HAL open science

Application de la méthodologie scale-down à l'étude de l'effet du mélange sur la physiologie de Trichoderma reesei et ses performances de production d'enzymes

Tamiris Gonçalves Roque

To cite this version:

Tamiris Gonçalves Roque. Application de la méthodologie scale-down à l'étude de l'effet du mélange sur la physiologie de Trichoderma reesei et ses performances de production d'enzymes. Biotechnologie. Université Paris-Saclay, 2022. Français. NNT : 2022UPASB062 . tel-03945900

HAL Id: tel-03945900

https://pastel.hal.science/tel-03945900

Submitted on 18 Jan 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

université PARIS-SACLAY

Application de la méthodologie scale-down à l'étude de l'effet du mélange sur la physiologie de *Trichoderma reesei* et ses performances de production d'enzymes

Application of the scale-down methodology to study the effect of mixing on Trichoderma reesei physiology and enzyme production performance

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n° 581, Agriculture, alimentation, biologie, environnement, santé (ABIES)
Spécialité de doctorat : Biotechnologies
Graduate School : Biosphera. Référent : AgroParisTech

Thèse préparée dans l'unité de recherche **IFP Energies Nouvelles**, sous la direction de **Fadhel BEN CHAABANE**, Cadre Scientifique (HDR), la co-direction de **Catherine BEAL**, Professeure, le co-encadrement de **Frédéric AUGIER**, Cadre Scientifique (HDR)

Thèse soutenue à Rueil-Malmaison, le 07 décembre 2022, par

Tamiris GONÇALVES ROQUE

Composition du Jury

Membres du jury avec voix délibérative

Stéphane DELAUNAY Professeur, ENSAIA Nancy	Président
Carole MOLINA-JOUVE Professeure, INSA Toulouse	Rapporteur et Examinatrice
Eric OLMOS Professeur, Université de Lorraine	Rapporteur et Examinateur
Frédéric AUGIER Cadre scientifique (HDR), IFPEN (Université Paris-Saclay)	Invité

THESE DE DOCTORAT

NNT : 2022UPASB062

ÉCOLE DOCTORALE
Agriculture, alimentation, biologie, environnement, santé (ABIES)
université PARIS-SACLAY

Titre : Application de la méthodologie scale-down à l'étude de l'effet du mélange sur la physiologie de *Trichoderma reesei* et ses performances de production d'enzymes

Mots clés : *Trichoderma reesei*, Cellulases, Scale-down, Hétérogénéités, Stress hydrodynamique

Résumé : Les cellulases industrielles sont principalement produites par un champignon filamenteux aérobie, *Trichoderma reesei*, en raison de sa grande capacité de sécrétion. L'extrapolation du procédé de production de cellulases est une condition préalable pour que les procédés de production d'éthanol à partir de biomasse lignocellulosique soient viables. Cette extrapolation est cependant difficile car la morphologie filamenteuse induit une augmentation de la viscosité du milieu, ce qui conduit à des hétérogénéités spatiales et temporelles au sein de la culture, notamment en termes de concentration en oxygène dissous, affectant négativement la production d'enzymes. L'objectif de cette thèse est d'étudier les effets du mélange de la culture, en termes de stress hydrodynamique et de gradients en oxygène dissous, sur la physiologie et la capacité de production de cellulases par *T. reesei*. Afin de reproduire à l'échelle du laboratoire les contraintes rencontrées à l'échelle industrielle, la méthodologie scale-down a été employée. L'impact du cisaillement sur la production de cellulases a été étudié en mode continu, en employant deux niveaux de stress hydrodynamique. L'effet des gradients d'oxygène a été étudié en cultures fed-batch à l'aide de trois approches scale-down : deux systèmes Bizone, constitués de deux bioréacteurs reliés, le plus grand étant aéré, l'autre non (ou l'inverse pour le système Bizone inversé) et un bioréacteur unique sur lequel une variation dynamique de la pO_2 est appliquée. Les résultats montrent que les performances sont dégradées par l'anaérobiose. Toutefois, l'existence de petites bulles d'air, maintenues dans les milieux visqueux, évite que le milieu soit totalement anaérobie, ce qui limite l'effet délétère de l'absence d'oxygène.
L'application de périodes d'hypoxie a également permis de faire émerger un variant non producteur, qui induit une baisse importante des performances du bioprocédé. Enfin, le développement de modèles originaux a confirmé l'importance de la prise en compte du hold-up lié aux petites bulles d'air pour bien représenter le comportement de *T. reesei*. L'ensemble de ces travaux permet enfin de démontrer une certaine « robustesse » du champignon face au cisaillement et aux hétérogénéités susceptibles d'apparaître à l'échelle industrielle.

Title : Application of the scale-down methodology to study the effect of mixing on *Trichoderma reesei* physiology and enzyme production performance

Keywords : *Trichoderma reesei*, Cellulases, Scale-down, Heterogeneities, Fluid dynamic stress

Abstract : Industrial production process of cellulases involves the aerobic filamentous fungus *Trichoderma reesei*, as it displays a high secretion capacity. Scaling-up this process is a prerequisite to allow the ethanol production processes from lignocellulosic biomass to be economically viable. However, this scale-up is challenging because the filamentous morphology of the fungus increases the medium viscosity. This leads to spatial and temporal heterogeneities within the culture, especially in terms of dissolved oxygen concentration, which negatively affect the enzyme production. This thesis aimed at studying the effects of mixing, by considering fluid dynamic stress and dissolved oxygen gradients, on *T. reesei* physiology and ability to produce cellulases. The scale-down methodology was employed to reproduce at bench scale the constraints encountered in large scale bioreactors. The impact of fluid dynamic stress on cellulases production was considered in continuous mode, using two levels of fluid dynamic stress. Our results showed that the intracellular proteins synthesis and the cellulases production by *T. reesei* were both affected by high fluid dynamic stress, but in a oxygen gradients was studied in fed-batch cultures using three scale-down approaches: Two *Bizone* systems, consisting of two connected bioreactors, the biggest one being aerated and the smallest one not (or conversely) and a single bioreactor to which a dynamic variation of the pO_2 was applied. Cellulases production was reduced when the fungus encountered anaerobiosis. However, small bubbles included in the viscous medium helped maintaining a low level of dissolved oxygen, thus limiting the deleterious effect of anaerobiosis. Our work also highlighted the rise of a non-producing variant of *T. reesei* when the population faced hypoxia. This sub-population induced a strong reduction of the bioprocess performances. In addition, the development of original models highlighted the importance of considering the hold-up due to small bubbles, to properly describe *T. reesei* behavior. Finally, this work demonstrated the "robustness" of the fungus when it faces fluid dynamic stress and heterogeneities that are likely to appear at large scale.

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier mes directeurs de thèse. Catherine Béal, merci pour ta disponibilité, tes conseils avisés, ton intérêt et ton enthousiasme à chaque échange et chaque réunion. Merci pour ta bienveillance, ta pédagogie et d'être une source d'inspiration pour moi. Fadhel Ben Chaabane, tu étais mon encadrant de tous les jours et je voudrais te remercier pour ta disponibilité, ton optimisme, tes encouragements, nos échanges toujours positifs et constructifs et ta bonne humeur infaillible. Je souhaite également remercier Frédéric Augier, mon co-encadrant, qui s'est fait présent tout le long de ma thèse et qui m'a guidé dans le monde de la modélisation. Merci pour ta disponibilité, tout l'intérêt que tu as toujours porté à ma thèse, nos nombreux échanges et ton soutien.

Cela a été un honneur pour moi d'être encadrée par ce trio magnifique. Impossible de dire qui était le plus enthousiasmé lors de nos réunions. Il n'y a rien de plus motivant pour un doctorant que de ressentir cet intérêt vif et réel de ses encadrants à sa thèse, et cela a été le cas pour moi du début à la fin de cette belle aventure.

Un grand merci à Alvin Nienow qui nous a quitté il y a peu. Alvin était membre de mon comité de suivi de thèse et a toujours participé, avec grand enthousiasme, à toutes les réunions. *I wish you could read these words. Thank you for your wise advices, your good mood and your inspiring legacy in science. It was such an honnor for me to have you as member of my thesis committee*.

Merci à Etienne, qui était également membre de mon comité de thèse et qui m'a prodigué des conseils toujours très pertinents pendant la thèse.

Je voudrais également remercier Carole Molina-Jouve et Éric Olmos, d'avoir accepté de rapporter ce travail et de l'intérêt qu'ils y ont porté, ainsi que Stéphane Delaunay d'avoir présidé le jury de thèse.

Merci à Antoine Margeot, le directeur du département de Biotechnologies d'IFPEN, de m'avoir accueilli et cru en mon potentiel.

Je remercie Bernard Chaussepied, qui m'a tout appris sur les fermenteurs F2P et qui m'a aidé tant de fois à adapter les équipements pour mes expériences inusitées. Merci pour ta bonne humeur, ta gentillesse et la bonne musique dans le labo le plus heureux du département, notre bien aimé H351.

Céline Cohen, c'est toi qui m'as appris, de A à Z, comment utiliser les fermenteurs DASGIP. Tu m'as également présenté tous les équipements d'analyse et les différents logiciels. Merci pour ta disponibilité, ta patience et ton efficacité.

J'aimerai également remercier chaleureusement Frédérique Bidard-Michelot, qui m'a présenté le monde de la génétique et de l'épigénétique. Merci pour ta pédagogie, ta bienveillance et ta tendresse. Merci également à Thiziri Aouam qui m'a beaucoup aidé dans la partie d'analyse transcriptomique.

Je remercie Hélène Velly pour son aide à la difficile mission d'utiliser la cytométrie en flux pour l'analyse des spore de *Trichoderma*.

Merci à Jérôme Delettre de m'avoir aidé dans la partie d'analyse protéomique intracellulaire.

Je remercie les stagiaires Emilie Longuemare, Louis Salomé et Pedro Fernandes pour leur aide à mes différentes études. Merci également à l'ensemble des ingénieurs et techniciens du département de Biotechnologies.

Un immense merci à Gwladys Chartier, pour nos pauses papotage, qui étaient pour moi bien plus qu'un simple moment de détente, mais l'occasion d'échanger avec toi qui es cette personne merveilleuse. Tu n'as jamais cessé de m'encourager, que ce soit pour la thèse ou dans la vie personnel et j'en serai toujours reconnaissante.

Je remercie mes amis, en spécial Cintia, Maristela et Stephanie, des perles rares dans ma vie. Votre soutien infaillible m'a été précieux.

Merci à ma famille qui, depuis le Brésil, m'a toujours motivée à suivre mon chemin dans la recherche, même si la distance nous a fait pleurer plus d'une fois. Merci également à ma belle-famille qui m'a accueilli ici en France avec beaucoup d'amour et qui m'a toujours soutenu dans ce parcours.

Je remercie enfin mon mari Nicolas, mon partenaire dans la vie, qui est mon rocher. Tu as suivi chaque pas, chaque petit détaille de cette thèse, toujours très fiers de ton épouse doctorante. Merci de m'avoir accompagnée dans cette magnifique expérience qu'était le doctorat et merci d'être *meu companheirinho* dans la plus belle aventure de nos vies qui commence maintenant !

Table des matières

Liste des figures ..... *i*

Liste des tableaux ..... *iv*

Nomenclature et abréviations ..... *v*

Introduction *1*

I. Synthèse bibliographique *5*

I.1. Les biocarburants **5**

I.1.1. Les biocarburants de première génération 5
I.1.2. Les biocarburants de deuxième génération 6
I.1.3. Les biocarburants de troisième génération 7
I.1.4. Le bioéthanol de deuxième génération : intérêt et limites 7

I.2. La valorisation biochimique de la biomasse lignocellulosique pour la production de bioéthanol 2G **9**

I.3. Les cellulases : enzymes impliquées dans l'hydrolyse enzymatique de la biomasse lignocellulosique **10**

I.3.1. Composition de la biomasse cellulosique 10
I.3.2. Structure et activité des cellulases 11
I.3.3. Contrôle de l'activité des cellulases 13

I.4. *Trichoderma reesei* : le champignon filamenteux producteur de cellulases **14**

I.4.1. Mécanismes de développement 15
I.4.2. La sécrétion de cellulases par *T. reesei* 16

I.5. Le procédé de production de cellulases **17**

I.5.1. Cultures en milieu liquide de *T. reesei* 18
I.5.2. La morphologie complexe de *T. reesei* en cultures liquides et son impact sur le procédé de production de cellulases 20
I.5.3. Description du procédé selon le protocole IFPEN 22
I.5.4. Critères d'évaluation des performances des bioprocédés de production de cellulases 23

I.6. Scale-up, scale-down du procédé de production de cellulases **24**

I.6.1. Problématiques liées au scale-up du procédé 25
I.6.2. Effets du stress hydrodynamique lors le d'extrapolation du procédé 27
I.6.3. Effet des hétérogénéités dans les cultures à grande échelle et hétérogénéité de populations 28
I.6.4. La méthodologie scale-down pour répondre aux problématiques du scale-up 29

I.7. Synthèse des informations et stratégie d'étude **32**

II. Mise en œuvre de la méthodologie scale-down pour évaluer l'impact du cisaillement sur T. reesei *35*

II.1. Introduction **35**

II.2. Impact du stress hydrodynamique dans les bioréacteurs à cuve agitée sur la synthèse des cellulases par *Trichoderma reesei* aux niveaux intracellulaire et extracellulaire **36**

II.2.1. Introduction 37
II.2.2. Material and Methods 40
II.2.3. Results and Discussion 43
II.2.4. Conclusion 54

II.3. Conclusion **56**

III. Mise en œuvre de la méthodologie scale-down pour évaluer l'impact des gradients

d'oxygène sur T. reesei *57*

III.1. Introduction **57**

III.2. Matériels et Méthodes **58**
III.2.1. Souche 58
III.2.2. Milieux de culture et de préculture 58
III.2.3. Précultures 59
III.2.4. Cultures en bioréacteur 59
III.2.5. Méthodes analytiques 61
III.2.6. Détermination des rendements et des vitesses spécifiques 64

III.3. Développement d'un protocole expérimental pour l'étude des hétérogénéités en bioréacteurs **65**
III.3.1. Conditions de culture communes à tous les essais 65
III.3.2. Cultures Témoin 66
III.3.3. Systèmes Bizone et Bizone Inversé 66
III.3.4. Système de Variation dynamique de la pO_2 71

III.4. Résultats et discussion **73**
III.4.1. Système Bizone 73
III.4.2. Système Bizone Inversé 74
III.4.3. Système de variation dynamique de la pO_2 76
III.4.4. Comparaison des approches Bizone x Bizone Inversé 77
III.4.5. Comparaison des approches Bizone x Bizone Inversé x Variation dynamique de la pO_2 79
III.4.6. Discussion des résultats 81

III.5. Conclusions **84**

IV. Etude de l'effet des gradients d'oxygène sur l'hétérogénéité des populations en bioréacteurs Bizone *85*

IV.1. Introduction **85**

IV.2. Matériels et Méthodes **87**

IV.3. Identification du phénotype macroscopique des sous-populations présentes lors d'une culture de *T. reesei* TR3060 simulant des gradients d'oxygène **87**
IV.3.1. Isolement des colonies 87
IV.3.2. Analyse morphologique du phénotype des colonies 89
IV.3.3. Etude de la capacité de sécrétion de cellulases des sous-populations isolées 89
IV.3.4. Caractéristiques cinétiques des sous-populations isolées 90
IV.3.5. Analyse transcriptomique 93

IV.4. Résultats et discussion **94**
IV.4.1. Identification et quantification de deux phénotypes macroscopiques 94
IV.4.2. Analyse de la capacité de sécrétion de cellulases par les deux sous-populations identifiées 96
IV.4.3. Caractérisation des cinétiques des deux sous-populations 97
IV.4.4. Identification des gènes avec un différentiel d'expression entre les deux variants isolés 101

IV.5. Commentaires et discussion des résultats obtenus **106**

IV.6. Conclusions **108**

V. Modélisation des cinétiques de Trichoderma reesei lors de l'application de gradients d'oxygène selon différentes approches scale-down *111*

V.1. Introduction **111**

V.2. Modèle cinétique initialement développé par IFPEN **112**
V.2.1. Cinétique de production de biomasse 112
V.2.2. Cinétique de production de cellulases 113
V.2.3. Cinétique de consommation du substrat carboné 114

V.2.4. Cinétique de consommation d'oxygène 114
V.2.5. Valeurs des constantes biologiques de *T. reesei* prises en compte dans les modèles..... 114

V.3. Bilans matière pour les cultures classiques.....115
V.3.1. Ecriture des bilans matière 115
V.3.2. Confrontation des simulations obtenues aux résultats expérimentaux 117

V.4. Modélisation des cinétiques de *Trichoderma reesei* lors de l'application de gradients d'oxygène en phase de production 118
V.4.1. Réajustement des cinétiques apparentes..... 119
V.4.2. Bilans de matière selon les différentes approches scale-down utilisées 119

V.5. Résultats et discussion.....135
V.5.1. Simulations de l'approche bioréacteurs *Bizone* 135
V.5.2. Simulations de l'approche bioréacteurs *Bizone Inversé* 138
V.5.3. Simulations de l'approche bioréacteur unique avec *Variation Dynamique de la* pO_2..... 142
V.5.4. Analyses de sensibilité sur les variables KO_2p et αp..... 144

V.6. Conclusions.....148

VI. Discussion générale et perspectives 151

Références bibliographiques 158

Liste des figures

Figure I.1. Filières de production de bioéthanol de première génération 6
Figure I.2. Filières de production de bioéthanol de deuxième génération 7
Figure I.3. Représentation schématique du procédé de production de bioéthanol 2G 10
Figure I.4. Structure simplifiée de la fibre végétale insoluble. 11
Figure I.5. Structure d'un polymère de cellulose : la cellulose cristalline est différenciée de la cellulose amorphe. 12
Figure I.6. Branchement apical et latéral d'une hyphe 15
Figure I.7. Représentation schématique des voies de synthèse et de sécrétion 16
Figure I.8. Schéma d'un bioréacteur de laboratoire modifiée. 17
Figure I.9. Les morphologies typiques des champignons filamenteux en cultures liquides. 21
Figure I.10. Viscosité apparente dynamique en fonction du taux de cisaillement pour les échantillons de culture de *T. reesei*. 21
Figure I.11. Courbes de croissance caractérisant pour deux cultures de *T. reesei* réalisées en mode batch en appliquant deux conditions d'agitation : 800 rpm et 1700 rpm 22
Figure I.12. Représentation schématique du protocole IFPEN pour la production de cellulases 23
Figure I.13. Représentation schématique des interrelations entre les processus d'un bioprocédé en milieu visqueux. 28
Figure I.14. Procédure scale-up/scale-down pour les procédés biotechnologiques. 29
Figure I.15. Approches scale-down utilisées pour simuler des gradients d'oxygène. 30
Figure II.1. Biomass and protein concentrations during continuous culture agitated by a Rayneri centripetal turbine impeller at initially 800 rpm increasing to 1700 rpm 44
Figure II.2. Proteomic analysis of *T. reesei* cells: A) 800 rpm (EDCFεmax 1884 $kW.m^{-3}.s^{-1}$); B) 1700 rpm (EDCFεmax 38400 $kW.m^{-3}.s^{-1}$) 55
Figure III.1. Photo d'un mobile d'agitation de type Rayneri 60
Figure III.2. Schéma représentatif de l'expérience *Bizone* 68
Figure III.3. Photo représentant les deux bioréacteurs couplés dans la configuration *Bizone* 69
Figure III.4. Schéma représentatif de l'expérience *Bizone Inversé*. 70
Figure III.5. Schéma représentatif du système de *Variation dynamique de la* pO_2. 72
Figure III.6. Oscillations cycliques de la concentration en oxygène dissous lors de l'expérience en système de *Variation Dynamique de la* pO_2. 73
Figure III.7. Cinétiques de croissance et de production de protéines pour les cultures en mode Bizone par rapport aux cultures Témoin. 74
Figure III.8. Comparaison du taux de production moyen (q_p) et du rendement de conversion de lactose en protéines ($Y_{p/L}$ ou $Y_{P/S}$) pour les cultures Témoin et les cultures en mode Bizone 74
Figure III.9. Cinétiques de croissance et de production de protéines pour les cultures en mode Bizone Inversé par rapport aux cultures Témoin 75
Figure III.10. Comparaison du taux de production moyen (q_p) et du rendement de conversion de lactose en protéines (Y p/L) pour les cultures Témoin et les cultures en mode Bizone Inversé 75
Figure III.11. Cinétiques de croissance et de production de protéines pour les cultures en mode de variation dynamique de la pO_2 par rapport aux cultures Témoin. 76
Figure III.12. Comparaison du taux de production moyen (q_p) et du rendement de conversion de lactose en protéines ($Y_{P/S}$) pour les cultures Témoin et les cultures en mode *Variation Dynamique*. 77

Figure.III.13. Comparaison des cinétiques de croissance et de production de protéines pour les cultures en mode Bizone et Bizone Inversé par rapport aux cultures Témoin 78
Figure III.14. Comparaison du taux de production moyen (q_p) et du rendement de conversion de lactose en protéines ($Y_{P/L}$ ou $Y_{P/S}$) pour les cultures en mode Bizone, Bizone Inversé et les cultures Témoin. 78
Figure.III.15. Comparaison des cinétiques de croissance et de production de protéines pour les cultures en mode Bizone, en mode Bizone Inversé et en système de variation dynamique de la pO_2 80
Figure III.16. Comparaison du taux de production moyen (q_p) et du rendement de conversion de lactose en protéines ($Y_{P/L}$ ou $Y_{P/S}$) pour les cultures en mode Bizone, en mode Bizone Inversé et en mode de Variation Dynamique de la pO_2 80
Figure III.17. Photo d'une culture agitée et aérée de *T. reesei* TR3060 en fed-batch conventionnel montrant l'aspect du moût de fermentation expansé 83
Figure IV.1. Evolution de la concentration en cellulases lors de la phase fed-batch d'une culture de *T. reesei* TR3060 conduite en bioréacteur Bizone. 87
Figure IV.2. Illustration des étapes d'isolement et d'identification des différents phénotypes macroscopiques observés lors de cultures de *T. reesei* TR3060. 88
Figure IV.3. Photo d'un bioréacteur agité Dasgip de 1,5 L, équipé de deux mobiles d'agitation (de type Rushton et oreille d'éléphant) 91
Figure IV.4. Phénotype macroscopique de la souche TR3060 en milieu PDA après incubation à 30°C pendant 5 jours. 94
Figure IV.5. Morphologie des phénotypes TR3060-P et TR3060-G en milieu PDA après incubation à 30°C pendant 5 jours. 95
Figure IV.6. Résultat des dosages de cellulases dans des cultures liquides en microplaque réalisées à 30°C, 150 rpm pendant 7 jours, avec à la souche industrielle TR3060, 7 clones du variants TR3060-P et 7 clones TR3060-G. 96
Figure IV.7. Photos des cultures des variants TR3060 P et TR3060 G en fed-batch alimenté avec du lactose pur. 98
Figure IV.8. Cinétiques de production de biomasse (A) et de cellulases (B) et de consommation de lactose (C) et de glucose (D) lors des cultures PL1 et PL2 réalisées avec des clones de la souche TR3060-P et lors des cultures GL1 et GL2 réalisées avec des clones de la souche TR3060-G. 99
Figure IV.9. Cinétiques de production de biomasse (A) et de cellulases (B) et de consommation de lactose (C) et de glucose (D) lors des cultures PGL1 et PGL2 réalisées avec des clones de la souche TR3060-P et lors des cultures GGL1 et GGL2 réalisées avec des clones de la souche TR3060-G. 100
Figure IV.10. Représentation des comparaisons d'expression réalisées dans cette étude. 102
Figure IV.11. A : Gènes montrant un différentiel d'expression (DE) entre les 2 variants, dans les deux conditions d'alimentation. 103
Figure V.1. Cinétique de croissance et de production de protéines pour une culture de *T. reesei*. 118
Figure V.2. Représentation schématique des débits d'entrée et de sortie de gaz pour les expériences de type Bizone et Bizone Inversé. 120
Figure V.3. Variation de la concentration saturante en oxygène dissous $[O_{2\,sat}]$ pendant 1 cycle de 24 min 128
Figure V.4. Simulation de la croissance et de la production de protéines par *T. reesei* selon l'approche Bizone pour une culture dont q_{pmax}=0,025 $gP.gX^{-1}.h^{-1}$ et KO_2p= 0,0005 $gO_2.L^{-1}$, avec $\alpha pr1 = 0$ et $\alpha pr2 = 0$. 136
Figure V.5. Simulation de la croissance et de la production de protéines par *T. reesei* selon l'approche Bizone pour une culture dont q_{pmax}=0,025 $gP.gX^{-1}.h^{-1}$ et KO_2p= 0,0005 $gO_2.L^{-1}$, avec $\alpha pr1 = 15\ \%$ et $\alpha pr2 = 27\ \%$. 137
Figure V.6. Comparaison des résultats obtenus en configuration Bizone. 137

Figure V.7. Simulation de la croissance et de la production de protéines par *T. reesei* selon l'approche Bizone Inversé pour une culture dont q_{pmax}=0,025 gP.gX^{-1}.h^{-1} et KO_2p= 0,0005 gO_2.L^{-1}, avec $\alpha pr1 = 0$ et $\alpha pr2 = 0$. 138
Figure V.8. Simulations de la croissance et de la production de protéines par *T. reesei* selon l'approche Bizone Inversé pour une culture dont q_{pmax}=0,025 gP.gX^{-1}.h^{-1} et KO_2p= 0,0005 gO_2.L^{-1} pour tester l'effet de différents $\alpha pr1$ (20 %, 25 % et 30 %). 139
Figure V.9. Simulation de la croissance et de la production de protéines par *T. reesei* selon l'approche Bizone Inversé pour une culture dont q_{pmax}=0,025 gP.gX^{-1}.h^{-1} et KO_2p= 0,0005 gO_2.L^{-1}, avec $\alpha pr1 = 27$ % et $\alpha pr2 = 15$ %. 140
Figure V.10. Comparaison des résultats obtenus en configuration Bizone Inversé. 141
Figure V.11. Simulation de la croissance et de la production de protéines par *T. reesei* selon l'approche Variation Dynamique de la pO_2 pour une culture dont q_{pmax}=0,025 gP.gX^{-1}.h^{-1} et KO_2p= 0,0005 gO_2.L^{-1}, avec $\alpha pr1$ nul. 142
Figure V.12. Simulation de la croissance et de la production de protéines par *T. reesei* selon l'approche Variation Dynamique de la pO_2 pour une culture dont q_{pmax}=0,025 gP.gX^{-1}.h^{-1} et KO_2p= 0,0005 gO_2.L^{-1}, avec $\alpha pr1 = 15$ %. 143
Figure V.13. Comparaison des résultats obtenus en configuration *Variation Dynamique de la* pO_2. 144
Figure V.14. Analyse de sensibilité sur $KO2p$ pour les approches Bizone, Bizone Inversé et Variation Dynamique de la pO_2. 145
Figure V.15. Analyse d'incertitude sur αp pour les 3 modèles (Bizone, Bizone Inversé et Variation Dynamique de la pO_2). 147

Liste des tableaux

Tableau I.1. Classification biologique de *Trichoderma reesei*....14
Tableau I.2. Valeurs des taux de croissance μmax et des rendements de croissance $Y_{X/S}$ mesurés lors de cultures de *T. reesei* sur différents substrats....20
Tableau I.3. Valeurs des vitesses spécifiques de production de cellulases q_p et des rendements de conversion de substrat en cellulases $Y_{P/S}$ lors de cultures de *T. reesei* 20
Tableau I.4. Interdépendance des paramètres scale-up. 26
Tableau I.5. Effet du scale-up en fonction des critères maintenus constant, pour des bioréacteurs de géométrie identique, un facteur d'échelle de 10 et un régime d'écoulement turbulent. 26
Table II.1. Measured values of culture parameters and associated p-values at the two different speeds and $EDCF_{\varepsilon max}$ values....45
Table II.2. Proteins newly-synthesized by the increase from 800 to 1700 rpm ($EDCF_{\varepsilon max}$ 1884 and 38,400 $kW.m^{-3}.s^{-1}$ respectively) 47
Table II.3. Proteins over-synthesized from the increase from 800to 1700 rpm ($EDCF_{\varepsilon max}$ 1884 and 38,400 $kW.m^{-3}.s^{-1}$ respectively) 48
Table II.4. Proteins under-synthesized by the increase from 800 rpm to 1700 rpm ($EDCF_{\varepsilon max}$ 1884 and 38,400 $kW.m^{-3}.s^{-1}$ respectively)....49
Table II.5. Comparison of the three different culture conditions and results obtained in this overall wide ranging study....53
Tableau.III.1. Composition du milieu 4N (milieu de culture IFP Energies Nouvelles pour *T. reesei)* 58
Tableau.III.2. Composition de la solution d'oligoéléments 58
Tableau.III.3. Bilans de matière caractérisant les cultures de *T. reesei* et calcul des rendements et des vitesses spécifiques. 64
Tableau III.4. Caractéristiques des bioréacteurs R1 et R2 pour les expériences en système Bizone....68
Tableau III.5. Caractéristiques des bioréacteurs R1 et R2 pour les expériences en système Bizone Inversé .70
Tableau III.6. Comparaison des approches utilisées pour simuler les gradients d'oxygène lors de cultures de *T. reesei* TR3060 79
Tableau IV.1. Composition de la solution de CTS50....89
Tableau IV.2. Composition du milieu inducteur F45 90
Tableau IV.3. Composition de la solution d'éléments traces 1000X 90
Tableau IV.4. Quantification des colonies TR3060-P et TR3060-G dans les conditions N3 et N11....95
Tableau IV.5. Résumé des conditions des cultures réalisées en bioréacteur pour caractériser les cinétiques des phénotypes TR3060-P et TR3060-G 97
Tableau V.1. Valeurs des paramètres des modèles pour *T. reesei* TR3060 115
Tableau V.2. Valeurs des débits d'injection de gaz dans les bioréacteurs 121
Tableau V.3. Valeurs des débits d'évaporation $Qevp$ calculés....121
Tableau V.4. Valeurs mesurées de $Q_{r\,1-2}$ et $Q_{r\,2-1}$ et résultats calculés de $Q_{rg\,1-2}$ et $Q_{rg\,2-1}$ 127
Tableau V.5. Paramètres corrélés aux conditions d'opération pour les approches *Bizone* et *Bizone Inversé*. Valeurs calculées à partir des débits $Q_{air\,in_r1}$ et $Q_{air\,in_r2}$ du Tableau V.2 129
Tableau V.6. Valeurs des constantes retenues pour l'équation V.68....133
Tableau V.7. Paramètres liés à la configuration des bioréacteurs 133
Tableau V.8. Valeurs calculées de k_La et hold-up pour les deux types de bioréacteurs 134
Tableau V.9. Valeurs calculées de K_La et αb et valeurs mesurées de αp pour chaque approche de simulation des gradients d'oxygène....134

Nomenclature et abréviations

C_{in} ($g.L^{-1}$) : Concentration en entrée du composé considéré

C_{out} ($g.L^{-1}$) : Concentration en sortie du composé considéré

C_L ($mg.L^{-1}$) : Concentration en oxygène (dans le liquide)

C_L^* ($mg.L^{-1}$) : Concentration en oxygène à saturation (dans le liquide)

Cont : continu (utilisé en indice)

D (h^{-1}) : Taux de dilution

D (m) : Diamètre du mobile d'agitation

DE (sans unité) : Différentiel d'expression

dO_2 (%) : Concentration en oxygène dissous (en % de la concentration saturante à température ambiante)

EDCF ($W.m^{-3}.s^{-1}$) : *Energy Dissipation Circulation Function* (en anglais) correspond à la dissipation d'énergie divisée par le temps de circulation

$EDCF_{\varepsilon max}$ ($W.m^{-3}.s^{-1}$) : Valeur de l'EDCF basée sur la dissipation maximale d'énergie divisée par le temps de circulation

F ($L.\ h^{-1}$) : Débit volumique d'alimentation du bioréacteur lors de la phase fed-batch

Fb : fed-batch (utilisé en indice)

