

La validité du principe d'exclusion compétitive enculture batch

2.2 Introduction

Un écosystème est « une unité écologique formée d'un biotope correspondant à l'ensemble des paramètres abiotiques (ou physico-chimiques) et d'une biocénose correspondant à l'ensemble des organismes y vivant » [84]. Ces deux ensembles, qui constituent chaque écosystème, entretiennent de nombreux types d'interactions différentes. Ainsi, un écosystème apparaît comme un système complexe difficile à aborder. L'écologie, science des écosystèmes, tente d'en améliorer la compréhension et est définie comme « la science des communautés ».

La diversité biologique correspond à : « la variabilité des organismes vivants de toute origine y compris, entre autres, les écosystèmes terrestres, marins et autres écosystèmes aquatiques ». La diversité est en générale subdivisée en trois niveaux :

- La diversité génétique qui se définit par la variabilité des gènes au sein d'une même espèce ou d'une population. On parle aussi de diversité intra-spécifique qui se caractérise par la différence de deux individus d'une même espèce ou sous-espèce.*
- La diversité spécifique ou diversité inter-spécifique qui correspond à la diversité des espèces.*
- La diversité éco-systémique, qui correspond à la diversité des écosystèmes présents.*

Ces trois niveaux de diversité sont reliés entre eux, mais sont suffisamment distincts pour que chacun puisse être étudié en soi. Il ne peut donc y avoir une mesure unique et objective de la diversité, mais uniquement des mesures relatives à des tendances ou objectifs précis d'utilisation ou d'application. En particulier, une mesure de la diversité spécifique consiste en l'étude de sa richesse qui désigne le nombre total d'espèces qui coexistent dans un espace considéré. Cette première approche dépend de la taille des échantillons et de la surface échantillonnée et ne considère pas l'abondance relative des différentes espèces. Une autre approche de la diversité consiste à tenir compte à la fois du nombre d'espèces présentes et de l'abondance de celles-ci.

Le monde microbien dans le sol est très complexe par sa diversité taxonomique et fonctionnelle résultant de diverses stratégies de colonisation des microbes basés sur leur capacité élevée d'employer une gamme de substrat dans différentes niches physico-chimiques. Plusieurs concepts ont été employés pour expliquer la dynamique des populations de sol en réponse à la modification de la disponibilité de substrat [12, 33, 34]. Cependant, la cinétique de chaque population, en termes de taux de croissance selon différents types de substrat, est généralement déterminante mais reste encore inconnu. Des études évaluant avec précision la cinétique des populations bactériennes doivent maintenant être conduites

pour mieux définir les attributs écologiques et pour modéliser la dynamique des populations dans les environnements complexes et hétérogènes. Les modèles mathématiques en écologie constituent des outils de représentation, de compréhension du fonctionnement de systèmes naturels et/ou de prédiction de leur évolution. Comme notre objectif de la modélisation est une meilleure compréhension du système et de tester des hypothèses relatives à sa dynamique, on s'intéresse à des modèles phénoménologiques basés sur la connaissance et des hypothèses réalistes qui peuvent être faites sur le phénomène étudié que l'on souhaite modéliser. Ils font intervenir les principes premiers de la physique et notamment les lois relatives à la conservation de la masse et au transfert de la matière et de l'énergie entre plusieurs compartiments. De plus un modèle permet d'aller au bout des conséquences logiques de ses hypothèses initiales, et doit être « validé » par la confrontation aux résultats d'expériences réalisables car « seule l'expérience est capable de nous aider à nous faire une idée sur la vérité ou la fausseté des énoncés portant sur des faits ».

Puisque le sol est un milieu très complexe, pour étudier et modéliser le processus de croissance bactérien, on a décidé de procéder en deux étapes :

- Dans une première étape, nous étudions le processus de croissance bactérien d'un nombre fini de souches pures en culture batch ;*
- Dans une deuxième étape, plusieurs souches ont été mélangées afin de reconstituer artificiellement des écosystèmes complexes.*

*Le but est de présenter les résultats de modélisation obtenus dans ces deux étapes : étudier et modéliser les cinétiques de croissance pour des souches de sol dans des milieux liquides réalisés en cultures batch pures et mixtes. Les souches considérées sont *Paenibacillus*, *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas axonopodis*, *Rhodococcus* et *Bradyrhizobium japonicum*. Ces souches ont été isolées du sol et elles appartiennent à différents groupes taxonomiques bactériens. Elles ont été choisies pour la variabilité de leur taux de croissance dans un milieu de culture. En particulier, *Cupriavidus* ou *pseudomonas* sont connus pour leur taux de croissance rapide tandis que *Bradyrhizobium* a un taux de croissance lent. Nous proposons un modèle mathématique comme une extension de celui du Monod [24], validé sur des données expérimentales, capable de décrire et de prévoir la dynamique en culture pure aussi bien qu'en culture mixte des bactéries qui croient sur un substrat limité essentiel (glucose) dans des réacteurs fonctionnant en batch (milieu de Bergersen).*

Les modèles prennent en considération les processus suivants : croissance bactérienne, mortalité microbienne, accumulation de cellules non viables dans le milieu et recyclage partiel des cellules mortes

en substrat, au cours du temps. La méthode des moindres carrés est employée pour identifier les paramètres du modèle. Ce modèle est évalué sur des données expérimentales en cultures pures et est prolongé aux cultures mixtes. En particulier, pour les cultures mixtes considérées, il est établi qu'il y a une compétition simple pour le substrat limitant. En outre, les interactions complexes entre les bactéries dans le milieu de culture sont négligées.

2.3 Matériels et méthodes

2.3.1 Processus expérimental

Dans ce paragraphe, nous donnons les détails relatifs au milieu de culture utilisé, aux souches inoculées, aux étapes du processus expérimental et nous présentons les données obtenues à l'issue des expérimentations réalisées.

Milieu de culture Bergersen

Un milieu de culture minimum ou milieu défini est un milieu comportant les éléments chimiques strictement nécessaires à la croissance bactérienne. Un milieu de culture minimum doit contenir une source de carbone et d'énergie, généralement le glucose, une source de potassium et de phosphore (K_2HPO_4), une source d'azote et de soufre, ($(NH_4)_2SO_4$), une source de magnésium ($MgCl_2$), une source de calcium ($CaCl_2$), une source de fer, une source d'oligoélément et de l'eau. Un tampon pH permet de maintenir un pH adapté : KH_2PO_4 , par exemple. En l'absence de l'un de ces composants, les bactéries ne se développent pas, car elles ne peuvent pas synthétiser les produits nécessaires à leur croissance. C'est l'adjonction de facteur(s) de croissance approprié(s) qui permet à des bactéries exigeantes de se développer. Dans nos expérimentations nous avons utilisé un milieu de culture de type Bergersen dont la composition est indiquée dans le tableau 2.1.

Ce milieu de culture est préparé pour différentes concentrations de glucose (en tant qu'unique source de carbone qu'on quantifie). Le pH est ajusté à 6.8. Ensuite, le milieu de culture est auto-clavé à 110°C pendant 40 minutes. Cette procédure de stérilisation est appliquée sur tout le matériel utilisé. Notons que les vitamines, biotine et thiamine, sont ajoutées après l'auto-clavage.

| <i>Produit</i> | <i>Formule chimique</i> | <i>Poids</i> |
|------------------------------------|-------------------------|-------------------------|
| <i>Glucose</i> | $C_6H_{12}O_6$ | 2g |
| <i>Disodium hydrogénophosphate</i> | $Na_2HPO_4, 12H_2O$ | 0.45g |
| <i>Magnésium de sulfate</i> | $MgSO_4, 7H_2O$ | 0.1g |
| <i>Chlorure de fer</i> | $FeCl_3$ | 0.02g |
| <i>Chlorure de calcium</i> | $CaCl_2, 2H_2O$ | 0.05g |
| <i>Extrait de levure</i> | | 0.5g |
| <i>Biotine</i> | | 0.2mg, 250 μ l/25ml |
| <i>Thiamine</i> | | 0.1mg, 125 μ l/25ml |
| <i>Eau</i> | H_2O | |

TAB. 2.1 – Milieu de culture Bergersen

Souches utilisées

| Inoculum | Affiliation phylogénétique | Source | Origine |
|---------------------------------------|----------------------------|--------|--------------------------|
| Paenibacillus | Firmicutes Bas GC | Sol | A. Hartman, Dijon |
| Pseudomonas syringae PVTomato PT23 | γ -protéobactéries | Sol | D.A. Cooksey, California |
| Xanthomonas axonopodis C7R12 | γ -protéobactéries | Sol | P. Lemanceau, Dijon |
| Rhodococcus ATCC 13898 R27 | Actinomycétales Haut GC | Sol | A. Hartman, Dijon |
| Bradyrhizobium japonicum | α -protéobactéries | Sol | A. Hartman, Dijon |

TAB. 2.2 – Souches utilisées

Les souches utilisées (2.2) sont isolées du sol, stockées à $-80^\circ C$ dans un milieu Luria Bertani modifié (LB^+), dilué à 50% avec une solution de glycérole pour inhiber toute croissance. Ces souches sont activées à $28^\circ C$ dans un milieu Bergersen à 1 g/L de glucose.

