fermentation characteristics of exopolysaccharides-producing lactic acid bacteria from sourdough and assessment of the isolates for industrial potential. *J. Microbial. Biotechnol.* 18(7):1266-1273.
- Jüsten P, Paul GC, Nienow AW, Thomas CR. 1996. Dependence of mycelial morphology on impeller type and agitation intensity. *Biotechnology and Bioengineering* 52(6):672-684.
- Kaan T, Jurgen B, Schweder T. 1999. Regulation of the expression of the cold shock proteins CspB and CspC in *Bacillus subtilis*. *Mol. Gen. Genet.* 262(2):351-354.
- Kataoka K. 1986. Taylor Vortices and Instabilities in Circular Couette Flows. In: Cheremisinoff NP, editor. *Encyclopedia of Fluid Mechanics*. Houston: Gulf. p 236-274.
- Kim WS, Ren J, Dunn NW. 1999. Differentiation of *Lactococcus lactis* subspecies *lactis* and subspecies *cremoris* strains by their adaptive response to stresses. *Fems Microbiology Letters* 171(1):57-65.
- Kitazawa H, Harata T, Uemura J, Saito T, Kaneko T, Itoh T. 1998. Phosphate group requirement for mitogenic activation of lymphocytes by an extracellular

- phosphopolysaccharide from *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *Int. J. Food Microbiol.* 40(3):169.
- Kleerebezem M, van Kranenburg R, Tuinier R, Boels IC, Zoon P, Looijesteijn E, Hugenholtz J, de Vos WM. 1999. Exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis*: from genetic engineering to improved rheological properties? *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal Of General And Molecular Microbiology* 76(1-4):357-365.
- Lara AR, Caspeta L, Gosset G, Bolívar F, Ramírez OT. 2008. Utility of an *Escherichia coli* strain engineered in the substrate uptake system for improved culture performance at high glucose and cell concentrations: An alternative to fed-batch cultures. *Biotechnology and Bioengineering* 99(4):893-901.
- Lara AR, Galindo E, Palomares LA, O.T. R. 2006. Living with heterogeneous bioreactors: understanding the effect of environmental gradients in cells. *Molecular Biotechnology* 34(3):355-381.
- Lara AR, Leal L, Flores N, Gosset G, Bolívar F, Ramírez OT. 2006. Transcriptional and metabolic response of recombinant *Escherichia coli* to spatial dissolved oxygen tension gradients simulated in a scale-down system. *Biotechnology and Bioengineering* 93(2):372-385.
- Larsson G, Törnkvist M, Wernersson ES, Trägårdh C, Noorman H, Enfors SO. 1996. Substrate gradients in bioreactors: origin and consequences. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 14(6):281.
- Larsson G, Törnkvist M, Wernersson ES, Trägårdh C, Noorman H, Enfors SO. 1996. Substrate gradients in bioreactors: origin and consequences. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 14(6):281-289.
- Lathrop DP, Fineberg J, Swinney HL. 1992. Transition to shear-driven turbulence in Couette-Taylor flow. *Physical Review A* 46(10):6390-6405.
- Lau PCY, Lindhout T, Beveridge TJ, Dutcher JR, Lam JS. 2009. Differential lipopolysaccharide core capping leads to quantitative and correlated modifications of mechanical and structural properties in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *J Bacteriol* 191(21):6618-31.
- Laws A, Gu Y, Marshall V. 2001. Biosynthesis, characterisation, and design of bacterial exopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Biotechnology Advances* 19(8):597.
- Lazarova V, Manem J. 1995. Biofilm characterization and activity analysis in water and wastewater treatment. *Water Research* 29(10):2227.
- Leib TM, Pereira CJ, Villadsen J. 2001. Bioreactors: a chemical engineering perspective. *Chemical Engineering Science* 56(19):5485.

- Lin YH, Neubauer P. 2000. Influence of controlled glucose oscillations on a fed-batch process of recombinant *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology* 79(1):27-37.
- Liu CI, Lee D.J. 1999. Micromixing effects in a couette flow reactor. *Chemical Engineering Science* 54:2883-2888.
- Looijesteijn PJ, Casteren WHMv, Tuinier R, Doeswijk-Voragen CHL, Hugenholtz J. 2000. Influence of different substrate limitations on the yield, composition and molecular mass of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* in continuous cultures. *Journal of Applied Microbiology* 89(1):116-122.
- Looijesteijn PJ, Hugenholtz J. 1999. Uncoupling of growth and exopolysaccharide production by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NIZO B40 and optimization of its synthesis. *J. Biosci. Bioeng.* 88(2):178-182.
- Marchisio DL, Barresi AA, Fox RO. 2001. Simulation of turbulent precipitation in a semi-batch Taylor-Couette reactor using CFD. *AIChE Journal* 47(3):664-676.
- Marshall VM, Cowie EN, Moreton RS. 1995. Analysis and production of two exopolysaccharides from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* LC330. *Journal of Dairy Research* 62(04):621-628.
- Mercier C, Durrieu C, Briandet R, Domakova E, Tremblay J, Buist G, Kulakauskas S. 2002. Positive role of peptidoglycan breaks in lactococcal biofilm formation. *Molecular Microbiology* 46(1):235-243.
- Mozes N, Rouxhet PG. 1987. Methods for measuring hydrophobicity of microorganisms. *Journal of Microbiological Methods* 6(2):99.
- Mozzi F, Giori GS, Oliver G, Valdez GF. 1996. Exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* under controlled pH. *Biotechnology Letters* 18(4):435.
- Nakajima H, Hirota T, Toba T, Itoh T, Adachi S. 1992. Structure of the extracellular polysaccharide from slime-forming *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SBT 0495. *Carbohydrate Research* 224:245.
- Namdev PK, Dunlop EH. 1995. Shear Sensitivity Of Plant-Cells In Suspensions - Present And Future. *Applied Biochemistry And Biotechnology* 54(1-3):109-131.
- Namdev PK, Thompson BG, Gray MR. 1992. Effect of feed zone in fed-batch fermentations of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering* 40(2):235-246.
- Nielsen PH, Jahn A, Palmgren R. 1997. Conceptual model for production and composition of exopolymers in biofilms. *Water Science and Technology* 36(1):11.
- Nienow A. 2006. Reactor Engineering in Large Scale Animal Cell Culture. *Cytotechnology* 50(1):9.