Fl (sans dimension) : Nombre de débit du mobile d'agitation

f_{o2} (-) : Fraction molaire d'oxygène en phase gaz

GH : Glycoside hydrolase

$H_{a,in}$ (-) : Humidité absolue entrant

$H_{a,out}$ (-) : Humidité absolue sortant

i : indice du composé

[i] ($g.L^{-1}$) : Concentration en composé i

IP (sans dimension) : pH isoélectrique

K ($Pa.s^n$) : Indice de consistance dans le modèle rhéologique

K_H ($mol.L^{-1}.atm^{-1}$) : Constante de Henry de l'oxygène

K_La (h^{-1}) : Coefficient volumique de transfert d'oxygène

K_{isp} ($g.L^{-1}$) : Constante d'inhibition de la production par le substrat

K_{ixp} ($g.L^{-1}$) : Constante d'inhibition de la production par la biomasse

K_{O2m} ($g.L^{-1}$) : Constante de saturation de l'oxygène en maintenance

K_{O2p} ($g.L^{-1}$) : Constante de saturation de l'oxygène en production

$K_{O2\mu}$ ($g.L^{-1}$) : Constante de saturation de l'oxygène en croissance

K_{sp} ($g.L^{-1}$) : Constante de saturation de substrat en production

K_{sm} ($g.L^{-1}$) : Constante de saturation de substrat en maintenance

$K_{s\mu}$ ($g.L^{-1}$) : Constante de saturation de substrat en croissance

MM_{o2} ($g.mol^{-1}$) : Masse molaire de l'oxygène

m_i (g) : Masse du composant i

m_s ($g_s.g_x.L^{-1}$) : Consommation de substrat liée à la maintenance des cellules

$m_{s\ max}$ ($g_s.g_x.L^{-1}$) : Consommation maximale de substrat liée à la maintenance des cellules

MW (kDa) : *Molecular weight* (en anglais) soit masse molaire

n : indice d'écoulement

N (rpm) : Vitesse de rotation du mobile d'agitation

N_p (sans dimension) : Nombre de puissance du mobile d'agitation

OUR ($g.L^{-1}.h^{-1}$) : *Oxygen Uptake Rate* (en anglais) correspond à la vitesse de consommation d'oxygène

OTR ($g.L^{-1}.h^{-1}$) : *Oxygen Transfert Rate* (en anglais) correspond à la vitesse de transfert d'oxygène

$[O_{2L}]$ ($g.L^{-1}$) : Concentration en oxygène dissous

$[O_{2p}]$ ($g.L^{-1}$) : Concentration en oxygène dans les petites bulles

$[O_{2sat}]$ ($g.L^{-1}$) : Concentration saturante en oxygène dissous

P ($g_P.kg^{-1}$) : Concentration en protéines ou Pression (atm)

P (W) : Puissance d'agitation

P_a (W) : Puissance d'agitation liée à l'aération

P_i (atm) : Pression partielle du composé i

P_u (W) : Puissance d'agitation sans aération

pO_2 (%) : Rapport de la concentration en oxygène dissous dans le milieu à un instant donné (C_L en $mg.L^{-1}$) sur la concentration saturante en oxygène (C_L^* en $mg.L^{-1}$)

P/V ($kW.m^{-3}$) : Puissance dissipée volumique

Q ($L.h^{-1}$) : Débit liquide

Q_{base} ($L.h^{-1}$) : Débit d'ammoniac introduit

$Qgaz$ ($L.h^{-1}$) : Débit gaz

q_{CO2} ($g_{CO2}.g_X^{-1}.h^{-1}$) : Vitesse spécifique de production de CO_2

Q_{evp} ($L.h^{-1}$) : Débit dévaporation exprimé en litres de liquide

Q_{fb} ($L.h^{-1}$) : Débit de fed batch

$Q_{gaz,in}$ ($L.h^{-1}$) : Débit de gaz entrant

$Q_{gaz,out}$ ($L.h^{-1}$) : Débit de gaz sortant

q_{O2} ($g_{O2}.g_X^{-1}.h^{-1}$ ou g_{O2} $kg_X^{-1}.h^{-1}$) : Vitesse spécifique de consommation d'O_2

q_P ($g_P.g_X^{-1}.h^{-1}$ ou $g_P.kg_X^{-1}.h^{-1}$) : Vitesse spécifique de production de protéines

q_{Pmax} ($g_P.g_X^{-1}.h^{-1}$ ou $g_P.kg_X^{-1}.h^{-1}$) : Vitesse spécifique maximale de production de protéines

q_{Pmin} ($g_P.g_X^{-1}.h^{-1}$ ou $g_P.kg_X^{-1}.h^{-1}$) : Vitesse spécifique minimale de production de protéines

$Q_{r\ i\text{-}j}$ ($L.h^{-1}$) : Débit de recirculation du liquide du réacteur i vers le réacteur j

q_S ($g_S.g_X^{-1}.h^{-1}$ ou $g_S.kg_X^{-1}.h^{-1}$) : Vitesse spécifique de consommation de substrat

$Q_{sout_R_n}$ ($L.\ h^{-1}$) : Débit de soutirage du bioréacteur R_n, avec $n = 1$ pour le réacteur R1 et $n = 2$ pour le réacteur R2.

r_{CO2} ($g_{CO2}.L^{-1}.h^{-1}$) : Vitesse volumique de production de CO_2

r_{O2} ($g_{O2}.L^{-1}.h^{-1}$) : Vitesse volumique de consommation d'O_2

r_P ($g_P.L^{-1}.h^{-1}$) : Vitesse volumique de production de protéines

r_S ($g_S.L^{-1}.h^{-1}$) : Vitesse volumique de consommation de substrat carboné

r_X ($g_X.L^{-1}.h^{-1}$) : Vitesse volumique de production de biomasse (cellules)

RPD (-) : Relative Power Demand ou Perte de puissance liée à l'aération

rpm (min^{-1}) : nombre de rotations par minutes

S ($g_S.L^{-1}$) : Concentration en substrat carboné dans le réacteur

S_{in} ($g_S.L^{-1}$) : Concentration en substrat carboné dans l'alimentation du réacteur

SHF : *Separate hydrolysis and fermentation* (en anglais), correspond à un procédé dans lequel l'hydrolyse enzymatique et la fermentation sont réalisées séparément, dans des réacteurs disctincts

SSF : *Simultaneous saccharification and fermentation* (en anglais), correspond à un procédé dans lequel l'hydrolyse enzymatique et la fermentation sont réalisées simultanément, dans le même réacteur)

t (s ou h) : temps

T (m) : Diamètre du fermenteur

tc (s) : Temps de circulation

t_{r_moyen} (min) : Temps de séjour moyen dans le bioréacteur

r_i : Indice du réacteur i

V (L ou m^3) : volume de milieu

V_L (L) : Volume du liquide

$V_{L_R_n}$ (L) : Volume de liquide du bioréacteur R_n, avec $n = 1$ pour le réacteur R1 et $n = 2$ pour le réacteur R2.

V_p (L) : Volume des petites bulles

V_{sg} ($m.s^{-1}$) : Vitesse superficielle du gaz

Vtip ($m.s^{-1}$) : Vitesse en bout de pale

Vvm ($L.L^{-1}.min^{-1}$) : Débit d'air par volume de milieu par minute

x : Rapport entre le diamètre du mobile d'agitation et le diamètre du vortex

X ($g_X.kg^{-1}$) : Concentration en biomasse

$Y_{X/S}$ ($g_X.g_S^{-1}$) : Rendement de production de biomasse par rapport au substrat consommé

$Y_{X/O2}$ ($g_X.g_S^{-1}$) : Rendement de production de biomasse par rapport à l'oxygène consommé

$Y_{O2/S}$ ($g_{O2}.g_S^{-1}$) : Rendement de consommation d'oxygène rapporté au substrat consommé

$Y_{P/S}$ ($g_P.g_S^{-1}$) : Rendement de production de cellulases par rapport au substrat consommé

$Y_{P/X}$ ($g_P.g_X^{-1}$) : Rendement de production de cellulases par rapport à la biomasse

$Y_{P/O2}$ ($g_P.g_{O2}^{-1}$) : Rendement de production de cellulases par rapport à l'oxygène consommé

A ou αG (%) : Hold-up de la dispersion gaz-liquide

αp (%) : Holdup-up de petites bulles

αb (%) : Hold-up de la dispersion gaz-liquide lié aux grosses bulles

αL (%) : Fraction volumique du liquide.

ΔQ_v ($L.h^{-1}$) : Variation de volume liquide en fonction du temps

ε_{max} ($W.m^{-3}$) : Vitesse spécifique maximale de dissipation d'énergie locale

$\dot{\gamma}$ (s^{-1}) : Cisaillement

μ (h^{-1}) : Taux de croissance spécifique

μ_{app} (Pa.s) : Viscosité apparente du milieu

μ_{max} (h^{-1}) : Taux de croissance spécifique maximal

ρ ($kg.m^{-3}$) : Masse volumique du liquide

ρ_L ($kg.m^{-3}$) : Masse volumique du liquide non-aéré

ρ_D ($kg.m^{-3}$) : Masse volumique de la dispersion gaz-liquide en conditions aérées

θm (s) : Temps de mélange

Introduction

La prise en compte des enjeux environnementaux dans notre société devient indispensable, au regard des conséquences du changement climatique (hausse des températures, accroissement des épisodes de sécheresse et des épisodes météorologiques extrêmes). Selon le dernier rapport du GIEC, la raison majeure de ce changement est liée à l'augmentation des émissions de gaz à effet de serre (GES) qui affectent notre atmosphère, mais aussi les océans, les calottes glaciaires et la biosphère… avec des conséquences sur la biodiversité, la disponibilité de l'eau, les risques sanitaires et à terme, des conséquences économiques (IPCC, 2022). La réduction des émissions de GES est donc incontournable et urgente aujourd'hui. Différentes stratégies sont étudiées ou déjà adoptées, visant l'utilisation d'une énergie moins carbonée voire décarbonée : remplacement des énergies fossiles, captage de CO_2, limitation des émissions de méthane, réduction de la demande énergétique, dans le but de limiter le réchauffement climatique de 1,5 °C par rapport à l'ère préindustrielle, comme acté lors de l'Accord de Paris en 2015.

Parmi les différentes stratégies mises en œuvre pour lutter contre le changement climatique, les biocarburants, et plus spécifiquement l'éthanol lignocellulosique dit de deuxième génération, représentent une alternative prometteuse pour un usage dans les transports. Cependant, les procédés de production d'éthanol 2G sont encore peu développés, principalement à cause des difficultés liées au traitement de la matière première lignocellulosique (Kumar et al., 2008). Un des principaux verrous porte sur la production d'enzymes cellulases, nécessaires à l'hydrolyse enzymatique de la cellulose afin de rendre les sucres fermentescibles. Ces enzymes sont naturellement produites par des microorganismes, notamment par le champignon filamenteux *Trichoderma reesei*, qui présente une forte capacité sécrétoire et permet d'attendre des concentrations élevées en fin de culture (Hardy, 2016).

Toutefois, la culture du champignon *T. reesei* engendre des contraintes spécifiques, liées au fait qu'en se développant, il génère des filaments organisés en structures tridimensionnelles complexes. Ces structures sont sensibles au cisaillement et accroissent la viscosité du milieu de production, dégradant en conséquence le temps de mélange et le transfert d'oxygène (Gabelle et al., 2012). En même temps, ce champignon étant aérobie, il faut aérer et agiter le milieu en permanence pour satisfaire ses besoins en oxygène. Or, plus le milieu est concentré en biomasse, plus il demande d'oxygène mais plus le transfert se dégrade du fait de l'augmentation de viscosité, et donc plus l'agitation doit être augmentée. Cependant, l'accroissement de l'agitation

s'accompagne d'un excès de cisaillement qui risque d'endommager le champignon et de dégrader la production d'enzymes.

La difficulté à mélanger le moût fermentaire visqueux, notamment dans les bioréacteurs industriels (dont les volumes peuvent atteindre quelques dizaines à quelques centaines de m^3), et à transférer l'oxygène de manière uniforme génère potentiellement des variations spatiales et temporelles des concentrations en oxygène dissous, en nutriments et du pH. Ces hétérogénéités de concentrations sont négligeables à l'échelle du laboratoire du fait des temps de mélange faibles en comparaison des vitesses de consommation des substrats, mais elles ne le sont plus à l'échelle industrielle, où le temps de mélange peut se compter en minutes. La prédiction des performances du champignon en conditions de production réelles (à grande échelle), nécessite donc de caractériser les effets de ces hétérogénéités sur la physiologie de *T. reesei* et ses performances.

A côté des techniques classiques d'extrapolation (*scale-up,* en anglais), les techniques de réduction d'échelle (*scale-down*, en anglais) sont un moyen de reproduire à l'échelle du laboratoire, l'environnement hydrodynamique et nutritionnel qui sera subi par les microorganismes à l'échelle industrielle, et d'évaluer ses implications pour l'économie du procédé. Cette dernière considération est particulièrement importante car la production de cellulases bon marché est nécessaire pour réduire les coûts de production du bioéthanol de deuxième génération (Hardy, 2016). Les méthodes de *scale-down* nécessitent cependant le développement et l'utilisation d'outils et de modèles pour évaluer leur pertinence à prédire le comportement du champignon en grands bioréacteurs, notamment en termes de conditions hydrodynamiques, de cisaillement, et d'hétérogénéités.

La thèse présentée dans ce manuscrit vise à **mieux comprendre et évaluer l'impact du changement d'échelle sur la production d'enzymes par *T. reesei*, grâce à une étude du cisaillement puis des hétérogénéités dans les bioréacteurs**. Elle s'inscrit dans une dynamique de recherche forte à l'IFPEN autour des bioprocédés mettant en œuvre *T. reesei* pour la production de cellulases, qui s'est déjà concrétisée par 4 thèses antérieures sur des sujets complémentaires : Etienne Jourdier (2012) sur la modélisation et l'optimisation de la production de cellulases, Jean-Christophe Gabelle (2012) sur l'étude de l'hydrodynamique et du transfert de matière des milieux visqueux, Nicolas Hardy (2016) sur l'impact du cisaillement sur la croissance et la production de cellulases de *T. reesei* et Vincenzo Capello (2020) sur la prédiction des hétérogénéités dans les bioréacteurs par modélisation CFD.

La stratégie retenue consiste à développer, à l'échelle du laboratoire, des dispositifs expérimentaux permettant de reproduire d'une part, des contraintes hydrodynamiques représentatives des conditions de fonctionnement des bioréacteurs industriels et d'autre part, de

simuler les hétérogénéités rencontrées par le champignon dans ces bioréacteurs. A l'aide de ces dispositifs, des gradients d'oxygène peuvent être simulés, afin de comprendre leurs effets sur la physiologie de *T. reesei* et sa capacité à produire des cellulases. Les hétérogénéités de population, conséquence de l'application de ces gradients d'oxygène, méritent également d'être caractérisées. Enfin, la thèse s'intéresse au développement d'un modèle capable de prédire la cinétique de production des cellulases lorsque le champignon est exposé à des hétérogénéités.

Ce manuscrit est structuré en cinq chapitres. Le **premier chapitre** est consacré à une synthèse bibliographique sur les enjeux et la production de bioéthanol, notamment de deuxième génération, sur les cellulases et leur production, sur le champignon *Trichoderma reesei*, producteur de cellulases et sur les méthodologies de changement d'échelles dans les bioprocédés.

Le **second chapitre** de la thèse est dédié à l'étude de la mise en œuvre de la méthodologie scale-down pour évaluer l'impact du cisaillement sur *T. reesei*. Il décrit les méthodes mises en œuvre et les résultats obtenus, sous la forme d'un article scientifique, publié dans *Chemical Engineering Science* dans en 2021.

Le **troisième chapitre** de ce manuscrit présente les travaux réalisés en vue de mettre en œuvre la méthodologie scale-down pour évaluer l'impact des gradients d'oxygène sur *T. reesei*. Il s'appuie sur le développement de trois configurations expérimentales visant à reproduire, à petite échelle, les hétérogénéités rencontrées à échelle industrielle, et à étudier leurs effets sur la croissance de *T. reesei* et sa capacité à produire les cellulases.

Dans le **quatrième chapitre**, l'effet des gradients d'oxygène sur l'hétérogénéité des populations en bioréacteurs Bizone est analysé. Les sous-populations de *T. reesei* identifiées sont ainsi caractérisées au niveau de leur transcriptome et de leurs performances en bioprocédés.

Enfin, le **cinquième et dernier chapitre** de la thèse s'intéresse à la modélisation des cinétiques de *T. reesei* lors de l'application de gradients d'oxygène. Le modèle développé est appliqué aux différentes configurations de bioréacteurs Bizone et les simulations sont comparées aux résultats expérimentaux en termes de production de cellulases, avec une prise en compte du transport d'oxygène par les petites bulles piégées dans le liquide.

Une **discussion générale et des perspectives** concluent finalement ce manuscrit.

I. Synthèse bibliographique

I.1. Les biocarburants

Compte tenu de la demande énergétique actuelle et des impacts environnementaux causés par les émissions de gaz à effet de serre (GES), il est essentiel de développer, d'améliorer et d'investir dans les énergies renouvelables. Actuellement, le transport est le secteur qui contribue le plus aux émissions de GES, représentant ainsi un total de 28,8% des émissions de CO_2 en France (Ministère de la transition écologique, 2019) et d'au moins 23% des émissions mondiales de CO_2 (Morales et al., 2015).

Les biocarburants sont des carburants obtenus à partir de la biomasse, matière organique d'origine végétale, animale ou issue de déchets, et représentent donc une ressource énergétique alternative et renouvelable. Leur incorporation dans les carburants d'origine fossile a comme principaux objectifs de « réduire l'émission de gaz à effet de serre, anticiper l'épuisement des réserves mondiales de pétrole, réduire la dépendance énergétique pétrolière, offrir un débouché supplémentaire aux filières agricoles et créer une filière de valorisation des déchets » (Ministère de la transition écologique, 2020). Il existe, aujourd'hui, trois générations de biocarburants, classées selon l'origine de la biomasse utilisée comme matière-première et les procédés de transformation employés pour leur production.

I.1.1. Les biocarburants de première génération

Les biocarburants dits de 1ère génération (1G) sont issus de ressources agricoles conventionnelles. Ils ne valorisent ainsi qu'une très faible partie de la plante, facilement assimilable par les microorganismes, mais qui coïncide aussi avec la partie utilisée pour la production d'aliments destinés à l'homme ou au bétail.

La filière biocarburant « essence » comprend l'éthanol et son dérivé l'ETBE (éthyl-tertio butyl-éther). Les sucres extraits des plantes sucrières (betterave et canne à sucre) et des plantes amylacées (blé et maïs) sont transformés en éthanol par un procédé de fermentation avec la levure Saccharomyces cerevisiae. L'ETBE est fabriqué à partir de cet éthanol agricole et d'isobutène (actuellement d'origine fossile). La filière « biodiesel » comprend des produits fabriqués à partir d'huiles extraites de plantes oléagineuses, comme le colza et le tournesol. Ces huiles subissent une réaction chimique de transestérification, ce qui permet leur utilisation dans les moteurs diesel modernes (Ministère de la Transition écologique et solidaire 2016). Les deux filières de

biocarburants de première génération sont représentées dans la Figure I.1.

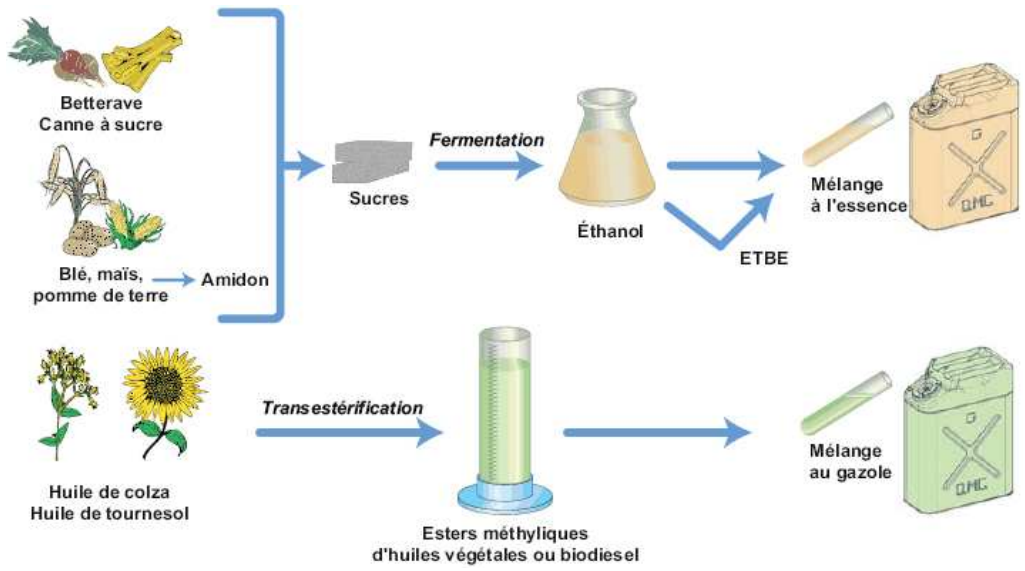


Figure I.1. Filières de production de bioéthanol de première génération
Source : IFP Energies Nouvelles

Les procédés de production biocarburants 1G sont actuellement bien développés et ont atteint le stade industriel. En 2021, les volumes produits représentaient 50 000 barils-équivalent-pétrole par jour en France, et environ 2 millions de barils-équivalent-pétrole par jour dans le Monde (IEA, 2022).

I.1.2. Les biocarburants de deuxième génération

Les biocarburants de deuxième génération (2G), aussi connus comme biocarburants avancés, sont produits à partir de la transformation de matière première lignocellulosique, fraction non-alimentaires des plantes. Cette matière première est issue de l'activité agricole (paille de blé), forestière (bois) ou de cultures dédiées (taillis à croissance rapide) (Lopes-Ferreira et al. 2020). Les biocarburants 2G présentent des bilans énergétiques plus favorables que les biocarburants 1G et permettent de limiter les problématiques liées à la concurrence avec le secteur alimentaire et l'usage des sols (Ministère de la transition écologique, 2020).

Il existe actuellement deux voies de transformation de la matière lignocellulosique : la voie thermochimique pour la production de biogazole de synthèse (par gazéification) et de bio-oil (par pyrolyse) et la voie biochimique pour la fabrication de bioéthanol (Ministère de la Transition écologique et solidaire 2016). Les deux voies de transformation de la lignocellulose sont illustrées dans la Figure I.2.

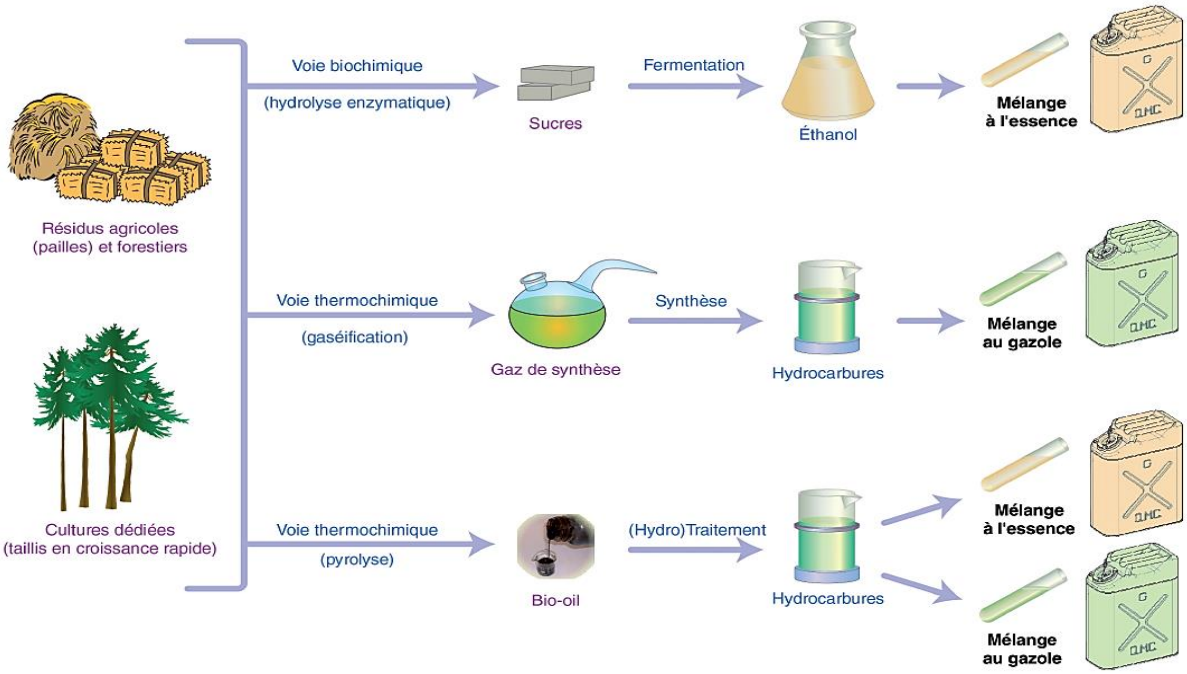


Figure I.2. Filières de production de bioéthanol de deuxième génération
Source : IFP Energies Nouvelles

Les biocarburants 2G sont en phase de développement avec des bonnes perspectives de mise sur le marché dans un futur proche. Cependant, un temps de maturité industrielle sera nécessaire avant que biocarburants avancés puissent être compétitifs avec les carburants fossiles (Lopes-Ferreira et al. 2020).

I.1.3. Les biocarburants de troisième génération

Actuellement, les carburants produits à partir des algues sont considérés comme les biocarburants de troisième génération (3G). Les algues utilisent le mécanisme de photosynthèse pour fixer le CO_2 et se caractérisent par des compositions chimiques similaires à celles des plantes terrestres. Elles pourraient donc être valorisées par des procédés similaires à ceux employés pour la production des biocarburants de première ou de deuxième génération (Jourdier, 2012).

Cependant, ces biocarburants 3G relèvent encore de l'expérience de laboratoire et les coûts de production sont à ce jour beaucoup plus élevés que ceux des biocarburants 2G. Actuellement, l'utilisation des microalgues comme matière première est limitée à des applications à haute valeur ajoutée et en volumes réduits, principalement dans l'industrie cosmétique et des compléments alimentaires (IFP Energies nouvelles, 2020).

I.1.4. Le bioéthanol de deuxième génération : intérêt et limites

Le bioéthanol est le biocarburant liquide le plus consommé au monde et l'un des principaux candidats pour remplacer, à plus long terme, les carburants liquides issus du pétrole, afin de

diminuer l'empreinte carbone (Morales et al., 2015; Colonna et al., 2020). En Europe, il peut être mélangé à l'essence jusqu'à 10% vol/vol dans le carburant SP95-E10 sans besoin de modifier les moteurs de véhicules, jusqu'à 85% vol/vol dans les véhicules flexfuel et même à 100% dans les moteurs spécialement conçus pour cette fin (Morales et al., 2015; Colonna et al., 2020).

Actuellement, les États-Unis et le Brésil sont les deux principaux pays producteurs de bioéthanol, représentant un total de 89 % de la production mondiale (Limayem and Ricke, 2012). Ce biocarburant est principalement produit à partir de maïs aux États-Unis, de canne-à-sucre au Brésil et de blé en Europe. Bien que le bioéthanol 1G soit un bon substitut de l'essence, participant à la lutte contre les émissions de CO_2, sa production entre en concurrence avec le secteur de la production alimentaire destinée à l'homme et à l'animal, provoquant une compétition avec les terres destinées à l'activité agricole (Limayem and Ricke, 2012; Morales et al., 2015). De plus, une incertitude forte demeure sur le prix des biocarburants 1G, à cause des variations des prix des carburants fossiles et de ceux des marchés agricoles mondiaux (Morales et al., 2015).

Dans le cas des biocarburants 2G, comme la lignocellulose correspond à la fraction non-alimentaire des plantes, son utilisation pour la production de bioéthanol 2G n'entraîne pas de concurrence avec le secteur alimentaire. Au contraire, leur production permet de mieux valoriser la fraction non digestible des plantes, et donc participe au maintien de l'emploi dans l'agriculture et les industries de transformation. Cependant, les procédés de production de bioéthanol lignocellulosique sont moins performants par rapport au bioéthanol 1G (Hardy, 2016). En effet, ils nécessitent une étape de prétraitement lourde et coûteuse, généralement réalisée par voie physico-chimique ou thermochimique, et qui génère des co-produits qui sont fortement inhibiteurs des microorganismes chargés de la fermentation éthanolique (Ben Chaabane et Marchal, 2013). Une autre ressource intéressante de biomasse lignocellulosique correspond aux déchets issus des activités du secteur agro-industriel (industrie sucrière et papetière, résidus vinicoles notamment), permettant ainsi de les valoriser et de réduire les coûts associés à leur traitement.

Puisqu'il s'agit de ressources peu coûteuses et renouvelables, cette matière lignocellulosique a un grand potentiel pour être convertie en bioéthanol 2G (Limayem and Ricke, 2012). Comparé aux carburants fossiles, le bioéthanol 2G permet une réduction de 82 et 91% (pour la tige de maïs ou la paille de blé, respectivement) des émissions des gaz à effet de serre (Morales et al., 2015). En revanche, les coûts de de production du bioéthanol cellulosique, actuellement situés entre 0,75 et 0,80 €/L à la fin de l'année 2020, sont supérieurs au prix de vente du bioéthanol 1G, qui peut varier de 0,56 à 0,65 €/L selon le pays (Colonna et al., 2020).

Au regard des différents avantages et intérêts du bioéthanol 2G, son développement est

poursuivi. Ainsi, un grand effort en recherche et développé est actuellement réalisé dans le but de réduire ses coûts de fabrication et de le rendre compétitif.

I.2. La valorisation biochimique de la biomasse lignocellulosique pour la production de bioéthanol 2G

La production de bioéthanol 2G se fait en 4 étapes successives principales, illustrées dans la Figure I.3 et décrites par Lopes-Ferreira et al. (2020). La première étape consiste en un prétraitement physico-chimique de la biomasse lignocellulosique dans le but de rendre les fibres de cellulose accessibles aux enzymes. Cette étape est réalisée dans les procédés commercialisés actuellement par explosion à la vapeur après imprégnation à l'acide sulfurique. La deuxième étape consiste en une hydrolyse enzymatique de la biomasse prétraitée, par des cellulases et des hémicellulases, enzymes capables d'hydrolyser les fibres de cellulose et d'hémicellulose résiduelle, afin de libérer les sucres fermentescibles (glucose, xylose). L'hydrolyse enzymatique se fait en général entre 45 °C et 55 °C, à des pH compris entre 4 et 6. Cette deuxième étape nécessite la production préalable d'enzymes cellulolytiques, étape qui constitue le cœur de ce travail de thèse et sera donc développée plus longuement dans les paragraphes suivants. Ensuite, se déroule l'étape de fermentation éthanolique, où les levures *Saccharomyces cerevisiae* convertissent les sucres en éthanol selon un procédé de fermentation en fed-batch ou en continu, associant plusieurs bioréacteurs en série afin de maximiser la productivité. Les températures de fermentation sont comprises entre 30 et 33 °C et les pH entre 4 et 5. Certains procédés proposent de réaliser l'hydrolyse et la fermentation simultanément. On parle, alors de mise en œuvre SSF (simultaneous saccharification and fermentation) par opposition à une mise en œuvre SHF (separate hydrolysis and fermentation) où les étapes d'hydrolyse et de fermentation sont réalisées séparément.

L'éthanol obtenu par fermentation est ensuite extrait du milieu de culture puis purifié par distillation et déshydratation, pour atteindre un degré de pureté de 99,9 %. Cette dernière étape nécessite une séparation en amont ou en aval du résidu de fermentation qui contient encore des matières en suspension, essentiellement de la lignine (Lopes-Ferreira et al. (2020).