Les cellules collectées après la centrifugation sont lavées deux fois avec la solution du milieu sans glucose puis elles sont inoculées dans le milieu de culture où la température est fixée à $28^\circ C$. Cette

culture est automatiquement agitée à 150rpm. Chaque culture est effectuée en triplicat.

La densité optique

La mesure la plus importante lors d'une culture cellulaire est celle de la biomasse. Bien que l'activité microbienne ne soit pas toujours associée à la croissance de la biomasse, il reste nécessaire d'en connaître la concentration dans le milieu de culture. La croissance est définie comme l'accroissement de la masse et du volume cellulaire jusqu'à ce qu'une taille définitive soit atteinte, moment où la cellule doit se diviser. La croissance est donc accompagnée d'une augmentation du nombre de cellules dans le temps. Le volume de la cellule va donc augmenter à partir du moment où elle vient de subir une division jusqu'à ce qu'elle soit de nouveau capable de se diviser. On remarque que les cellules nouvellement formées (donc celles avec un volume minimal) sont les plus nombreuses, deux fois plus que les cellules en cours de division. Le volume cellulaire double pratiquement entre le volume minimal et le volume juste avant la division cellulaire. La croissance d'une population peut se faire par division binaire (bactéries), bourgeonnement (levures), allongement d'hyphes (moisissures) ou par mitose. Il faut que la méthode soit simple, précise, robuste, stérilisable et peu coûteuse. Le fait de pouvoir mesurer plusieurs métabolites à la fois réduit le nombre de capteurs nécessaires. L'absorption A ou densité optique est la propriété d'une substance matérielle de diminuer l'intensité d'un faisceau lumineux qui la traverse. Cette propriété varie principalement en fonction de la longueur d'onde et est caractérisée par un coefficient d'absorption.

La densité optique d'une solution est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre ou un bioscreen qui émet un faisceau d'ondes monochromatiques d'intensité I_0 . Celui-ci traverse une cuve contenant la solution dont on veut déterminer la densité optique (DO) et arrive ensuite sur une cellule réceptrice qui mesure l'intensité transmise I. I et I_0 sont reliés par la loi de Beer-Lambert :

$$A = \epsilon l X = -\log\left(\frac{I}{I_0}\right)$$

avec ϵ est le coefficient d'extinction molaire (en l/mole/cm), X est la concentration en mol/l et l est la longueur du trajet optique en cm. L'absorbance est donc définie comme l'inverse de la transmittance (qui correspond au rapport entre l'intensité lumineuse mesurée par le capteur et l'intensité initiale). En d'autres termes il s'agit de la quantité de lumière ayant traversé la solution sans être absorbée. Connaissant la longueur de la cuve et le coefficient d'extinction ϵ , il est donc possible de déterminer X, qui est la concentration des cellules en solution. Les mesures se font généralement à 600 nm.

- Cette méthode est rapide et une utilisation en-ligne est envisageable. Des biophotomètres stérilisables existent.
- Toutefois elle ne donne pas d'information sur la viabilité des cellules et elle peut être influencée par les particules se trouvant dans le milieu (ainsi que par les éventuelles bulles). Son plus gros désavantage est qu'elle nécessite des dilutions importantes et n'est pas transposable d'un organisme à un autre sans une calibration préalable. Enfin la loi de Lambert-Beer n'est linéaire que sur un certain intervalle.

On a testé plusieurs concentrations (initiales) en glucose pour chaque souche pour étudier le comportement de la croissance en fonction de la présence du glucose dans la culture, et aussi pour estimer les taux de croissance par la suite. Pour chaque souche, la durée de la phase de latence est la même pour toutes les concentrations initiales en glucose. En fait, la durée de la phase de latence dépend des conditions d'inoculation (Spencer, [90]) et on peut la déterminer à partir des données expérimentales. Le maximum des densités optiques croît avec les concentrations en glucose (Figure 2.1).

Dosage de glucose

Le dosage de glucose (substrat) se fait par une méthode enzymatique en point final. Cette méthode nécessite une faible prise d'échantillon. Elle est très rapide et précise. Il s'agit d'une réaction principale suivie d'une réaction secondaire pour colorer la solution. Ainsi le dosage de glucose est basé sur 2 réactions enzymatiques :

- la première, catalysée par la glucose oxydase utilise le glucose comme substrat et produit H_2O_2 .
- la seconde, catalysée par la peroxydase utilise le peroxyde d'hydrogène formé comme substrat ainsi qu'un chromogène et produit de l'eau et la forme colorée du chromogène.

En présence de glucose oxydase (GOD), le glucose en solution aqueuse est oxydé par le di-oxygène dissout en acide gluconique avec formation de peroxyde d'hydrogène selon l'équation suivante :



Le peroxyde d'hydrogène est ensuite dosé par une réaction enzymatique indicatrice. En présence de peroxydase (POD), le peroxyde d'hydrogène oxyde, en le colorant, un chromogène que l'on dose finalement par spectro-photométrie à 450 nm :



Le chromogène coloré absorbe fortement à 450 nm, et est directement proportionnel à la concentration en glucose présente initialement dans la solution. On a donc la relation $A_{450} = k S$, avec S est la concentration en glucose présente dans la solution. Le réactif glucose contient nécessairement la glucose oxydase, la peroxydase et le chromogène dans un tampon phosphate. Le dosage du glucose a été réalisé avec un réactif préparé au laboratoire.

Pour avoir des résultats plus précis, il faut travailler dans les conditions opératoires suivantes :

- Réaction suffisamment longue pour avoir la transformation totale du glucose.*
- Température constante ($\simeq 37^{\circ}\text{C}$).*
- pH constant : milieu tamponné ($\simeq 7$).*
- Enzyme en quantité suffisante*
- Substrats secondaires en excès pour ne pas limiter la réaction*

La concentration initiale en glucose (S_0) a été fixée à 1g/L, à l'issue des croissances des différentes souches (Figure 2.1). Les données utilisées finalement dans la modélisation sont la moyenne des trois triplicats.