- O'Connor KC, Cowger NL, De Kee DCR, Schwarz RP. 2002. Prolonged shearing of insect cells in a couette bioreactor. *Enzyme And Microbial Technology* 31(5):600-608.
- O'Sullivan E, Condon S. 1997. Intracellular pH is a major factor in the induction of tolerance to acid and other stresses in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63(11):4210-4215.
- Odell JA, Taylor MA. 1994. Dynamics and thermomechanical stability of DNA in solution. *Biopolymers* 34(11):1483.
- Ohmura N, Kataoka K, Shibata Y, Makino T. 1997. Effective mass diffusion over cell boundaries in a Taylor-Couette flow system. *Chemical Engineering Science* 52(11):1757-1765.
- Ohmura N, Makino T, Motomura A, Shibata Y, Kataoka K. 1998. Intercellular mass transfer in wavy/turbulent Taylor vortex flow. *International Journal of Heat and Fluid Flow* 19(2):159-166.
- Oosterhuis NMG, Groesbeek NM, Olivier APC, Kossen MWF. 1983. Scale down aspects of the gluconic acid fermentation. *Biotechnology Letters* 5(3):141-146.
- PARK, Y.-H. L, S. KY, H. KK. 1999. 10-Hydroxyoctadecanoic acid produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* as a part of flocculent aggregate. *Journal of microbiology and biotechnology* 9(1):39-43.
- Patel N, Choy V, White T, Munkvold G, Thibault J. 2010. Design of a novel Couette flow bioreactor to study the growth of fungal microorganism. *Journal of Biotechnology* 145(3):264-272.
- Pelletier E, Viebke C, Meadows J, Williams PA. 2001. A rheological study of the order-disorder conformational transition of xanthan gum. *Biopolymers* 59(5):339-346.
- Petit C, Grill JP, Maazouzi N, Marczak R. 1991. Regulation of polysaccharide formation by *Streptococcus thermophilus* in batch and fed-batch cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology* 36(2):216.
- Poolman B, Konings WN. 1988. Relation of growth of *Streptococcus lactis* and *Streptococcus cremoris* to amino acid transport. *J. Bacteriol.* 170(2):700-707.
- Postma PW, Lengeler JW, Jacobson GR. 1993. Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 57(3):543-594.
- Priebe M, Kalbfleisch S, Tolkiehn M, Koster S, Abel B, Davies RJ, Salditt T. 2010. Orientation of biomolecular assemblies in a microfluidic jet. *New J. Phys.* 12.

- Quivey RG, Faustoferri R, Monahan K, Marquis R. 2000. Shifts in membrane fatty acid profiles associated with acid adaptation of *Streptococcus mutans*. *FEMS Microbiology Letters* 189(1):89.
- Racina A, Kind M. 2006a. Specific power input and local micromixing times in turbulent Taylor–Couette flow. *Experiments in Fluids* 41(3):513-522.
- Racina A, Kind M. Mixing behavior and local mixing times in Taylor-Couette flow; 12th European Conference on Mixing 27-30 June 2006; Bologna. p 751-758.
- Rallu F, Gruss A, Ehrlich SD, Maguin E. 2000. Acid- and multistress-resistant mutants of *Lactococcus lactis*: identification of intracellular stress signals. *Molecular Microbiology* 35(3):517.
- Rallu F, Gruss A, Maguin E. 1996. *Lactococcus lactis* and stress. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal Of General And Molecular Microbiology* 70(2-4):243-251.
- Ramos A, Boels IC, de Vos WM, Santos H. 2001. Relationship between glycolysis and exopolysaccharide biosynthesis in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67(1):33-41.
- Redon E, Loubiere P, Coccagn-Bousquet M. 2005a. Transcriptome analysis of the progressive adaptation of *Lactococcus lactis* to carbon starvation. *Journal Of Bacteriology* 187(10):3589-3592.
- Redon E, Loubiere P, Coccagn-Bousquet M. 2005b. Role of mRNA stability during genome-wide adaptation of *Lactococcus lactis* to carbon starvation. *Journal Of Biological Chemistry* 280(43):36380-36385.
- Rikmanis M, Berzinš A, Viesturs U. 2007. Excess turbulence as a cause of turbohypobiosis in cultivation of microorganisms. *Central European Journal of Biology* 2(4):481.
- Rizzi M, Baltes M, Theobald U, Reuss M. 1997. In vivo analysis of metabolic dynamics in *Saccharomyces cerevisiae*: II. Mathematical model. *Biotechnology and Bioengineering* 55(4):592-608.
- Rizzi M, Theobald U, Querfurth E, Rohrhirsch T, Baltes M, Reuss M. 1996. In vivo investigations of glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering* 49(3):316-327.
- Ruas-Madiedo P, de los Reyes-Gavilan CG. 2005. Invited Review: Methods for the Screening, Isolation, and Characterization of Exopolysaccharides Produced by Lactic Acid Bacteria. *J. Dairy Sci.* 88(3):843-856.

- Ruas-Madiedo P, Hugenholtz J, Zoon P. 2002. An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *International Dairy Journal* 12(2-3):163-171.
- Rudman M. 1998. Mixing and particle dispersion in the wavy vortex regime of Taylor-Couette flow. *AIChE Journal* 44(5):1015-1026.
- Rudman M, Metcalfe G, Graham LJW. 2008. Nonmixing vortex cores in wavy Taylor vortex flow. *Physics of Fluids* 20(6):063602.
- Rusconi R, Lecuyer S, Guglielmini L, Stone H. Bacterial streamers in curved microchannels; 62nd Annual Meeting of the American Physical Society's Division of Fluid Dynamics November 22-24 2010; Minneapolis, USA.
- Sahoo S, Verma RK, Suresh AK, Rao KK, Bellare J, Suraishkumar GK. 2003. Macro-level and genetic-level responses of *Bacillus subtilis* to shear stress. *Biotechnology Progress* 19(6):1689-1696.
- Sanders JW, Venema G, Kok J. 1999. Environmental stress responses in *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiology Reviews* 23(4):483.
- Schär-Zammaretti P, Ubbink J. 2003. The Cell Wall of Lactic Acid Bacteria: Surface Constituents and Macromolecular Conformations. *Biophysical Journal* 85(6):4076.
- Schmalzriedt S, Jenne M, Mauch K, Reuss M. 2003. Integration of physiology and fluid dynamics. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. Heidelberg: Springer Berlin. p 19-68.
- Schügerl K, Kretzmer G, Henzler H, Kieran P, Kretzmer G, MacLoughlin P, Malone D, Schumann W, Shamlou P, Yim S, Henzler H-J. 2000. Particle Stress in Bioreactors. Influence of Stress on Cell Growth and Product Formation: Springer Berlin / Heidelberg. p 35.
- Schügerl K, Kretzmer G, Henzler H, Kieran P, Kretzmer G, MacLoughlin P, Malone D, Schumann W, Shamlou P, Yim S, Yim S, Shamlou P. 2000. The Engineering Effects of Fluids Flow on Freely Suspended Biological Macro-Materials and Macromolecules. Influence of Stress on Cell Growth and Product Formation: Springer Berlin / Heidelberg. p 83.
- Schwab C, Ganzle MG. 2006. Effect of membrane lateral pressure on the expression of fructosyltransferases in *Lactobacillus reuteri*. *Syst. Appl. Microbiol.* 29(2):89-99.
- Schweder T, Krüger E, Xu B, Jürgen B, Blomsten G, Enfors SO, Hecker M. 1999. Monitoring of genes that respond to process-related stress in large-scale bioprocesses. *Biotechnology and Bioengineering* 65(2):151.