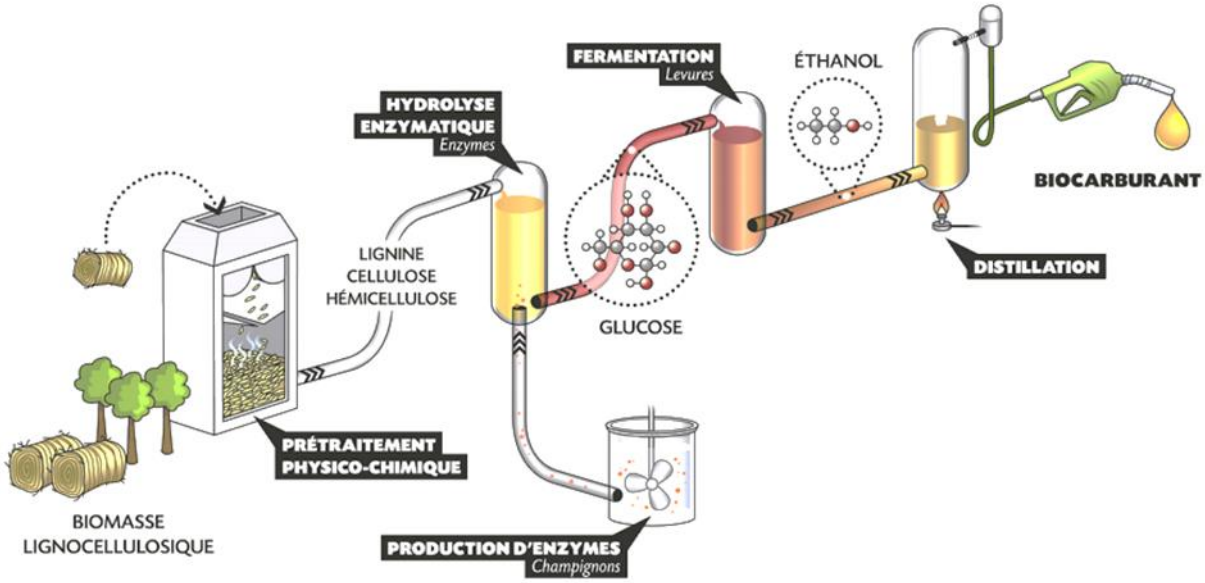


Figure I.3. Représentation schématique du procédé de production de bioéthanol 2G
Source : IFP Energies Nouvelles

L'obtention des sucres fermentescibles à partir de la biomasse lignocellulosique par hydrolyse enzymatique est plus complexe qu'à partir de canne à sucre, de blé ou de maïs (Hardy, 2016). L'étape de traitement enzymatique, où la cellulose et l'hémicellulose sont hydrolysées en sucres fermentescibles, nécessite une grande quantité d'enzymes et représente l'un des principaux postes de coût du procédé (Patel et al., 2009).

Diverses stratégies complémentaires sont actuellement réfléchies pour réduire les coûts liés à l'utilisation des cellulases. L'amélioration génétique des souches productrices et des cellulases en termes de stabilité et d'activité spécifique constitue la première approche. Une deuxième stratégie consiste à optimiser le procédé de production des cellulases et à accroître les volumes de production, afin de réduire les coûts d'opération et donc, du prix final de ces enzymes (Percival Zhang et al., 2006). La dernière stratégie proposée consisterait produire les enzymes directement sur le site de production du bioéthanol, ce qui ajouterait une étape supplémentaire au procédé (Jourdier, 2012).

I.3. Les cellulases : enzymes impliquées dans l'hydrolyse enzymatique de la biomasse lignocellulosique

I.3.1. Composition de la biomasse cellulosique

La biomasse lignocellulosique est une matière biologique composée de trois constituants principaux : la cellulose, l'hémicellulose et la lignine (Figure I.4). La cellulose, ressource biologique naturelle renouvelable la plus abondante (Percival Zhang et al., 2006), est un composé sous forme

cristalline, d'architecture complexe formée de microfibrilles de chaînes de cellulose. Chaque chaîne de cellulose est formée par une chaîne linéaire de monomères D-glucose liés par des liaisons β-1,4 glycosidiques. L'hémicellulose est formée de différents pentoses, hexoses et acides sucrés. En raison de sa nature amorphe et ramifiée, elle est plus facilement hydrolysée que la cellulose. La lignine est la principale composante structurelle des plantes et représente 10–25% de la matière lignocellulosique (Kumar et al., 2008) . Sa structure complexe renforce la biomasse lignocellulosique et fonctionne comme une barrière aux enzymes hydrolytiques (Ribeiro et al., 2016; Soni et al., 2018). N'étant pas composée de sucres, la lignine ne peut pas être convertie en sucres fermentescibles (Kumar et al., 2008).

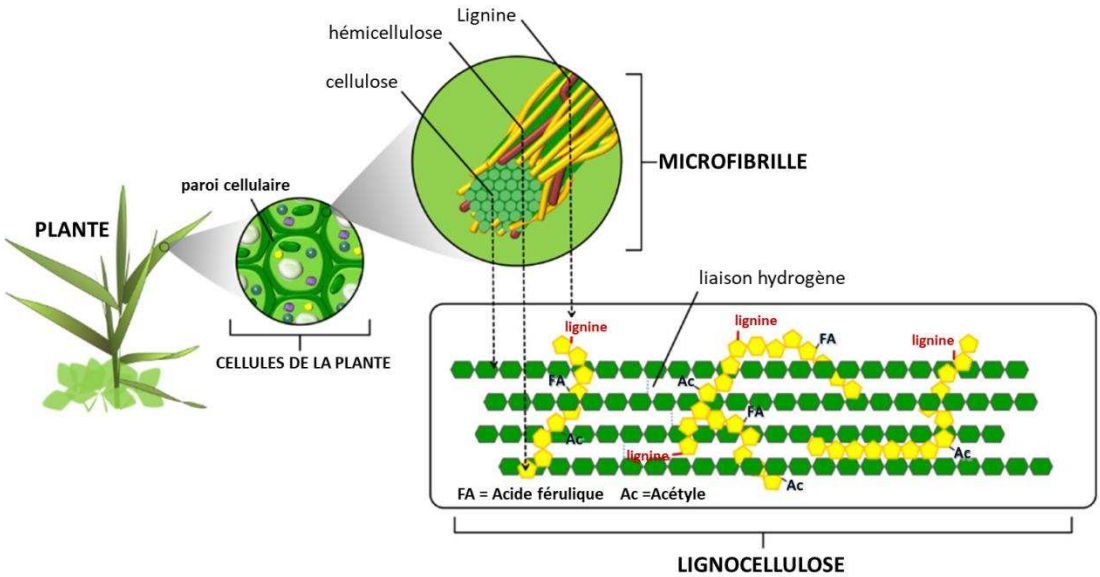


Figure I.4. Structure simplifiée de la fibre végétale insoluble.
Schéma présentant la cellulose cristalline en vert et l'hémicellulose en jaune et ses liaisons avec la lignine, l'acétyle (AC) et l'acide férulique (FA) (Ribeiro et al. 2016)

I.3.2. Structure et activité des cellulases

L'hydrolyse de la matière lignocellulosique nécessite l'action conjointe de différentes enzymes, agissant en synergie (Hardy 2016). Ces enzymes font partie du groupe des enzymes cellulolytiques, aussi connues comme cellulases (Jourdier, 2012). Les enzymes cellulolytiques sont produites par une grande variété de microorganismes comme des bactéries (*Thermobacillus xylanilyticus, Clostridium straminisolvens, C. thermocellum, Bacillus subtilis, B. licheniformis, Geobacillus thermolovorans, G. sp.70PC53, Caldicellulosiruptor bescii, Caldobacillus cellulovorans, Acidothermus cellulolyticus*…), les actinomycètes et les champignons filamenteux. Parmi ces microorganismes, ce sont les champignons aérobies (et notamment le genre *Trichoderma*) qui

constituent les microorganismes de plus grand intérêt industriel, grâce à leur croissance rapide et aptitude à sécréter de grandes quantités d'enzymes (Soni et al., 2018).

Les cellulases sont des enzymes modulaires, ce qui signifie qu'elles sont organisées en unité structurelles appelées Modules ou Domaines. Une cellulase typique contient un module de liaison de carbohydrate CBM (*Carbohydrate Binding Module*) lié par une courte région de liaison (*linker*) à un domaine catalytique CD (*Catalytic Domain*). Le CBM est un module crucial pour les cellulases. Son rôle principal est d'approcher le CD du réseau de cellulose (Soni et al., 2018), comme illustré dans la Figure I.5.

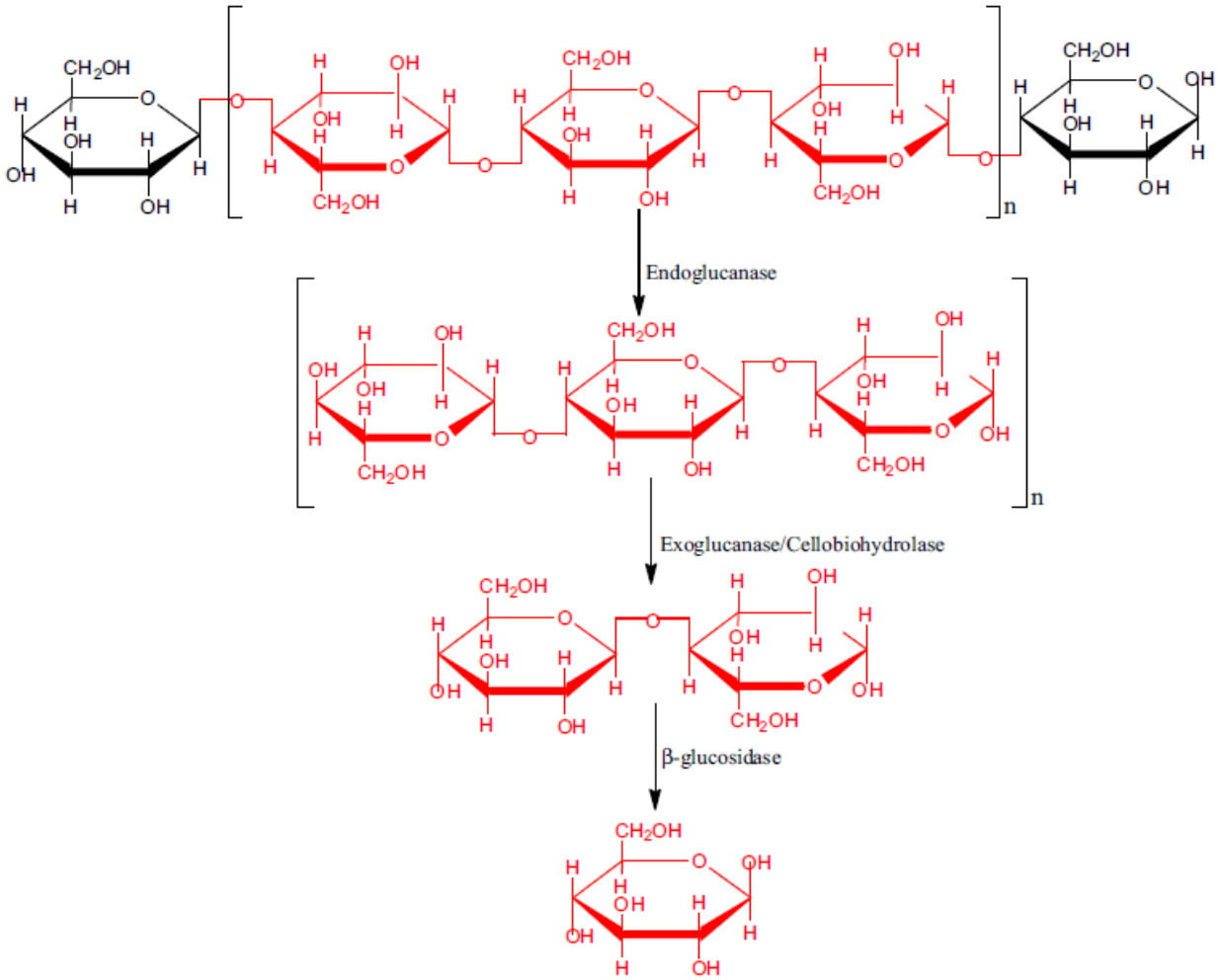


Figure I.5. Structure d'un polymère de cellulose : la cellulose cristalline (en rouge) est différenciée de la cellulose amorphe (en noir).
Les points représentent les mesures expérimentales et les traits pleins le modèle (X : concentration en biomasse ; P : concentration en protéines ; S : concentration en lactose).

Les cellulases sont souvent classifiées en fonction de leur mécanisme d'action. Les cellobiohydrolases (EC 3.2.1.9.1), qui appartiennent au groupe des exoglucanases, attaquent les chaînes de cellulose à partir des extrémités, libérant des molécules de cellobiose. Les endoglucanases (EC 3.2.1.4) hydrolysent les chaînes de cellulose au hasard, générant de nouvelles

extrémités accessibles aux cellobiohydrolases. La β-glucosidase (EC 3.2.1.21) a pour rôle d'hydrolyser en glucose la cellobiose libérée par l'action des endoglucanases et des cellobiohydrolases. Cette action de la β-glucosidase empêche la rétro-inhibition des cellobiohydrolases par la cellobiose. Ce travail synergique de ces enzymes clés est essentiel pour une hydrolyse efficace de la biomasse lignocellulosique par le champignon (Kumar et al., 2008). De plus, *T. reesei* est également capable de sécréter des xyloglucanases (Herpoël-Gimbert et al., 2008), ce qui améliore l'efficacité d'hydrolyse totale des substrats lignocellulosiques grâce à l'activité hémicellulolytique de cette enzyme.

I.3.3. Contrôle de l'activité des cellulases

Les cellulases sont des enzymes inductibles, et leur production est finement contrôlée par des mécanismes d'activation et de répression. La cellobiose, le sophorose, le lactose jouent ainsi le rôle d'activateurs de la production, alors qu'à l'inverse, le glucose est un répresseur (Juturu et Wu, 2014).

Les déterminants génétiques des cellulases ont été décrits par plusieurs auteurs notamment pour le cas de l'induction au lactose. Ainsi, deux stratégies existent chez les champignons pour cataboliser le lactose : Il peut-être hydrolysé par une β galactosidase dans le milieu extracellulaire ; le glucose et le galactose produits sont ensuite transportés dans la cellule. Ou alors, il peut d'abord être importé puis hydrolysé à l'intérieur de la cellule (Seiboth et al. 2007b).

Les deux stratégies sont utilisées par *Trichoderma*. Jusqu'à récemment on pensait que seule la première était mise en œuvre mais trois transporteurs de la famille des MFS (Major Facilitator Superfamily) impliqués dans l'absorption du lactose ont été découverts au cours des dix dernières années : Tr_3405 (aussi appelé CRT1 ; Ivanova et al., 2013 ; Zhang et al., 2013), Tr_77517 et Tr_79202 (Porciuncula et al., 2013). L'invalidation de ces gènes réduit très fortement la croissance sur lactose ainsi que la vitesse d'absorption de ce dernier mais affecte également négativement l'induction des cellulases. La présence intracellulaire du lactose pourrait donc constituer une étape clé dans la transduction du signal conduisant à l'induction des cellulases. Il est à noter que, ni le glucose ni le galactose ne sont capables d'induire la production de cellulases. A de faibles taux de croissance, le galactose entraine l'activation transcriptionnelle des gènes codant les cellulases, mais celle-ci reste nettement plus faible qu'avec le lactose (Karaffa et al., 2006). Ces propriétés ont une influence forte sur la conduite du bioprocédé. En effet, la croissance doit être dissociée de la production pour contourner la répression. Ainsi, la croissance est tout d'abord conduite en présence de glucose, substrat facilement assimilable. La production de cellulases est induite lorsque la concentration en glucose devient inférieure à un seuil, et c'est l'apport du sucre inducteur (le lactose

par exemple), en mode fed-batch, qui favorise ensuite la production des cellulases. Le rôle inducteur du lactose a été bien mis en évidence par Portnoy et al. 2011, qui montrent que ce sucre régule la synthèse de deux gènes activateurs *xyr1* et ace2, et du gène corépresseur *ace1* chez la souche *T. reesei* QM9414, les 2 premiers étant fortement transcrits alors que le dernier est peu exprimé chez une souche hyper-productrice.

D'autres sucres tels que le cellobiose ou le sophorose ont également été décrits comme inducteurs (Ilmen et al. (1997), Foreman et al. (2003), Pakula et al. (2005) mais sont trop onéreux pour être utilisés au stade industriel.

I.4. *Trichoderma reesei* : le champignon filamenteux producteur de cellulases

Trichoderma reesei, anamorphe de *Hypocrea jecorina,* est un champignon filamenteux mésophile aérobie largement retrouvé dans les sols des régions tropicales (Leghlimi, 2013). Sa découverte date de la seconde guerre mondiale dans la région sud du Pacifique, quand l'armée américaine a souffert de la rapide destruction de ses vêtements et tentes en coton. Le champignon, d'abord identifié comme *Trichoderma viride* et nommé QM6a, a ensuite été reconnu comme étant distinct de *T. viride* et ainsi renommé *Trichoderma reesei* en l'honneur du chercheur T. Elwyn Reese (Mandels and Reese, 1957; Gusakov, 2011; Peterson and Nevalainen, 2012). Sa classification est donnée dans le Tableau I.1.

Tableau I.1. Classification biologique de *Trichoderma reesei*

Règne	*Fungi*
Division	*Ascomycota*
Sous-division	*Pezizomycotina*
Classe	*Sordariomycetes*
Sous-Classe	*Hypocreomycetidae*
Ordre	*Hypocreales*
Famille	*Hypocreaceae*
Genre	*Trichoderma*
Espèce	*reesei*

Parmi d'autres microorganismes capables de produire des cellulases, *T. reesei* est connu par sa capacité à secréter une grande quantité d'enzymes cellulolytiques. Des mutants hyper-sécréteurs de *T. reesei* ont été développés dans le but d'obtenir une source peu coûteuse de cellulases (Nitta

et al., 2012 ; Juturu et Wu, 2014 ; Druzhinina et Kubicek 2017). Ainsi, grâce à la grande capacité de sécrétion de *T. reesei* et l'amélioration réussie des souches, le genre *Trichoderma s'*est positionné comme une plateforme microbienne incontournable pour la production de cellulases (Lopes Ferreira et al., 2014).

I.4.1. Mécanismes de développement

Les champignons filamenteux supérieurs ont des cellules allongées, séparées par des parois septales perpendiculaires (Carlile, 1995). Le cycle de vie de *T. reesei* débute sous forme de conidies qui sont capables de germer et former des hyphes lorsque les conditions physicochimiques sont favorables.

Les hyphes sont composées de compartiments multinucléés et le champignon se développe par extension de ses compartiments apicaux par un système de flux cytoplasmique polarisé (Drougard, 2018) . Chaque extension du compartiment apical est un cycle mitotique, où la division des noyaux est suivie d'une septation du compartiment (Ahamed and Vermette, 2009). Chaque septum possède un pore septal, qui permet une circulation des organites cellulaires entre les compartiments (Quintanilla et al., 2015). Un compartiment sous-apical peut également se ramifier, ce qui entraîne la formation d'une nouvelle extrémité en extension (Müller et al., 2000) . La ramification des hyphes semble avoir deux objectifs principaux : augmenter la surface de la colonie pour optimiser l'assimilation des nutriments et favoriser les échanges de nutriments et de signaux entre différents hyphes d'une même colonie mais aussi avec d'autres organismes (Drougard, 2018). Selon Harris, 2008 , deux types de ramification sont possibles dans une structure mycélienne : apicale et latérale (Figure I.6). Le réseau des hyphes est appelé mycélium (Quintanilla et al., 2015), et c'est sous cette forme que *T. reesei* est effectivement producteur de cellulases.

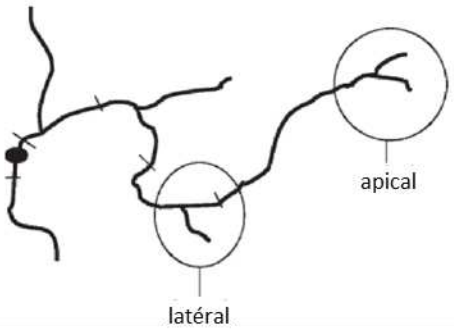


Figure I.6. Branchement apical et latéral d'une hyphe (Harris, 2008)

I.4.2. La sécrétion de cellulases par *T. reesei*

Chez les champignons filamenteux, la sécrétion d'enzymes est polarisée et se produit principalement dans les extrémités des hyphes en croissance (Wösten et al., 1991). En effet, à ce niveau, la paroi cellulaire est plus poreuse que dans la paroi mature, permettant une diffusion rapide des protéines (Nevalainen and Peterson, 2014).

Les protéines sont synthétisées dans le réticulum endoplasmique, puis voyagent dans des vésicules de sécrétion jusqu'à l'appareil de Golgi pour une modification post-traductionnelle. Les vésicules de sécrétion transportent ensuite les protéines modifiées vers la pointe de l'hyphe pour une sécrétion apicale, ou éventuellement vers les septums grâce à une voie sécrétoire alternative (Nevalainen and Peterson, 2014). La Figure I.7 illustre les voies de synthèse et de sécrétion de protéines par *T. reesei*.

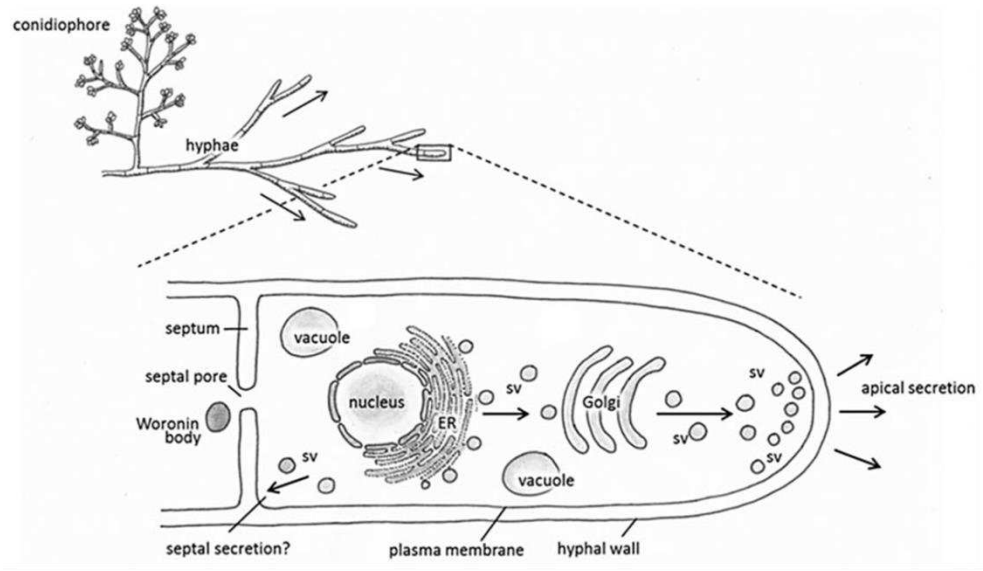


Figure I.7. Représentation schématique des voies de synthèse et de sécrétion de protéines par *T. reesei* (Nevalainen and Peterson, 2014).
(RS) Réticulum endoplasmique ; (VS) Vésicules de sécrétion

Le cocktail d'enzymes cellulolytiques sécrétées par *T. reesei* est composé de nombreuses enzymes cellulolytiques. Il comprend principalement deux exoglucanases (CBHI et CBHII), cinq endoglucanases (EGI, EGII, EGIII, EGIV et EGV) et deux β-glucosidases (BGLI et BGLII) (Lynd et al., 2002). Les enzymes CBHI, CBHII, EGI et EGII représentent 90 à 95% du total des protéines sécrétées (Gusakov, 2011).

I.5. Le procédé de production de cellulases

Même si de nombreux champignons filamenteux et bactéries sont étudiés pour la production de cellulases, *Trichoderma reesei* reste actuellement le microorganisme de référence pour la production de ces enzymes à cause de sa grande capacité de sécrétion (Lopes Ferreira et al., 2014). Dans des conditions naturelles, *T. reesei* sécrète des cellulases capables de convertir la cellulose en glucose, qu'il utilise à la fois comme source d'énergie et de carbone. Bien que la fermentation à l'état solide soit un mode d'opération possible, la plupart des procédés industriels sont basés sur la fermentation en milieu liquide (Singhania et al., 2010). Cette approche permet en effet de réguler plus facilement les conditions opératoires (pH, température, oxygénation…) et d'aboutir à des concentrations plus élevées (Hardy, 2016). Il a ainsi été possible de produire, avec ce mode de fermentation en milieu liquide, des concentrations en cellulases supérieures à 120 g/L (Ben Chaabane et Chaussepied, 2011). Les cultures en milieu liquide présentent également l'avantage, d'être plus favorables à l'extrapolation (Hardy, 2016), ce qui justifie le choix de ce type de culture pour la production industrielle de cellulases.

Les cultures liquides sont menées dans des bioréacteurs, équipés de nombreux dispositifs permettant de contrôler les conditions d'opération, comme l'agitation, le pH, la température et la pO_2. Afin d'éviter la contamination des cultures, les bioréacteurs doivent être étanches, facilement nettoyables et stérilisables. Pour ces raisons ils sont le plus souvent fabriqués en verre à l'échelle laboratoire et en acier inoxydable à partir de 10-20 L (pour une stérilisation en place), des matériaux résistants aux températures élevées et à la corrosion. La Figure I.8 présente un schéma illustrant un bioréacteur de petit volume.

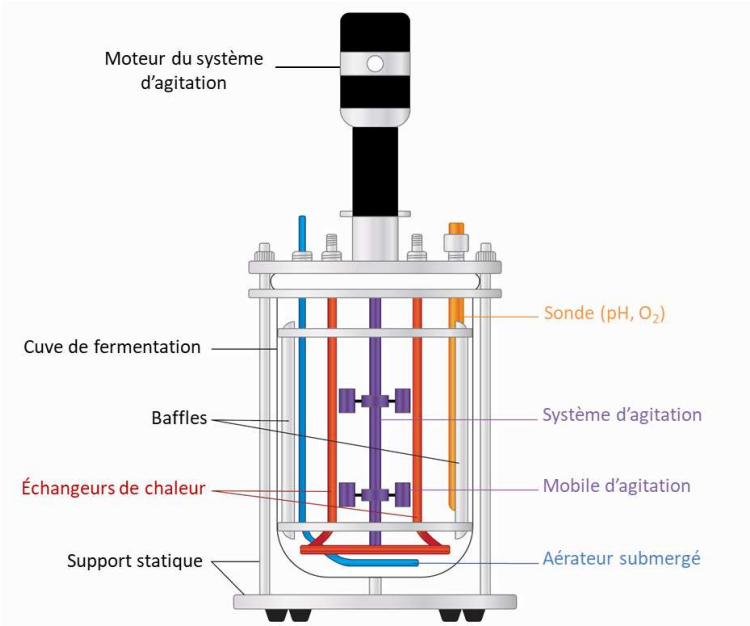


Figure I.8. Schéma d'un bioréacteur de laboratoire modifiée.
D'après une création de Louis Tessier sous licence Creative Commons (CC BY-NC-SA)

I.5.1. Cultures en milieu liquide de *T. reesei*

I.5.1.1. Conditions de culture de T. *reesei* pour la production de cellulases

La production d'enzymes cellulolytiques par *Trichoderma reesei* est dissociée de la croissance. Ainsi les cultures industrielles en milieu liquide sont très souvent réalisées en 2 étapes : l'une dédiée à la croissance du champignon et l'autre dédiée à la production de cellulases (Jourdier, 2012). En phase de croissance, *T. reesei* est capable d'utiliser différentes sources de carbone, pourtant le glucose est le sucre plus utilisé, pour des raisons de coût et de rapidité d'assimilation (Jourdier, 2012). Le champignon a également besoin d'une source d'azote, qui est apportée sous forme de corn steep en début de culture et ensuite sous forme d'ammoniaque, qui a également un rôle de régulation du pH (Hardy, 2016*). T. reesei* nécessite aussi des sels minéraux et des oligo-éléments à faibles concentrations (Jourdier, 2012).

La production de cellulases par le champignon est naturellement induite par la cellobiose, produit de dégradation de la cellulose. Cependant, la production peut également être induite par d'autres oligosaccharides tels que le lactose et le sophorose, à la condition que ces sucres soient en limitation, i.e. en très faible concentration résiduelle (Jourdier et al., 2013).

T. reesei étant un champignon mésophile et qui tolère bien les pH acides, il est souvent cultivé à des températures comprises entre 25 et 30 °C et à un pH d'environ 4,5 (Hardy, 2016).

Dans les cultures de *T. reesei*, comme dans toutes les fermentations aérobies, il est très important de maintenir une concentration en oxygène dissous dans le milieu (pO_2) à une valeur supérieure à la pO_2 critique pour la souche. La pO_2 représente le rapport de la concentration en oxygène dissous dans le milieu à un instant donné (C_L en mg.L^{-1}) sur la concentration saturante en oxygène (C_L^* en mg.L^{-1}) (Hardy, 2016) et peut être décrite par l'équation suivante :

$$pO_2 = C_L / C_L^* \qquad \text{(I.1)}$$

La concentration d'oxygène à saturation (C_L^*) dépend de la force ionique, mais généralement elle est de l'ordre de 7 mg.L^{-1} dans les conditions normales de température et de pression, l'oxygène étant donc très peu soluble en milieux aqueux. La pO_2 critique correspond à la valeur de pO_2 minimale pour laquelle la cinétique de croissance n'est pas ralentie dans des conditions de cultures classiques. Selon Marten et al., 1996, cette valeur est d'environ 15 % pour la souche *T. reesei* RUT-30.

I.5.1.2. Le transfert d'oxygène : un paramètre clef pour les cultures aérobies

Le transfert d'oxygène dans les bioréacteurs est assuré par l'association permanente de l'injection d'air (éventuellement enrichi en oxygène) à un débit contrôlé et de l'agitation à une vitesse donnée. L'injection d'air doit être réalisée de façon continue, du fait de la très faible solubilité de l'oxygène. L'agitation dans les bioréacteurs aérobies a un rôle essentiel pour permettre une bonne dispersion des gaz injectés dans la culture, dans le but de favoriser les transferts d'oxygène vers la phase liquide et les microorganismes.

Dans les cultures aérobies, l'oxygène dissous dans le milieu est consommé par les microorganismes à une vitesse caractéristique OUR (pour *Oxygen Uptake Rate,* en $g.L^{-1}.h^{-1}$*)*, qui augmente en fonction de l'accroissement de la concentration en biomasse et de la vitesse spécifique de respiration du microorganisme. C'est pourquoi il est très important d'assurer un apport d'oxygène efficace tout au long des cultures aérobies. Dans ce contexte, le taux de transfert de l'oxygène OTR (pour *Oxygen Transfert Rate,* en $g.L^{-1}.h^{-1}$) de la phase gazeuse vers la phase liquide est un paramètre clef qu'il est nécessaire de maîtriser pour le bon déroulement de cultures aérobies. Il est calculé par l'équation :

$$OTR = K_L a \cdot (C_L^* - C_L) \qquad \text{(I.2)}$$

Où $K_L a$ est le coefficient volumique de transfert d'oxygène en h^{-1}, et C_L* et C_L, les concentrations en oxygène dissous à la saturation du milieu et à l'équilibre.

Lorsque la concentration en oxygène dissous dans le milieu est maintenue constante, l'OUR est égal à l'OTR. Ainsi, lorsque le taux de consommation d'oxygène par la biomasse augmente, il est nécessaire d'accroitre le $K_L a$ afin d'ajuster l'OTR à l'OUR et donc de maintenir la pO_2 constante dans le milieu (Hardy, 2016).

I.5.1.3. Grandeurs caractéristiques des cultures de *T. reesei*

La quantification d'une production microbienne passe essentiellement par deux types de grandeurs : les rendements et les vitesses spécifiques qui déterminent, ensembles, la capacité du microorganisme à utiliser efficacement et rapidement ses substrats pour se développer et produire les molécules d'intérêt. Les valeurs de ces grandeurs pour le champignon *T. reesei*, dans un contexte de production de cellulases, sont résumées aux Tableau I.2 et Tableau I.3.

Selon Jourdier, 2012, le rendement théorique maximal de production de biomasse ($Y°_{X/S}$) par *T. reesei* est d'environ 0,6 $g_X.g_S^{-1}$, et le rendement théorique maximal de conversion des sucres en cellulases ($Y°_{P/S}$) est d'environ 0,6 $g_P.g_S^{-1}$. Toutefois, d'après cet auteur, les rendements réels sont

plus faibles, avec un rendement de croissance $Y_{X/S}$ compris entre 0,35 et 0,55 $g_X.g_S^{-1}$ et un rendement réel de conversion de 0,3 à 0,4 $g_P.g_S^{-1}$.

Les vitesses spécifiques varient selon la souche de *T. reesei* utilisée et les conditions de culture (pH, température, oxygénation) employées. Le taux de croissance maximum (μ_{max}) de *T. reesei* est en général compris entre 0,06 et 0,15 h^{-1}. Il est toujours plus élevé en cultures sur glucose par rapport au lactose et au galactose. Selon Hardy, 2016, le temps de génération est ainsi compris entre 6 et 16 heures selon la souche utilisée. La vitesse spécifique de production de cellulases (q_P) est de l'ordre de 15 $mg_P.g_X^{-1}.h^{-1}$ (Jourdier, 2012).