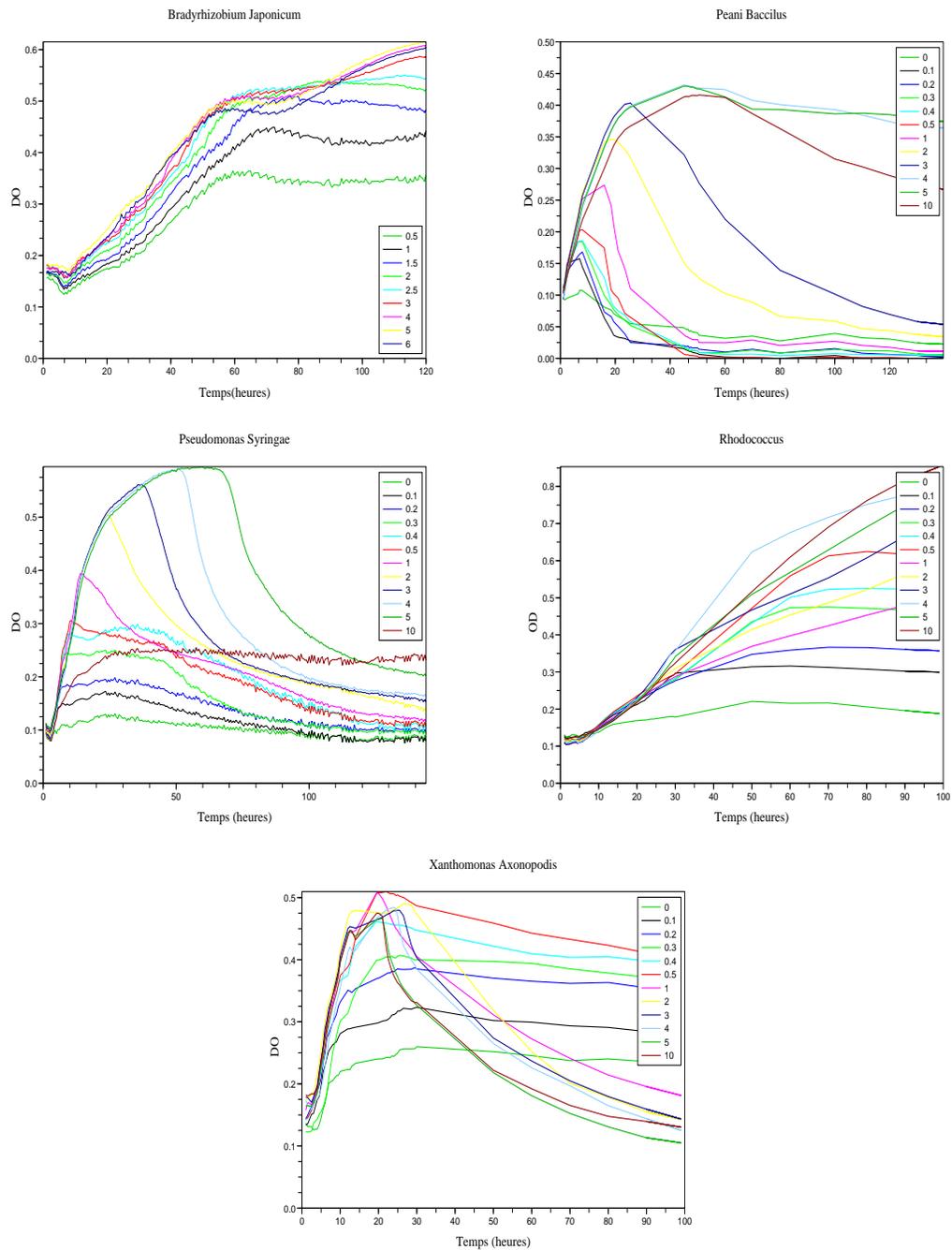


FIG. 2.1 – La croissance de chaque souche pour différentes concentration initiales en glucose

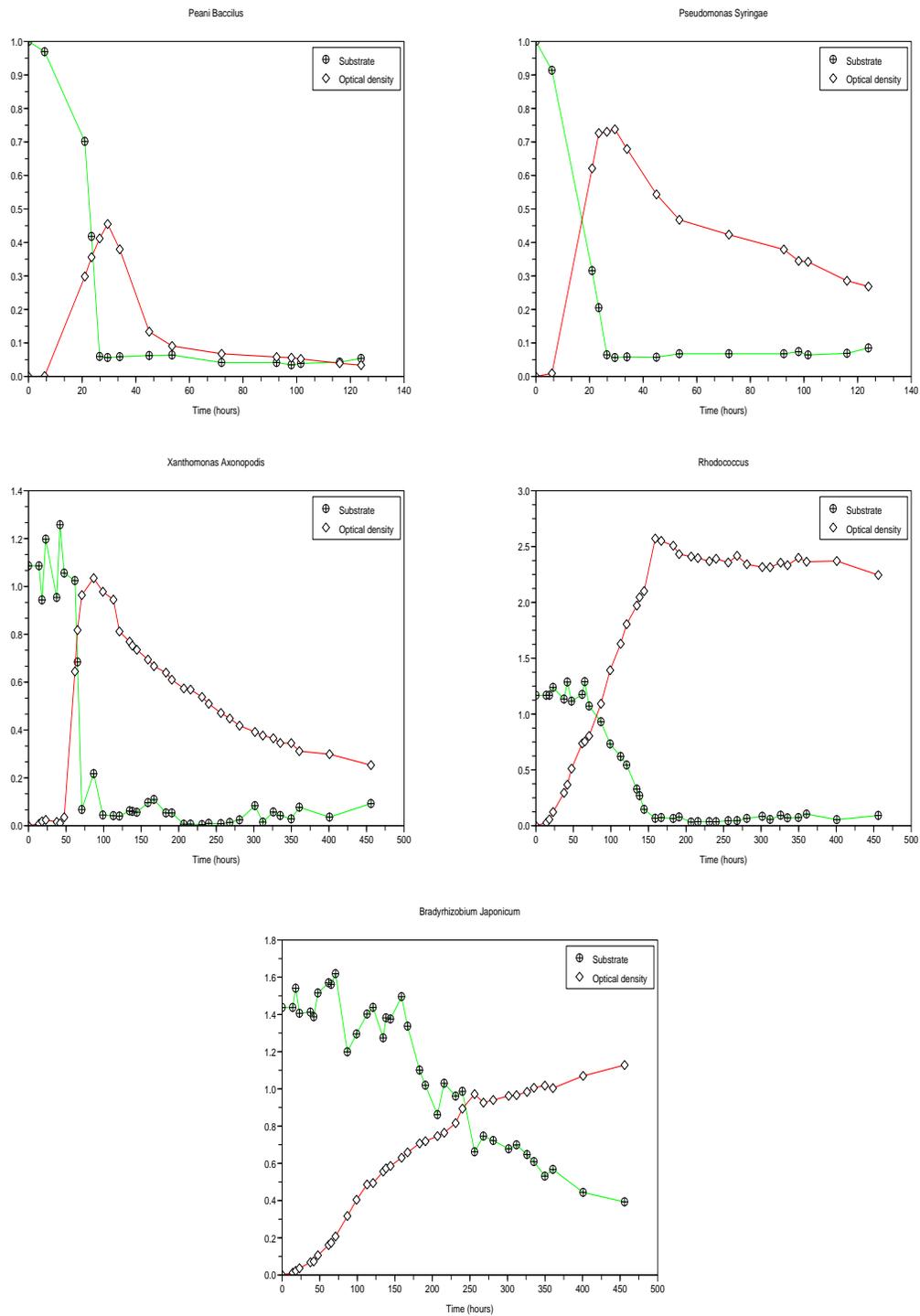


FIG. 2.2 – Les données disponibles

2.4 Modélisation mathématique

Comme nous l'avons vu dans les chapitres précédents, plusieurs modèles pour la croissance microbienne et la bio-dégradation ont été proposés et analysés dans la littérature. Le modèle de Monod est l'un des plus populaires qui décrit la dynamique de la croissance d'une biomasse de concentration X sur un substrat de concentration S en culture batch (voir par exemple [74] ou plus récemment [65]) :

$$\begin{cases} \dot{S} &= -\frac{\mu(S)}{Y} X, \\ \dot{X} &= \mu(S) X, \end{cases} \quad (2.1)$$

Le taux spécifique de croissance $\mu(\cdot)$ est donné par l'expression suivante connue sous le nom fonction de Monod :

$$\mu(S) = \mu_{\max} \frac{S}{K_s + S}, \quad (2.2)$$

où μ_{\max} est taux maximal de croissance, et K_s est le coefficient d'affinité. Y est le coefficient de rendement de la conversion de substrat en biomasse.