- Snoep JL, Teixeira de Mattos MJ, Starrenburg MJ, Hugenholtz J. 1992. Isolation, characterization, and physiological role of the pyruvate dehydrogenase complex and alpha-acetolactate synthase of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* bv. *diacetylactis*. *J. Bacteriol.* 174(14):4838-4841.
- Stoodley P, Cargo R, Rupp CJ, Wilson S, Klapper I. 2002. Biofilm material properties as related to shear-induced deformation and detachment phenomena. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 29(6):361-367.
- Stoodley P, Lewandowski Z, Boyle JD, Lappin-Scott HM. 1998. Oscillation characteristics of biofilm streamers in turbulent flowing water as related to drag and pressure drop. *Biotechnology and Bioengineering* 57(5):536.
- Stricot M, Filali A, Lesage N, Spérandio M, Cabassud C. Side-stream membrane bioreactors: Influence of stress generated by hydrodynamics on floc structure, supernatant quality and fouling propensity. *Water Research* 44(7):2113.
- Stuart MR, Chou LS, Weimer BC. 1999. Influence of Carbohydrate Starvation and Arginine on Culturability and Amino Acid Utilization of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(2):665-673.
- Taherzadeh D, Picioreanu C, Kuttler U, Simone A, Wall WA, Horn H. 2010. Computational Study of the Drag and Oscillatory Movement of Biofilm Streamers in Fast Flows. *Biotechnology And Bioengineering* 105(3):600-610.
- Takahashi S, Abbe K, Yamada T. 1982. Purification of pyruvate formate-lyase from *Streptococcus mutans* and its regulatory properties. *J. Bacteriol.* 149(3):1034-1040.
- Thomas TD, Ellwood DC, Longyear VMC. 1979. Change from Homo- to Heterolactic Fermentation by *Streptococcus lactis* Resulting from Glucose Limitation in Anaerobic Chemostat Cultures. *J. Bacteriol.* 138(1):109-117.
- Vadeboncoeur, Michel Frenette, Lortie L-A. 2000. Regulation of the pts Operon in Low G+C. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 2(4):483-490.
- Van der Meulen R, Grosu-Tudor S, Mozzi F, Vaningelgem F, Zamfir M, de Valdez GF, de Vuyst L. 2007. Screening of lactic acid bacteria isolates from dairy and cereal products for exopolysaccharide production and genes involved. *Int. J. Food Microbiol.* 118(3):250-258.
- vanKranenburg R, Marugg JD, vanSwam, II, Willem NJ, deVos WM. 1997. Molecular characterization of the plasmid-encoded eps gene cluster essential for exopolysaccharide biosynthesis in *Lactococcus lactis*. *Molecular Microbiology* 24(2):387-397.
- Villiermaux. 1995. Génie de la réaction chimique. 2nd édition, Tec&Doc Lavoisier.

- Vogel V, Sheetz M. 2006. Local force and geometry sensing regulate cell functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7(4):265-275.
- Waller LN, Fox N, Fox KF, Fox A, Price RL. 2004. Ruthenium red staining for ultrastructural visualization of a glycoprotein layer surrounding the spore of *Bacillus anthracis* and *Bacillus subtilis*. *Journal of Microbiological Methods* 58(1):23.
- Wang L, Marchisio DL, Vigil RD, Fox RO. 2005. CFD simulation of aggregation and breakage processes in laminar Taylor-Couette flow. *Journal of Colloid and Interface Science* 282(2):380-396.
- Wase, Patel. 1985. Variations in the volumes of microbial cells with change in the agitation rates of chemostat cultures. *Journal of genetic microbiology*.
- White FM. 2002. *Fluid mechanics*.
- Whittaker CJ, Clemans DL, Kolenbrander PE. 1996. Insertional inactivation of an intrageneric coaggregation-relevant adhesin locus from *Streptococcus gordonii* DL1 (Challis). *Infect. Immun.* 64(10):4137-4142.
- Wilén B-M, Jin B, Lant P. 2003. The influence of key chemical constituents in activated sludge on surface and flocculating properties. *Water Research* 37(9):2127.
- Yim S, Shamlou P. 2000. *The Engineering Effects of Fluids Flow on Freely Suspended Biological Macro-Materials and Macromolecules. Influence of Stress on Cell Growth and Product Formation*: Springer Berlin / Heidelberg. p 83.

TABLE DES ILLUSTRATIONS

LISTE DES FIGURES

Figure I.1 : Spectres de l'énergie cinétique $E(\sigma)$ et des fluctuations de concentration $G(\sigma)$ (d'après Delafosse (2008))

Figure I.2 : représentation schématique des mécanismes de mélange turbulent, d'après Baldyga et Bourne repris de (Delafosse 2008)

Figure I.3 : Champs de concentration en glucose obtenu par simulation LES (Large Eddy Simulation) dans un bioréacteur de 22 m³ alimenté en glucose à 500 g/L au taux de 180 L/h, d'après Enfors *et al.*, 2000.

Figure I.4 – Ordre de grandeur des temps de relaxation des microorganismes (Bailey and Ollis 1986)

Figure I.5 Expression de la contrainte adimensionnée en fonction de la taille de la particule considérée

Figure I.6 d'après (Yim and Shamlou 2000): estimation de la contrainte minimum nécessaire à la rupture de la bioparticule considérée.

Figure I.7 (Rusconi *et al.*) : observation de streamer dans un écoulement laminaire

Figure I.8 d'après Taherzadeh *et al.* (2010) : perturbation de l'écoulement par un streamer

Figure I.9 : schéma simplifié des niveaux de régulation et d'observation de la réponse biologique

Figure I.10: représentation schématique du réacteur Couette

Figure I.11 : transitions dans un réacteur Couette, d'après Andereck, 1986

Figure I.12 Schématisation des tourbillons de l'écoulement Taylor vortex flow, d'après Ohmura *et al.*, (1997)

Figure I.13 (Haut *et al.*, 2003) : visualisation du mélange dans un écoulement tourbillonnaire

Figure I.14 d'après Rudman *et al.* 2008 : non mixing vortex cores

Figure I.15 : d'après Coufort, 2004 : profil de répartition de la dissipation et du cisaillement dans un réacteur Couette

Figure I.16 : schéma succinct du système PTS (Görke and Stülke 2008 XXX)

Figure I.17 : voie de la glycolyse (et bilan carbone)

Figure I.18 : Métabolisme du pyruvate. LDH : lactate deshydrogénase, PFL : pyruvate formiate lyase, PDH : pyruvate deshydrogénase, PTA : phosphotransacétylase, ACK : acétate kinase, ADHE : alcool deshydrogénase.

Figure I.19, d'après de Vuyst and Degeest, 1999 XXX : représentation schématique des voies métaboliques mettant en jeu catabolisme du lactose et synthèse d'EPS chez *Lactococcus lactis* fermentant le lactose (transport du lactose via un système spécifique de phosphotransférase) et les souches *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*, galactose-negative (transport du lactose via un système d'antiport lactose/galactose). Chez les souches fermentant le glucose, celui ci est transporté à l'intérieur de la cellule par le système PTS et entre dans les voies métaboliques sous forme phosphorylée. Les enzymes impliquées sont numérotées comme suit : 1, phospho-L-galactosidase; 2, L-galactosidase; 3, glucokinase; 4, phosphoglucomutase; 5, UDP-glucose pyrophosphorylase; 6, UDP-galactose-4-epimerase; 7, dTDP-glucose pyrophosphorylase; 8, déhydratase; 9, epimerase reductase; 10, phosphoglucose isomerase; 11, 6-phosphofructokinase; 12, fructose-1,6-bisphosphatase; 13, fructose-1,6-diphosphate aldolase; 14, galactose 6- phosphate isomerase; 15, tagatose 6-phosphate kinase; 16, tagatose-1,6-diphosphatealdolase.

Figure I.20 : schéma de la paroi des Gram + , membrane plasmique et peptidoglycane, d'après Delcour *et al.* 1999.

Figure II.1 : Illustration du transfert de matière par diffusion vers les cellules et influence de la concentration moyenne sur le flux transféré

Figure II.2 : représentation schématique du réacteur *scale down* utilisé par Dunlop

Figure II.3 : Illustration du micromélange par incorporation et de son effet sur le couple concentration/proportion de la population concernée.

Figure III.1 : photographie de cellules emprisonnées dans un filament. A cellules vivantes, B cellules totales.