Tableau I.2. Valeurs des taux de croissance $\bar{\mu}_{max}$ et des rendements de croissance $Y_{X/S}$ mesurés lors de cultures de *T. reesei* sur différents substrats

Substrat	$\bar{\mu}_{max}$	$Y_{X/S}$	Souche	Conditions de culture	Référence
Lactose	0,070	0,58	C5	30°C ; pH 5,0	Chaudhuri and Sahai, 1994
	0,076	0,60	RutC30	30°C ; pH 4,8_	Pakula et al., 2005
	> 0,12	0,61	RutC30	25°C ; pH 5,0 ; pO_2 70%	Lo et al., 2010
Glucose	0,015	0,53	*T. viride* QM 9123	30°C, pH 4,0	Brown and Zainudeen, 1977
	0,13	0,74	*Trichoderma sp.*	30°C, pH 4,0	Nagai et al., 1976
	0,13	0,61	RutC30	25°C ; pH 5,0 ; pO_2 70%	Lo et al., 2010
Galactose	0,075	~0,5	QM 9414	30°C ; pH 5,0	Fekete et al., 2007
	0,060	0,59	Rut C30	25°C ; pH 5,0 ; pO_2 70%	Lo et al., 2010

Tableau I.3. Valeurs des vitesses spécifiques de production de cellulases q_p et des rendements de conversion de substrat en cellulases $Y_{P/S}$ lors de cultures de *T. reesei*

Souche	Mode de culture	q_p ($mg_P.g_X^{-1}.h^{-1}$)	$Y_{P/S}$ (g_P/g_S)	Référence
CL847	fed-batch	12,5	0,36	Jourdier et al., 2012bb
MG80	continu	16,9*	0,60*	Nicholson et al. 1989, cité par Jourdier et al., 2012ab
VTT D-99676	continu	19,9*	0,60*	Bailey and Tähtiharju, 2003

*Valeurs identifiés par Jourdier et al., 2012 en supposant que $Y°_{X/S}$ = 0,6 $g.g^{-1}$.

I.5.2. La morphologie complexe de *T. reesei* en cultures liquides et son impact sur le procédé de production de cellulases

Lors de cultures en milieux liquides, les champignons filamenteux sont capables de développer des morphologies complexes, qui peuvent être classées en trois groupes principaux : les pellettes (ou boulettes) , les touffes (agrégats mycéliens ou « clamps ») et les mycéliums librement dispersés (Cox, 1998; Paul and Thomas, 1998). Ces trois types de morphologie sont illustrés à la Figure I.9.

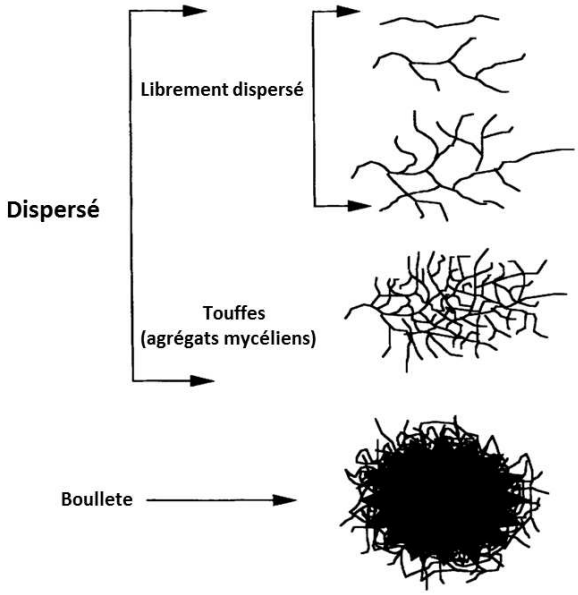


Figure I.9. Les morphologies typiques des champignons filamenteux en cultures liquides.
Adapté de Cox, 1998

Pendant la phase de croissance, *T. reesei* développe des hyphes capables de former des branches qui peuvent former des structures tridimensionnelles complexes. Cette structure complexe entraîne un accroissement de la viscosité du moût, qui acquiert un comportement rhéofluidifiant (Hardy, 2016). La Figure I.10 présente les valeurs de viscosité apparente obtenues avec un moût de *T. reesei* en phase de croissance, pour différentes valeurs de vitesses d'agitation. Elle montre que la concentration cellulaire affecte peu la viscosité, mais qu'une vitesse d'agitation élevée réduit fortement la viscosité du moût de fermentation.

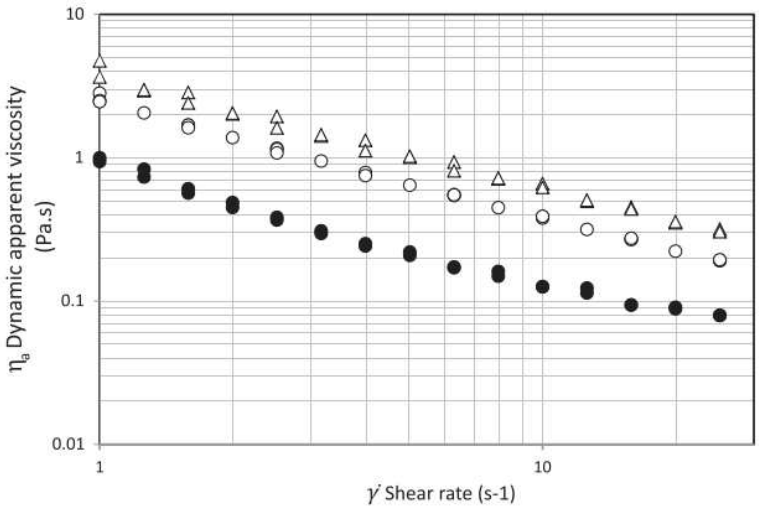


Figure I.10. Viscosité apparente dynamique en fonction du taux de cisaillement pour les échantillons de culture de *T. reesei* (Hardy et al. 2017).
Les échantillons ont été collectés pendant la phase de croissance exponentielle à 800 rpm en utilisant un mobile d'agitation de type Rayneri pour des concentrations en biomasse de 5,3 g. kg^{-1} (cercles blancs) et 8,2 g. kg^{-1} (triangles blancs), et à 1700 rpm et pour une concentration en biomasse de 7,4 g. kg^{-1} (cercles noirs). Des duplicates avec deux cycles par échantillon sont présentés pour chaque condition.

Une conséquence importante de cette augmentation de la viscosité est une limitation du transfert d'oxygène dans le milieu (Albaek et al., 2012; Gabelle et al., 2012). Ainsi, pour assurer un apport suffisant d'oxygène dans un milieu visqueux, il est nécessaire d'augmenter la puissance d'agitation appliquée sur le moût, ce qui génère un stress hydrodynamique sur la structure mycélienne (Hardy et al. 2017). Ce stress se traduit notamment par une réduction du taux de croissance du champignon (Hardy et al. 2017) et de sa capacité à produire les cellulases. La Figure I.11 illustre l'effet délétère d'une forte agitation sur la croissance de *T. reesei* soumis à deux vitesses d'agitation différentes.

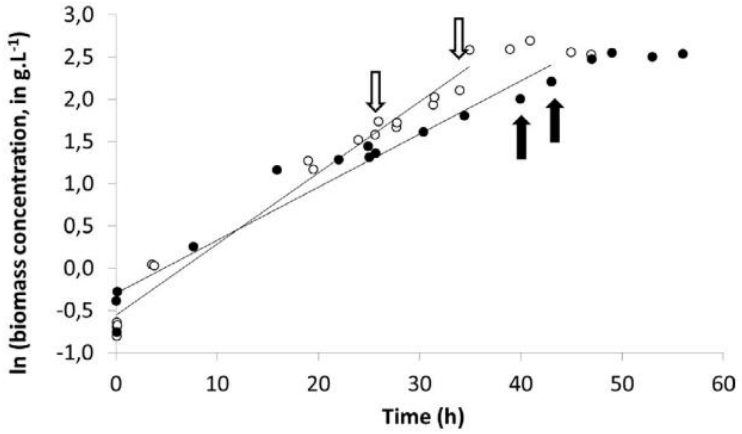


Figure I.11. Courbes de croissance caractérisant pour deux cultures de *T. reesei* réalisées en mode batch en appliquant deux conditions d'agitation : 800 rpm (cercles blancs) et 1700 rpm (cercles noirs) (Hardy et al. 2017).
Le mobile d'agitation utilisé était de type Rayneri. Les flèches indiquent le moment où des échantillons ont été prélevés afin d'effectuer des mesures de viscosité apparente et d'analyse d'image.

Enfin, l'accroissement nécessaire de la puissance d'agitation en milieu visqueux implique aussi une augmentation des coûts de production (Gabelle et al., 2012).

I.5.3. Description du procédé selon le protocole IFPEN

Compte-tenu des connaissances déjà acquises sur la production de cellulases par *T. reesei*, IFP Energies nouvelles a développé un procédé optimisé de production de cellulases en bioréacteur, qui comprend deux phases successives : croissance et production (Figure I.12).

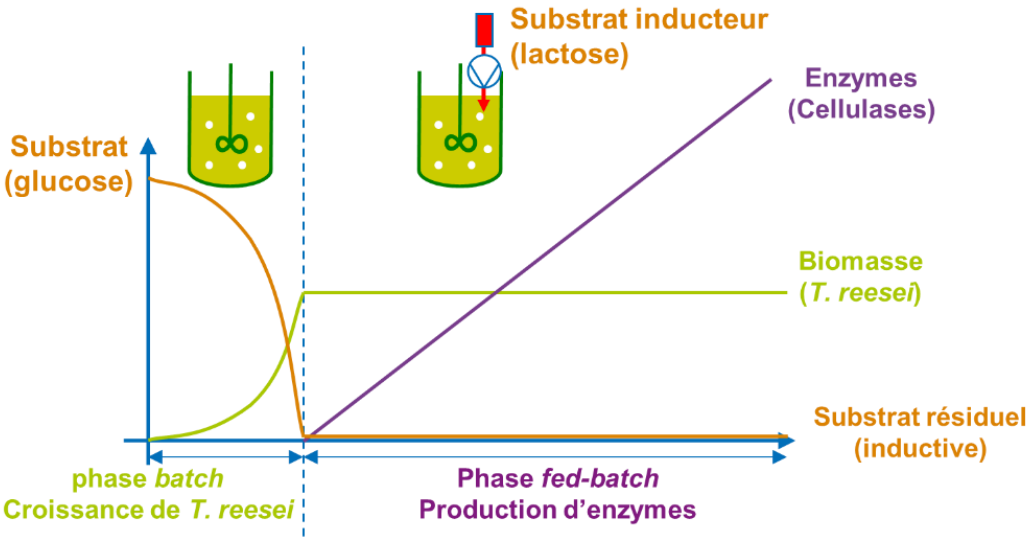


Figure I.12. Représentation schématique du protocole IFPEN pour la production de cellulases (Jourdier 2012)

La phase de croissance est réalisée en mode *batch,* utilisant du glucose en excès comme source de carbone. Cette phase peut être réalisée en plusieurs étapes successives dans des fermenteurs de capacité croissante, de façon à augmenter progressivement le volume jusqu'à pouvoir inoculer le fermenteur de production (Hardy 2016). Au cours de la croissance, réalisée à pH 4,8 et 27°C, l'agitation va être augmentée de façon à maintenir la pO_2 à 40% et éviter toute limitation en oxygène.

La deuxième phase est dédiée à la production de cellulases. Son mode d'opération est en *fed-batch*, afin d'alimenter le fermenteur avec du lactose à un débit limitant optimal de l'ordre de 35 à 45 $mg.g^{-1}.h^{-1}$ pour induire la sécrétion de cellulases par le champignon. Au cours de la phase de production, le pH est contrôlé à 4, la température à 25°C et la pO_2 à 40%.

En fin de phase de production, le milieu fermenté est récolté et les cellulases sont séparées de la biomasse par filtration frontale.

I.5.4. Critères d'évaluation des performances des bioprocédés de production de cellulases

La performance du bioprocédé, et donc les coûts de production de cellulases, sont déterminés par quatre critères principaux, qui sont liés à la performance de la souche, du mode de conduite de la fermentation, de la composition du milieu de culture et des conditions environnementales utilisés. Il s'agit de :

- la productivité en cellulases ($g_P .L^{-1}.h^{-1}$),
- le rendement de conversion en cellulases ($g_P . g_S^{-1}$),
- la concentration en cellulases ($g_P .L^{-1}$),

– la vitesse volumique de consommation d'oxygène (rO_2, g_{O2} . L^{-1} . h^{-1})
– le coefficient volumique de transfert d'oxygène (K_La, h^{-1}).

La productivité et la concentration ont un impact direct sur les CAPEX (dépenses d'investissement de capital), c'est-à-dire les coûts des équipements nécessaires au fonctionnement du procédé. En effet, ces deux critères déterminent directement le volume du bioréacteur et le temps nécessaire pour atteindre une certaine concentration de produit. Le rendement a une incidence sur les OPEX (dépenses d'exploitation), car il détermine le coût du substrat par rapport à la quantité de produit recherchée. Et enfin, les besoins en oxygène étant directement liés au transfert d'oxygène, ils ont une influence à la fois sur les CAPEX et les OPEX, car ils ont une incidence sur le dimensionnement des moteurs nécessaires pour fournir la puissance d'agitation et la compression de l'air, et sur l'énergie nécessaire en cours de culture pour assurer un transfert d'oxygène optimal dans le bioréacteur via l'agitation et l'aération (Jourdier, 2012). Sur l'ensemble de ces critères, la taille du bioréacteur a également une influence forte, les coûts associés à la production étant relativement plus faibles lorsque le fermenteur est de plus grande échelle (Hardy et al. 2017).

I.6. Scale-up, scale-down du procédé de production de cellulases

Les cellulases sont des enzymes coûteuses, en termes de CAPEX et d'OPEX. Pour qu'elles puissent être utilisées commercialement dans les bioraffineries, il est donc essentiel de réduire significativement leur coût de production. L'une des stratégies pour rendre l'utilisation des cellulases économiquement viable est l'augmentation de la productivité volumique des enzymes commerciales (Percival Zhang et al., 2006) en optimisant la conduite des opérations et les conditions de production. L'augmentation d'échelle est un autre levier très classique de minimisation des coûts de production (Hardy et al. 2017). Cependant, dans le cas de l'utilisation de *T. reesei* pour la production de cellulases, l'extrapolation du procédé de production est difficile en raison des liens complexes qui existent entre les conditions du procédé (besoins importants en oxygène du champignon), la morphologie de ce champignon (générant une viscosité élevée) et sa productivité (Hardy et al. 2017).

Deux approches peuvent être mises en œuvre pour réaliser ce changement d'échelle : une approche *scale-up* qui permet de transposer le bioprocédé de la petite échelle pilote vers la grande échelle, généralement par une approche d'analyse dimensionnelle et une approche *scale-up* qui consiste à reproduire, à la petite échelle, les contraintes identifiées à la grande échelle pour favoriser ensuite le transfert d'échelle.

I.6.1. Problématiques liées au scale-up du procédé

Puisque la physiologie cellulaire, les rendements et la qualité des produits dépendent fortement des conditions d'opération, au cours d'une approche *scale-up,* il est nécessaire de reproduire le mieux possible les conditions de culture développées en laboratoire lors du changement d'échelle (Lara et al. 2006). Il convient donc de déterminer quels sont les paramètres critiques de l'extrapolation, afin d'anticiper les problèmes qui peuvent être rencontrés à l'échelle industrielle.

Pour réaliser le *scale-up* de bioprocédés, certains paramètres peuvent être maintenus constants lors du passage de l'échelle du laboratoire à l'échelle industrielle. Les principaux paramètres généralement cités sont : le temps de circulation (t_c) ou le temps de mélange (θ_m), la vitesse en bout de pale (V_{tip}), le débit d'air par volume de milieu par minute (vvm), le coefficient volumique de transfert d'oxygène (K_La) et la puissance dissipée volumique (P/V) (Gabelle, 2012). Cependant, quand la similarité géométrique est conservée entre les échelles lors de l'extrapolation du procédé, ces paramètres opérationnels sont fortement interdépendants et seuls quelques-uns peuvent être maintenus constants en pratique.

Dans le Tableau I.4, on peut ainsi observer que, à l'exception du maintien de la vitesse d'agitation N, le maintien de tous les autres paramètres proposés pour le *scale-up* entraîne une augmentation du temps de mélange, proportionnel au temps de circulation (Lara et al., 2006). Lorsque l'extrapolation du procédé est basée sur un temps de mélange constant (cas illustré dans la colonne 2 du Tableau I.4), il y a une réelle difficulté de reproduire, à grande échelle, des temps de mélange de l'ordre de ceux obtenus à petite échelle. De plus, la consommation d'énergie (puissance dissipée) est très fortement accrue et cette configuration est donc économiquement impraticable (Lara et al., 2006; Gabelle, 2012).

Tableau I.4. Interdépendance des paramètres scale-up.
Adapté de Lara et al., 2006

Critère *scale-up* [a]		Fermenteur 80 L	Fermenteur de production 10 m^3			
			Paramètre constant			
			P/V	N	V_{tip}	Re
Puissance dissipée	P	1	125	3125	25	0,2
Puissance dissipée volumétrique	P/V	1	1	25	0,2	0,0016
Vitesse de rotation	N	1	0,34	1	0,2	0,04
Temps de circulation [b,c]	t_c	1	2,94	1	5	25
Vitesse en bout de pale	V_{tip}	1	1,7	5	1	0,2
Nombre de Reynolds	Re	1	8,5	25	5	1

[a] Le critère *scale-up* indique la variable conservée constante entre les deux échelles

[b] Calculé comme l'inverse du débit volumétrique du mobile d'agitation

[c] $t_c = \theta_m/4$

Ainsi, lors du *scale-up*, dans les configurations habituellement mises en œuvre, on observe inévitablement un temps de mélange plus élevé dans les bioréacteurs de grande échelle (plusieurs centaines de mètres de cubes) par rapport à l'échelle du laboratoire (Lemoine et al., 2017).

Différentes alternatives ont été proposées pour conduire le *scale-up*. Elles consistent à considérer une cible associée à un critère d'extrapolation, cette cible pouvant être atteinte en modifiant plusieurs paramètres opératoires. Ces alternatives sont résumées au Tableau I.5 qui précise, pour chacune, les effets induits par le changement d'échelle.

Tableau I.5. Effet du scale-up en fonction des critères maintenus constant, pour des bioréacteurs de géométrie identique, un facteur d'échelle de 10 et un régime d'écoulement turbulent.
Adapté de Hardy, 2016

Critère maintenu constant	**Effets du *scale-up***
Temps de mélange θ_m	Consommation d'énergie très importante Configuration économiquement impraticable
Puissance dissipée volumétrique P/V	Augmentation de V_{tip}, de k_La (si le taux d'aération est fixé) et de θ_m Possible impact négatif dû au cisaillement
Nombre de Reynolds Re et Vitesse en bout de pale V_{tip}	Réduction de P/V et du k_La Diminution du transfert d'oxygène et possible apparition d'hétérogénéités
Coefficient volumique de transfert d'oxygène K_La	Maintien du transfert d'oxygène, mais augmentation de P/V Scénario inadapté aux champignons filamenteux à cause de l'impact variable de la rhéologie sur le k_La

Dans le cas d'une culture aérobie, une autre cible pertinente peut être le maintien de la concentration en oxygène dissous au-dessus d'un certain seuil. Cette approche se traduit par la mise en place d'un k_La assez bien conservé (voire légèrement inférieur) entre les échelles et donc le maintien (voire la baisse) de la puissance dissipée par unité de volume. En conséquence la vitesse en bout de pale et le temps de mélange vont augmenter lors de l'extrapolation, ainsi que le risque de voir apparaitre des hétérogénéités dans le milieu de culture.

I.6.2. Effets du stress hydrodynamique lors le d'extrapolation du procédé

Un phénomène expérimenté par les champignons lors de l'extrapolation du procédé est le changement des conditions hydrodynamiques. Si les bactéries et les levures ne sont significativement pas impactées par des contraintes de dynamique des fluides, en lien avec leur petite taille (Hewitt et al., 1998), les microorganismes filamenteux sont en revanche facilement et couramment affectés (Stocks and Nienow, 2018). Ainsi, *T. reesei* est sensible aux stress hydrodynamiques, ce qui se traduit par une réduction de taille de ses structures mycéliennes lors de leur exposition à de fortes contraintes de cisaillement (Hardy et al. 2017). Une modification de la morphologie tridimensionnelle est également observée, en conséquence du cisaillement (Hardy et al. 2017). Ces conséquences impactent alors la capacité de croissance du microorganisme et sa capacité à produire les enzymes (Hardy et al. 2017). Cela est particulièrement observé dans le cas où la puissance d'agitation est augmentée pour compenser les temps de mélange plus importants trouvés dans les grands bioréacteurs.

Ainsi, l'optimisation des fermentations avec ces micro-organismes est complexe car la morphologie fongique a une incidence sur les paramètres du procédé, alors que les conditions du procédé affectent en retour la morphologie et éventuellement la productivité (Figure I.13).

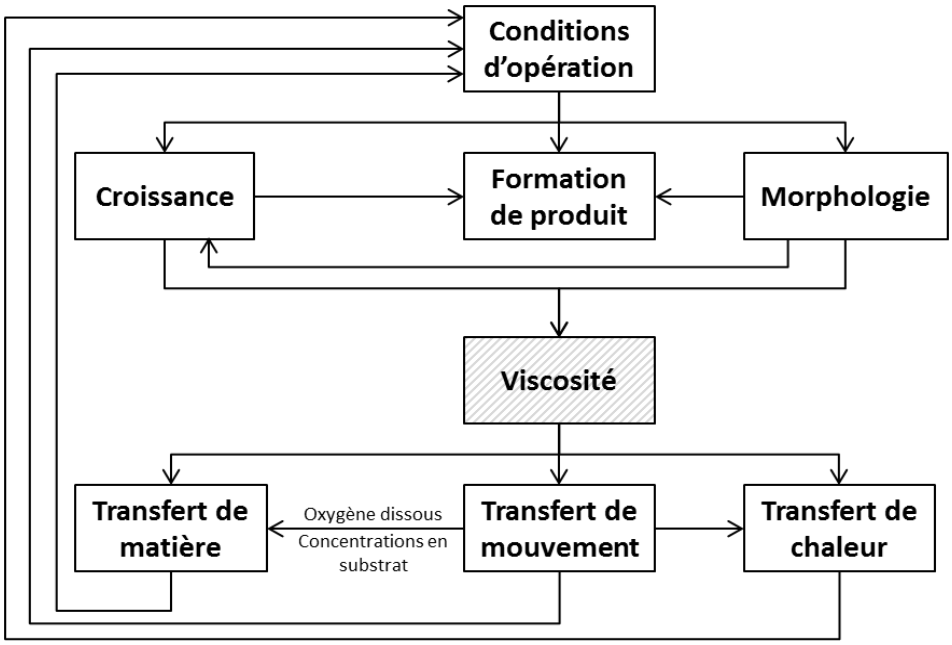


Figure I.13. Représentation schématique des interrelations entre les processus d'un bioprocédé en milieu visqueux.
Adapté de Metz et al., 1979.

I.6.3. Effet des hétérogénéités dans les cultures à grande échelle et hétérogénéité de populations

Dans les cultures en bioréacteurs, lorsque le temps de mélange est supérieur ou du même ordre de grandeur que le temps caractéristique d'une réaction clé de l'organisme cultivé, alors des hétérogénéités sont susceptibles de se produire (Lara et al., 2006). Ces hétérogénéités peuvent générer des gradients de concentration de substrat, d'oxygène dissous, de température, de pH et de concentrations en base et en acide. Elles peuvent être perçues par les cellules comme des stress, liés aux différentes conditions environnementales dans les différentes zones du réacteur, stress dont la fréquence varie selon les conditions d'agitation. Ces types de stress provoquent une réponse biologique d'adaptation et peut affecter le taux de consommation des substrats, de production des enzymes et, de manière concomitante, les flux intracellulaires (Lara et al., 2006 ; Takors, 2012).

Dans certains cas, des populations hétérogènes peuvent apparaitre via des mécanismes épigénétiques (Casadesús and Low, 2013, Schroeder et al., 2018). Le terme de dégénérescence a été défini par Reusser en 1963 comme le fait de perdre la capacité de produire des composés chimiques souhaitables. Il indique que ce phénomène est influencé par la capacité de la population à conserver les caractéristiques biosynthétiques souhaitables d'une génération à l'autre (Reusser, 1963). Il s'agit d'un phénomène déjà observé chez de nombreux microorganismes d'intérêt industriel comme *Trichoderma reesei* (Martzy et al, 2021). L'origine principale des phénomènes de dégénérescence des souches est l'apparition de mutants par instabilité génétique ou par

épigénétique, en conséquence notamment de différents stress comme les carences en substrats, les stress thermiques, acides ou alcalins, et osmotiques, ou la présence de produits toxiques (Peng and Liang ; 2020, Bouchat et al., 2022). Ces mécanismes peuvent mener à l'apparition d'une hétérogénéité de population au sein de la culture (Bouchat, 2022).

I.6.4. La méthodologie scale-down pour répondre aux problématiques du scale-up

Originairement proposée par Oosterhuis (1984), la méthodologie scale-down consiste à simuler, à l'échelle du laboratoire, les conditions subies par les microorganismes à l'échelle de production. La méthodologie *scale-down* est ainsi une démarche itérative. Ainsi, il est d'abord nécessaire définir les phénomènes et paramètres pertinents du procédé à grande échelle pour qu'ils puissent ensuite être reproduits à une plus petite échelle, où les expériences peuvent être conduites pour limiter le risque d'échec lors du *scale-up* ultérieur (Stocks and Nienow, 2018) .

L'analyse de régime est l'un des moyens efficaces qui permet d'estimer quantitativement l'effet du *scale-up*, des conditions parfaitement agitées obtenues à petite échelle jusqu'aux conditions en grande échelle où des hétérogénéités peuvent apparaitre (Stocks and Nienow, 2018) . Cette approche correspond à la première étape de la méthodologie *scale-down* et son but est d'identifier les possibles mécanismes limitants dans le bioréacteur à grande échelle. Dans la deuxième étape de l'étude *scale-down*, des simulations sont menées en laboratoire pour simuler le parcours des cellules à travers un bioréacteur hétérogène. Ces simulations permettent d'évaluer les effets des hétérogénéités sur les cellules, sans avoir à faire l'expérience à l'échelle industrielle, tâche souvent coûteuse et peu pratique à réaliser. Les connaissances ainsi générées à petite échelle sont alors utilisées pour optimiser les cultures à grande échelle (Lara et al., 2006).

La Figure I.14 résume les approches mises en œuvre en procédures scale-up et scale-down en biotechnologies.

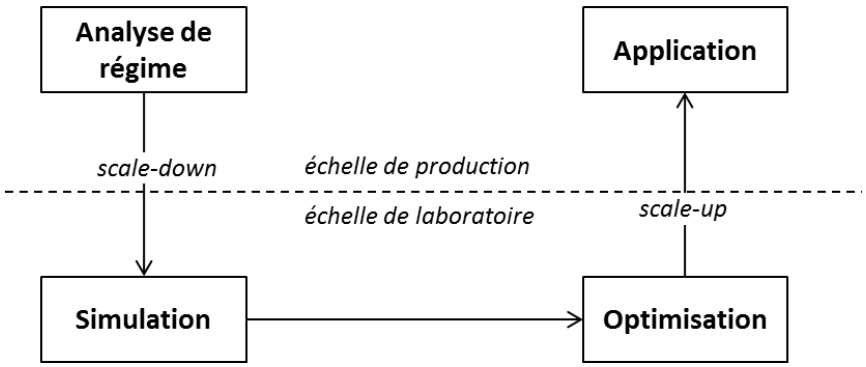


Figure I.14. Procédure *scale-up/scale-down* pour les procédés biotechnologiques.
Adapté de Oosterhuis (1984)

I.6.4.1. Approches scale-down appliquées à l'étude de l'effet du cisaillement sur les microorganismes filamenteux

L'impact du cisaillement sur la croissance et la production d'enzymes par *T. reesei* a été bien étudié par Nicolas Hardy lors de sa thèse (Hardy et al., 2015; Hardy, 2016; Hardy et al., 2017a; Hardy et al., 2017b). Le développement de méthodes permettant de quantifier les critères morphologiques et la viscosité apparente en fonction du cisaillement lors des cultures de *Trichoderma reesei* a permis d'étudier l'effet du cisaillement sur le taux de croissance du microorganisme et sa vitesse spécifique de production d'enzymes. Le cisaillement est une notion qui peut être considérée de différentes manières : cisaillement maximal, souvent considéré comme proportionnel à la vitesse en bout de pale (Vtip), cisaillement moyen souvent relié à la puissance dissipée par unité de volume (P/V) ou de l'historique des cisaillements subis par le champignon (EDCF) qui correspond à la puissance dissipée divisée par le temps de recirculation dans la cuve. C'est ce dernier qui est apparu comme étant le plus pertinent pour représenter le cisaillement subi par le microorganisme à l'échelle industrielle (Hardy, 2016). En effet, les corrélations établies avec ce critère à partir de fermentations réalisées à l'échelle de 3L, ont permis d'estimer le taux de croissance, la viscosité et les critères morphologiques obtenus à l'échelle de 100m^3.

I.6.4.2. Approches scale-down appliquées à l'étude de l'effet des gradients d'oxygène au sein des bioréacteurs industriels

Plusieurs approches *scale-down* peuvent être utilisées pour étudier l'effet des hétérogénéités au sein des grands bioréacteurs sur les microorganismes, notamment en termes de concentration en oxygène dissous. La Figure I.15 regroupe les principales approches *scale-down* utilisées pour simuler les gradients d'oxygène, qui sont explicitées ci-dessous.

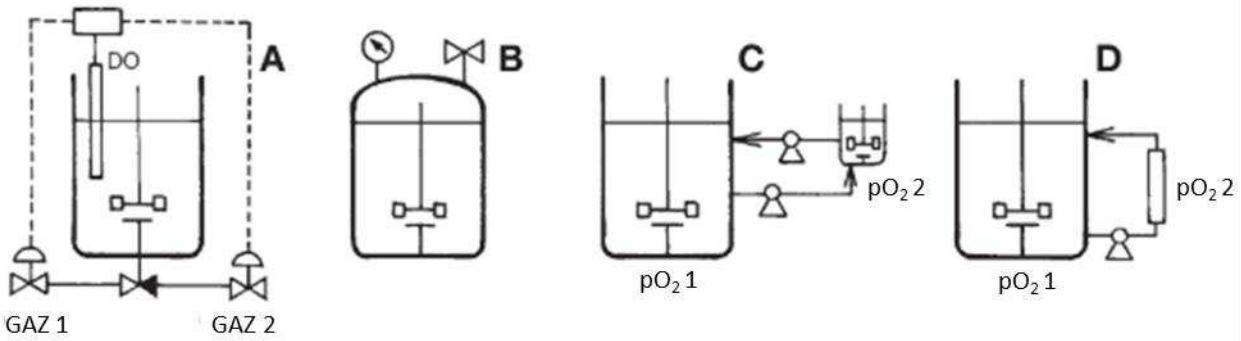


Figure I.15. Approches *scale-down* utilisées pour simuler des gradients d'oxygène.
Adapté de Lara et al. (2006).
pO_2 1 et pO_2 2 font référence à différentes concentrations de gaz dissous A) système à compartiment unique agité avec des variations de la pression partielle d'oxygène contrôlé avec un régulateur de gaz en boucle fermée ; B) bioréacteur agité avec manipulation de la pression en tête du bioréacteur ; C) système à deux compartiments agités opérant à des différentes pO_2 ; D) combinaison d'un réacteur agité et d'un réacteur piston.

La configuration A est constituée d'un bioréacteur unique sur lequel sont appliquées des variations de la pression partielle en oxygène. Cette configuration est relativement simple à mettre en place. Elle nécessite *a minima* d'avoir deux débitmètres, un pour l'arrivée d'air et l'autre pour l'arrivée d'azote, ainsi qu'un régulateur permettant de maintenir la pO_2 constante. Ce système permet d'alterner des périodes à différentes pO_2 au sein du bioréacteur.

Le système B est composé d'un bioréacteur unique sur lequel la pression en tête peut être modifiée. L'application d'une surpression permet d'augmenter rapidement la concentration en oxygène dissous (loi de Henry). Cependant, ce système peut s'avérer plus coûteux, car il implique l'utilisation d'un bioréacteur capable de travailler en surpression (Stocks et Nienow 2018).

Le système D est formé d'un réacteur agité connecté à un réacteur piston (plug-flow). Il permet de travailler dans une échelle de volume de 4 à 12 L. En revanche, il est assez compliqué de réguler les paramètres et notamment le pH dans le réacteur piston, ce qui peut créer un biais.