Plusieurs modèles mathématiques sophistiqués sont proposés dans la littérature, telle que le modèle de Baranyi [4–6] ou celui de Buchanam [14], qui prennent en compte la phase de latence. Tout ces modèles satisfaisaient la phase exponentielle mais ils pré-dictent pas ce qui peut se passer pour des longues durées [74], car il ne tiennent pas compte ni de l'accumulation des cellules mortes ni des cellules non-viables. Une partie des cellules non-viables lysées libèrent des molécules de substrat en quantités non négligeable lorsque le substrat ajouté au tout début est consommé. L'observation en ligne de la biomasse se fait à travers les mesures de densité optique qui donnent, généralement, une mesure de la biomasse totale et pas la proportion vivante-morte.

Dans ce travail, nous considérons une extension du modèle de Monod considérant l'accumulation des cellules mortes et le recyclage d'une partie d'entre elle en substrat, et abordons la question d'identification des paramètres et de la reconstruction d'état. Un nombre considérable d'études mathématiques ont adressé les modèles pour les culture en continue (chemostat) avec recyclage de substrat [7, 8, 35, 56, 57, 66, 80, 81, 95, 103, 104] alors que peu de travaux considèrent des cultures en batch. Une explication possible vient du fait que seule la phase exponentielle de la croissance, pour lequel la

mortalité de cellules et la recyclage de substrat peuvent être négligées, est considérée pour des applications industrielles. Néanmoins, dans l'environnement comme dans les sols, la modélisation des autres phases de la croissance est également importante, particulièrement pour la décontamination biologique et bioremédiation de sol.

Extension du modèle de Monod

Dans une première étape on va considérer un taux de mortalité dans le modèle de Monod (2.2) :

$$\dot{X} = \mu(S)X - mX$$

où le paramètre $m > 0$ n'est pas négligeable lorsque $\mu(S)$ prend des petites valeurs. De plus on va considérer un autre compartiment X_d qui décrit les cellules mortes accumulées dans le milieu de culture :

$$\dot{X}_d = \delta mX,$$

où le paramètre $\delta \in (0, 1)$ décrit le part des cellules mortes non éclatées. On suppose qu'à partir des cellules éclatées, il y a recyclage d'une partie du substrat qu'elles l'ont assimilées et qui n'est pas transformé. Ainsi la dynamique du substrat peut être modifiée comme suit :

$$\dot{S} = -\frac{\mu(S)}{Y}X + \lambda(1 - \delta)mX,$$

où $\lambda > 0$ est le facteur de recyclage. Il est naturel, de point de vue biologique, de supposer que le facteur λ est plus petit que celui de croissance :

$$\lambda < \frac{1}{Y}$$

Le taux spécifique de croissance $\mu(\cdot)$ est donné soit par la fonction de Monod soit par l'expression suivante, connue par "fonction d'Haldane" :

$$\mu(S) = \mu_{max} \frac{S}{k_s + S + \frac{S^2}{k_i}}, \quad (2.3)$$

où k_i est le coefficient d'inhibition.

Supposons que pour $t = 0$, la culture ne contient pas de cellules non viables. On a alors les conditions initiales suivantes :

$$S(0) = S_0 > 0, X_d(0) = 0 \text{ et } X(0) = X_0 > 0.$$

Données disponibles

Les données disponibles en ligne, notées y , sont la concentration en substrat (S) et la densité optique (Z)

$$y = \begin{pmatrix} S \\ Z \end{pmatrix}.$$

La densité optique est supposée être la combinaison linéaire de la concentration des cellules viables et de celle des cellules non viables :

$$Z = O.D. = \gamma_1 X + \gamma_2 X_d \quad \text{unité de densité optique,}$$

où γ_1 et γ_2 sont respectivement les coefficients d'extinction molaire des cellules viables et des cellules non viables.

1 Remarque Dans le chapitre 3, une analyse détaillée et un observateur pratique à structure en cascade seront proposés pour ce modèle dans le cas où on a des observations en ligne de la concentration en substrat et la densité de la biomasse totale.

Estimation des taux de croissance

On suppose que, pour $t = 0$, il n'y a pas de cellules mortes dans la culture et que le taux de mortalité est négligeable en phase exponentielle (taux de croissance maximal). En calculant les pentes, à l'échelle logarithmique, de la phase exponentielle pour différentes conditions initiales en S_0 (0.1, 0.2, ..., 10 g/L en glucose) on obtient le taux de croissance en fonction de la concentration en substrat S (c.f. Figure 2.3). L'ajustement de ces données, basé sur une fonction de type Monod ou Haldane est obtenu par la routine "leastsq" disponible sous Scilab.

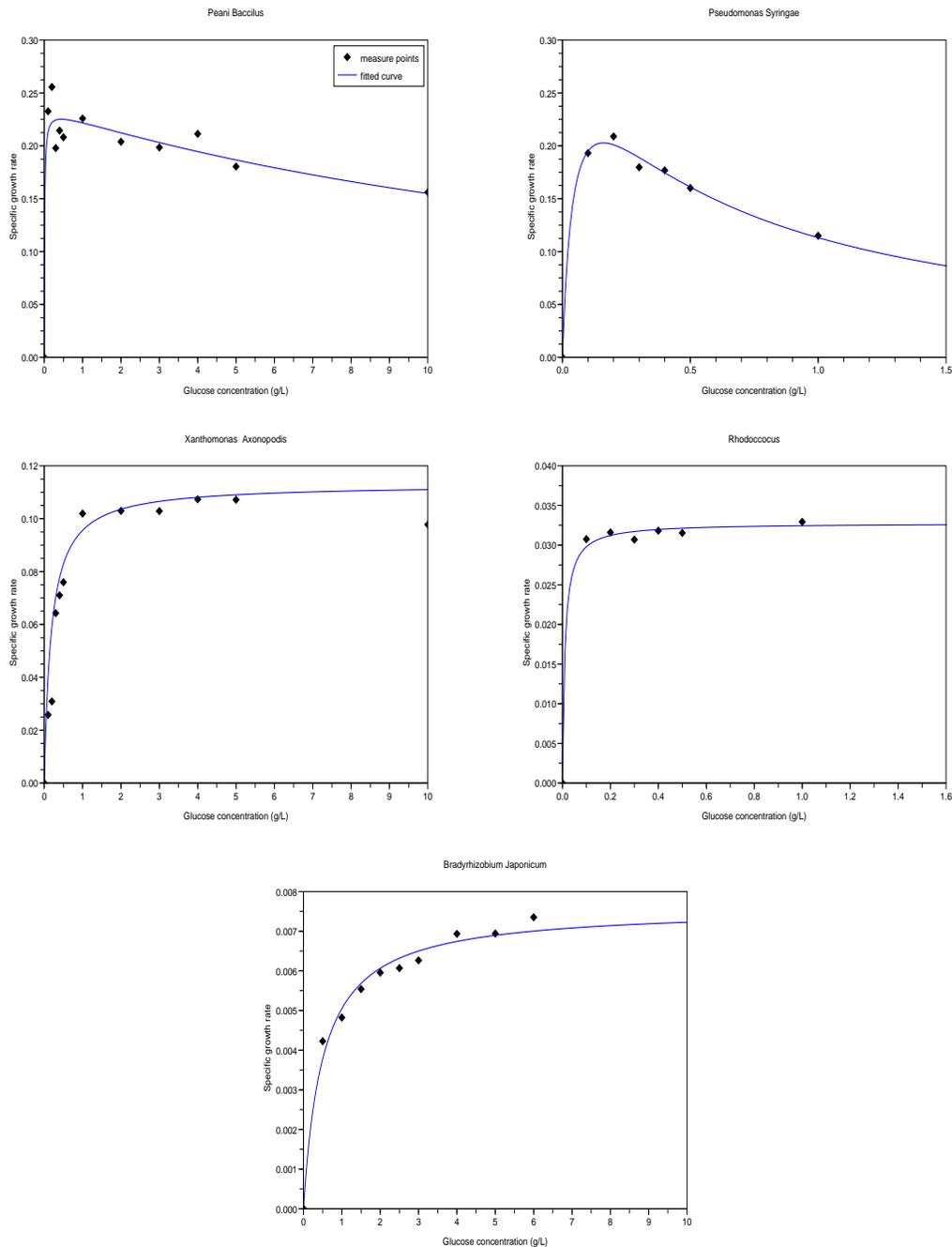


FIG. 2.3 – Les taux de croissance estimés

Les souches ont des taux de croissance très variés du plus lent (*Bradyrhizobium*) au plus rapide (*Bacillus*). Les paramètres ajustés sont donnés dans le tableau 2.3.