Figure IV. 1: champs instantanés de dissipation pour une section verticale de l'écoulement à 20 RPM

Figure IV.2 : champs de dissipation locale et champs de vitesse pour un plan vertical de l'écoulement à 20RPM

Figure IV.3 : zoom sur une boucle de recirculation

LISTE DES TABLEAUX

Table I.1 : échelles caractéristiques du mélange dans un écoulement turbulent homogène

Tableau II.1 : Echelles spatiotemporelles caractéristiques du réacteur Couette utilisé pour le mélange de glucose.

Tableau II.2 : valeur moyenne du rendement formiate/glucose et écart type pour des cultures à 20 RPM (■ □) et 114 RPM (● ○) Figure II.1 : Illustration du transfert de matière par diffusion vers les cellules et influence de la concentration moyenne sur le flux transféré

Tableau II.3 : synthèse des résultats de l'expérience de Dunlop

Tableau III.1 : résultats du dosage des polysaccharides liés aux cellules par la méthode à l'anthrone

Tableau III.2 : résultats du dosage des protéines liées aux cellules par la méthode BCA

Tableau III.3 : affinité pour les solvants selon la méthode MATS .

Tableau III.4 : ratios protéines/polysaccharides

Tableau IV.1: détermination des régimes d'écoulement rencontrés

Tableau IV.2: Valeurs caractéristiques pour différentes vitesses de rotation.

Tableau IV.3 : échelles caractéristiques turbulentes pour les différentes vitesses de rotation utilisées à partir de la dissipation moyenne

Tableau IV.4 : Valeurs moyenne et moyenne volumique de la dissipation

Tableau IV.6: valeurs moyennes et médianes de l'échelle de Kolmogorov (μm)

Tableau IV.7: valeurs moyennes et médianes du taux de cisaillement (s^{-1})

Tableau IV.8 : fréquence des perturbations

Tableau IV.10 : Contraintes s'exerçant sur des bactéries ou ensembles de bactéries dans les zones inertielle diffusive et inertielle convective

LISTE DES GRAPHES

Graphes II.1 : croissance de *Lactococcus lactis* NCDO 2118 en fonction du temps pour des cultures à 20 RPM (■ □) et 114 RPM (● ○)

Graphes II.2 : taux de croissance de *Lactococcus lactis* NCDO 2118 en fonction de la biomasse (évaluée en termes de densité optique à 580 nm) pour des cultures à 20 RPM (■ □) et 114 RPM (● ○)

Graphe II.3 : évolution de la concentration en glucose pour des cultures à 20 RPM (■ □) et 114 RPM (● ○).

Graphe II.4 : concentration en lactate en fonction du temps pour des cultures à 20 RPM (■ □) et 114 RPM (● ○).

Graphe II.5 : concentration en formiate en fonction du temps pour des cultures à 20 RPM (■ □) et 114 RPM (● ○)

Graphes II.6 : concentration en formiate en fonction du glucose résiduel pour des cultures à 20 RPM (■ □) et 114 RPM (● ○)

Graphe II.7 : vitesse spécifique de production de formiate en fonction de la concentration en glucose résiduelle pour des cultures à 20 RPM (■ □) et 114 RPM (● ○). Les vitesses spécifiques moyennes à 20 RPM (-) et 114 RPM (--) sont également indiquées.

Graphe II.8 : évolution de la densité optique pour des cultures à 20 RPM (□, différentes nuances de gris) et 114 RPM (○, différentes nuances de gris)

Graphe II.9 : taux de croissance de *Lactococcus lactis* NCDO 2118 en fonction de la biomasse (évaluée en termes de densité optique à 580 nm) pour des cultures à 20 RPM (□, différentes nuances de gris) et 114 RPM (○, différentes nuances de gris)

Graphe II.10 : évolution de la concentration en glucose pour des cultures à 20 RPM (□, différentes nuances de gris) et 114 RPM (○, différentes nuances de gris)

Graphe II.11: évolution de la concentration en lactate pour des cultures à 20 RPM (□, différentes nuances de gris) et 114 RPM (○, différentes nuances de gris)

Graphe II.12 : évolution de la concentration en formiate pour des cultures à 20 RPM (□, différentes nuances de gris) et 114 RPM (○, différentes nuances de gris)

Graphe II.13 : évolution de la concentration en formiate en fonction de la concentration en glucose résiduelle pour des cultures à 20 RPM (□, différentes nuances de gris) et 114 RPM (○, différentes nuances de gris) et courbes de régression linéaire 20 RPM (-) et 114 RPM (--).

Graphe II.14 : vitesse spécifique de production de formiate en fonction de la concentration en glucose résiduelle pour des cultures à 20 RPM (■ □) et 114 RPM (● ○).

Graphe II.15 : Effet de la ségrégation sur l'assimilation de substrat à concentration en substrat élevée

Graphe II.16 : effet de la ségrégation lorsque la concentration moyenne en substrat est faible (tk=500ms)

Graphe IV.1 : stabilisation du couple pour des simulations à 20 RPM (l'axe des ordonnées correspond à un coefficient de calcul proportionnel au couple)

Graphe IV.2 : valeur du couple en fonction du Reynolds d'après Wendt (empirique), Coufort (mesure) et

Graphe IV.3 : dissipation en fonction du Reynolds, obtenue par calcul et numériquement

Graphe IV.4 : profil du moment angulaire normalisé pour des simulation en DNS de l'écoulement à 20 RPM

Graphe IV.5 : Profil de la composante tangentielle de la vitesse en moyenne spatiale et temporelle (en gras) dans un plan horizontal $z=10$ pour différents champs instantanés : t_0 (\diamond), $t_1= t_0+2s$ (\square), $t_2= t_0+4s$ (Δ), $t_3= t_0+6s$ (\times), $t_4= t_0+8s$ (*), $t_5= t_0+10s$ (\circ), $t_6= t_0+12s$ (+).

Graphe IV.6 : Profil de la composante axiale de la vitesse en moyenne spatiale et temporelle (en gras) dans un plan horizontal $z=10$ pour différents champs instantanés : t_0 (\diamond), $t_1= t_0+2s$ (\square), $t_2= t_0+4s$ (Δ), $t_3= t_0+6s$ (\times), $t_4= t_0+8s$ (*), $t_5= t_0+10s$ (\circ), $t_6= t_0+12s$ (+).

Graphe IV.7 : Profil de la composante radiale de la vitesse en moyenne spatiale et temporelle (en gras) dans un plan horizontal $z=10$ pour différents champs instantanés : t_0 (\diamond), $t_1= t_0+2s$ (\square), $t_2= t_0+4s$ (Δ), $t_3= t_0+6s$ (\times), $t_4= t_0+8s$ (*), $t_5= t_0+10s$ (\circ), $t_6= t_0+12s$ (+).

Graphe IV.8 : Profil de vitesse radiale à 20 RPM pour des plans horizontaux de hauteur $z=2, 6, 12$ et 14 cm

Graphe IV.9 : Profil de vitesse axiale à 20 RPM pour des plans horizontaux de hauteur $z=2, 6, 12$ et 14 cm

Graphe IV.10 : Profil de vitesse tangentielle à 20 RPM pour des plans horizontaux de hauteur $z=2, 6, 12$ et 14 cm

Graphe IV.11 : profil de la vitesse tangentielle moyennée sur un plan vertical ($z= 14$ cm) pour différentes vitesses de rotation

Graphe IV.12 : profil de la vitesse axiale moyennée sur un plan vertical ($z= 14$ cm) pour différentes vitesses de rotation

Graphe IV.13 : profil de la vitesse radiale moyennée sur un plan vertical ($z= 14$ cm) pour différentes vitesses de rotation

Graphe IV.14 : les profils de vitesse tangentielle de la vitesse moyenne obtenus expérimentalement par Coufort à 30 RPM (◆), 50 RPM (□), 70 RPM (▲), 90 RPM (○) et 110 RPM (●).