Enfin, le système C est composé de deux bioréacteurs agités connectés en boucle, c'est-à-dire que le flux sortant du premier réacteur alimente le second, dont le flux sortant revient dans le premier. Pour l'étude des hétérogénéités en termes de concentration en oxygène dissous, les deux bioréacteurs travaillent à des pO_2 différentes, ce qui permet aux microorganismes de passer successivement d'une condition gazeuse à une autre. Cette configuration nécessite d'utiliser des pompes de recirculations et des débits mètres à air et à azote en plus du système de régulation de la pO_2 dans chaque réacteur. Cette configuration permet une flexibilité sur le rapport entre les volumes des deux compartiments, en plus de permettre le contrôle des conditions d'opération dans les deux réacteurs (Limberg et al., 2016). Un autre avantage du système C par rapport au système D consiste dans le fait que le premier génère des oscillations plus hétérogènes, ce qui résulte en des gradients plus complexes (Limberg et al., 2016).

Nous avons choisi de travailler avec deux différentes approches pour étudier l'effet des gradients d'oxygène sur la physiologie de *Trichoderma reesei* : un système à deux compartiments composés de deux bioréacteurs agités (bizone) et un système à compartiment unique (1 bioréacteur agité) avec des oscillations de la concentration en oxygène dissous dans le milieu. Ce choix a été motivé par le fait que ces deux approches sont les plus représentatives et aussi les plus utilisées par les auteurs ayant étudié l'effet des hétérogénéités dans les bioréacteurs. Ces approches sont également les plus adaptées pour la réalisation d'expériences avec nos équipements.

I.7. Synthèse des informations et stratégie d'étude

Compte tenu du scénario énergétique et environnemental actuel, le bioéthanol de deuxième génération constitue un bon candidat pour remplacer une partie des combustibles fossiles dans le secteur du transport. Provenant de ressources renouvelables essentiellement composées de lignocellulose, telles que des 'déchets générés par les industries agroalimentaires et forestières, il ne présente pas de concurrence sur les surfaces agricoles dédiées au le secteur alimentaire.

Cependant, pour que l'éthanol 2G devienne compétitif sur le marché, il est nécessaire de réduire son coût de la production. Or, l'une des étapes les plus coûteuses de son procédé de production est l'hydrolyse enzymatique du substrat cellulosique obtenu après prétraitement, principalement du fait du coût de production des cellulases. A l'échelle industrielle, ces enzymes sont majoritairement produites en milieu liquide par le champignon *Trichoderma reesei,* au cours d'un procédé biotechnologique mettant en œuvre une phase de croissance en batch sur glucose, suivie d'une phase de production de cellulases en fed-batch en présence de concentrations limitantes en lactose. Lors de sa croissance, le champignon filamenteux forme des structures tridimensionnelles enchevêtrées dans le milieu, dont la structure morphologique a été récemment caractérisée. Ces structures complexes entraînent une augmentation de la viscosité du moût au cours de la croissance du champignon. *T. reesei* est en outre aérobie stricte et ce qui implique la nécessité d'assurer un transfert d'oxygène suffisant tout au long de la culture. Cependant, les structures complexes du champignon sont sensibles au cisaillement, ce qui complexifie la maîtrise des transferts de mouvement et de matière, car il faut en même temps agiter et aérer fortement pour répondre aux besoins en oxygène du champignon dans un contexte de forte viscosité des milieux, mais sans déstructurer les filaments pour ne pas affecter négativement la production des cellulases. Or, des travaux antérieurs ont montré que le stress hydrodynamique lié aux fortes agitations nécessaires pour assurer les transferts impact négativement la production.

Cette problématique est d'autant plus forte que la taille du bioréacteur augmente. Or, l'une des solutions possibles pour répondre à la question de la réduction du coût de production des cellulases, consiste à produire ces enzymes dans de très grands bioréacteurs afin de réduire les coûts d'investissements (économie d'échelle). Cette option nécessite alors d'extrapoler le procédé de production afin de travailler dans des bioréacteurs de plusieurs centaines de mètres-cube, en le faisant de la façon la plus pertinente possible pour ne pas bouleverser les équilibres entre morphologie du champignon, viscosité du moût, besoins en oxygène et sensibilité au cisaillement des cellules, afin d'aboutir à une production efficiente de l'enzyme. En effet, les conditions de mélange dans les grands bioréacteurs de taille industrielle sont très différentes de celles des

bioréacteurs de laboratoire. Notamment, les temps de mélange sont plus élevés, ce qui peut entraîner l'apparition de zones hétérogènes et affecter la productivité du champignon.

Pour répondre à ces problématiques, la méthodologie *scale-down* s'avère une solution intéressante, car elle permet d'anticiper les problèmes pouvant être rencontrés par le champignon à grande échelle, en les reproduisant à petite échelle pour les étudier et proposer des leviers pour les contourner.

Dans cette thèse, la méthodologie *scale-down* sera donc appliquée afin de répondre à quatre questions complémentaires : Quel est l'impact du cisaillement sur la production d'enzymes par *T. reesei* ? Quel est l'effet des gradients en oxygène sur la production de cellulases ? Quel est l'effet des gradients d'oxygène sur l'hétérogénéité populationnelle ? Comment modéliser ces effets afin de mieux les prédire ? Pour ce faire, des fermentations seront effectuées dans bioréacteurs de laboratoire afin de simuler les conditions subies par le champignon au sein des bioréacteurs à l'échelle industrielle, grâce à des développements méthodologiques adaptés.

II. Mise en œuvre de la méthodologie *scale-down* pour évaluer l'impact du cisaillement sur *T. reesei*

II.1. Introduction

Lors des cultures de *T. reesei*, la croissance des hyphes forme des structures complexes qui modifient la rhéologie du moût. L'augmentation de la viscosité qui en résulte, notamment en fin de phase de croissance et en début de phase de production d'enzymes, affecte négativement le transfert d'oxygène vers le milieu. Dans le but de maintenir une concentration en oxygène dissous suffisante pour le champignon aérobie, la puissance d'agitation doit être augmentée. Selon Hardy et al., 2017, l'agitation a un impact sur la morphologie du champignon, son taux de croissance et la rhéologie du milieu, et ce, différemment dans des bioréacteurs à différentes échelles. Ces auteurs ont montré que le critère *EDCFεmax* permet de corréler ces différentes variables.

Dans la présente étude, basée sur les travaux de Hardy, 2016, les effets du stress hydrodynamique sur la capacité de production de cellulases par *T. reesei* ont été caractérisés et analysés, aux niveaux extracellulaire et intracellulaires. Cette partie de la thèse fait l'objet d'une publication, publiée en 2021 dans le journal *Chemical Engineering Science* (232, 116353), et présentée ci-dessous dans la forme de l'article. Celui-ci décrit l'approche scale-down utilisée pour atteindre deux niveaux de stress hydrodynamique caractérisés par le critère *EDCFεmax* et leurs effets sur la production d'enzymes (mesurée au niveau extracellulaire) et sur la synthèse de protéines mesurée au niveau intracellulaire (par analyse protéomique), et présente une discussion sur les résultats obtenus.

II.2. Impact du stress hydrodynamique dans les bioréacteurs à cuve agitée sur la synthèse des cellulases par *Trichoderma reesei* aux niveaux intracellulaire et extracellulaire

The impact of fluid-dynamic stress in stirred tank bioreactors on the synthesis of cellulases by *Trichoderma reesei* at the intracellular and extracellular levels

Tamiris Roque[1], Jérôme Delettre[2], Nicolas Hardy[1], Alvin W Nienow[3], Frédéric Augier[4], Fadhel Ben Chaabane[1], Catherine Béal[2]

1 IFP Energies Nouvelles, 1 et 4 avenue de Bois-Préau, 92852 Rueil-Malmaison, France;

2 AgroParisTech, UMR SayFood, 1 avenue Lucien Brétignières, 78850 Thiverval-Grignon, France;

3 School of Chemical Engineering, University of Birmingham, Edgbaston, Birmingham B15 2TT, United Kingdom;

4 IFP Energies Nouvelles, Rond-Point de l'Echangeur de Solaize, BP3, 69360 Solaize, France

**Corresponding author: frédéric.augier@ifpen.fr*

Abstract

Cellulases for bioethanol production are mainly made by fed-batch fermentation using a filamentous fungus, *Trichoderma reesei*. Agitation at different scales impacts on morphology, rheology and growth rate and can be correlated by $EDCF_{\varepsilon max}$. Typically, $EDCF_{\varepsilon max}$ is much smaller at commercial scale and fungal size, viscosity and growth rate are greater. Here, to increase understanding, continuous culture in 3 L bioreactors using two $EDCF_{\varepsilon max}$ values were undertaken. The higher $EDCF_{\varepsilon max}$ decreased the cellulase production (concentration, 21 %; specific production rate, 24 %; protein yield, 20 %) whilst proteomic analysis showed, at an intracellular level, a decrease of cellulase and hemicellulase synthesis. An increase of stress proteins also occurred, which may help cells to limit the impact of fluid dynamic stress. Also, cellulase production during continuous culture at the bench varied with $EDCF_{\varepsilon max}$ similarly to that between bench and commercial scale during fed-batch culture.

Key-words: *Trichoderma reesei*; cellulases; fluid dynamic stress; scale-up/scale-down; proteomic analysis.

Highlights

- Higher values of $EDCF_{\varepsilon max}$ reduce production of extracellular cellulases
- This reduction is linked to a lowering of intracellular synthesis of cellulases
- Higher fluid dynamic stress leads to the appearance of stress proteins
- Intracellular stress proteins induce moderate changes in q_p from large ones in $EDCF\varepsilon max$

II.2.1. Introduction

Second-generation (2G) bioethanol from lignocellulosic materials is a good candidate to replace conventional fuels. Indeed, 2G bioethanol allows a reduction of about 85% of greenhouse gas emissions compared to fossil fuels (Morales et al., 2015). Also, 2G bioethanol uses lignocellulosic waste from the agri-food and forestry and does not compete with food. However, production costs remains high compared to ethanol from starch. This increase is mainly due to the high price of cellulases, the enzymes which hydrolyze lignocellulosic biomass into simple sugars. The 2G bioethanol price can be reduced if cellulases production costs are lowered (Hardy et al., 2017). Economy of scale is a way of doing so, requiring the use of bioreactors of several hundred cubic meters, a huge size compared with that at which the process is developed. With increasing scale, the medium in the bioreactor experiences increasing spatial heterogeneities (Amanullah et al., 2004; Lara et al., 2006) and the fluid dynamic stresses change (Hardy et al., 2017); and it is important to know what their impact will be.

Cellulolytic enzymes are mainly produced at industrial scale by the filamentous fungus *Trichoderma reesei* because of its high cellulases secretion capacity (Lopes Ferreira et al., 2014; Soni et al., 2018). As enzyme production is dissociated from growth, industrial cultures are often carried out in two steps: a batch phase for growth of the fungus followed by a fed-batch phase for the production of cellulases (Jourdier et al., 2013). During growth, *T. reesei* can use different carbon sources, but glucose is the most common (Hardy, 2016). As the *T. reesei* grows, it develops hyphae which form complex structures (Hardy et al., 2017b). The complex morphology and high concentrations at the end of growth lead to a high viscosity medium with shear thinning behavior

(Gabelle et al., 2012; Hardy et al., 2015; Quintanilla et al., 2015).

The production phase starts when the growth stops by limiting the carbon source to induce the production of cellulases (dos Santos Castro et al., 2014). In this phase, soluble sugars such as sophorose, cellobiose and lactose are used to induce the secretion of cellulases. In order to avoid further growth, an inductive substrate is fed continuously at an optimal limiting rate (Jourdier et al., 2013; Hardy et al., 2017). As *T. reesei* is a strictly aerobic microorganism, the dissolved oxygen concentration (dO_2) must be above the critical value, 15 % dO_2 (1.2 mg of $O_2.L^{-1}$) (Marten et al., 1996) for the strain RUT-C30. However, the high viscosity at the end of the batch phase reduces mass transfer rates, and oxygen transfer (Albaek et al., 2012; Gabelle et al., 2012). To ensure dO_2 > 15 % dO_2 at this time, the power input has to be increased (Gabelle et al., 2012), enhancing the fluid dynamic stress on the mycelia.

There are many ways of characterizing fluid dynamic stress with changes in agitation intensity and with scale (Amanullah et al., 2004). Until the 1990s, the two most common were tip speed or specific power input, *P/V* ($W.m^{-3}$). However, in 1996, it was shown with the fungus, *P. chrysogenum*, that whilst tip speed increased with scale at constant specific power, damage to the organism was reduced (Jüsten et al., 1996). However, a new function which reduced with increasing scale, the energy dissipation/circulation function, *EDCF*, was able to correlate fungal breakage and various growth parameters, better than *P/V* (Jüsten et al., 1996). In essence, the *EDCF* concept is that fungus break to an equilibrium size dependent on the maximum specific energy dissipation rate, ε_{max} ($W.m^{-3}$) in a region close to the impeller and the frequency with which the organism passes through that region, $1/t_c$ (s) where the circulation time, $t_c = V/(Fl \cdot N \cdot D^3)$. Here, V (m^3) is the volume of broth in the bioreactor, N ($rev.s^{-1}$) the agitator speed, D (m) its diameter and Fl (dimensionless), its flow number. Because the circulation time increases with increasing scale even at constant P/V, *EDCF* generally decreases with scale, sometimes markedly. There are a number of ways of assessing ε_{max} and a recently developed definition by Grenville et al. (2017) is $\varepsilon_{max} = 1.04 \,.\, x \,.\, \rho \,.\, Po^{\frac{3}{4}} \,.\, N^3 . D^2$. Here, x is the ratio of impeller diameter to trailing vortex diameter, a dimensionless characteristic of the impeller being used, as is *Po*, the power number; and ρ ($kg.m^{-3}$) is the density of the broth. In 2017, we used this definition of ε_{max} to develop (Hardy et al., 2017) an improved *EDCF* function, $EDCF_{\varepsilon max}$. We then used $EDCF_{\varepsilon max}$ to correlate the impact of the fluid dynamic stress associated with a variety of impellers on various process parameters during the initial batch growth phase of *T. reesei* fermentations at the bench scale and also with a multiple impeller combination at the industrial scale.

Other filamentous organisms to which the *EDCF* has been applied are *T. harzianum* (Rocha-

Valadez et al., 2007), *Aspergillus oryzae* (Amanullah et al., 2002) and *Pleurotus ostreatus* (Fernández-Alejandre et al., 2016), where it was related to the transition of the organism from clumps to pellets. With *T. reesei* (Hardy et al., 2017), higher values of $EDCF_{\varepsilon max}$ reduced the mycelial size and specific growth rate (by up to 20 %) at the bench scale whilst at the commercial scale, as explained above, though the tip speed increased, $EDCF_{\varepsilon max}$ decreased leading to larger mycelia, higher viscosity and higher growth rates. However, as the bench runs were limited to the growth phase, cellulases were not produced; so the impact of fluid dynamic stresses on their production could not be investigated.

Previous work on the proteome of *T. reesei* has been studied in order to better identify the enzymes involved in lignocellulosic biomass degradation and the protein secretion profile under different environmental conditions (Herpoël-Gimbert et al., 2008). Apart from the common proteins involved in general metabolism, it mostly consists of two cellobiohydrolases (CBHI and CBH2), five endoglucanases (EGI, EGII, EGIII, EGIV and EGV) and two β-glucosidases (BGLI and BGLII) that act in synergy to degrade lignocellulosic materials (Herpoël-Gimbert et al., 2008). Proteomic studies have investigated the secretome and/or intracellular proteins synthesized by filamentous fungi (Peterson and Nevalainen, 2012) by combining one-dimensional (1D) or two-dimensional (2D) gel electrophoresis with protein identification by liquid chromatography/ mass spectrometry. This technique allows the analysis of the multicomponent cocktail of cellulolytic enzymes secreted by *T. reesei* in culture media (Herpoël-Gimbert et al., 2008; Jun et al., 2013; Kubicek, 2013), and to investigate the differential protein synthesis at intracellular level (Bianco and Perrotta, 2015). The influence of carbon source (Jun et al., 2013; dos Santos Castro et al., 2014; Peciulyte et al., 2014), pH (Adav et al., 2011), light intensity (Stappler et al., 2017) and agitation intensity (Mukataka et al., 1988; Lejeune and Baron, 1995) on extracellular enzyme secretion has also been studied. However, except for Jun et al., 2013, which compared its intracellular proteome with various carbon sources; and Arvas et al., 2011 that studied the intracellular effects of growth rate and cell density in chemostat culture, the impact of culture conditions on intracellular protein synthesis by *T. reesei* remains poorly investigated. To our knowledge, the impact of fluid dynamic stress (here expressed as $EDCF_{\varepsilon max}$) on the synthesis of intracellular proteins by *T. reesei* has never been reported.

The objective of this work therefore was to characterize the effects of fluid dynamic stress on the production of both intracellular proteins and extracellular cellulases by *T. reesei*.

II.2.2. Material and Methods

II.2.2.1. Strain, preculture and culture media

The *T. reesei* strain used and the composition of the preculture medium and of the batch-culture medium were fully described previously (Hardy et al., 2017). For the production phase, the medium had the same composition as the batch-culture medium but it was supplemented with 0.83 $g.L^{-1}$ yeast extract instead of powdered corn steep liquor.

A 150 mL preculture was prepared in a 2 L Fernbach flask by mixing 135 mL of preculture medium and 15 mL of a sterile glucose solution at 250 g L^{-1}. The flasks were seeded with 1 mL of conidia to give a seeding rate of 10% and held in a shaker incubator (Multitron II, Infors, Bottmingen, Switzerland) for 72 hours at 30°C and 180 rpm with an orbit of 50 mm before being added into the bioreactor culture.

II.2.2.2. Bioreactor cultures using two different fluid dynamic stress conditions

This work is a follow on to that reported in Hardy et al. (2017). In that study, the initial batch production of *T. reesei* was studied at the bench scale in a 3.5 L bioreactor with a working volume of 2.5 L and at commercial scale. At the bench scale, a Rayneri centripetal turbine impeller (VMI-mixing, Montaigu, France) (see Figure II.1) was used along with 3 others. All of the changes in process performance brought about by fluid dynamic stress for each impeller were successfully related to changes in $EDCF_{\varepsilon max}$. In order to move to continuous culture, a different bioreactor had to be selected and one of a similar size was available which used a Rayneri impeller. Since that impeller had fitted in well with the others in the earlier work, in order to have bench scale data in a similar sized bioreactor to aid comparison between the different aspects of the overall study, the present configuration was chosen.

A 3.0 L, dished bottomed, stirred bioreactor (ezControl BioBundle, Applikon Biotechnology, Foster, CA, USA) with a working volume of 1.5 L, diameter T = 126 mm with a broth height, H mm such that H/T = 1 and without baffles but with sufficient probes inserted to provide a significant baffling effect. The Rayneri centripetal turbine impeller was 0.08 m diameter, height, 0.045 m with Po = 2.0 and Fl = 1.3. The temperature was controlled at 27 °C, pH at 4.8 and dissolved oxygen concentration at 70 % by introducing a blend of air and nitrogen (thereby altering the driving force for mass transfer) through a sparger. The total flow rate was held constant at 0.8 L/min so that neither the dO_2 or flow rate changed during the experiment (Hardy et al., 2017). However, as in earlier work (Herpoël-Gimbert et al., 2008), to control to this dO_2 at the bench scale even with gas blending required a high P/V (Hardy et al., 2017) of at least 6 kW. m^{-3}, which needed a minimum

speed of 800 rpm. Such speeds led to very high $EDCF_{\varepsilon max}$ compared to the commercial scale, where the circulation time is significantly longer and the specific power was kept as low as possible for economic reasons.

Two complete runs, each consisting of 3 parts, were undertaken. In each, there was an initial batch phase during which the fungus was grown at an agitation speed of 800 rpm until a fungal biomass concentration of ~ 7.9 ± 0.2 $g.kg^{-1}$ was reached. Then, the continuous phase of the run was begun, thereby commencing cellulase production. That time is marked as 'start of continuous feed' on Figure II.1 and from then, it was held at 800 rpm for another 150 hrs which allowed time for approximately 5 volume changes so that a steady state should have been reached (Macauley-Patrick and Finn, 2008). The concentration of biomass and the production of cellulases also indicated an approximate steady state for 50 hrs. At that point, the speed was increased to 1700 rpm to give a higher fluid dynamic stress and then kept constant with the same feed and discharge rate. This condition was held constant for another approximately 140 hrs, equivalent to approximately 4 volume changes, sufficient to approach another steady state and allow the impact of the change on biomass and intracellular and extracellular proteins to be assessed. The experiment was duplicated and samples were withdrawn at regular intervals for biomass and protein concentration measurements and those taken at the times noted on Figure II.1 were used for proteomic analysis.

In the batch phase, the bioreactor contained 0.75 L 2N culture medium, 0.3 L water and 0.3 L glucose solution (150 $g.L^{-1}$) and it was inoculated with 0.15 L preculture to give an initial fungal concentration in the medium of 0.8 $g.kg^{-1}$. During the whole of the continuous phase, the constant feed and discharge rates of two solutions were lactose (180 $g.L^{-1}$) at 6 $mL.h^{-1}$ and the enriched 2N medium at 39 $mL.h^{-1}$ giving a dilution rate, D (0.03 h^{-1}) which since $D = \mu$, the growth rate, is also 0.03 h^{-1}.

II.2.2.3. Determination of concentrations in the culture medium

Biomass was quantified as described previously (Hardy et al., 2017) as was lactose following the method used for glucose. The concentration of the cellulases produced was quantified on filtered broth samples according to the Lowry method, by using the Protein Assay DC_{TM} kit (Biorad, Hercules, CA, USA) and a range of bovine serum albumin (BSA) concentrations from 0 to 1.5 $g.L^{-1}$ as standards (Hardy, 2016). β-glucosidase activity was measured as described by Jourdier et al. (2013). All analyses were performed in duplicate.

II.2.2.4. Proteomic analyses

The proteomic analyses of intracellular proteins were carried out in 3 steps: protein

extraction, two-dimensional (2D) electrophoresis on sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel (SDS PAGE) and identification of proteins by mass spectrometry coupled to liquid chromatography.

The cytoplasmic proteins were first extracted by cell grinding from a biomass cake obtained by filtration as previously described. Initially, 0.2 g of biomass cake was washed and re-suspended as described previously (Wang et al., 2011). The cells were lysed with 0.6 g of glass beads (0.3 g of diameter 0.1 mm and 0.3 g of diameter 0.5 mm, Biospec Products, Bartlesville, OK, USA) in a FastPrep FP 120 equipment (Bio 101, Savant Instruments, Holbrook, AZ, USA), for four times with cycles of 30 s at an intensity of 6.5. After grinding the cells, the samples containing solubilized cytoplasmic proteins were centrifuged, purified with 60 U endonuclease (Biorad, Hercules, CA, USA) and precipitated, and their protein concentration was assayed using the colorimetric method of Bradford (1976) using bovine serum albumin as a standard in order to ensure 300 µg of proteins were present (Wang et al., 2011).

The separation of the extracted proteins was achieved by successive separation according to their isoelectric point by isoelectric focusing (IEF) and to their molecular weight by SDS-page electrophoresis. All samples from the two conditions were analyzed in triplicate from three different extractions. The cell extracts containing 300 µg of proteins were diluted in 350 µL of extraction buffer [31]. To perform IEF, the diluted samples were loaded onto Immobiline DryStrip gels (pI 4-7, 17 cm, Biorad) that were submitted to electric focusing at 20°C on an IEF Cell (Biorad, Hercules, CA, USA) to reach 73,000 Wh for about 24 hours.

After equilibration of the DryStrip gels, the second dimension separation was performed in SDS-polyacrylamide gels as described by Wang et al. (2011). Proteome image analysis was carried out with PDQuest 2-D software (Biorad) to compare the proteins density on the gels obtained from different conditions. Spots only present on one gel condition or showing a difference in density greater than a factor of 2 were considered as different between two conditions and retained for identification.

The spots corresponding to the differentially synthesized proteins were collected, washed separately with 50 mM ammonium hydrogen carbonate and 50 % acetonitrile and then dried. After digestion with 0.5 µg of trypsin (Promega, Madison, WI) and 50 mM ammonium hydrogen carbonate for 12 h at 37 °C, the supernatant containing peptides were used for protein identification by tandem mass spectrometry coupled to liquid chromatography (LC-MS / MS) using a LTQ-XL mass spectrophotometer (ThermoFinnigan, Waltham, MA, USA) (PAPPSO, Gif-sur-Yvette, France). The sequences were identified using the Joint Genome Institute databases (JGI, Walnut Creek, CA USA).

II.2.3. Results and Discussion

II.2.3.1. Estimation of the fluid dynamic stress, EDCFεmax

In order to estimate ε_{max} (see Section II.2.1), a value of x is required. The values (Grenville et al., 2017) for different impellers range from 12 to 17 but one is not available for the Rayneri impeller, which is a very different shape to others (see Figure II.1). However, it produces radial flow as does a Rushton turbine which has an x value of 12 and this value is initially assumed here. Thus $EDCF_{\varepsilon max}$ was 1884 and 38,400 $kW.m^{-3}.s^{-1}$ respectively, a little higher than used previously (Hardy et al., 2017) because though similar speeds were used, here the bioreactor volume was smaller.

At the commercial scale, multiple impellers were used but the Rushton turbine provided most of the power input (Hardy et al., 2017). Thus, both the Po value and x of the Rushton turbine were chosen for the determination of $EDCF_{\varepsilon max}$ for the commercial scale, which as explained earlier was very much lower at ~ 6.65 $kW.m^{-3}.s^{-1}$ (Hardy et al., 2017). Overall, $EDCF_{\varepsilon max}$ was the best correlator of hyphal size, broth rheology and growth rate for all the impellers and across these scales.

II.2.3.2. Effect of fluid dynamic stress, EDCFεmax, on the production of cellulases

The details of the runs are given in Section II.2.2.2. Figure II.1 shows the biomass and protein concentration throughout the culture whilst Table II.1 gives the mean biomass and cellulase concentrations at the first steady state (the lower $EDCF_{\varepsilon max}$) and the near-steady state at the higher $EDCF_{\varepsilon max}$. Table II.1 also gives the value of a range of other process parameters obtained for these two conditions and p values from ANOVA tests for the results for the time periods indicated by the dotted lines on Figure II.1. The variables describing the biomass (biomass concentration, specific growth rate, growth yield) were not influenced by the agitation rate (p-values higher than 0.05). The variables that characterize the protein production (protein concentration, specific production rate, production and conversion yields and β-glucosidase activity) were significantly affected by the $EDCF_{\varepsilon max}$ value (p-values lower than 0.05).

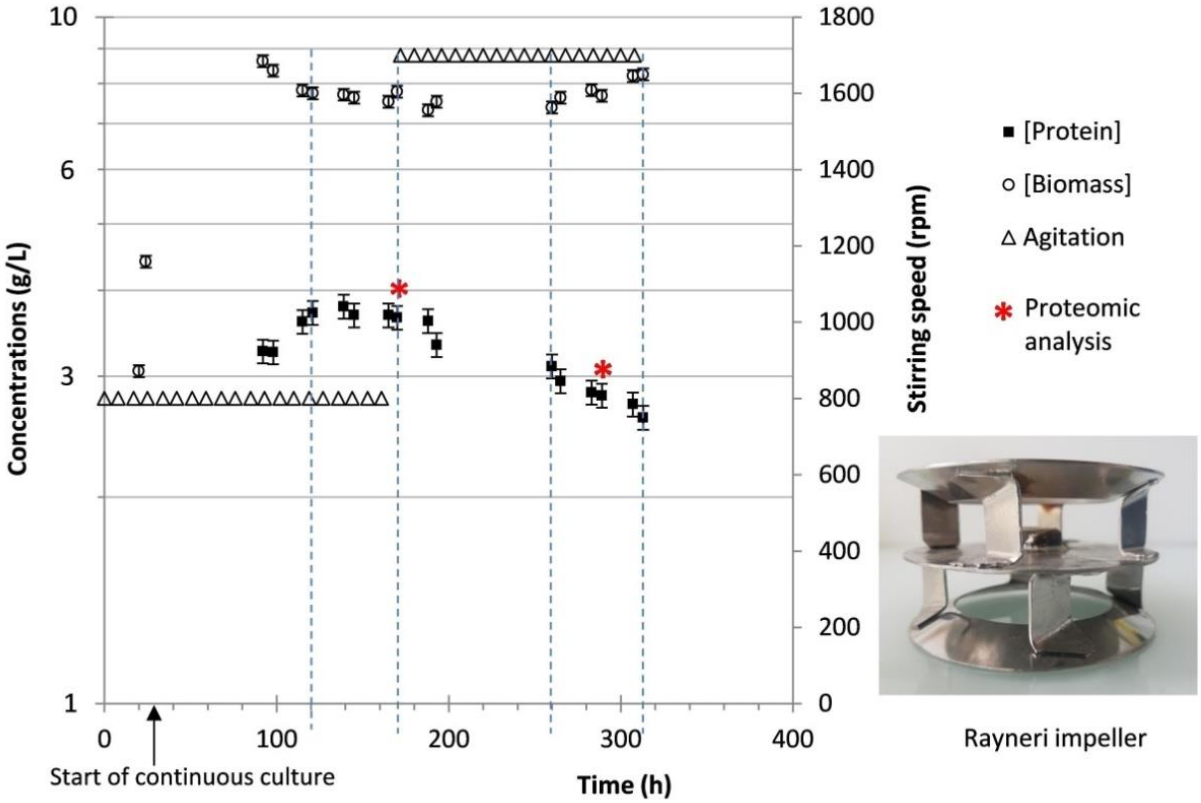


Figure II.1. Biomass and protein concentrations during continuous culture agitated by a Rayneri centripetal turbine impeller (embedded image) at initially 800 rpm increasing to 1700 rpm ($EDCF_{\varepsilon max}$ 1884 and 38,400 $kW.m^{-3}.s^{-1}$ respectively).
Dotted lines indicate time periods used for ANOVA tests. Error bars represent the standard deviation.

Table II.1. Measured values of culture parameters and associated p-values at the two different speeds and $EDCF_{\varepsilon max}$ values

Stirring speed	800 rpm	1700 rpm	p-value
$EDCF_{\varepsilon max}$ (kW.m^{-3}.s^{-1})	1884	38400	na
Biomass concentration, X (g.kg^{-1})	7.7 ± 0.2	7.6 ± 0.2	0.538
Specific growth rate, μ (h^{-1})	0.028 ± 0.001	0.028 ± 0.003	0.064
Protein concentration, P (g.kg^{-1})	3.7 ± 0.1	2.9 ± 0.1	0.001
Specific protein (cellulases)production rate, q_p (g.kg^{-1}.h^{-1})	13.5 ± 0.5	10.3 ± 0.8	0.0002
Specific substrate consumption rate, q_s (g.kg^{-1}.h^{-1})	0.084 ± 0.002	0.077 ± 0.002	0.0001
β-Glucosidase activity (IU/mL)	129.0 ± 1.7	107.9 ± 1.2	0.001
$Y_{X/S}$ (g.g^{-1})	0.35 ± 0.02	0.36 ± 0.04	0.471
$Y_{P/S}$ (g.g^{-1})	0.17 ± 0.01	0.13± 0.01	0.005
$Y_{P/X}$ (g.g^{-1})	0.48 ± 0.02	0.37 ± 0.02	0.002

The data presented corresponds to the mean values for each condition (800 and 1700 rpm) for the period shown on Figure II.1 and their standard deviations. Legend as in Nomenclature ; na: not applicable.

The specific growth rate remained unchanged since a constant value was imposed by the constant dilution rate, *D*. However, constant biomass concentration is globally determined as cell dry weight. Ideally, the biomass concentration should also be subdivided into the percentage of active and inactive/damaged cells. However, reliable techniques for quantitatively measuring the viability of filamentous fungi are not available whether by fluorescent dyes, because of sampling issues, or by flow cytometry, because of the filamentous structure of the fungi which tends to block the capillaries. On the other hand, the constant biomass implies that it should all be active.

Table II.1 and Figure II.1 show that the specific production rate decreased by 24 % and the protein production yields in relation to sugar and to biomass concentration decreased by 20 % and 23 % respectively with p values again showing statistical significance. These results agree with previous studies on the effect of fluid dynamic stress on secondary metabolites production by filamentous fungus in stirred bioreactors. Jüsten et al. (1998) observed increase in *EDCF* with different impellers decreased penicillin production during fed-batch fermentations of *P. chrysogenum*. Lejeune and Baron (1995) and Mukataka et al. (1988) found a lower production of cellulases at higher speeds with *T. reesei* cultures but did not analyze the impact of different impellers or quantify hydrodynamic stress beyond agitator speed. Reese and Ryu (1980) determined the effect of 'shear' on the stability of a crude cellulase preparation of *T. reesei* and found that it caused deactivation of the enzyme exoglucanase cellobiohydrolase (CBH), which slowed down cellulose digestion in a cellulosic biomass hydrolysis. Ganesh et al. (2000) observed similar inactivation with increasing speed in stirred reactors. These studies confirm that higher fluid dynamic stresses lead to a decrease in cellulases production by *T. reesei* and to a deactivation of components of its cellulolytic cocktail.