| Paramètres | μ_{max} | k_s | k_i |
|--------------------------|-------------|-----------|-----------|
| Souche | | | |
| Paenibacillus | 0.2353863 | 0.01 | 19.275558 |
| Pseudomonas Syringae | 0.315895 | 0.0445648 | 0.5723382 |
| Xanthomonas Axonopodis | 0.112999 | 0.1822481 | |
| Rhodococcus | 0.0327701 | 0.01 | |
| Bradyrhizobium Japonicum | 0.0075893 | 0.503239 | |

TAB. 2.3 – Paramètres des taux de croissance

2.5 Résultats

2.5.1 Cultures pures

La méthode des moindres carrés est utilisée pour identifier les paramètres du modèle en minimisant la fonction coût suivante :

$$J = \frac{\sigma_1}{2} \sum_{i=1}^{n_1} (S(t_i) - S_e(t_i))^2 + \frac{\sigma_2}{2} \sum_{j=1}^{n_2} (Z(t_j) - Z_e(t_j))^2$$

où t_i sont les instants de prélèvement pour le substrat et t_j ceux de prélèvement pour la densité optique, S_e est la concentration en substrat dosée et Z_e est la densité optique mesurée. $S(t_i)$ et $Z(t_i)$ sont la concentration en substrat et la densité optique simulées à partir du modèle à l'instant $t_i, i = 1, \dots, n$. σ_1 et σ_2 sont les coefficients de pondération. n_1 et n_2 sont les nombres de mesures effectuées en substrat et en densité optique, respectivement.

On note une bonne adéquation entre les courbes simulées et les données expérimentales, ce qui tend à confirmer que les hypothèses sur lesquelles est basé le modèle sont satisfaisants et suffisants pour expliquer les données.

Les paramètres identifiés sont donnés dans le tableau 2.4.

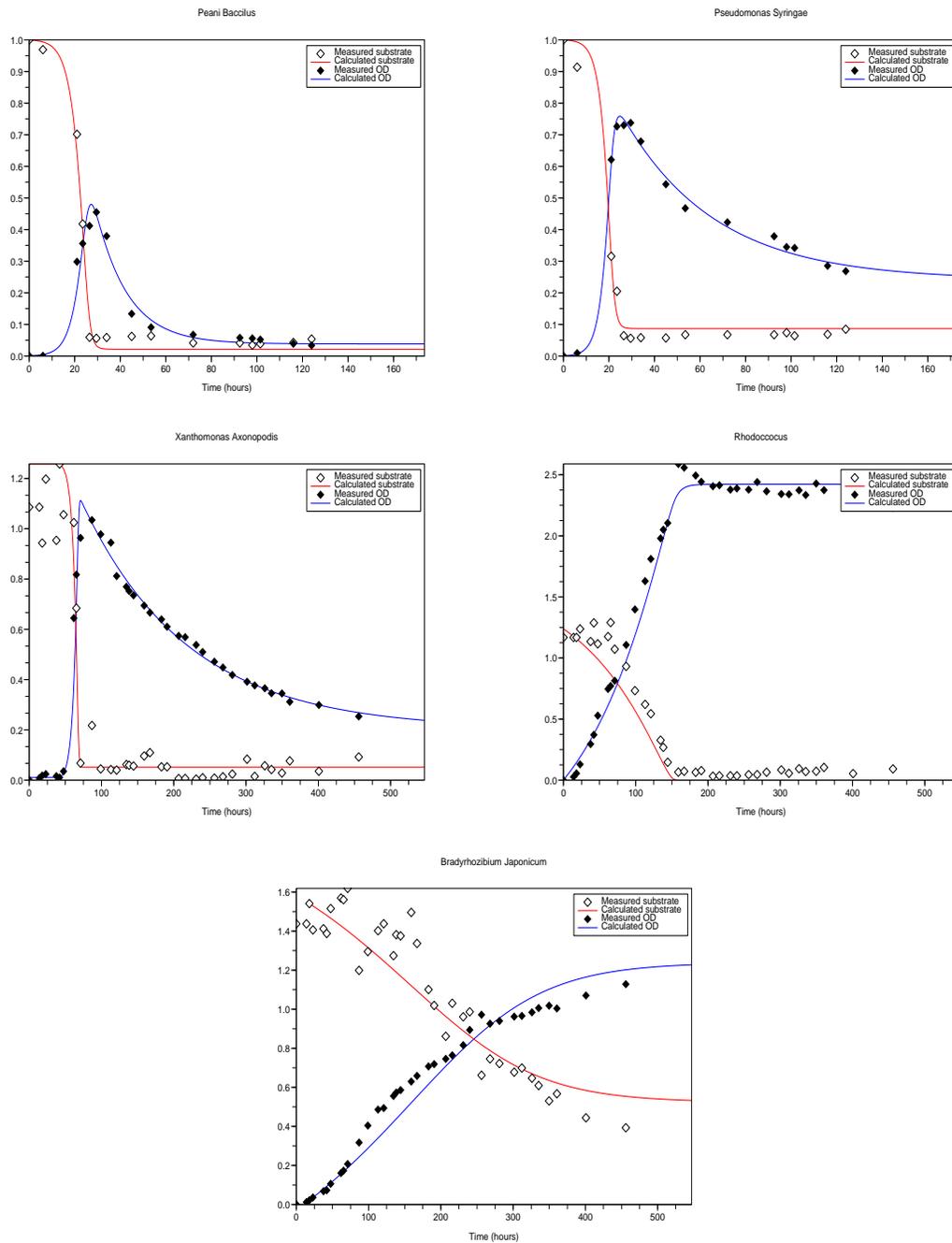


FIG. 2.4 – Ajustment des données

| Paramètre Souche | Y | δ | λ | m | γ_1 | γ_2 |
|-----------------------------|--------|----------|-------------|---------|------------|------------|
| Peani Bacillus | 1.043 | 0.0806 | 0.3 | 0.1 | 0.7207 | 0.3318 |
| Pseudomonas Syringae | 0.8282 | 0.28383 | 1.39 | 0.12679 | 1.1376 | 0.2173 |
| Xanthomonas Axonopodis | 0.7878 | 0.019 | 1.21 | 0.1056 | 1.22 | 0.7022 |
| Rhodococcus | 0.974 | 0.98 | 0.2 | 0.116 | 0.031 | 1.987 |
| Bradyrhizobium Japonicum | 1 | 0.988 | 0.202302746 | 0.101 | 0.972 | 1.2 |

TAB. 2.4 – Paramètres du modèle

2.5.2 Cultures mixtes

Dans ce paragraphe, le modèle est adapté au cas de plusieurs souches poussant dans la même culture. Pour $j = 1, \dots, n$, X_j décrit la concentration de la j ème cellule viable, X_{dj} décrit la concentration de la j ème cellule non viable et S décrit la concentration du substrat dans la culture, à l'instant t . Le modèle mathématique, pour n espèces, est donné par le système d'équations ordinaires suivant, basé sur le modèle (3.1) de n souches en compétition sur S :

$$\begin{cases} \dot{X}_j &= (\mu_j(S) - m_j) X_j, \\ \dot{X}_{dj} &= \delta_j m_j X_j, \\ \dot{S} &= - \sum_{j=1}^n \frac{\mu_j(S)}{Y_j} X_j + \sum_{j=1}^n \lambda_j (1 - \delta_j) m_j X_j, \end{cases}$$

tel que

$$\frac{1}{Y_j} > \lambda_j, \quad j = 1 \dots n.$$

Supposons que, pour $t = 0$, on n'a pas de cellules non viables dans la culture, d'où les conditions initiales suivantes :

$$S(0) = S_0 > 0, X_{dj}(0) = 0, X_j(0) = X_{j0} > 0.$$

Les taux de croissances sont de type Monod : $\mu_j(S) = \mu_{\max j} \frac{S}{k_s^j + S}$, $j = 1, n$, ou de type Haldane $\mu_j(S) = \mu_{\max j} \frac{S}{k_s^j + S + \frac{S^2}{k_{ij}}}$, $j = 1, n$, avec $\mu_{\max j}, k_{sj}$ et k_{ij} sont, respectivement, le taux maximal de croissance, la constante de saturation et le coefficient d'inhibition de la jème espèce. Pour mémoire, rappelons que les paramètres $Y_j, \lambda_j, \delta_j, m_j, \mu_{\max j}, k_{sj}$ et k_{ij} ont été identifiés en culture pure et sont donnés par les tableaux 2.3 et 2.4.