Graphe IV.15 : distribution en nombre de la dissipation sur un plan $x=0$ à différents instants pour l'écoulement à 20 RPM

Graphe IV.16 : profil de dissipation moyennée dans un plan vertical dans l'entefer à 20 RPM (○), 30 RPM (+), 70 RPM (□) et 120 RPM (*)

Graphe IV.17 : distribution volumique de la dissipation sur un plan $x=0$ pour des écoulements à 20, 30, 70 RPM
Tableau IV.5 : valeurs moyennes et médianes de la dissipation pour les différents écoulements considérés

Graphe IV.18 : profil de l'échelle de Kolmogorov* moyennée dans un plan vertical dans l'entefer à 20 RPM (○), 30 RPM (+), 70 RPM (□) et 120 RPM (*)

Graphe IV.19 : distribution volumique de l'échelle de Kolmogorov sur un plan $x=0$ pour des écoulements à 20, 30, 70 et 114 RPM.

Graphe IV.20 : valeurs médiane (□), moyenne (■) et la plus probable selon Coufort (▲) de l'échelle de Kolmogorov en fonction de la vitesse de rotation du cylindre interne

Graphe IV.21 : profil du taux de cisaillement moyenné dans un plan vertical dans l'entefer à 20 RPM (○), 30 RPM (+), 70 RPM (□) et 120 RPM (*)

Graphe IV.22 : distribution volumique du cisaillement sur un plan $x=0$ pour des écoulements à 20, 30, 70 et 114 RPM.

Graphe IV.23 : Niveau de dissipation normée par la dissipation moyenne vue par une particule le long de sa trajectoire à 20 RPM

Graphe IV.24 : Niveau de dissipation normée par la dissipation moyenne vue par une particule le long de sa trajectoire à 30 RPM

Graphe IV.25 : Niveau de dissipation normée par la dissipation moyenne vue par une particule le long de sa trajectoire à 70 RPM

Graphe IV.26 : Niveau de dissipation normée par la dissipation moyenne vue par une particule le long de sa trajectoire à 120 RPM

Graphe IV.27 : Amplitude des contraintes vues par une particule le long de sa trajectoire à 20 RPM

Graphe IV.28 : Amplitude des contraintes vues par une particule le long de sa trajectoire à 120 RPM

Graphe IV.29: Alternance des contraintes de compression et d'élongation vue par une particule le long de sa trajectoire à 20 RPM

Graphe IV.30 : Alternance des contraintes de compression et d'élongation vue par une particule le long de sa trajectoire à 120 RPM

Graphe IV.31 : Distribution volumique de la taille des agrégats à 20 RPM (○), 30 RPM (+), 70 RPM (□) et 120 RPM (*).

Graphe IV.32 : comparaison entre la taille des agrégats(▲) et les échelles de Kolmogorov médiane (□) et moyennes (■) Tableau IV.9: taille des agrégats rapportés à la dissipation et au cisaillement

Graphe IV.33 : évolution de la taille des agrégats de taille inférieure à 1mm en fonction du taux de cisaillement

ANNEXE 1 : CULTURE DE *LACTOCOCCUS LACTIS* NCDO 2118

1 SOUCHES

La majeure partie des cultures conduites au cours de cette thèse a été réalisée avec la souche *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCDO 2118. Cette souche a été choisie car elle présente la particularité de répondre à une modification du flux glycolytique par un shift métabolique, comme expliqué précédemment.

Des essais complémentaires ont été réalisés avec *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IL1403, d'origine laitière et curée de tous ses plasmides, et *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* LD61, souche laitière industrielle de la collection SOREDAB.

2 CULTURES

2.1. Milieux de cultures

Au cours de cette étude, deux milieux de culture ont été utilisés pour les cultures des différentes souches du genre *Lactococcus* : un milieu riche et un milieu chimiquement défini (MCD).

Le milieu riche M17 (M17 broth - OXOID LTD., Basingstoke, Hampshire, England) est composé de tryptone (5 g/L), peptone de soja (5 g/L), extrait de viande (5 g/L), extrait de levure (2,5 g/L), acide ascorbique (0,5 g/L), sulfate de magnésium (0,25 g/L) et di-sodium glycérophosphate (19 g/L). La source carbonée, ici le glucose, est ajoutée en fonction de la concentration finale désirée (5 ou 25 g/L).

La composition du milieu chimiquement défini est rappelée dans les tableaux ci-dessous. Après reconstitution, le pH est ajusté à 6,6 et le milieu est conservé à 4°C et utilisé dans les 5 jours suivant sa préparation.

- Sucres et sels

Composé	Concentration (g/L)	Composé	Concentration (g/L)
Glucose	25	MgCl ₂ , 6H ₂ O	0.2
Acétate de sodium	1	FeSO ₄ , 7 H ₂ O	0.011
Citrate d'ammonium	0.6	CaCl ₂ , 2H ₂ O	0.05
KH ₂ PO ₄	9	ZnSO ₄ , 7H ₂ O	0.005
K ₂ HPO ₄	7.5	CoCl ₂ , 6H ₂ O	0.0025

- Acides aminés

Composé	Concentration (g/L)	Composé	Concentration (g/L)
Alanine	0.24	Sérine	0.34
Arginine	0.12	Thréonine	0.23
Asparagine	0.34	Tryptophane	0.05
Glutamine	0.51	Valine	0.33
Glycine	0.17	Isoleucine	0.2
Histidine	0.11	Leucine	0.47
Lysine	0.35	Phénylalanine	0.28
Méthionine	0.12	Tyrosine	0.29
Proline	0.68	Cystéine	0.17

- Bases azotées

Composé	Concentration (g/L)	Composé	Concentration (g/L)
Adénine	0.01	Uracile	0.01
Guanine	0.01	Xanthine	0.01

- Vitamines

Composé	Concentration (g/L)	Composé	Concentration (g/L)
Biotine	0.01	Acide nicotinique	0.001
Riboflavine	0.001	Inosine	0.005
B12 (Cyano-cobalamine)	0.001	Pyridoxine	0.002
Pantothénate de calcium	0.001	Thiamine	0.001
Acide Lipoiqne	0.0025	Thymidine	0.005
Acide folique	0.001		

2.2. Techniques de culture

2.2.1. Conservation des souches

Des cellules en phase exponentielle de croissance réalisées sur milieu M17 (glucose 5 g/L) sont conservées dans des cryotubes à -80 °C avec 20 % (V/V) de glycérol.

2.2.2. Précultures

Les précultures sont réalisées dans des fioles scellées, dans le milieu choisi pour la fermentation. Une première préculture est réalisée à partir de cellules décongelées (inoculation 1,5 % V/V, incubation une nuit à 30 °C sous agitation). La seconde préculture est réalisée à partir de la précédente (inoculation 4 % V/V) dans les mêmes conditions de milieu et d'incubation. Les cellules issues de cette préculture sont ensuiteensemencées dans le réacteur alors qu'elles sont en phase de croissance.

2.2.3. Cultures batch en réacteur

Les cultures ont été réalisées dans deux réacteurs Couette et un fermenteur parfaitement mélangé.