II.2.3.3. Effect of higher fluid dynamic stress on the synthesis of intracellular proteins

Scanned pictures of the two SDS-PAGE gels from proteomic analysis of cells are given in Figure II.2 (Supplementary Material). The gels indicate intracellular proteins that were differently synthesized at the two $EDCF_{\varepsilon max}$ values of 1884 and 38,400 $kW.m^{-3}.s^{-1}$ respectively. Image analysis of these gels allowed these proteins to be collected and identified. In total, 30 spots, which corresponded to 24 different proteins, had their synthesis modified as $EDCF_{\varepsilon max}$ increased. They were identified by tandem mass spectrometry coupled with liquid chromatography (LC-MS/MS) and compared with *in silico* data from sequence libraries as described in Section II.2.2. At the higher $EDCF_{\varepsilon max}$, six proteins were newly-synthesized (NW1 to NW6 in Table II.2); six proteins were increasingly-synthesized (up-regulated) by times 2 or more (UP1 to UP6, Table II.3); and 18 proteins were under-synthesized (down-regulated) by times 2 or more (UN1 to UN18, Table II.4).

An analysis of Table II.2 shows the increase in $EDCF_{\varepsilon max}$ only produced five new proteins, as two of the 6 spots are isoforms of the same protein. Of the others, three assist in protein quality control (including one chaperonin and two ubiquitin dependent proteasomes) and are recognized as stress proteins. From Table II.3, three up-synthesized proteins are involved in the central carbon metabolism as they are related to oxidoreductase activity (dihydrolipoyl dehydrogenase and FAD/NAD(P) domain-containing protein) and Acetyl CoA biosynthesis (acetate kinase). The four others are involved in carbon metabolism (adenosylhomocysteinase), proteolysis (glutamate carboxylpeptidase) and GDP-mannose biosynthesis (phosphomannomutase). Finally, of the under-synthetized proteins (Table II.4), there are a number of isoforms and only 12 different ones are identified from 18 spots of which four relate to cellulolytic (glucosidases, endoglucanase and cellobiohydrolases) and hemicellulolytic (xyloglucanases) activities. Of the eight others, one involved putrescine biosynthesis (putative agmatine deiminase), two to transferase activity (transketolase and uracil phosphoribosyl transferase) plus one isomerase (UDP-glucose-4-epimerase), one kinase (diphosphomevalonate decarboxylase), one oxidoreductase (NAD(P)H-dependent-D-xylose reductase), one involved in Ca^{2+} homeostasis (SGL domain-containing protein) and one implicated in proteolysis (Zn-dependent exopeptidases). Overall, two groups of proteins can be highlighted: under the higher $EDCF_{\varepsilon max}$, stress proteins were over-synthesized (up-regulated) and cellulases were under-synthesized (down-regulated).

Table II.2. Proteins newly-synthesized by the increase from 800 to 1700 rpm ($EDCF_{\varepsilon max}$ 1884 and 38,400 $kW.m^{-3}.s^{-1}$ respectively)

Spot	Protein ID*	Protein description	*MW* (KDa) in the 2D gel	*IP* in the 2D gel	Coverage** (%)	Functional category
NW1	135423	Chaperonin HSP60	63.1	5.25	75	Chaperone molecular family
NW2	26797	20S proteasome subunit alpha type (homologs PSMA4 / PRE9)	26.2	6.12	73	Threonine endopeptidase activity - Ubiquitin-dependent protein
NW3	99350	20S proteasome alpha type (homologs PSMA6 / SCL1)	26.3	6.30	73	
NW4	80225	Uroporphyrinogen decarboxylase	39.2	5.99	71	Porphyrin biosynthesis
NW5 & NW6***	39524	Malate dehydrogenase	35.5 35.5	5.92 6.22	37 49	Oxidoreductase activity - Carbohydrate metabolism

*MW: molecular weight; IP: isoelectric pH; *Protein ID were obtained from JGI database; **Coverage corresponds to the percentage of the protein sequence covered by identified peptides; ***Spots that correspond to isoforms of the same protein*

Table II.3. Proteins over-synthesized from the increase from 800 to 1700 rpm ($EDCF_{\varepsilon max}$ 1884 and 38,400 $kW.m^{-3}.s^{-1}$ respectively)

Spot	Protein ID*	Protein description	*MW* (KDa) in the 2D gel	*IP* in the 2D gel	Coverage** (%)	Log2 fold change	Functional category
UP1	78299	Dihydrolipoyl dehydrogenase	55.3	6.47	77	1.9	Oxidoreductase activity - Cell redox homeostasis
UP2	25190	FAD/NAD(P)-binding domain-containing protein	59.5	6.07	78	1.4	
UP3	97186	Phosphomannomutase	28.1	5.38	71	1.3	GDP-mannose biosynthetic process
UP4	137356	Glutamate carboxypeptidase	57.8	5.69	82	2.5	Proteolysis
UP5	99242	Acetate kinase	46.6	6.49	81	1.3	Acetyl-CoA biosynthesis
UP6	142425	Adenosylhomocysteinase	46.0	6.22	68	1.5	Nucleic acid and amino-acid metabolism

*MW: molecular weight; IP: isoelectric pH; *Protein ID were obtained from JGI database; **Coverage corresponds to the percentage of the protein sequence covered by identified peptides*

Table II.4. Proteins under-synthesized by the increase from 800 rpm to 1700 rpm ($EDCF_{\varepsilon max}$ 1884 and 38,400 $kW.m^{-3}.s^{-1}$ respectively)

Spot	Protein ID*	Protein description	*MW* (KDa) in the 2D gel	*IP* in the 2D gel	Coverage** (%)	Log2 fold change	Functional category
UN1	122470	Exoglucanase II (1,4-β-cellobiohydrolase)	63.5	5.22	67	-2.3	Hydrolase activity – Cellulases
UN2	124438	Endo-β -1,4-glucanase	22.8	5.81	71	-2.3	
UN3 to UN7***	136547	β-D-glucoside glucohydrolase I	94.8	5.98	66	-1.5	
			91.8	6.15	65	-1.5	
			74.9	6.15	67	-2.8	
			74.5	6.34	69	-2.6	
			75.7	6.49	71	-2.8	
UN8 & UN9***	111943	Xyloglucanase	96.5	4.97	61	-2.4	Hydrolase activity – Hemicellulase
			92.1	4.87	63	-1.5	
UN10	108605	Uracil phosphoribosyl transferase	25.4	5.82	85	-1.2	Transferase activity - Nucleoside metabolism
UN11	111063	Peptide hydrolase	67.5	4.60	58	-2.3	Proteolysis
UN12 & UN13***	102903	Putative agmatine deiminase	47.0	4.55	84	-1.5	Putrescine biosynthesis
			46.8	4.65	40	-2.6	
UN14	99640	SMP30/gluconolactonase / LRE-like protein	33.7	5.12	75	-1.2	Ca^{2+} homeostasis and signal transduction
UN15	101957	Diphosphomevalonate decarboxylase	36.0	5.63	45	-1.1	Kinase activity - ATP binding - Phosphorylation
UN16	137982	UDP-glucose 4-epimerase	37.0	6.15	39	-1.3	Coenzyme binding - Isomerase activity - Cellular metabolism
UN17	94809	NAD(P)H-dependent D-xylose reductase	24.4	5.08	53	-1.6	Oxidoreductase activity
UN18	110941	Transketolase	74.7	6.39	72	-2.9	Transferase activity – Metal ion binding - Carbohydrate metabolism

*MW: molecular weight; IP: isoelectric pH; *Protein ID were obtained from JGI database; ** Coverage corresponds to the percentage of the protein sequence covered by identified peptides; ***Spots that correspond to isoforms of the same protein*

II.2.3.3.1. Effect of higher fluid dynamic stress on the synthesis of stress proteins

It is known that environmental stresses cause protein denaturation by aggregation and misfolding leading to loss of biological functions and cell apoptosis (Roller and Maddalo, 2013; Tiwari et al., 2015). Table II.2 and Figure II.2 (Supplementary Material) show the higher speed ($EDCF_{\varepsilon max}$) produces the chaperonin protein HSP60 and the ubiquitin-proteasome system which are known to reduce cell damage by acting on post-translational processes (Tiwari et al., 2015), correcting protein folding, helping refolding and stabilizing them under stress (Pickart, 1999). Specifically, HSP60 has a crucial role in synthesis, transportation, folding and degradation of proteins (Chen et al., 1999) and its over-expression under heat (Raggam et al., 2011; Tiwari et al., 2015) and heavy metal (Enjalbert et al., 2006) stress has been reported in fungal pathogens. Kashyap et al., 2016 observed its expression under saline stress in halotolerant fungus *P. clavariiformis*. The ubiquitin-proteasome system performs a similar function (Shang and Taylor, 2011; Kashyap et al. (2016) with various fungi; for example, nitrogen deprivation (Shang and Taylor, 2011), heat shock (Staszczak, 2008) and exposure to cadmium (Goller et al., 1998).

The present study clearly shows for the first time that the cells response to higher fluid dynamic stress is similar to that with other environmental stresses in order to protect themselves against irreversible damage.

II.2.3.3.2. Effect of fluid dynamic stress on the synthesis of cellulases

Figure II.2 (Supplementary Material) and Table II.4 show that at the higher $EDCF_{\varepsilon max}$, the synthesis of four intracellular cellulases decreased: glucosidases (β-D-glucoside glucohydrolase I), endoglucanases (endo-1,4-β-glucanases), cellobiohydrolases (exo-1,4-β-glucanases) and xyloglucanases. The first three make up the *T. reesei* cellulolytic cocktail (Jourdier et al., 2013). Cellobiohydrolases attack the cellulose chains from the ends, releasing cellobiose molecules. Endoglucanases hydrolyze cellulose chains randomly, generate new ends accessible to cellobiohydrolases. β-glucosidase has the role of hydrolyzing into glucose the cellobiose released by the action of endoglucanases and cellobiohydrolases. This synergistic action is essential for hydrolysis of lignocellulosic biomass by the fungus (Kumar et al., 2008) as are xyloglucanases (Herpoël-Gimbert et al., 2008) for improving hydrolysis efficiency as the hemicellulolytic activity of this enzyme increases the surface area (Benkő et al., 2008).

The fact that the synthesis of cytoplasmic cellulases is negatively affected by higher fluid dynamic stress is strongly linked to the reduction of extracellular cellulases (Figure II.1 and Table II.1). This result indicates that the profile of extracellular proteins is directly linked to the synthesis

of intracellular proteins, as demonstrated above from the proteomic analysis. This finding is original because, although some authors have reported the negative effects of 'shear' stress on the secretion of cellulases by *T. reesei* (Mukataka et al., 1988; Lejeune and Baron, 1995), the literature has not made any connection with the effect of fluid dynamic stress on the intracellular synthesis of cellulases.

II.2.3.4. Effect of scale on the production of cellulases

For this study in chemostat culture, $EDCF_{\varepsilon max}$ was 1884 $kW.m^{-3}.s^{-1}$ and 38400 $kW.m^{-3}.s^{-1}$ and the proteomic analysis showed that, as a result, a change took place at the intracellular level to protect the cells and partially maintain the production of cellulases. As a result of this protective action, though $EDCF_{\varepsilon max}$ increased substantially, the fall in cellulase production was relatively small, from 13.5 to 10.3 $g.kg^{-1}.h^{-1}$.

In the batch cultures previously reported (Hardy et al., 2017) (i.e. during the growth phase of the fermentation), $EDCF_{\varepsilon max}$ was a little smaller at the bench scale than here because a larger bench scale bioreactor was used. As usual, it was also much lower than at the commercial scale (6.65 $kW.m^{-3}.s^{-1}$) for the reasons given earlier (Hardy et al., 2017) and in Section II.2.3.1. The lower $EDCF_{\varepsilon max}$ was mirrored by increases in the growth rate, the viscosity of the broth and the size of the fungi.

At the commercial scale (Hardy et al., 2017), since the aim was to produce as much cellulase as possible, fed batch culture was used for the production phase to give a q_p of 17 $g.kg^{-1}.h^{-1}$. In bench scale work (Hardy, 2016) related to this continuous culture study and the earlier batch study (Hardy et al., 2017), two fed batch cultures were also undertaken. These fed-batch studies were done in the same 3.5 L bioreactor as used by Hardy et al. (2017) with the Rayneri centripetal impeller at 1000 rpm to give an $EDCF_{\varepsilon max}$ of 2760 $kW.m^{-3}.s^{-1}$. The biomass concentration was controlled to 3.5 g/kg or 12 g/kg but the impact on the production of cellulases was not statistically significant (q_p = 11.9 ± 3.3 $g.kg^{-1}.h^{-1}$). Clearly, the scatter was large (Hardy, 2016). It is interesting to compare the small change in q_p for cellulase production with the very different $EDCF_{\varepsilon max}$ values in the continuous culture conditions reported here and those arising in fed-batch at the two very different scales. It is also convenient to assess whether the choice of x = 12 for the Rayneri impeller is an appropriate one.

Hardy et al. (2017) showed that in batch culture, the growth rate μ is linked with $EDCF_{\varepsilon max}$ and under the conditions studied, the growth rate was well described by the empirical function, Eq II.3 for all the impellers tested at the bench scale and for the data obtained at the commercial scale:

$$\mu = A \cdot ln(EDCF_{\varepsilon max})_{batch} + B \quad \text{(II.3)}$$

In order to investigate the effect of $EDCF_{\varepsilon max}$ on the specific production rate q_p, a similar analysis is proposed. However, given the low number of experiments performed, it is not possible to validate the function proposed by Hardy et al. (2017) or indeed any other function. Given this situation, it has been assumed as a working hypothesis, that a similar function of $EDCF_{\varepsilon max}$ is usable with other constants A and B. Thus,

$$q_{p_{cont}} = A \cdot ln(EDCF_{\varepsilon max})_{cont} + B \quad \text{(II.4)}$$

Based on this hypothesis, the results of the present work are used to fit constants to Eq II.4 and then used for scale-up consideration. Using the q_p values obtained in the present work at the two $EDCF_{\varepsilon max}$ gives A = -1.05 and B = 21.4. Eq II.4 can now applied to the fed-batch case at the bench (subscript fb1) and commercial scale (subscript fb2) to give the empirical Eq II.5:

$$q_{p_{fb2}} = q_{p_{fb1}} - A \cdot ln\left(EDCF_{\varepsilon max_{fb1}} / EDCF_{\varepsilon max_{fb2}}\right) \quad \text{(II.5)}$$

If it is assumed that though different fermentation methods (fed-batch and continuous) give different product yields, the impact of fluid dynamic stress is the same for the particular organism, then the specific production rate at commercial scale can be obtained by Eq II.6:

$$q_{p_{fb2}} = 11.9 + 1.05 \cdot ln(2760/6.65) = 18.3 \quad \text{(II.6)}$$

This predicted value of q_p (18.3 $g.kg^{-1}.h^{-1}$) at the commercial scale is similar to the actual one (17 $g.kg^{-1}.h^{-1}$), especially considering the large difference in the scales used for these two fed-batch runs and that other factors can come into play at the commercial scale such as increased levels of inhomogeneity due to the greater mixing time and pCO_2 and dO_2 due to the static head. Nevertheless, it is clear that more data are required to confirm this relationship.

Table II.5 summarizes the different culture conditions, scales, process parameters, $EDCF_{\varepsilon max}$ and results obtained in the whole of this wide ranging study.

Table II.5. Comparison of the three different culture conditions and results obtained in this overall wide ranging study

Source	Culture Conditions	Bioreactor Scale	Process Parameters	EDCFεmax ($kW.m^{-3}.s^{-1}$)	Results
Hardy (2016)	Fed batch	3.5 L and ~100 m^3	q_p	2760 and 6.65	q_p : 0.012 and 0.017 $g.kg^{-1}.h^{-1}$
Hardy et al., (2017)	Batch	3.5 L and ~100 m^3	Rheology, biomass and morphology Y	24000 to 6.6	$Y = A \cdot ln(EDCF_{\varepsilon max}) + B$
This work	Continuous	3.0 L	q_p	38400 and 1880	q_p: 0.010 and 0.014 $g.kg^{-1}.h^{-1}$

The question regarding the impact of the value of *x* (the ratio of impeller diameter to trailing vortex diameter) chosen for the Rayneri impeller can also be addressed in relation to this type of analysis. Grenville et al. (2017) give a range of *x* values from 12 to 17 with 12 being the value for the Rushton turbine and chosen for the Rayneri because, though very different from most impellers, they are both radial flow. If the other extreme, *x* = 17, is chosen to test the range of possible impacts on this analysis, then the $EDCF_{\varepsilon max}$ values of the continuous cultures reported in Table II.1 are multiplied by 17/12, the *B* parameter of Eq. II.3 becomes 21.9 instead of 21.4, and the *A* parameter remains unchanged. Applying the same *x* value of 17 for the bench scale fed batch run, $EDCF_{\varepsilon max}$ becomes 3910 $kW.m^{-3}.s^{-1}$. If this value is used in Eq II.5 then, since $EDCF_{\varepsilon max}$ for the large scale where the Rushton turbine dominates remains the same, the predicted value of q_p for the commercial scale becomes 18.6 $g.kg^{-1}.h^{-1}$. In this case, the choice of *x* clearly is not a significant factor in the analysis of the impact of fluid dynamic stress on the production of cellulases. Therefore given the similarity in flow pattern between the Rayneri impeller and the Rushton turbine, *x* = 12 remains the value of choice.

Overall, it can be concluded that not only can the use of the $EDCF_{\varepsilon max}$ function enable bench scale data to predict hyphal size, broth rheology and growth rate at the commercial scale (Hardy et al., 2017), it also seems to be a promising tool in aiding scale-up in relation to predicting the production of cellulases. Indeed, the production of cellulases at the commercial scale should not be compromised by fluid dynamic stresses. More importantly, the agitation intensity chosen should be based on ensuring it is sufficient to meet the demands of oxygen mass transfer and carbon dioxide stripping along with an adequate blending strategy, including sub-surface addition of nutrients and pH control chemicals (Amanullah et al., 2004). In addition, economic considerations must be taken into account.

II.2.4. Conclusion

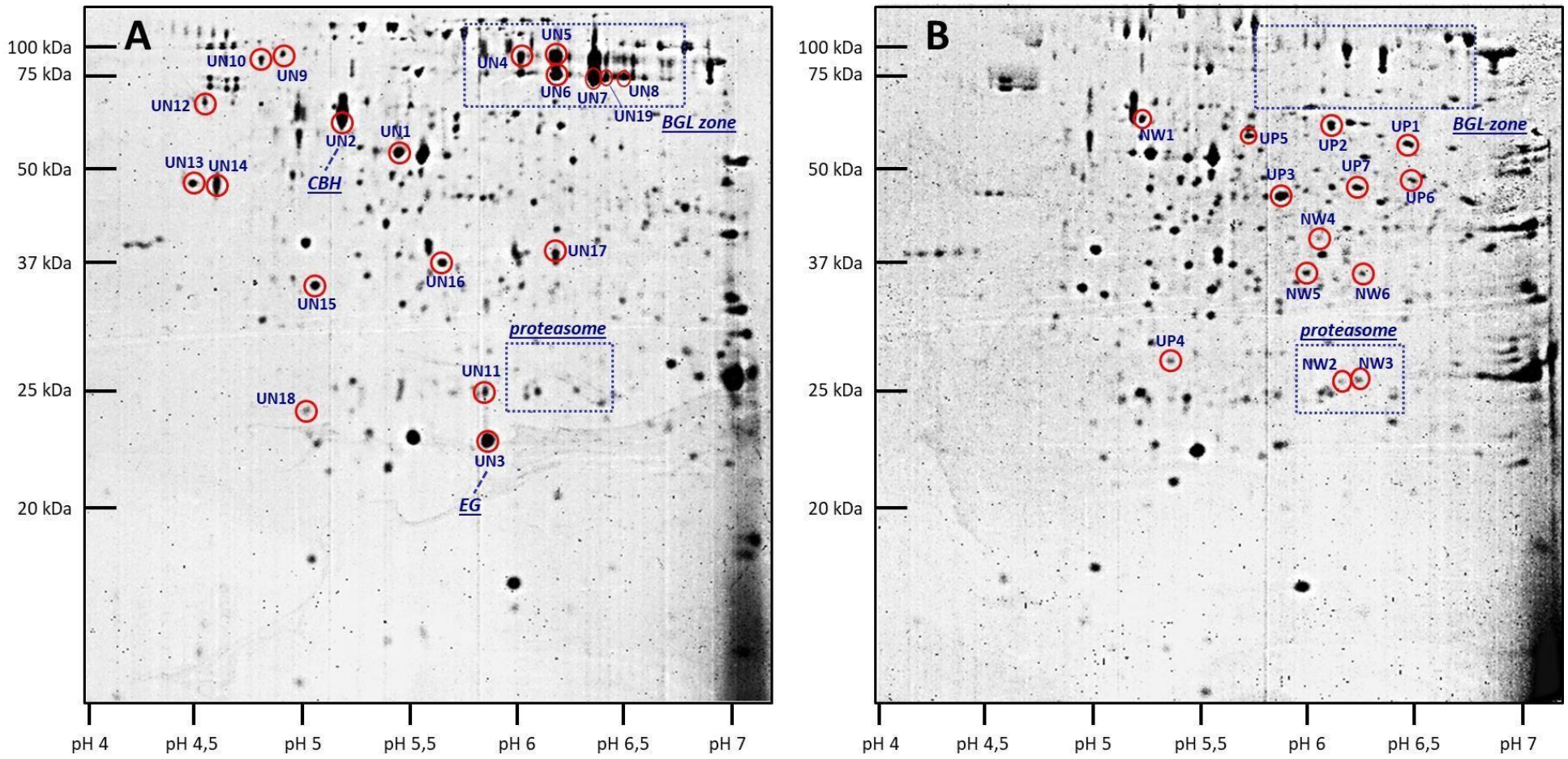
T. reesei was cultivated in continuous cultures at two $EDCF_{\varepsilon max}$ values, the lower one (1884 $kW.m^{-3}.s^{-1}$) until a steady state was reached and the higher (38400 $kW.m^{-3}.s^{-1}$) until a near-steady state, sufficient to show a significant fall in protein production linked to measureable changes in intracellular proteins. This method of defining fluid dynamic stress has already been successful in correlating its impact in the batch growth phase of *T. Reesei* at the bench and commercial scale (Hardy et al., 2017). Here, the use of $EDCF_{\varepsilon max}$ provided a link between this bench scale continuous culture study with that batch work (Hardy et al., 2017) and also related fed-batch culture to produce cellulases at the bench (Hardy, 2016) and commercial scale (~ 100 m^3) (Hardy et al., 2017). It is worthy of note, that a recent extensive review of scale-up methods concluded that the *EDCF* function was the best way of defining agitation intensity in bioprocessing (Böhm et al., 2019).

At the higher $EDCF_{\varepsilon max}$ at the bench scale, the concentration of the cellulases in the medium as well as the production yield and the specific production rate decreased by 21 %, 20 % and 24 % respectively. A proteomic analysis provided further insight that helped to explain these observations. Firstly, at the higher $EDCF_{\varepsilon max}$, the intracellular synthesis of all enzymes involved in cellulosic activity was decreased. On the other hand, stress proteins such as the HSP60 chaperone protein and the ubiquitin-proteasome system whose role is to protect the cells from the effects of fluid dynamic stress appeared. These findings demonstrate that at higher fluid dynamic stress, the fungus adapts itself by triggering protection and damage repair mechanisms at the intracellular level and by favoring its central metabolism to the detriment of other less essential functions, the combination of the two explaining the small decrease of cellulase biosynthesis even at much higher $EDCF_{\varepsilon max}$.

The higher extracellular cellulase production (q_p) at the lower $EDCF_{\varepsilon max}$ in continuous culture compared to that at the higher $EDCF_{\varepsilon max}$ is quantitatively similar to the increase in q_p during fed-batch fermentation at the commercial scale compared to that at the bench scale. Perhaps more importantly for the commercial aim of producing cellulases, the sensitivity to fluid dynamic stress is relatively small as the proteomic analysis explains.

Supplementary material

Figure II.2. Proteomic analysis of *T. reesei* cells: A) 800 rpm (EDCFεmax 1884 kW.m^{-3}.s^{-1}); B) 1700 rpm (EDCFεmax 38400 kW.m^{-3}.s^{-1}). UN1-UN19: under-synthesized proteins; UP1-UP7: over-synthesized proteins; NW1-NW6: newly-synthesized proteins.



II.3. Conclusion

T. reesei a été cultivé en cultures continues à deux vitesses d'agitations (800 et 1700 rpm), générant des stress hydrodynamiques distincts, caractérisés par le critère *EDCFεmax*, dont les valeurs étaient 1884 $kW.m^{-3}.s^{-1}$ et 38400 $kW.m^{-3}.s^{-1}$, respectivement. L'application de ces deux niveaux de stress a été réalisé en deux phases : la valeur d'*EDCFεmax* la plus basse (1884 $kW.m^{-3}.s^{-1}$) a été appliquée jusqu'à ce qu'un état d'équilibre soit atteint et ensuite la plus élevée (38400 $kW.m^{-3}.s^{-1}$) jusqu'à un état quasi-stationnaire, suffisant pour montrer une baisse significative de la production de protéines extracellulaires liée à des changements dans la synthèse des protéines intracellulaires. Cette méthode de caractérisation de la contrainte hydrodynamique a été préalablement employé par Hardy et al., 2017 pour corréler l'impact des stress hydrodynamiques sur la croissance de *T. reesei* en cultures en mode batch à l'échelle de laboratoire et à l'échelle commerciale. Dans une étude récente et approfondie sur les méthodes scale-down, Böhm et al., 2019 ont conclu que la fonction *EDCF* était le meilleur moyen de définir l'intensité d'agitation dans les bioprocédés, confirmant l'intérêt de notre approche.

Dans notre étude, l'application de l'*EDCFεmax* plus élevé a entraîné un effet négatif sur la concentration en cellulases dans le milieu ainsi que sur le rendement et sur la vitesse spécifique de production de cellulases. Ces trois variables ont cependant diminué de façon modérée, de 21%, 20% et 24%, respectivement. L'analyse protéomique a permis de confirmer et d'expliquer cet effet. A l'*EDCFεmax* plus élevé, la synthèse intracellulaire de toutes les enzymes impliquées dans l'activité cellulosique a été diminuée. En revanche, des protéines de stress telles que la protéine chaperon HSP60 et le système ubiquitine-protéasome dont le rôle est de protéger les cellules des effets du stress hydrodynamique sont apparues. Ces résultats démontrent qu'à un fort stress hydrodynamique, le champignon s'adapte en déclenchant des mécanismes de protection et de réparation des dommages au niveau intracellulaire et en favorisant son métabolisme central au détriment d'autres fonctions moins essentielles, telles que la production de cellulases. La combinaison de ces deux phénomènes explique la diminution modérée de la biosynthèse de cellulases, même à des *EDCFεmax* très élevés.

III. Mise en œuvre de la méthodologie *scale-down* pour évaluer l'impact des gradients d'oxygène sur *T. reesei*

III.1. Introduction

Dans les bioréacteurs à l'échelle de laboratoire, le temps de mélange du milieu de culture est faible (de l'ordre de quelques secondes) ce qui permet une distribution homogène des composants du moût. Ainsi, dans les cultures menées dans ce type de réacteur il n'y a pas de variation significative des concentrations en biomasse, oxygène, substrat, pH, température et métabolites dans les différentes zones du réacteur. Cependant, avec l'augmentation de l'échelle, le milieu subit des variations spatiales et temporelles, en particulier au niveau des concentrations en oxygène dissous et en substrats, ainsi qu'au niveau du pH, par rapport à l'échelle de laboratoire (Jourdier 2012). Ainsi, dans les cuves à l'échelle industrielle, les temps de mélange sont de l'ordre de la minute, soit du même ordre de grandeur que le temps caractéristique de transfert et de consommation d'oxygène par *Trichoderma reesei*. En conséquence, le champignon est exposé à différents microenvironnements, ce qui peut générer des stress et modifier les performances de la culture.

L'objectif de cette étude était d'analyser l'impact des gradients d'oxygène subis par *T. reesei* au sein des bioréacteurs à grande échelle sur sa capacité de production de cellulases. Pour répondre à cette question, deux approches scale-down ont été mises en œuvre, afin de mimer, à petite échelle, les hétérogénéités subies à grande échelle. Les deux approches retenues sont constituées (1) d'un système à deux compartiments composés de deux bioréacteurs agités (l'un aéré et l'autre non-aéré) et (2) d'un système à un seul compartiment (un seul bioréacteur) où une alternance de conditions aérée et non aérée a été opérée par injection d'air et/ou de de diazote pur. L'objectif de l'étude étant d'analyser les effets de ces gradients d'oxygène sur la production de cellulases, ils ont été appliqués uniquement en phase de production pour les deux approches employées, soit après la phase de croissance du champignon réalisée en condition aérée. Les cinétiques ont été caractérisées pour chaque expérience. Une culture Témoin réalisée en bioréacteur agité opérant à une pO_2 constante et

supérieure à la pO_2 critique de la souche a permis d'interpréter et d'analyser les résultats obtenus.

III.2. Matériels et Méthodes

III.2.1. Souche

La souche industrielle de *Trichoderma reesei* TR 3060 a été utilisée pour l'étude de l'effet des hétérogénéités sur sa physiologie et particulièrement sur sa capacité à produire des cellulases. Cette souche est descendante de la souche CL847 (Durand, Clanet et Tiraby 1988). Elle a été améliorée génétiquement par le département Biotechnologie d'IFPEN en collaboration avec la société PCAS Proteus (Longjumeau, France).

III.2.2. Milieux de culture et de préculture

Le milieu utilisé pour les cultures est appelé 4N car, selon Jourdier 2012, il est 4 fois plus concentré que le milieu originairement utilisé par Mandels et Weber 1969. Sa composition est détaillée dans le Tableau.III.1.

Tableau.III.1. Composition du milieu 4N (milieu de culture IFP Energies Nouvelles pour *T. reesei*)

Composé	Concentration
KOH	3,3 $g.L^{-1}$
H_3PO_4 85 %	6,0 $mL.L^{-1}$
$(NH_4)_2SO_4$	5,6 $g.L^{-1}$
$MgSO_4$, $7H_2O$	1,2 $g.L^{-1}$
$CaCl_2$, $2H_2O$	1,2 $g.L^{-1}$
Na_2HPO_4, $12H_2O$	0,23 $g.L^{-1}$
Solution d'oligoéléments (Tableau.III.2)	2 $mL.L^{-1}$
pH 2,0 avec H_2SO_4 concentré	-

Tableau.III.2. Composition de la solution d'oligoéléments

Composé	Concentration
$FeSO_4$	30 $g.L^{-1}$
$Co(NO_3)_2$, $6H_2O$	9,0 $g.L^{-1}$
$MnSO_4$, $1H_2O$	6,4 $g.L^{-1}$
$ZnSO_4$, $7H_2O$	8,4 $g.L^{-1}$
$CuSO_4$, $5H_2O$	3,0 $g.L^{-1}$
H_3BO_3	0,4 $g.L^{-1}$
$MoNa_2O_4$, $2H_2O$	1,0 $g.L^{-1}$
pH 1,8 avec H_3PO_4 85 %	-

L'ensemble des composants des milieux provient de Sigma Aldrich (Saint Louis, MO, USA).

Les sources de carbone utilisées dépendent de la phase de la culture. Pour les précultures, il s'agit d'une solution de glucose ajoutée à 25 $g.L^{-1}$, pour la phase de croissance de la culture réalisée en batch, le glucose est ajouté à 30 $g.L^{-1}$, et pour la phase de production de cellulases, une solution de lactose à 210 $g.L^{-1}$ est injectée en mode fed-batch dans le bioréacteur.

Pour les précultures, le milieu 4N est utilisé à 40 % (v/v) et complémenté avec du *corn steep* (Roquette Frères, Lestrem, France) à une concentration de 2 $g.L^{-1}$. Ensuite le milieu est tamponné avec de l'acide phtalique (sel di-potassique) et son pH est ajusté à 5,25 avec de l'hydroxyde de sodium 5,5 N avant stérilisation à 121°C pendant 20 minutes.