2 Remarque Ce modèle vérifie les mêmes propriétés que le modèle (3.1), notamment en ce qui concerne la positivité des variables et la vérification du principe de conservation de masse.

1 Proposition $\Omega = \{(S, X_1, \dots, X_n, X_{d1}, \dots, X_{dn}) \in \mathbb{R}_+^{n+1} \mid S + \sum_{j=1}^n (\frac{X_j}{Y_j} + (\frac{1}{Y_j} - \lambda_j(1 - \delta_j)) \frac{X_{dj}}{\delta_j}) = S_0 + \sum_{j=1}^n \frac{X_{0j}}{Y_j}\}$ est invariant par la dynamique (2.4)

Comme dans le cas des cultures pures, les données disponibles pour confronter ces modèles aux données sont la concentration en glucose S_e (substrat) et la densité optique Z_e . Rappelons que la densité optique est modélisée en tant que combinaison linéaire des concentrations en cellules viables et en cellules non viables de toutes les souches présentes dans la culture :

$$Z = \sum_{j=1}^n (\gamma_j X_j + \gamma_{2j} X_{dj})$$

où les paramètres γ_j et γ_{2j} sont les coefficients d'absorption (d'extinction molaire) qui ont été identifiés en culture pure (cf. paragraphe 2.5.1).

Les co-inoculations sont faites à des conditions initiales égales. Les résultats sont présentés sur les figures 2.5 et 2.6.

Ainsi que pour les cultures pures, on note une bonne adéquation entre les simulations et les données expérimentales. Si l'on regarde maintenant le comportement de chacune des souches présentes, on note que le comportement global s'explique par l'application du principe d'exclusion compétitive. Autrement dit, ce sont les espèces les plus rapides qui prennent le dessus.

3 Remarque Une simple compétition, sans référence à aucune autre type d'interaction, permet d'expliquer le comportement global observé dans la culture de plusieurs souches en réacteur batch.

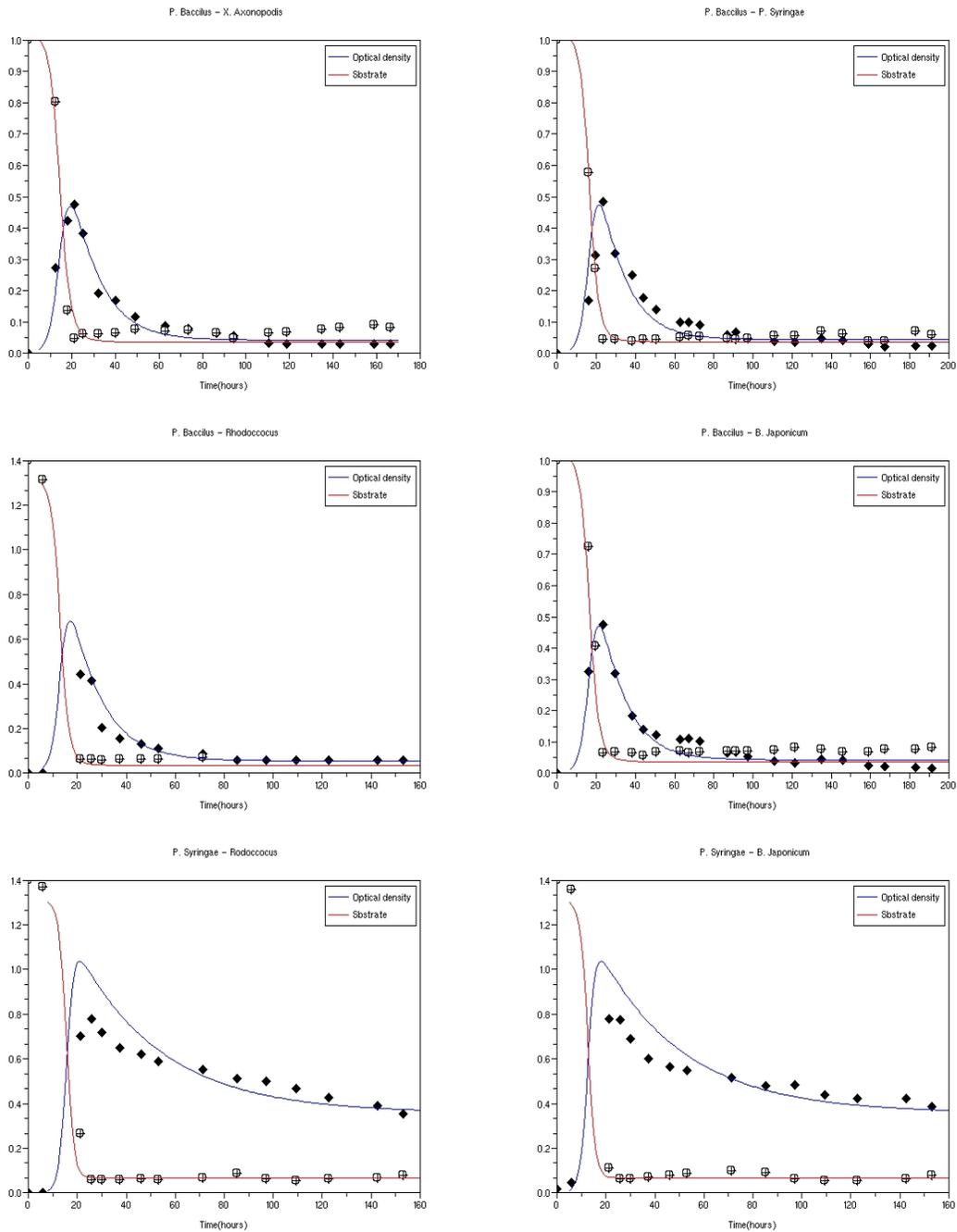


FIG. 2.5 – Validation expérimentale en cultures mixtes par les résultats de densité optique