2.2.3.1. Réacteurs Couette

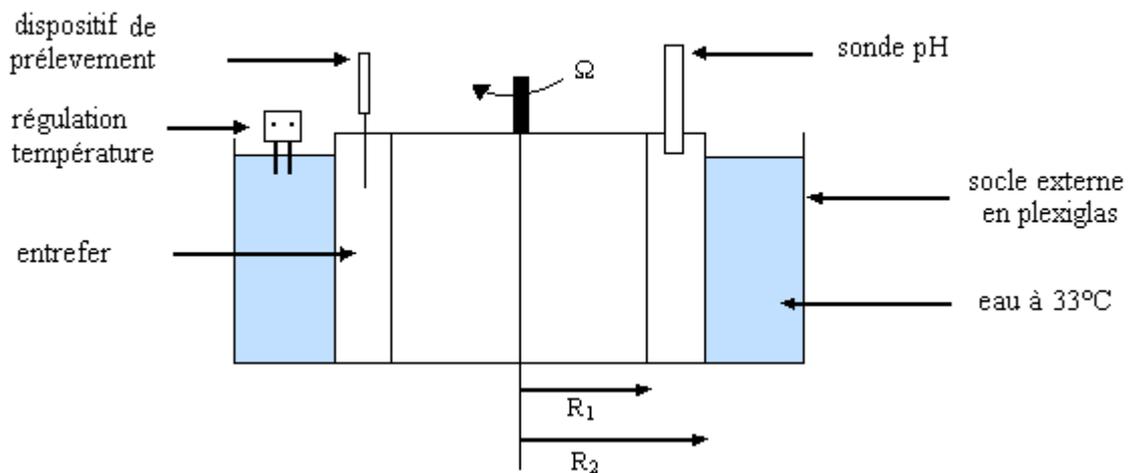
Un réacteur Couette est constitué de deux cylindres concentriques. L'espace interannulaire appelé entrefer, contient le milieu de culture.

Le réacteur principalement utilisé est constitué des deux cylindres concentriques suivants :

- un cylindre interne rotatif en PVC de rayon $R_1 = 100$ mm,
- un cylindre externe fixe en plexiglas de rayon $R_1 = 115$ mm.

L'espace annulaire e entre ces deux rayons est de 15 mm et le ratio des diamètres $\eta = 0,87$. La hauteur des deux cylindres, $H = 200$ mm, confère au dispositif un rapport de forme $H/e \approx 13,3$. Le volume utile du réacteur est de 2 L.

Les vitesses de rotation du cylindre interne vont de 5 à 110 RPM avec une précision de 3 RPM. Cette installation repose sur un socle externe carré fait en aluminium. Le schéma simplifié de l'installation est donné dans la figure XXX. Ce réacteur a été adapté afin de permettre la culture bactérienne en son sein. Il a en particulier été équipé d'un dispositif de régulation de température et de pH.



Des essais ont également été réalisés dans un réacteur Couette de caractéristiques légèrement différentes :

- cylindre interne rotatif en PVC de rayon $R_1 = 100\text{mm}$,
- cylindre externe fixe en PVC de rayon $R_2 = 120\text{ mm}$.

L'espace annulaire e entre ces deux rayons est de 20 mm et le ratio des diamètres $\eta = 0,83$. La régulation de température est assurée par une circulation externe de liquide.

2.2.3.2. Réacteur Parfaitement Mélangé

Certaines cultures sont réalisées dans des fermenteurs de 2 L (SGI) équipés d'une turbine de Rushton. Les fermenteurs sont autoclavés (121 °C, 20 min) remplis d'eau. Le milieu est ensuite introduit stérilement dans le fermenteur puis dégazé à l'azote pendant 30 min.

2.2.4. Conditions de culture régulation du pH, température

Un module SGI permet de réguler les différents paramètres de culture. L'agitation est fixée à 80 RPM et la température est maintenue constante à 30 °C par une barre chauffante et un circuit de refroidissement par circulation d'eau. Le pH est régulé à 6,6

par ajout automatique de KOH 5 N. Les fermenteurs sont inoculés avec 60 mL de préculture à DO = 1.

2.2.5. Echantillonnage et suivi de la croissance

La concentration cellulaire est évaluée par mesure de la densité optique (DO) à 580 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Si nécessaire, les échantillons sont dilués pour rester dans la gamme de linéarité de l'appareil (DO < 0,6).

La corrélation établie par Even XXX (2001) permet d'accéder à la concentration en biomasse X en g.l⁻¹ à partir de la mesure de la DO à 580 nm : $X = 0,3 \times DO$.

2 x 1ml d'échantillons sont également régulièrement prélevés et centrifugés (3 min – 12 000 RPM – 4 °C) et le surnageant conservé à -18 °C pour des analyses ultérieures.

ANNEXE 2 : CHIMIE ANALYTIQUE

1 DOSAGES BIOCHIMIQUES

1.1. Dosage des polysaccharides par la méthode à l'anthrone

Réactif : Anthrone (à préparer le jour même de l'analyse)

- 20 mg d'anthrone en poudre
- 10 mL d'H₂SO₄ concentré

Ces dosages sont réalisés en microplaques avec 50 µL d'échantillon + 200 µL de réactif à l'anthrone. La plaque est homogénéisée au shaker avant d'être incubée 20 min à 60 °C. Les absorbances à 620 nm sont ensuite lues au spectrophotomètre dans des micro cuves.

Pour chaque série d'analyses, une gamme étalon en glucose (de 0 à 0,15 g/L) est traitée simultanément. Chaque étalon de la gamme et chaque échantillon sont dosés en triplicats.

1.2. Dosage des sucres et acides en HPLC

Les surnageants des échantillons prélevés lors des cultures sont analysés par chromatographie liquide à haute pression (HPLC). Le système d'HPLC (Hewlett Packard series 1050) est équipé d'un passeur automatique (Waters 717 Autosampler), d'une précolonne (Biorad Microguard) et d'une colonne de type H⁺ (Biorad HPX87H) qui effectue une séparation par échange d'ions et exclusion. L'analyse des échantillons est réalisée à 48 °C et avec un débit d'éluant (H₂SO₄ 5 mM) de 0,5 ml.min⁻¹. La détection est assurée par un spectrophotomètre UV (Perkin Elmer LC90Bio) à 210 nm pour le lactate et le formiate, et par un réfractomètre (Hewlett Packard series 1047A) pour le glucose, tous deux branchés en série. Les concentrations de ces composés dans les surnageants de culture sont déterminées grâce au dosage de solutions étalons.

1.3. Dosage des protéines

La quantification des protéines par la méthode à l'acide bicinchonique (BCA) implique la formation d'un complexe BCA-Cu²⁺ de couleur pourpre dont l'intensité est mesurée à 570 nm.

Le kit de dosage par la méthode au BCA est constitué de deux solutions :

- une solution A contenant de l'acide bicinchonique, du carbonate de sodium, du bicarbonate de sodium, du tartrate de sodium. Les composés sont dissous dans de la soude 0.1N.
- une solution B contenant du cuivre pentahydraté (CuSO₄ 5H₂O) 4 % (w/v)

La solution de travail BCA se prépare en mélangeant la solution A et B dans des proportions 50/1.

Ces dosages sont réalisés en microplaques : 25 µL d'échantillon sont mélangés avec 200 µL de solution de travail BCA. L'ensemble est agité sur le shaker avant d'être incubé à 60 °C pendant 30 min. Après refroidissement à température ambiante, l'absorbance est mesurée à 570 nm.