Pour les cultures en bioréacteur, le milieu 4N est utilisé à 50 % (v/v) et également complémenté avec du *corn steep* à une concentration de 2 $g.L^{-1}$. De l'antimousse SB2121 (Strucktol, Hambourg, Allemagne), composé de polyalkylène glycol, est ajouté dans le milieu à une concentration de 1 $mL.L^{-1}$. Le pH du milieu est ajusté à 4,8 avec de l'ammoniaque 5,5 N après stérilisation à 121°C pendant 20 minutes.

III.2.3. Précultures

La préculture est réalisée dans une fiole de type Fernbach de 2 L, contenant 225 mL de milieu de préculture, additionné de 25 mL d'une solution stérile de glucose à 250 $g.L^{-1}$. Elle est inoculée avec un cryotube contenant environ 4×10^7 spores de la souche TR3060. Ensuite elle est incubée à 30 °C pendant 72 h, sur une table d'agitation Multitron II (Infors, Bottmingen, Suisse) avec une agitation orbitale de 50 mm à 180 rpm. À l'issue de la préculture, l'inoculum est transféré stérilement dans le bioréacteur à un taux d'ensemencement de 10 % (v/v).

III.2.4. Cultures en bioréacteur

III.2.4.1. Fermenteurs utilisés

Dans cette étude, deux types de bioréacteurs ont été utilisées : F2P et Biolafitte.

Les bioréacteurs de type F2P (IFPEN) ont une capacité totale de 3,5 L et un volume utile de 3 L, avec un diamètre interne D = 0,16 m et une hauteur H = 0,22 m. Le contrôle de la température du milieu est réalisé à l'aide d'une lampe chauffante externe et d'un serpentin

de refroidissement placé à l'intérieur du réacteur. Ces bioréacteurs sont équipés d'un mobile d'agitation Rayneri (VMI-mixing, Montaigu, France) de 80 mm de diamètre. Ce mobile est constitué de 3 disques fermés solidarisés par 8 pales courbes (Figure III.1). Il génère un flux centrifuge vers le haut et centripète vers le bas (Hardy 2016), ce qui permet de limiter le cisaillement tout en assurant un mélange correct.

Figure III.1. Photo d'un mobile d'agitation de type Rayneri (VMI-mixing, Montaigu, France)

Les bioréacteurs de type Biolafitte ont une capacité volumétrique de 1 L utile avec un diamètre interne D = 0,11 m et une hauteur H = 0,26 m. Ces réacteurs sont équipés d'une double enveloppe qui permet de réguler la température du milieu de culture. Ils sont également équipés d'un mobile d'agitation de type Rayneri (VMI-mixing, Montaigu, France) de 55 mm diamètre.

Pour les deux types de bioréacteur utilisés dans cette étude, l'injection de gaz est faite par le bas à l'aide d'un sparger torique situé sous le mobile d'agitation.

III.2.4.2. Contrôle et suivi en ligne des fermentations

III.2.4.2.1. Suivi et contrôle de la température

La température est mesurée en ligne grâce à une sonde de température Pt100 préalablement étalonnée. Cette sonde est connectée au système de régulation de température du bioréacteur, qui permet de maintenir la température à une valeur constante dans les bioréacteurs.

III.2.4.2.2. Suivi du pH

La variation de pH du milieu au cours de la culture est suivie en ligne par une sonde de pH Mettler-Toledo (Greifensee, Suisse), après étalonnage par trois solutions tampons (pH = 2,

4 et 7). Les valeurs de pH sont revérifiées régulièrement lors des prélèvements des échantillons à l'aide d'un pH-mètre SevenCompact Mettler-Toledo (Greifensee, Suisse) également étalonné préalablement par les trois solutions tampon.

III.2.4.2.3. Mesure de la pO2

La concentration en oxygène dissous dans le milieu est mesurée en ligne par une sonde optique InPro 6860i Mettler-Toledo (Greifensee, Suisse). Cette sonde possède un temps de réponse inférieur à 70 secondes (pour atteindre 98% de la réponse finale) et délivre une réponse avec une précision de ± 1 %. Son étalonnage se fait à l'air avant insertion dans le bioréacteur contenant le milieu de culture pour autoclavage de l'ensemble. Ensuite, après l'autoclavage, un deuxième étalonnage à 2 points est réalisé : 1) à pO_2 = 0 % par injection de diazote et 2) à pO_2 = 100 % avec injection d'air comprimé. En cours de culture, le contrôle de la pO_2 est fait par l'injection d'un mélange gazeux composé de diazote et d'air comprimé, dont les débits sont régulés par des régulateurs de débit massiques de gaz EL-FLOW F-201CV (Bronkhorst, Ruurlo, Pays-Bas), comme décrit précédemment par (Hardy et al. 2017).

III.2.4.2.4. Détermination de la composition des gaz en sortie de bioréacteur

La composition des gaz en sortie de bioréacteur est mesurée en ligne par un analyseur de gaz Tandem PRO (Magellan BioTech, HEL Ltd., Hertfordshire, UK). La teneur en dioxygène est mesurée par galvanométrie et la teneur en CO_2 est mesurée par absorbance infrarouge.

III.2.5. Méthodes analytiques

III.2.5.1. Mesure de la concentration en biomasse

La concentration en biomasse est mesurée en utilisant la méthode du poids sec. Pour cela, une coupelle d'aluminium contentant un papier-filtre de porosité 1,2 µm est préalablement déshydratée en étuve à 105°C puis refroidie dans un dessiccateur. Ensuite, un échantillon d'environ 10 mL est prélevé du bioréacteur et pesé. Cet échantillon est alors filtré sous pression puis rincé avant d'être placé à l'étuve à 105 °C pendant 24 h, refroidi et pesé de nouveau. La concentration en biomasse est exprimée en g de biomasse par kg de milieu. Le filtrat est récupéré pour analyses ultérieures.

III.2.5.2. Dosage des sucres

Les sucres sont dosés selon deux méthodes, l'une (Glucostat GM10) rapide mais approximative pour informer en cours d'expérience sur son avancement, l'autre (HPLC) plus précise mais avec des résultats obtenus en différé.

- Dosage par Glucostat GM10

Le Glucostat GM10 (Analox Instruments, London, Royaume-Uni) est utilisé au cours de l'expérience car il permet de mesurer rapidement la concentration en glucose d'un échantillon. L'analyse du glucose est réalisée à l'aide d'une réaction enzymatique. L'enzyme glucose-oxydase catalyse la réaction entre le β-D-glucose en présence d'oxygène et forme de l'acide gluconique. La gamme d'analyse du Glucostat est comprise entre 0,5 et 10 $g.L^{-1}$, les échantillons sont donc dilués en conséquence. Un standard de concentration connue (10 $g.L^{-1}$) est utilisé avant chaque analyse pour valider le dosage.

- Dosage par HPLC

En fin d'expérience, le dosage des sucres dans les milieux de fermentation est effectué par HPLC sur les échantillons préalablement bouillis et filtrés afin d'éliminer les protéines qui risquent de précipiter dans la colonne. La séparation est réalisée sur une colonne Metacarb 87P Varian (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA) à 80 °C, avec une phase mobile constituée d'eau milliQ circulant à un débit de 0,4 $mL.min^{-1}$, et à une pression de 32 bar. La détection est réalisée par un réfractomètre Waters 2414 (Milford, MA, EUA). Cette méthode permet de quantifier les concentrations en glucose, lactose, xylose, galactose et arabinose, en utilisant une gamme d'étalons externes de concentrations comprises entre 1 et 10 $g.L^{-1}$.

III.2.5.3. Dosage des protéines et de l'activité β-glucosidase

La détermination de la concentration en protéines totales dans les milieux de fermentation est réalisée sur les filtrats, à l'aide du kit DCTM Protein Assay (Biorad, Hercules, EUA). Elle s'appuie sur un étalonnage externe, réalisé avec une gamme de sérum-albumine bovine comprise entre 0 et 1,5 $g.L^{-1}$, selon la méthode de Lowry recommandée par l'IUPAC (Hardy 2016).

Les filtrats sont également utilisés pour mesurer l'activité β-glucosidase comme décrit par Jourdier et al. 2013. La réaction permet de transformer le 4-nitrophénol-β-D-

glucopyranoside (pNPG) en 4-nitrophénol (pNP) qui est alors quantifié, par comparaison avec une gamme d'étalon de pNP de 25 à 200 µM. Toutes les analyses sont réalisées en triplicate.

III.2.5.4. Mesure du hold-up

Selon Hassan et Robinson 1977, le hold-up caractéristique de la dispersion gaz-liquide (α, en %) d'un milieu donné peut être calculé par l'équation :

$$\alpha = 1 - \frac{\rho_D}{\rho_L} \qquad \text{(III.7)}$$

Où ρ_L correspond à la masse volumique du liquide non-aéré (kg.m^{-3}) et ρ_D est la masse volumique de la dispersion gaz-liquide en conditions aérées (kg.m^{-3}).

Par analogie, le hold-up du moût de *T. reesei* en phase de production de cellulases peut être calculé par l'équation :

$$\alpha = 1 - \frac{Q_D}{Q_L} \qquad \text{(III.8)}$$

Où Q_L correspond au débit de soutirage du milieu non-agité et non-aéré (kg.h^{-1}) et Q_D est le débit de soutirage du milieu de culture agité et aéré en phase de production (kg.h^{-1}) au même débit volumique.

Une méthode a été mise au point pour mesurer expérimentalement le hold-up des cultures de *T. reesei*, c'est-à-dire les débits massiques du milieu en conditions non aérées et aérées. Dans cette méthode, on considère tout d'abord que la masse volumique du milieu 4N est très similaire à celle de l'eau.

Un bioréacteur est alors préalablement rempli d'eau (pour mimer le milieu 4N), qui est ensuite soutirée dans une éprouvette graduée tarée, à l'aide d'une pompe péristaltique (à 70 rpm). L'éprouvette est ensuite pesée, ce qui permet de connaître le débit massique de l'eau en condition non-aérée et non-agitée.

Puis le moût réel de *T. reesei* en phase de production de cellulases contenu dans un bioréacteur de même type que celui utilisé précédemment est pompé dans une éprouvette graduée tarée à l'aide d'une pompe péristaltique (à 70 rpm) tout en gardant les conditions d'opération (aération et agitation du milieu). L'éprouvette est alors pesée ce qui permet de connaître le débit massique du moût de culture en conditions agitée et aérée. Il suffit ensuite

de calculer le rapport du débit massique en condition non aérée sur le débit massique en condition aérée pour déterminer le hold-up (en %).

III.2.6. Détermination des rendements et des vitesses spécifiques

Afin de quantifier les cinétiques de croissance et de production de cellulases de *T. reesei*, des bilans de masse ont été établis pour quatre variables d'état : les concentrations en substrat carboné (S), en biomasse (X) et en protéines (cellulases) (P) (en $g.kg^{-1}$) et le volume du milieu (V, en L). Ces bilans ont permis de calculer les vitesses volumétriques de consommation de substrat, de production de biomasse et de cellulases, r_S, r_X et r_P (en $g.L^{-1}.h^{-1}$), respectivement. Les vitesses volumétriques (ou productivités) ont été divisées par la concentration de biomasse mesurée dans le bioréacteur, afin de calculer les vitesses spécifiques de consommation de substrat q_S (en $g_S.g_X^{-1}.h^{-1}$) et de production de biomasse μ (en h^{-1}) et de protéines q_P (en $g_P.g_X^{-1}.h^{-1}$). Les rendements de conversion de la biomasse et des protéines à partir du substrat carboné (respectivement, $Y_{X/S}$ et $Y_{P/S}$ en $g.\ g^{-1}$ de substrat) et le rendement de production de cellulases par la biomasse $Y_{P/X}$ (en $g.\ g^{-1}$ de biomasse) ont également été calculés. Les équations définissant ces variables sont résumées dans le Tableau.III.3.

Tableau.III.3. Bilans de matière caractérisant les cultures de *T. reesei* et calcul des rendements et des vitesses spécifiques.

Variables	Bilans de matière	Vitesses spécifiques	Rendements
V	$\frac{dV}{dt} = F_{in} - F_{out}$	-	-
S	$\frac{dVS}{dt} = FS_{in} - FS_{out} + r_S V$	$q_S = \frac{r_S}{X}$	-
X	$\frac{dVX}{dt} = FX_{in} - FX_{out} + r_x V$	$\mu = \frac{r_X}{X}$	$Y_{X/S} = \frac{r_X}{r_S}$
P	$\frac{dVP}{dt} = FP_{in} - FP_{out} + r_p V$	$q_P = \frac{r_P}{X}$	$Y_{P/X} = \frac{r_P}{r_X}$; $Y_{P/S} = \frac{r_P}{r_S}$

V: Volume (en L); S, X, P: concentrations en substrat, biomasse et protéine (en $g.\ kg^{-1}$)*; F: débit (L. h^{-1}); r_S, r_X et r_P : vitesses volumétriques de consommation de substrat ou de production de biomasse et de protéines (cellulases), respectivement (g. $L^{-1}.h^{-1}$); q_S, μ et q_P : vitesses volumétriques spécifiques de consommation de substrat, de production de biomasse et de protéines, respectivement* (mg. $gX^{-1}.\ h^{-1}$); *$Y_{X/S}$, $Y_{P/S}$: rendements de conversion du substrat en biomasse et en protéines* (g. g^{-1}); *$Y_{P/X}$: rendement de production de protéines par la biomasse* (g. g^{-1}).

Dans ce chapitre, toutes les cultures ont été réalisées en mode fed-batch, alimentées uniquement avec une solution de lactose, donc le débit de sortie du bioréacteur F_{out} est considéré comme nul. De plus, l'alimentation n'apportant que du lactose, les concentrations en biomasse et en protéines à l'alimentation X_{in} et P_{in} sont également nulles.

III.3. Développement d'un protocole expérimental pour l'étude des hétérogénéités en bioréacteurs

L'effet des hétérogénéités physico-chimiques induites par le *scale-up* sur le comportement du champignon *Trichoderma reesei* a été étudié à l'aide de deux approches *scale-down* : (1) un système Bizone, constitué de deux bioréacteurs caractérisés chacun par des concentrations différentes en oxygène dissous et (2) un système de Variation Dynamique de la pO_2, caractérisé par un bioréacteur unique alimenté en oxygène et en diazote de façon alternative, avec une fréquence fixe de fluctuation de la concentration en oxygène dissous (pO_2). Cette approche expérimentale s'est, en partie, appuyée sur les travaux antérieurs de Oosterhuis et al. 1985. Chaque essai réalisé a été comparé avec une condition de culture Témoin, mise en œuvre en utilisant les conditions optimales de croissance et de production de cellulases par le champignon, sans limitation en oxygène dissous.

III.3.1. Conditions de culture communes à tous les essais

Toutes les cultures ont été réalisées en 2 phases successives, de croissance puis de production de cellulases. La première phase de croissance était conduite en mode batch, avec une température maintenue constante et égale à 27 °C, un pH contrôlé à 4,8 grâce à l'ajout d'ammoniaque (5,5 N) et une vitesse d'agitation fixée à 800 rpm. La pO_2 est maintenu à 40 % en injectant un mélange d'air et de diazote. La concentration initiale en glucose dans le bioréacteur était de 30 $g.L^{-1}$. La phase de croissance était considérée comme terminée quand la concentration en glucose résiduel dans le milieu devenait inférieure à 5 $g.L^{-1}$, ce qui signifiait que le champignon avait consommé la quasi-totalité du sucre introduit initialement. Sa durée était d'environ 42 h.

Ensuite, la seconde phase correspondant à la production de cellulases, effectuée en mode fed-batch avec une alimentation en lactose. Cette phase de culture a été réalisée à 25 °C

pendant environ 230 heures, avec un pH régulé à 4,0 par injection d'ammoniaque à 5,5 N, et une vitesse d'agitation fixée à 1000 rpm. Le fed-batch était assuré par l'injection d'une solution de lactose à 210 $g.L^{-1}$ à un débit de 4 $mL.h^{-1}$, afin de maintenir une concentration en lactose résiduel proche de zéro.

Selon ces conditions, trois types de fermentation ont été réalisées : une culture Témoin, une culture en mode de Variation Dynamique, i.e. dans un seul bioréacteur avec application d'oscillations de la pO_2, et des cultures utilisant un système à deux compartiments pour simuler des oscillations de la pO_2 (systèmes Bizone et Bizone Inversé).

III.3.2. Cultures Témoin

L'objectif de ces expériences était de fournir les données de base d'une culture fed-batch conventionnelle de *Trichoderma reesei* pour une ultérieure comparaison avec des expériences reproduisant les hétérogénéités expérimentées par le champignon au sein des systèmes scale-down simulant les bioréacteurs d'échelle industrielle.

La culture Témoin est réalisée dans un bioréacteur F2P (IFPEN) contenant un volume initial de milieu de 2,5 L et selon les conditions décrites dans le paragraphe III.3.1. L'aération du milieu est réalisée à un débit total de gaz de 0,25 L. min^{-1} par injection d'un mélange d'air et de diazote. Le débit d'injection de ces deux gaz varie selon l'avancement de la culture afin de maintenir une concentration en oxygène dissous égale à 40 % de la concentration saturante. L'expérience Témoin a été réalisée en duplicate.

III.3.3. Systèmes Bizone et Bizone Inversé

L'objectif de ces expériences était de simuler une exposition temporelle des champignons aux zones hétérogènes en termes d'aération des bioréacteurs industriels. Avec la configuration générée par le système à deux compartiments, le moût fermenté contenant le champignon filamenteux est forcé de passer d'un bioréacteur aéré vers un autre non-aéré, simulant ainsi les oscillations subies par les champignons entre les zones oxygénées et les zones pauvres en oxygène dans les grands bioréacteurs.

Actuellement, peu d'information est disponible concernant la distribution volumique des différentes zones au sein des bioréacteurs industriels et sur le temps de circulation entre ces zones (Noorman 2011). Dans notre étude, pour l'approche Bizone, l'hétérogénéité est

obtenue en faisant circuler le milieu de fermentation entre un compartiment limité en oxygène représentant contenait 20 % du volume total de milieu et un compartiment oxygéné contenant 80 % du volume de milieu. Cette proportion a été employée précédemment par plusieurs auteurs pour des études scale-down sur les hétérogénéités au sein des bioréacteurs (Limberg et al. 2016; Käß et al. 2014; Junne et al. 2011; Amanullah et al. 2001). Pour l'approche Bizone Inversé, le compartiment non-aéré correspond à 80 % du volume total de moût (le compartiment aéré 20 %), afin d'analyser l'impact d'une exposition plus prolongée du champignon à des zones limitées en oxygène.

III.3.3.1. Système Bizone

Une première phase de croissance est réalisée dans un bioréacteur F2P comme expliqué dans le paragraphe III.3.1. A l'issue de la croissance, la phase de production est menée dans les conditions décrites au paragraphe III.3.1 pendant 72 h, avec une pO_2 maintenue à 40 % afin d'assurer que la culture n'est pas limitée en oxygène. Après ce temps, ce réacteur aérobie appelé R1 contenant 2,5 L de milieu est connecté à un bioréacteur anaérobie R2 de type Biolaffite, vers lequel 0,5 L du volume total de milieu est transféré à l'aide d'une pompe péristaltique. Dans ce deuxième bioréacteur, uniquement du diazote est injecté à un débit constant de 0,25 $L.min^{-1}$. Les deux bioréacteurs sont équipés avec des sondes de pO_2, de pH et de température et sont connectés à des analyseurs de gaz (équipements décrits dans le paragraphe III.2.4.2).

L'alimentation avec la solution de lactose est réalisée uniquement en zone aérobie (réacteur R1). Le milieu de culture circule entre les deux bioréacteurs à l'aide de deux pompes péristaltiques identiques (console drive Masterflex 77521-57 et tête Masterflex L/S easy-load 7518-00, Cole-Parmer, Barrington, IL, EUA) et de deux tuyaux de 6 mm de diamètre interne et 1 m de longueur chacun, représentant environ 2 % du volume total de moût. La pompe « maître » assure un débit fixe de soutirage de milieu du réacteur R1 vers le réacteur R2 (199 $mL.min^{-1}$). La pompe « esclave » est responsable du soutirage du milieu du réacteur R2 vers le réacteur R1. Pour maintenir un volume de milieu constant de 0,5 L dans le réacteur R2, la balance sur laquelle il repose est connectée à un système PID qui contrôle la vitesse de cette pompe, réglée à une vitesse de rotation 30 % plus élevée que celle de la pompe maître (Limberg et al. 2016).

Cette expérience a été reproduite trois fois.

Le Tableau III.4 résume les caractéristiques des réacteurs R1 et R2 en configuration Bizone. La Figure III.2 illustre le système Bizone et la Figure III.3 montre une photo de l'installation.

Tableau III.4. Caractéristiques des bioréacteurs R1 et R2 pour les expériences en système Bizone

Bioréacteur	Type de réacteur	Distribution volumétrique (%)*	Injection de gaz	Débit de gaz (vvm)
R1	F2P	80	air + N_2	0,1
R2	Biolafitte	18	N_2	0,5

*Distribution volumétrique au début de la phase de recirculation du moût. Cette distribution évolue dans le temps puisque le système opère en mode fed-batch

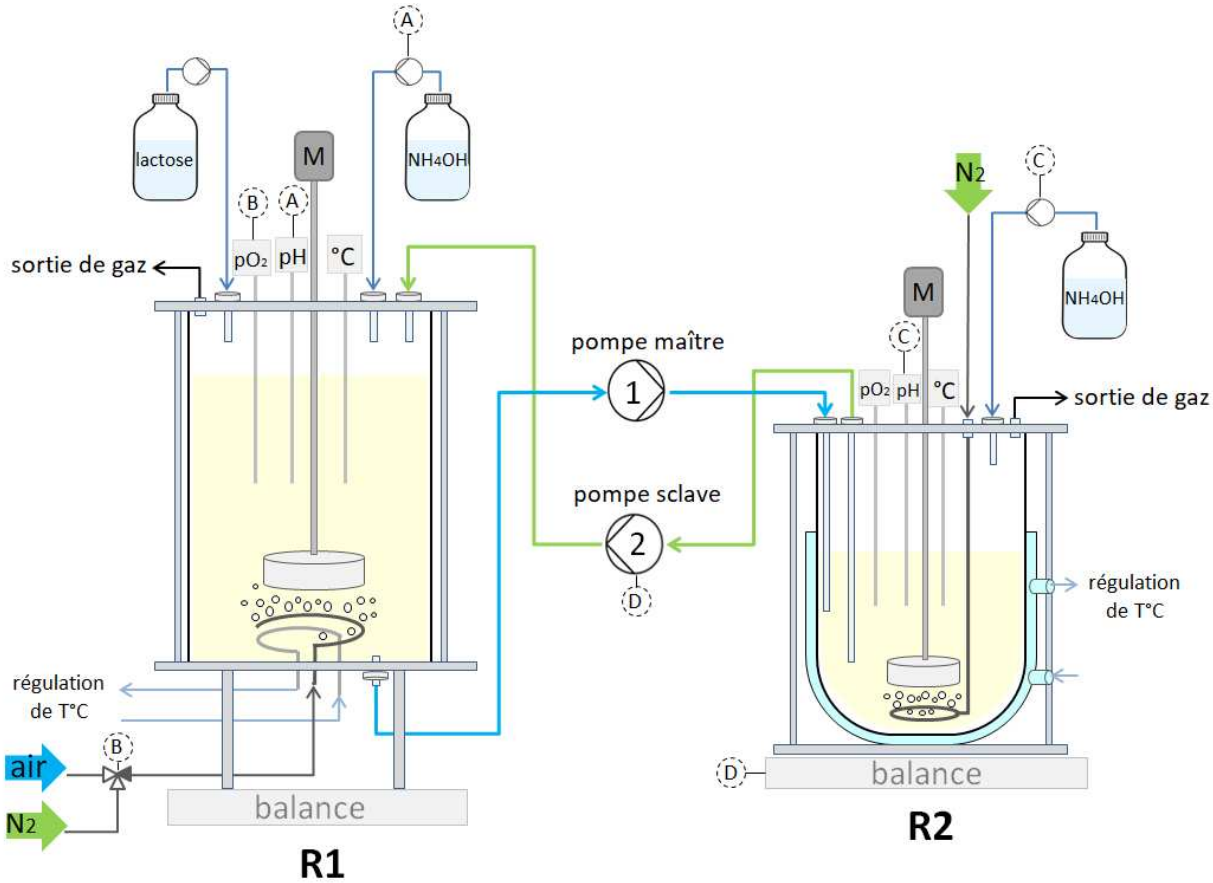


Figure III.2. Schéma représentatif de l'expérience *Bizone*.
Le bioréacteur R1 correspond à la zone aérée et R2 est le bioréacteur non-aéré. A et C correspondent aux systèmes de régulation du pH des réacteurs R1 et R2, respectivement. B est le système de régulation des débits d'air et d'azote pour maintenir une pO2 égale à 40 % dans le réacteur R1. D correspond au système de régulation de la vitesse de rotation de la pompe esclave. M représente le moteur d'agitation des réacteurs R1 et R2.

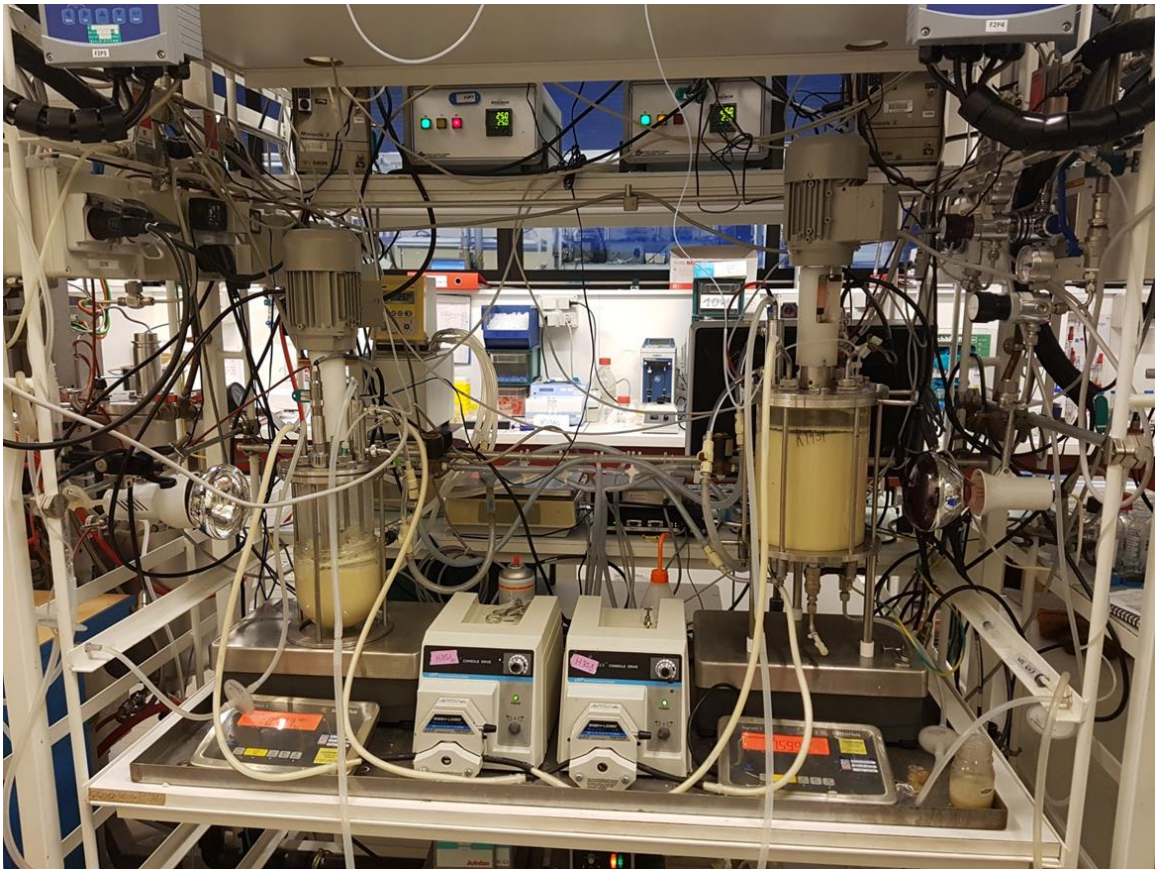


Figure III.3. Photo représentant les deux bioréacteurs couplés dans la configuration Bizone

III.3.3.2. Système Bizone Inversé

Pour le système Bizone Inversé, la phase de croissance et les 72 premières heures de production de cellulases en mode fed-batch sont réalisées de façon identique au système Bizone. Après ce temps, le bioréacteur de type F2P contenant 2,5 L de milieu devient le compartiment limité en oxygène (appelé R2). Cela est assuré par l'injection d'azote à un débit constant de 0,25 $L.min^{-1}$. Ce bioréacteur R2 est alors connecté à un bioréacteur aérobie R1 de type Biolaffite, vers lequel 0,5 L du volume total de milieu est transféré à l'aide d'une pompe péristaltique. Dans ce deuxième bioréacteur, un mélange d'air et de diazote est injecté à un débit constant de 0,25 $L.min^{-1}$ afin de maintenir une pO_2 = 40 %.

Ce système utilise les mêmes sondes et équipements que le système Bizone. L'alimentation avec la solution de lactose est réalisée uniquement en zone aérobie (bioréacteur R1). Cependant, contrairement au système Bizone, la pompe « esclave » est celle qui soutire le moût du bioréacteur R1 vers le réacteur R2. Cela est nécessaire car la capacité volumique du réacteur R1 (Biolafitte) ne permet pas d'accueillir l'augmentation de volume

dans le temps dû à l'alimentation avec la solution de lactose.

Cette expérience a été reproduite 4 fois.

Le Tableau III.5 résume les caractéristiques des bioréacteurs R1 et R2 en configuration Bizone Inversé. La Figure III.4 illustre le système Bizone Inversé.

Tableau III.5. Caractéristiques des bioréacteurs R1 et R2 pour les expériences en système Bizone Inversé

Bioréacteur	Type de réacteur	Distribution volumétrique (%)*	Injection de gaz	Débit de gaz (vvm)
R1	Biolafitte	18	air + N_2	0,5
R2	F2P	80	N_2	0,1

*Distribution volumétrique au début de la phase de recirculation du moût. Cette distribution évolue dans le temps puisque le système opère en mode fed-batch

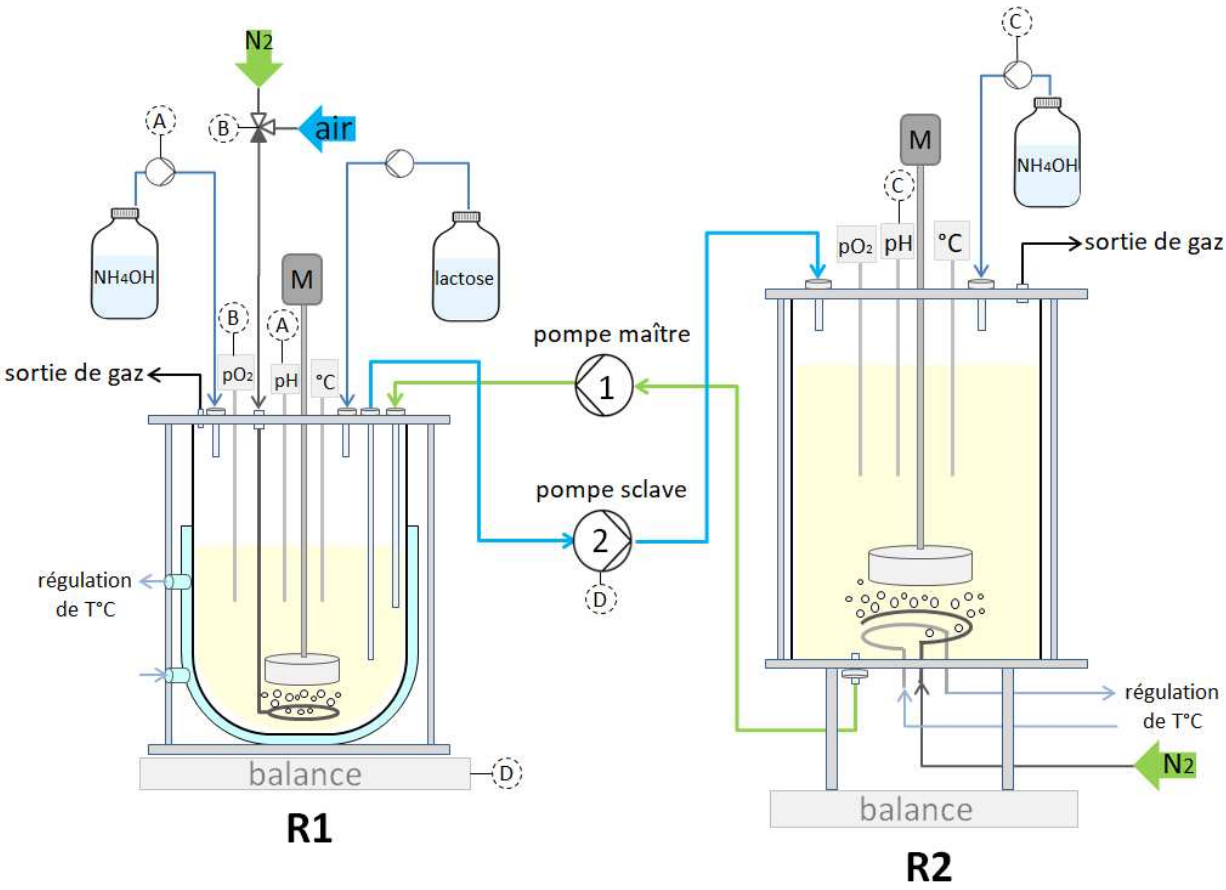


Figure III.4. Schéma représentatif de l'expérience *Bizone Inversé*.
Le bioréacteur R1 correspond à la zone aérée et R2 est le bioréacteur non-aéré. A et C correspondent aux systèmes de régulation du pH des réacteurs R1 et R2, respectivement. B est le système de régulation des débits d'air et d'azote pour maintenir une pO2 égale à 40 % dans le réacteur R1. D correspond au système de régulation de la vitesse de rotation de la pompe esclave. M représente le moteur d'agitation des réacteurs R1 et R2.