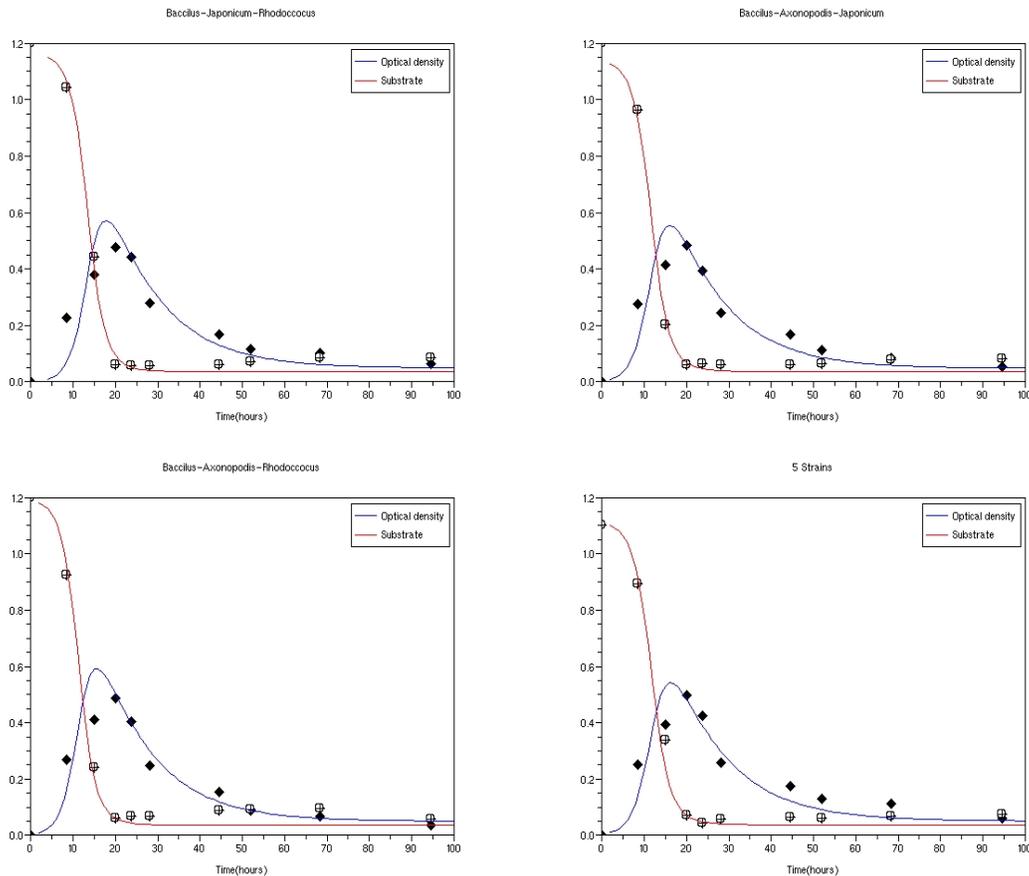


FIG. 2.6 – Validation expérimentale en cultures mixtes par les résultats de densité optique

2.5.3 Discussion

Relativement aux théories actuelles sur la coexistence, ce travail confirme le principe d'exclusion compétitive pour les consortiums artificiels considérés dans des conditions de laboratoire.

Toutefois, nous n'observons que le comportement global de la culture et pour valider nos affirmations, il nous faut vérifier que le comportement de chaque souche est bien celui prévu par la simulation. En effet, on pourrait imaginer qu'en présence de plusieurs souches, certaines interactions se développent mais que le comportement global reste le même. Pour cela nous avons réalisé une série de cultures avec des outils moléculaires permettant de suivre qualitativement l'abondance relative de chacune des souches présentes.

L'outil moléculaire utilisé a été la PCR quantitative (qPCR) qui permet de dénombrer spécifiquement

un gène cible au sein d'un échantillon d'ADN. Afin de pouvoir suivre spécifiquement l'évolution de chacune des souches lorsqu'elles sont co-inoculées, nous avons donc développé des outils de qPCR permettant de détecter spécifiquement le gène codant pour l'ADN ribosomique de chacune des souches utilisées.

L'extraction de l'ADN est une technique permettant d'isoler l'ADN de cellules ou de tissus. L'ADN ainsi extrait peut ensuite être utilisé pour des recherches de biologie moléculaire, telles que le séquençage, la PCR ou le clonage. Il existe différents protocoles pour extraire l'ADN, qui suivent approximativement le même schéma de principe :

- Lyse des cellules
- Élimination des protéines
- Élimination des autres acides nucléiques (ARN...)
- Concentration de l'ADN par précipitation à l'alcool

Différentes variantes sont employées, suivant que l'on cherche à extraire de l'ADN génomique ou de l'ADN plasmidique. Il existe aujourd'hui des kits commerciaux permettant de réaliser rapidement ces extractions à l'aide de réactifs prêts à l'emploi.

Les résultats des qPCR ont été réalisés et menés par une technicienne sur l'appareil StepOne plus (Applied biosystem) en utilisant des amorces spécifiques de chacune des souches à quantifier et ils sont rapportés dans les Figures 2.7 - 2.12. Ces résultats sont qualitativement en accord avec les résultats de simulation et confirment que dans chaque culture mixte, c'est bien la souche avec le plus fort taux de croissance qui gagne la compétition. Prenons par exemple le cas de poly-inoculation de cinq souches (cf. Figure 2.7), on voit bien que seul *Paenibacillus* (la souche la plus rapide en terme de croissance) a démarrée et a dominée toutes les autres souches (*P. syringae*, *Xanthomonas*, *Bradyrhizobium*...). Également, dans le cas de trois souches (cf. Figure 2.8), toujours le *Paenibacillus* qui démarre et domine les deux autres souches (*Xanthomonas* et *Bradyrhizobium*). Ces observations se répètent dans le cas de deux souches pour le cas *Paenibacillus* et *Bradyrhizobium* (cf. Figure 2.9), le cas de *Paenibacillus* et *Xanthomonas* (cf. Figure 2.10), le cas *P. syringae* et *Xanthomonas* (cf. Figure 2.11) et le cas de *P. syringae* et *Paenibacillus* (cf. Figure 2.12). Encore une fois, la souche qui a le taux de croissance le plus rapide prend le dessus. Cela confirme bien le principe d'exclusion compétitive dans une culture en batch.

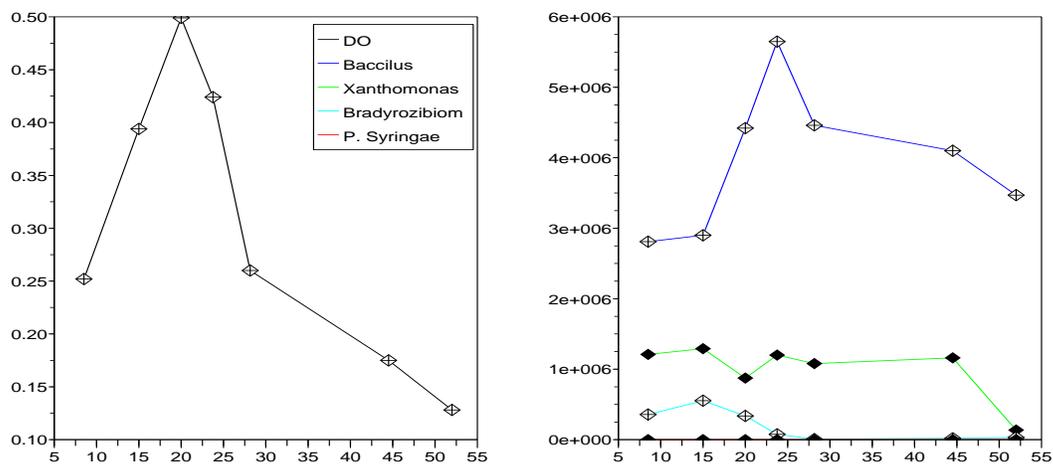


FIG. 2.7 – Les résultats qPCR pour les cinq souches

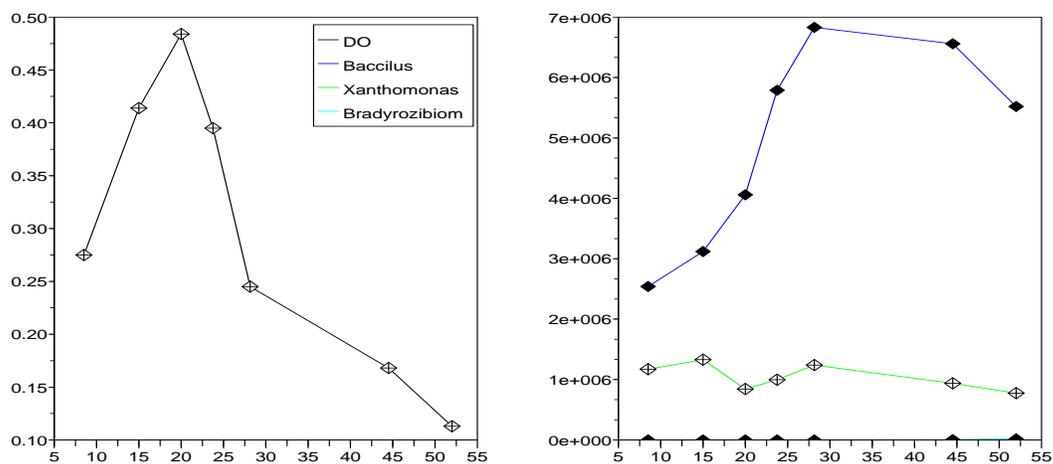


FIG. 2.8 – Les résultats qPCR pour Paenibacillus, Xanthomonas et Bradyrhizobium

2.6 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons présenté l'ensemble des expérimentations que nous avons réalisées. Les données récoltées (densité optique, concentration en substrat) ont été confrontées aux modèles