Une gamme étalon de BSA à différentes concentrations (0.01, 0.025, 0.05, 0.075, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75 g/L) est traitée de manière identique en parallèle.

Chaque échantillon est dosé en triplicat.

1.4. Quantification des polysaccharides par précipitation à l'éthanol

Le protocole d'extraction et de quantification des exopolysaccharides dans le milieu de culture contenant des cellules en phase stationnaire est adapté des travaux de Jung et al. (2008). 4 % (W/V) d'acide trichloroacétique est ajouté au milieu, l'ensemble est chauffé 100 °C pendant 20 min (dénaturation des protéines et amélioration du détachement des EPS de la surface cellulaire) puis centrifugé (4000 RPM/4 °C/15 min). Le mélange éthanol-surnageant (50 % V/V) est ensuite agité sur rouleaux d'agitation pendant 48 h à

4 °C. Les EPS ainsi précipités sont ensuite filtrés (filtres millipores 0.45 µm), séchés (24 h / 60 °C / 0.2 atm) et pesés.

ANNEXE 3 : MESURES PHYSICOCIMIQUES

1 QUANTIFICATION DE L’AFFINITE POUR LES SOLVANTS – MATS (MICROBIAL ADSORPTION TO SOLVENTS)

Cette technique permet de caractériser certaines propriétés physicochimiques (caractère hydrophile-hydrophobe, donneur ou accepteur d’électrons) des surfaces des cellules.

La mesure est réalisée sur des cellules lavées deux fois dans de l’eau physiologique (NaCl 9 g/L). Quatre solvants sont testés : chloroforme, acétate d’éthyle, hexadécane et décane. Après mélange intime entre la phase cellulaire aqueuse et le solvant, l’affinité pour ledit solvant est fonction de la proportion de cellule restant dans la phase aqueuse après séparation des phases (décantation pendant 15 min).

$$Affinite = 1 - \frac{DO_{init}}{DO_{finale}} \times 100$$

2 MESURES GRANULOMETRIQUES

Le suivi de la taille moyenne des cellules et des agrégats au cours des premières heures de fermentation a été réalisé à l’aide d’un granulomètre Mastersizer Malvern.

Les échantillons sont dilués dans de l’eau additionnée de NaCl à 9g/L, puis le volume d’échantillon est ajusté afin de se situer dans une zone définie d’obscurité du laser. Ici, c’est la zone 5 – 15 % qui est choisie. Il est nécessaire de définir cette zone dans laquelle les distributions sont ‘linéaires’. En effet, un échantillon, trop concentré (obscurité > à la limite supérieure fixée) ou pas assez concentré (obscurité < à la limite inférieure), renverra des distributions très différentes. La zone de ‘linéarité’ correspond à la zone dans laquelle les distributions renvoyées sont identiques.

3 TRAITEMENTS D'EXTRACTION

3.1. Séparation des cellules et de la matrice filamenteuse

3.1.1. Traitement aux ultrasons

A l'issue de la fermentation, on récolte 400 mL de milieu de culture, répartis en 8 flacons à centrifuger de 50 ml.

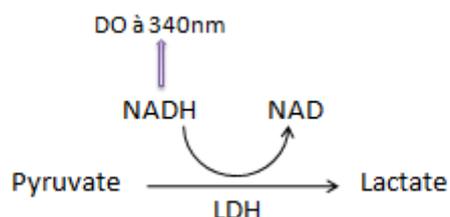
Les cellules sont lavées 3 fois selon le protocole suivant : centrifugation 20 min à 4000 rpm et 4 °C, élimination du surnageant, compléter à 50 ml avec du tampon PBS.

A l'issue de la dernière centrifugation, les culots sont récoltés dans un seul flacon et le volume complété à 50 ml avec du PBS.

Le traitement aux ultrasons est réalisé avec un appareil (Bioblock Scientific Vibra Cell 72412) dont la fréquence est 20 KHZ et la puissance est de 600W. L'amplitude de l'appareil est réglée à 20 % ; soit pour le traitement de 50 ml de solution, une puissance volumique de 2,4 W/ml. La sonde de diamètre 1 cm est plongée dans 1 cm d'échantillon. Chaque cycle comprend une phase de traitement (20 s - 2,4 W/ml - 0 °C) et une phase de refroidissement (1 min - 0 °C). Après 4 cycles, l'échantillon est centrifugé et le surnageant conservé à -18 °C.

3.1.2. Vérification de la lyse cellulaire par le dosage de l'activité LDH

La lactate déshydrogénase (LDH) est une enzyme intracellulaire catalysant la réduction du pyruvate en lactate, réaction associée à l'oxydation du NADH en NAD.



Le dosage de l'activité de LDH s'effectue par la mesure de la diminution de NADH (coefficient d'extinction à 340 nm de $6223 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) qui peut être suivie par lecture de l'absorbance à 340 nm, en fonction du temps. La solution de mesure de l'activité enzymatique contient 250 μL de PBS, 100 μL de MgCl_2 (50 mM), 100 μL de NADH (6 mM), 400 μL d'eau et 100 μL de surnagent après traitement aux ultrasons. 50 μL de pyruvate (400 mM) sont ajoutés dans la solution pour initier la réaction. L'absorbance à 340 nm est suivie à 30 °C pendant 10 min, une mesure étant faite toutes les 12 s. La cinétique d'absorbance est collectée par l'enregistreur du spectrophotomètre (Hewlett Packard 8453).

ANNEXE 4 : FLUORESCENCE ET MICROSCOPIE

1 ECHANTILLONNAGE ET PREPARATION

Les échantillons sont prélevés en fin de fermentation. Des brins de filaments sont récoltés à l'aide d'une aiguille stérile plongée dans le milieu de culture. Après quelques secondes, celle-ci est entourée de masse filamenteuse. Elle est alors délicatement retirée et l'échantillon est placé dans un tube Eppendorf. Le fait de travailler avec des échantillons récoltés en fin de culture permet de s'affranchir de la présence de glucose résiduel.

Les échantillons sont ensuite fixés selon une méthode décrite par Böckelmann *et al.* (2002) selon le protocole suivant : cellules + PBS contenant 4 % de paraformaldéhyde (PFA), incubation 2 h à 4 °C, 3 lavages successifs dans du PBS, centrifugation 10000 RPM – 5 min puis élimination du surnageant et ajout de 500 µL de PBS au culot.

Les échantillons fixés sont ensuite déshydratés (condition sinequanone à la fixation des lectines) : l'échantillon est mis au contact de solutions d'éthanol de concentration croissante (50 %, 80 % et 96 % V/V) pendant 3 min.

2 FISH (FLUORESCENT IN SITU HYBRIDIZATION)

Après fixation et déshydratation, les échantillons sont hybridés. Chaque échantillon est traité avec 100 µL de solution d'hybridation et 10 µL de solution de sonde à 50 ng/µl. La sonde utilisée ici est la sonde universelle bactérienne EUB338-cy3 (Aman *et al.* 1990). Les échantillons sont incubés pendant 1,5 h, à 46 °C et dans l'obscurité.

Les échantillons hybridés sont ensuite lavés avec la solution de lavage pendant 10 min à 48 °C et rincés 3 fois à l'aide de la solution de lavage.

Enfin, chaque échantillon est rincé 2 fois avec le tampon de lavage.

Les compositions des solutions sont rappelées ci-dessous :

Solution d'hybridation

0.9 M NaCl

20 mM Tris-HCl pH 8

25 % formamide

0.02 % de SDS.