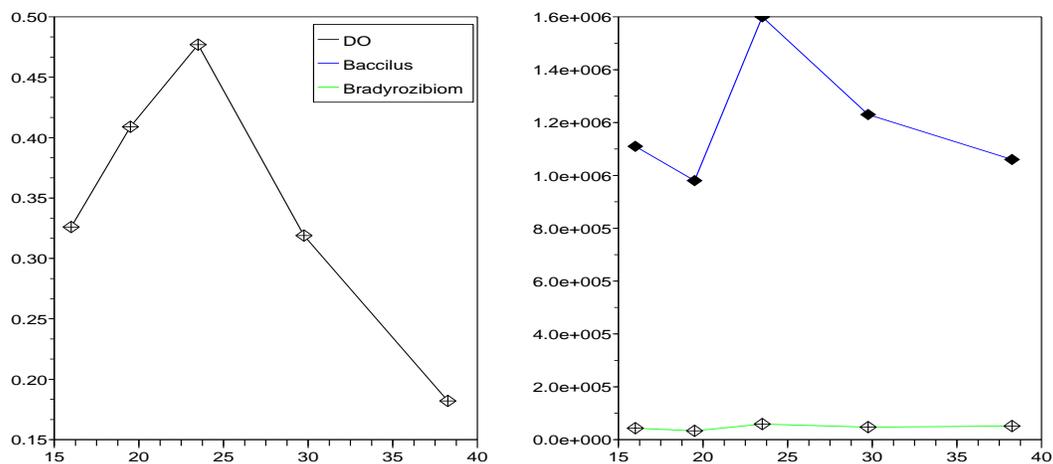


FIG. 2.9 – Les résultats qPCR pour Paenibacillus et Bradyrhizobium

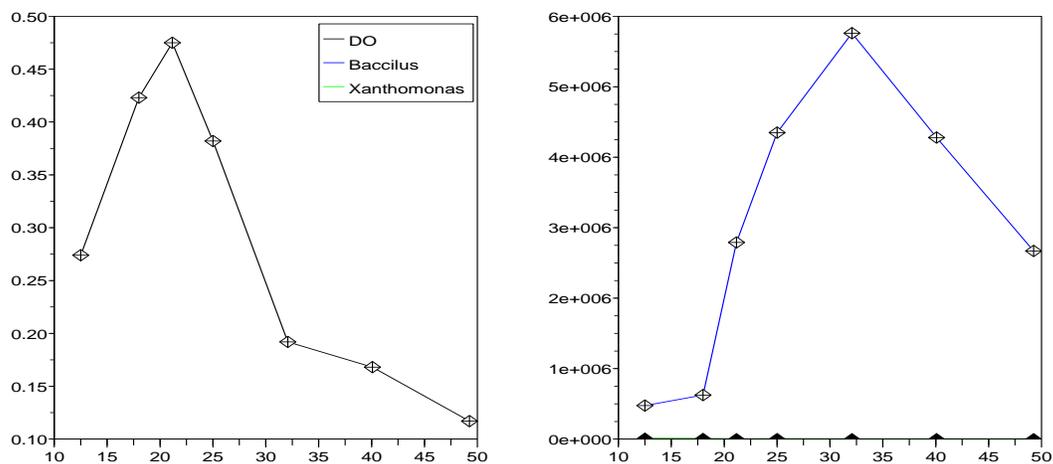


FIG. 2.10 – Les résultats qPCR pour Paenibacillus et Xanthomonas

proposés. Les modèles mathématiques qui ont été proposés sont basés sur une extension de celui de Monod, et visant décrire et prévoir la croissance microbienne sur un substrat limité essentiel dans les cultures pures en batch en revisitant la manière où la densité optique est modélisée. Ces modèles prennent en considération la croissance de cellules viables, la dégradation de substrat, la mortalité

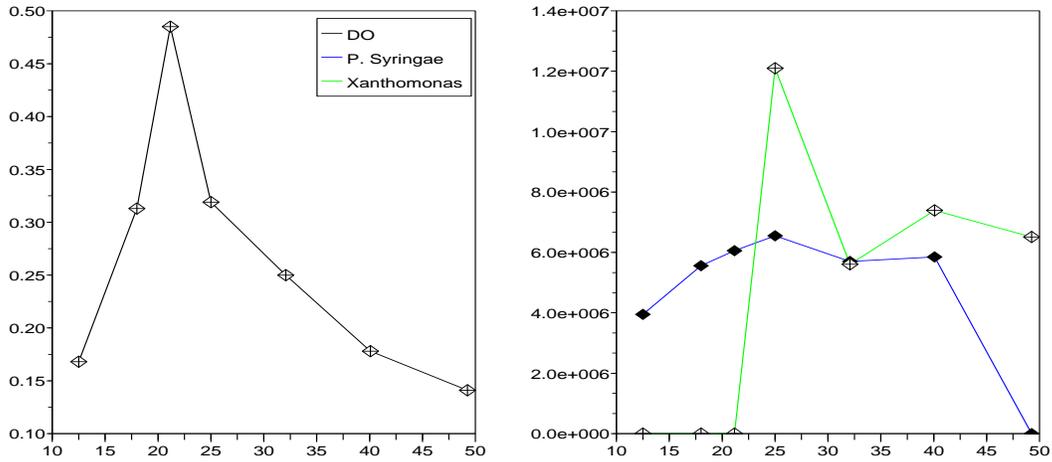


FIG. 2.11 – Les résultats qPCR pour P. Syringae et Xanthomonas

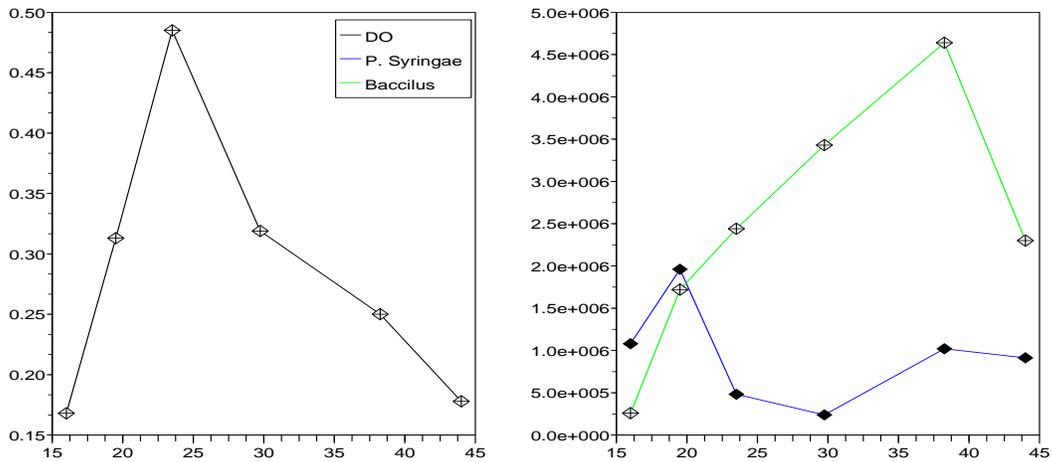


FIG. 2.12 – Les résultats qPCR pour P. Syringae et Bradyrhizobium

naturelle, l'accumulation de cellules non viables dans le milieu de culture et la recyclage partielle des cellules mortes en substrat. Ces modèle emploient l'information pauvre de densité optique en phase exponentielle pour prévoir le comportement pendant toutes les autres phases. La méthode de moindres carrés est employée pour identifier les paramètres du modèle. Le système est alors prolongé et validé