Solution de lavage

0.15 M NaCl,

20 mM Tris-HCl pH 8

5 mM EDTA

0.01 % SDS (SodiumDodecylSulfate)

Sonde

50 ng/L EUB338-cy3

Tampon de lavage

88 mM NaCl

20 mM Tris-HCl pH 8

0.01 % SDS

3 MARQUAGE PAR DES LECTINES

Chaque lectine (Sigma Aldrich inc.) est marquée au FITC (Fluorescein isothiocyanate). L'origine, le nom commun, les sucres spécifiques aux lectines utilisées ainsi que les concentrations sont résumés dans le tableau suivant.

Les échantillons traités selon les protocoles décrits précédemment sont incubés en présence de 100 µL de lectine pendant 30 min à température ambiante et à l'obscurité. Chaque échantillon ainsi marqué est ensuite lavé 5 fois avec le tampon de rinçage afin d'éliminer les lectines non fixées. Il convient ici de faire très attention à ne pas détruire l'échantillon et le lavage s'opère en éliminant les surnageants à la pipette.

Les échantillons ainsi hybridés et marqués sont ensuite délicatement déposés sur les lames multi puits et séchés pendant 1 nuit à 35 °C avant d'être observés en microscopie confocale à épifluorescence.

Nom commun	Taxonomie	Sucre(s) spécifique(s) (selon les spécifications du fournisseur)	Concentration
Carnivalia ensifomis	Concanavalin A	α -glucose, α -mannose	0.12 mg/ml
Lentil	Lens culinaris	α -D-mannosyl and α -D- glucosyl residues	<i>not specified</i>
Griffonia simplicifolia	Bandeiraea simplicifolia	α -D-galactosyl residues and N-acetyl- α -D- galactosaminyl residues	<i>not specified</i>
Coral tree	Erythina cristagalli	D-galactose and D- galactosides	0.04 mg/ml

characteristics of the lectins used in the lectin-binding assays of *L. lactis* NCDO 2118

4 MICROSCOPIE CONFOCALE ET EPIFLUORESCENTE, CFDA ET SYTO 61

4.1. Intérêt et principe de la microscopie confocale

La microscopie confocale permet de faire des visualisations avec une très faible profondeur de champs, ce qui a pour conséquence d'obtenir des images avec une résolution améliorée par rapport aux techniques de microscopie optique. Cette technique présente un intérêt certain pour l'observation d'échantillons d'une certaine épaisseur car cela permet de faire des images dans une coupe de très faible épaisseur. La superposition des plans ainsi obtenus permet de réaliser une image en 3D de l'échantillon.

4.2. Epifluorescence

L'échantillon, dont les molécules d'intérêt ont été préalablement marquées par une molécule liée à un fluorochrome, est soumis à une excitation laser. La molécule fluorescente, excitée par des rayons lumineux d'énergie appropriée, réémet un signal

fluorescent. C'est ce signal qui est ensuite filtré par le sténopé du microscope et transmis à l'observateur.

Les marqueurs utilisés dans cette étude portent différents fluorochromes dont les longueurs d'onde d'excitation et d'émission sont résumées dans le tableau suivant (tableau XXX)

Fluorochrome	Longueur d'onde excitatrice	Longueur d'onde émise
FITC	494 nm	521 nm
Cy3	512 – 550 nm	570 – 615 nm

marqueurs fluorescents, longueurs d'ondes caractéristiques

4.3. Observation des échantillons hybridés et marqués par les lectines

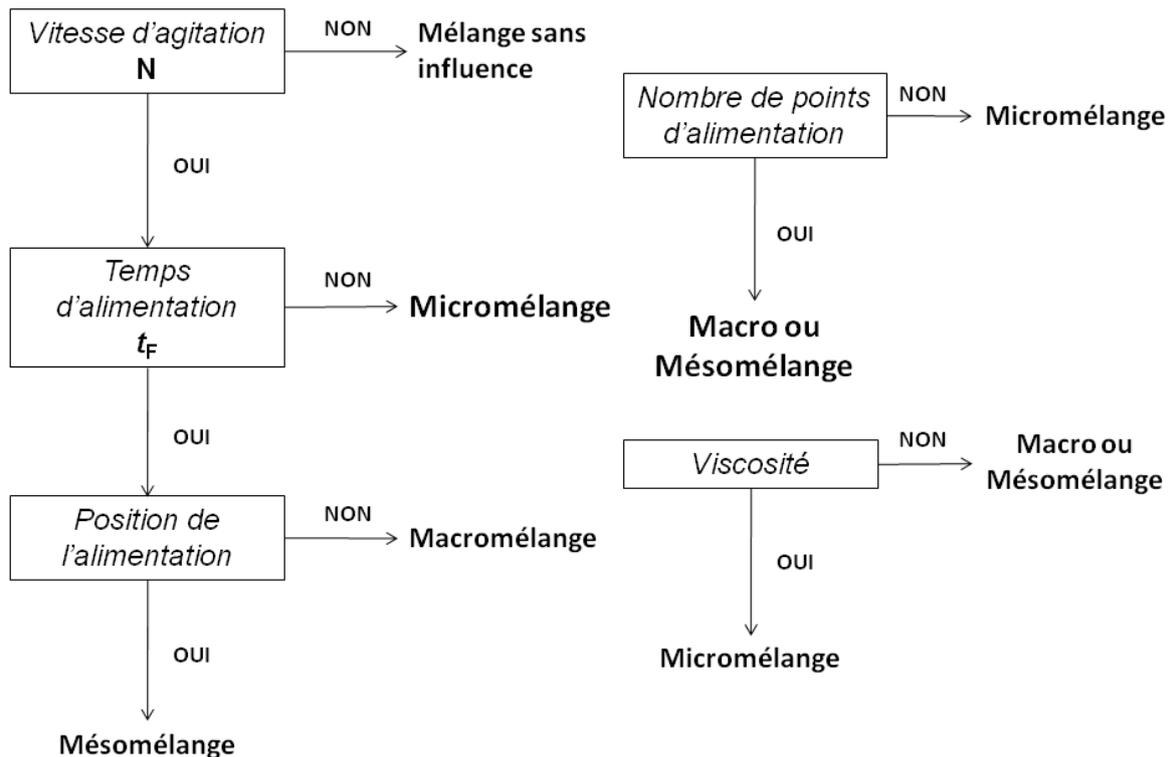
Pour permettre une meilleure visualisation, une goutte de cytifluor est déposée à la surface de chaque échantillon. Ceux-ci sont observés à l'immersion avec un microscope confocal à épifluorescence (Leica TCS SP2 with argon, GreNe and HeNe laser).

La reconstruction des images est effectuée à l'aide du logiciel Volocity (PerkinElmer).

ANNEXE 5 : METHODOLOGIE D'IDENTIFICATION DES PARAMETRES DE MELANGE CRITIQUE

Cette série d'expérience permet d'identifier le ou les mécanismes de mélange contrôlant une réaction. Cette méthodologie s'applique particulièrement à des réacteurs alimentés (réacteurs continus et fed batch) et agités mécaniquement. Pour ces réacteurs, cinq paramètres physiques dont dépend le mélange sont identifiés.

- vitesse d'agitation (N)
- Temps caractéristique de l'alimentation (t_F)
- Position du point d'alimentation
- Nombre de points d'alimentation (n_F)
- Viscosité du milieu (μ)



Série d'expériences permettant d'identifier le ou les mécanismes de mélange contrôlant une réaction, d'après Bourne.