III.3.3.3. Calcul des temps de séjour moyens pour les systèmes Bizone et Bizone Inversé

Le temps de séjour moyen (t_{r_moyen}, en min) dans chacun des compartiments des configurations Bizone et Bizone Inversé peut être déterminé à l'aide de l'équation III.3.

$$t_{r_moyen} = \frac{V_{L_R_n}}{Q_{sout_R_n}} \qquad \text{(III.9)}$$

Où $V_{L_R_n}$ et $Q_{sout_R_n}$ sont, respectivement, le volume de liquide et le débit de soutirage du bioréacteur R_n, avec $n = 1$ pour le réacteur R1 et $n = 2$ pour le réacteur R2.

A partir de l'équation III.3, on identifie un temps de séjour moyen de 11,5 min dans le compartiment aéré et de 2,5 min dans le compartiment non-aéré pour le système Bizone au début de la phase de recirculation du moût. Pour le système Bizone Inversé, les temps de séjour moyens sont de 2,5 min dans le compartiment aéré et de 11,5 min dans le compartiment non-aéré.

III.3.4. Système de Variation dynamique de la pO2

L'objectif de cette expérience était de générer des oscillations cycliques de la pression partielle en oxygène dans le milieu, pour simuler les gradients d'oxygène subis par le champignon lorsqu'il se déplace d'une zone riche en oxygène à une zone pauvre en oxygène à l'intérieur des grands bioréacteurs.

Ces expériences ont été conduites dans un bioréacteur F2P contenant 2,5 L de milieu de culture, selon les mêmes conditions que la culture Témoin, à l'exception des conditions d'aération et du pourcentage d'oxygène dissous dans le milieu. Les oscillations cycliques de la pO_2 ont été produites en injectant successivement du diazote ou un mélange d'air et de diazote dans le milieu de culture. La

Figure III.5 représente la configuration utilisée pour les essais de Variation Dynamique de la pO_2.

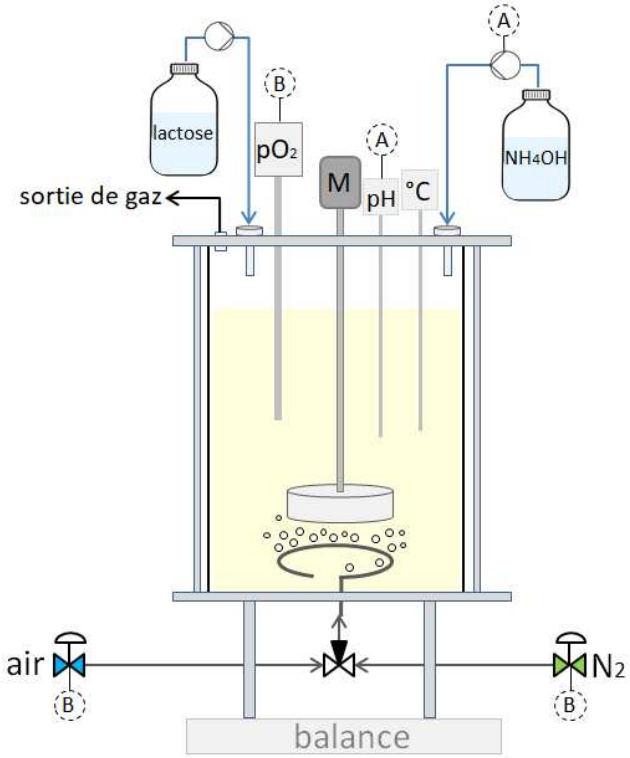


Figure III.5. Schéma représentatif du système de *Variation dynamique de la pO_2*, composé d'un seul bioréacteur où la pression partielle d'oxygène dans le réacteur est modifiée de façon cyclique. Ce système est contrôlé avec un régulateur de la concentration en oxygène dissous en boucle fermée. A correspond au système de régulation de pH du réacteur. B est le système de régulation des débits d'air et d'azote. M représente le moteur d'agitation du réacteur.

Le débit total d'injection de gaz était fixé à 0,25 L.min^{-1} et les débits d'injection d'air et de diazote s'adaptaient selon les consignes imposées en termes de pourcentage en oxygène dissous fixées par chaque cycle (Figure III.6) : ~12,5 minutes à pO_2 supérieure à 35 % et ~2,5 minutes à pO_2 = 0 %. D'après la Figure III.6, il convient de noter que pendant les phases de désoxygénation et d'oxygénation, le champignon est exposé à une pO_2 inférieure à 10 % pendant environ 7 min.

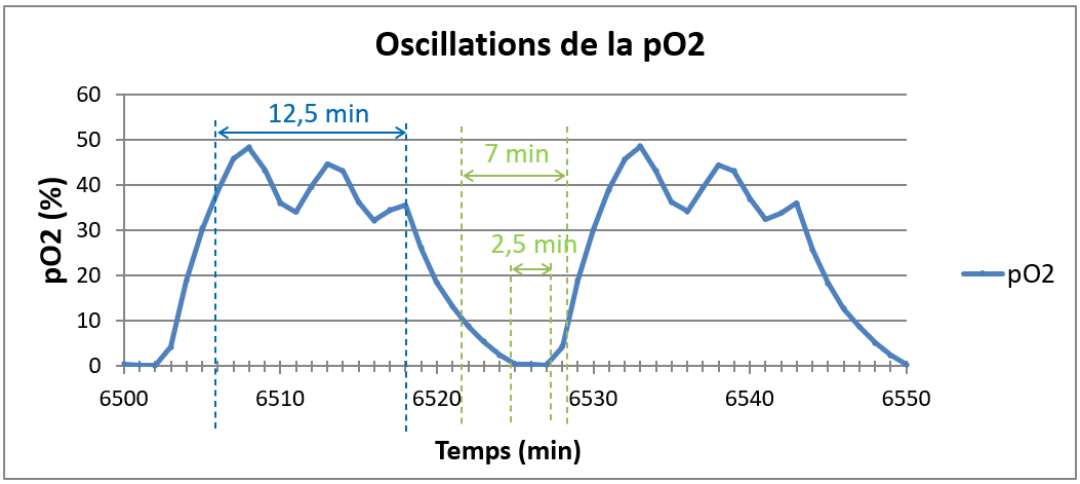


Figure III.6. Oscillations cycliques de la concentration en oxygène dissous lors de l'expérience en système de Variation Dynamique de la pO_2.
Cette courbe est issue de la mesure de la pO2 par une sonde optique InPro 6860i Mettler-Toledo (Greifensee, Suisse).

III.4. Résultats et discussion

L'impact des gradients d'oxygène simulés par l'emploi des différents systèmes expérimentaux (Bizone, Bizone Inversé et Variation Dynamique de la pO_2) est présenté pour chaque système indépendamment, puis soumis à comparaison. L'analyse se concentre sur la période de la culture où les gradients en oxygène ont été appliqués, c'est-à-dire de 72 heures après le début du fed-batch jusqu'à la fin des cultures (soit 220 heures).

III.4.1. Système Bizone

Comme le montre la Figure III.7, les cinétiques de croissance et de production de cellulases ne sont pas significativement affectées lors des expériences en mode Bizone par rapport aux cultures Témoin. La concentration en biomasse atteint 10,99 ± 0,56 $g.kg^{-1}$ après 72 h de fed-batch, avant de diminuer à 8,48 ± 0,18 $g.kg^{-1}$ en fin de fed-batch. Les concentrations finales en protéines atteignent une valeur moyenne de 28,59 ± 2,37 $g.L^{-1}$, quelles que soient les conditions d'aération mises en œuvre.

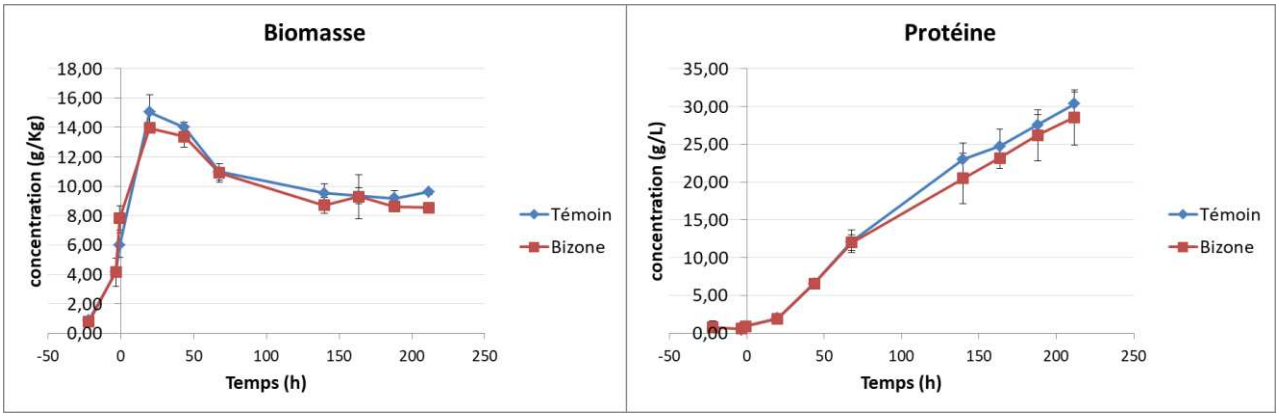


Figure III.7. Cinétiques de croissance et de production de protéines pour les cultures en mode Bizone (en rouge) par rapport aux cultures Témoin (en bleu).
Le temps zéro correspond au début du fed-batch. Les barres d'erreur représentent les écart-types.

Cette constatation est renforcée par la Figure III.8 qui montre qu'il n'y a pas de différence significative entre les vitesses spécifiques moyennes de production de protéines (16,54 ± 1,00 $mg.g^{-1}.h^{-1}$) et les rendements de conversion du lactose en protéines (0,52 ± 0,02 $g.g^{-1}$) entre les cultures en mode Bizone et les cultures Témoin.

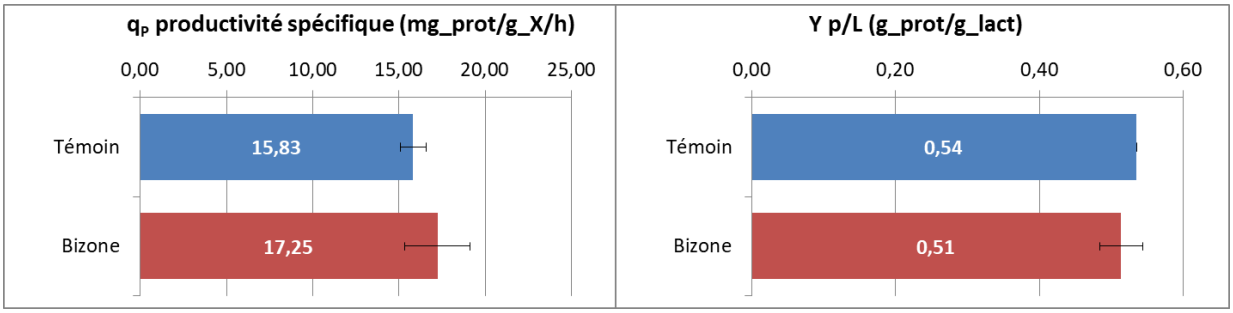


Figure III.8. Comparaison du taux de production moyen (q_p) et du rendement de conversion de lactose en protéines ($Y_{p/L}$ ou $Y_{P/S}$) pour les cultures Témoin (en bleu) et les cultures en mode Bizone (en rouge).
Les barres d'erreur représentent les écart-types.

Ces résultats signifient que l'exposition cyclique du champignon à une condition non-aérée dans le petit bioréacteur pendant environ 2,5 minutes n'est pas suffisante pour affecter négativement sa capacité de production de protéines dès lors qu'il retrouve un environnement aéré pendant 11,5 min.

III.4.2. Système Bizone Inversé

Dans la Figure III.9, il est possible d'observer que l'exposition cyclique du champignon au compartiment non-aéré pendant une durée d'environ 11,5 minutes dans le système Bizone Inversé a provoqué une diminution de la production de protéines, avec une réduction de 14 % de la concentration en protéines en fin de culture par rapport au Témoin. La concentration

finale atteinte est ainsi de 26,02 ± 2,08 g.L^{-1} en mode Bizone Inversé, au lieu de 30,34 ± 1,56 g.L^{-1} en condition Témoin. En parallèle, une reprise de croissance légère et transitoire est observée, puisque la concentration en biomasse passe de 10,58 ± 0,85 g.kg^{-1} à 11,27 ± 0,90 g.kg^{-1}, avant de revenir à 10,55 ± 0,84 g.kg^{-1}, alors que dans le même temps, la concentration en biomasse fluctue autour de 9,43 ± 0,20 g.kg^{-1} pour la culture Témoin.

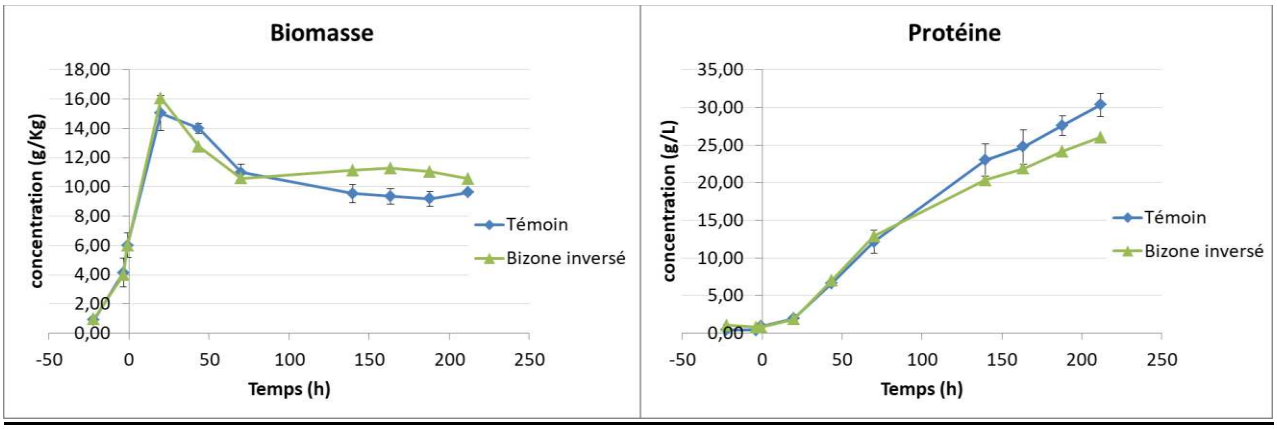


Figure III.9. Cinétiques de croissance et de production de protéines pour les cultures en mode Bizone Inversé (en vert) par rapport aux cultures Témoin (en bleu).
Le temps zéro correspond au début du fed-batch. Les barres d'erreur représentent les écart-types.

Cette observation est confirmée par les graphiques de la Figure III.10, qui montrent une réduction de 34 % de la vitesse spécifique de production de protéines, qui passe de 15,83 ± 0,75 mg.g^{-1}.h^{-1} à 10,49 ± 0,69 mg.g^{-1}.h^{-1}, et une diminution de 15 % du rendement de conversion du lactose en protéines qui passe de 0,54 ± 0,00 g.g^{-1} à 0,46 ± 0,02 g.g^{-1}, lorsque le champignon est soumis à une période non aérée de 2,5 min par rapport à la condition Témoin.

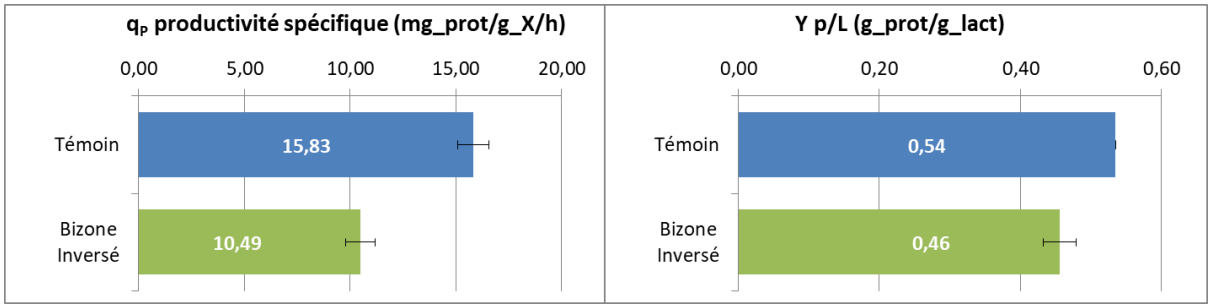


Figure III.10. Comparaison du taux de production moyen (q_P) et du rendement de conversion de lactose en protéines (Y p/L) pour les cultures Témoin (en bleu) et les cultures en mode Bizone Inversé (en vert).
Les barres d'erreur représentent les écart-types.

Ces résultats indiquent que l'exposition cyclique du champignon à une condition non-aérée dans le grand bioréacteur pendant environ 11,5 minutes affecte significativement sa

capacité de production de protéines, à la fois en termes de rendement (15 %) et en termes de vitesse spécifique (34 %).

III.4.3. Système de variation dynamique de la pO2

Dans le système de variation dynamique de la pO_2, les cellules de *Trichoderma reesei* contenues dans le bioréacteur sont exposées à des cycles d'alternance de conditions aérobies pendant 12,5 min suivies de conditions anaérobies d'environ 2,5 minutes. Il est important de rappeler que, entre les étapes d'oxygénation et de désoxygénation, les cellules sont en réalité exposées à une pO_2 inférieure à 10 % pour une durée totale d'environ 7 minutes.

Les résultats obtenus lors de la mise en œuvre de ces conditions sont présentés dans la Figure III.11. Ils montrent une diminution et un ralentissement de la production de cellulases et une forte reprise de la croissance, en conséquence des fluctuations de la pO_2 simulées par le système de variation dynamique. La concentration en biomasse finale s'accroît de 11,33 ± 0,91 $g.kg^{-1}$ à 13,38 ± 1,07 $g.kg^{-1}$, alors que dans le même temps, la concentration en biomasse fluctue autour de 9,43 ± 0,20 $g.kg^{-1}$ pour la culture Témoin. La concentration en protéines atteint une valeur de 20,88 ± 1,67 $g.L^{-1}$ en mode Variation Dynamique, au lieu de 30,34 ± 1,56 $g.L^{-1}$ en condition Témoin.

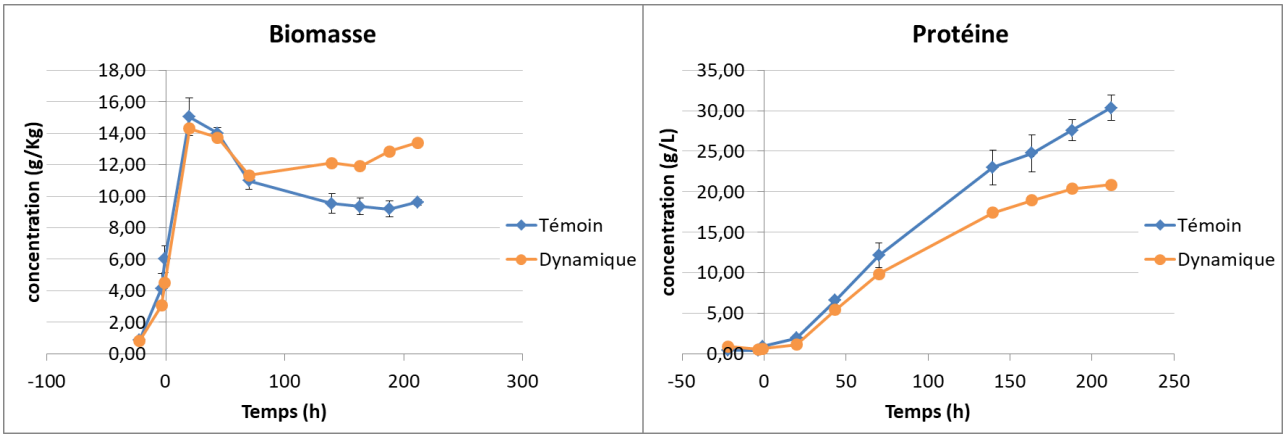


Figure III.11. Cinétiques de croissance et de production de protéines pour les cultures en mode de variation dynamique de la pO_2 (en orange) par rapport aux cultures Témoin (en bleu).
Le temps zéro correspond au début du fed-batch. Les barres d'erreur représentent les écart-types.

En plus d'une diminution de la concentration en cellulases, la vitesse de production d'enzymes est également réduite lorsque la pO_2 fluctue dans le bioréacteur. De la Figure III.12, on observe une forte diminution la vitesse spécifique de production (q_p) qui passe

d'une valeur de 15,83 ± 0 ,75 mg.g^{-1}.h^{-1} en condition Témoin, à 6,38 ± 0,65 mg.g^{-1}.h^{-1} en Variation Dynamique. Le rendement de conversion du lactose en protéines diminue également puisqu'il passe de 0,54 ± 0,00 g.g^{-1} à 0,34 ± 0,02 g.g^{-1}, lorsque le champignon est soumis à alternance de périodes aérées et non aérées.

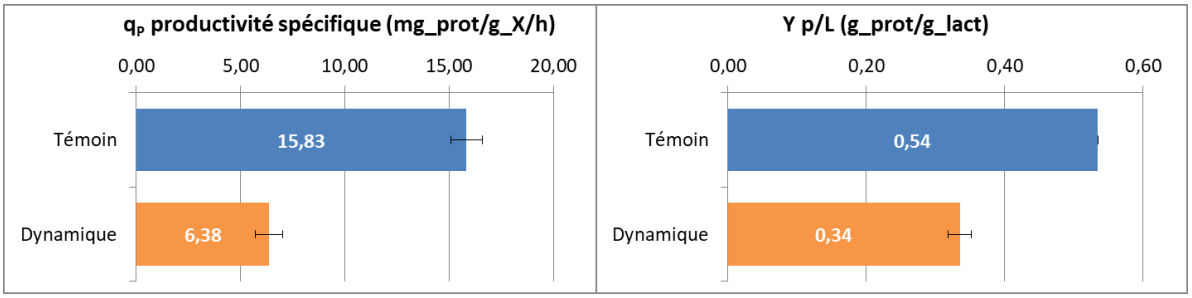


Figure III.12. Comparaison du taux de production moyen (q_p) et du rendement de conversion de lactose en protéines ($Y_{P/S}$) pour les cultures Témoin (en bleu) et les cultures en mode Variation Dynamique (en orange).
Les barres d'erreur représentent les écart-types.

Ainsi, la modalité consistant à faire subir au champignon une variation de la pO_2 sur des cycles de 2,5 min en anaérobiose et 12,5 min en aérobiose impacte fortement sa capacité à produire des cellulases. En particulier, la vitesse spécifique de production est réduite de 60 % et le rendement de conversion du lactose en protéines diminue de 37 % par rapport à la condition Témoin.

III.4.4. Comparaison des approches Bizone x Bizone Inversé

La Figure III.12 montre les courbes d'évolution des concentrations en biomasse et en protéines dans le milieu de culture, au cours des cultures réalisées avec les systèmes Bizone et Bizone Inversé. Les résultats obtenus avec la condition Témoin sont également rappelés. On observe que, même si la production de protéines est ralentie pour l'expérience Bizone Inversé par rapport à la condition Témoin (voir Figure III.9), la variation de concentration en protéines observées pour le système Bizone Inversé n'est pas significativement différente de celle obtenue pour le système Bizone, si l'on tient compte de la variabilité des mesures.

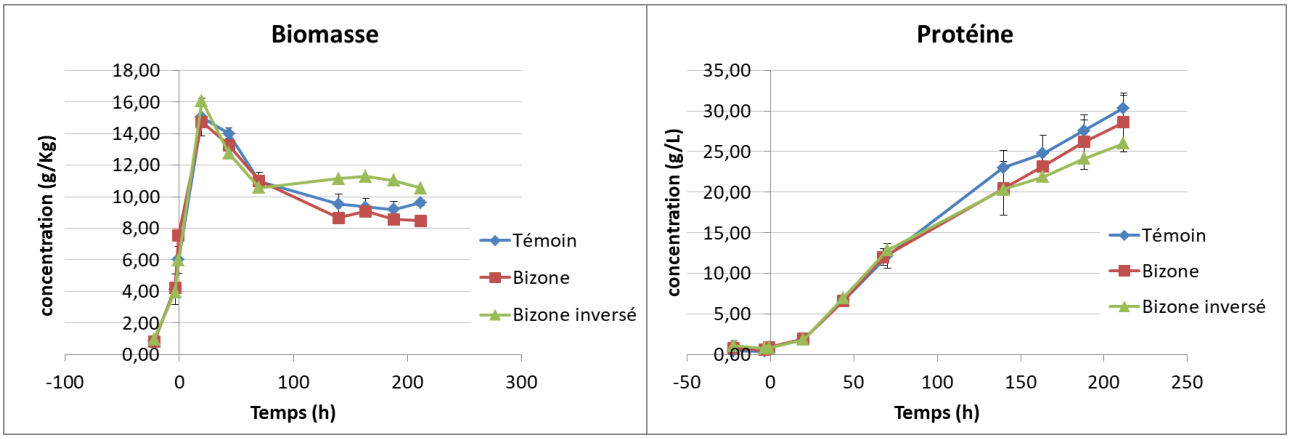


Figure.III.13. Comparaison des cinétiques de croissance et de production de protéines pour les cultures en mode Bizone et Bizone Inversé (en rouge et vert, respectivement) par rapport aux cultures Témoin (en bleu).
Le temps zéro correspond au début du fed-batch. Les barres d'erreur représentent les écart-types.

Cependant, pour les courbes d'évolution des concentrations en biomasse, il est possible de remarquer une nette reprise de croissance pendant environ 60 heures, lors de l'expérience Bizone Inversé par rapport au système Bizone. Cette reprise de croissance a une incidence négative sur la vitesse spécifique de production de protéines (q_p) et sur le rendement de production de l'enzyme par le substrat ($Y_{P/S}$), comme le montre la Figure III.14.

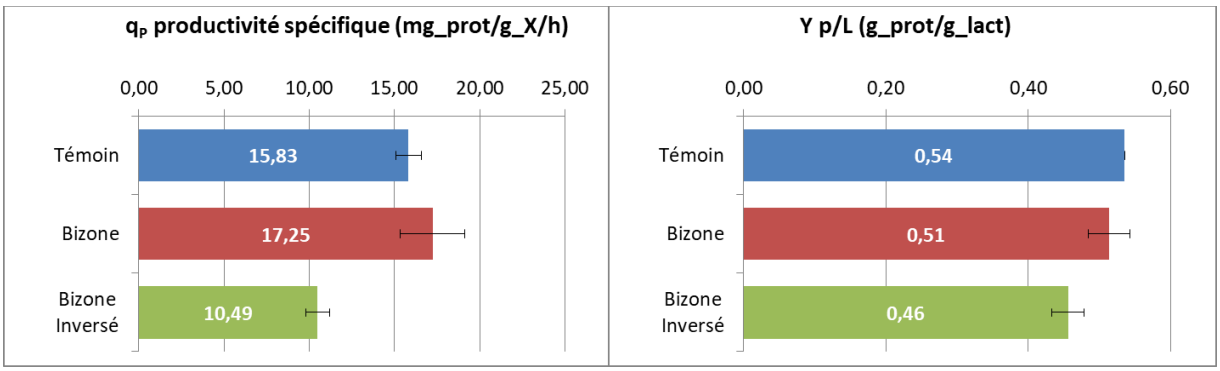


Figure III.14. Comparaison du taux de production moyen (q_p) et du rendement de conversion de lactose en protéines ($Y_{P/L}$ ou $Y_{P/S}$) pour les cultures en mode Bizone (en rouge), Bizone Inversé (en vert) et les cultures Témoin (en bleu).
Les barres d'erreur représentent les écart-types.

Dans le cas du système Bizone Inversé, lorsque le temps de séjour dans le compartiment non-aéré augmente d'un facteur proche de 4 par rapport au système Bizone (i.e. 11,5 min au lieu de 2,5 min), une diminution de q_p d'environ 39 % est observée. Si l'on considère le rendement de production de l'enzyme par la biomasse, la diminution observée est de 26 %. Ces effets restent toutefois relativement faibles au vu du temps d'exposition du champignon à la limitation en oxygène.

L'impact d'un passage du champignon dans une zone non aérée reste donc limité sur la production de cellulases par *T. reesei*, que le temps de séjour dans cette zone soit de 2,5 min ou de 11,5 min. Par ailleurs, il est peu probable qu'une hétérogénéité menant à une exposition des microorganismes à une zone non-aérée pour une durée de 11,5 minutes se produise dans les bioréacteurs à grande échelle. Cette situation, bien qu'intéressante sur le plan de la compréhension des phénomènes limitant le métabolisme de *T. reesei*, n'est finalement pas représentative de la réalité rencontrée dans les grands bioréacteurs industriels.

III.4.5. Comparaison des approches Bizone x Bizone Inversé x Variation dynamique de la pO2

Afin de faciliter la comparaison des résultats issus des trois configurations, le Tableau III.6 rappelle les conditions caractéristiques de chacune d'elle.

Tableau III.6. Comparaison des approches utilisées pour simuler les gradients d'oxygène lors de cultures de *T. reesei* TR3060

Configuration de bioréacteurs	Description de la configuration	Temps d'exposition à pO_2 ~40 %	Temps d'exposition en condition non-aérée
Bizone	Recirculation entre un bioréacteur aéré (pO_2 maintenu à ~40 %) et un bioréacteur non-aéré	~11,5 min	~2,5 min
Bizone Inversé	Recirculation entre un bioréacteur aéré (pO_2 maintenu à ~40 %) et un bioréacteur non-aéré	~2,5 min	~11,5 min
Variation Dynamique de la pO_2	Bioréacteur unique avec variation de la pression partielle en oxygène (pO_2 à 40 % - 0 %)	~12,5 min	~2,5 min à 0 % ~7 min à pO_2 < 10 % ~10 min à pO_2 < 20 %

Dans un premier temps, la comparaison des approches Bizone et Variation Dynamique de la pO_2 nous a paru pertinente, car dans les deux cas, les champignons sont exposés à une anaérobiose de 2,5 min environ. Toutefois, la comparaison avec le système Bizone Inversé s'avère également intéressante, si l'on tient compte de la durée passée par les cellules en conditions de faible aérobiose (pO_2 < 10 %) pour l'approche de Variation Dynamique de la pO_2.

La Figure.III.15 permet de comparer la production de protéines par le champignon dans les systèmes de Variation Dynamique de la pO_2, Bizone et Bizone Inversé. Une diminution importante de la concentration en protéines est observée en Variation Dynamique, puisque la concentration finale est réduite de 27 % par rapport au système Bizone et de 20 % par rapport au système Bizone Inversé. En outre, la concentration en biomasse en fed-batch est

nettement supérieure en mode de Variation Dynamique, avec un écart de 58 % par rapport au mode Bizone et de 27 % par rapport au mode Bizone Inversé.

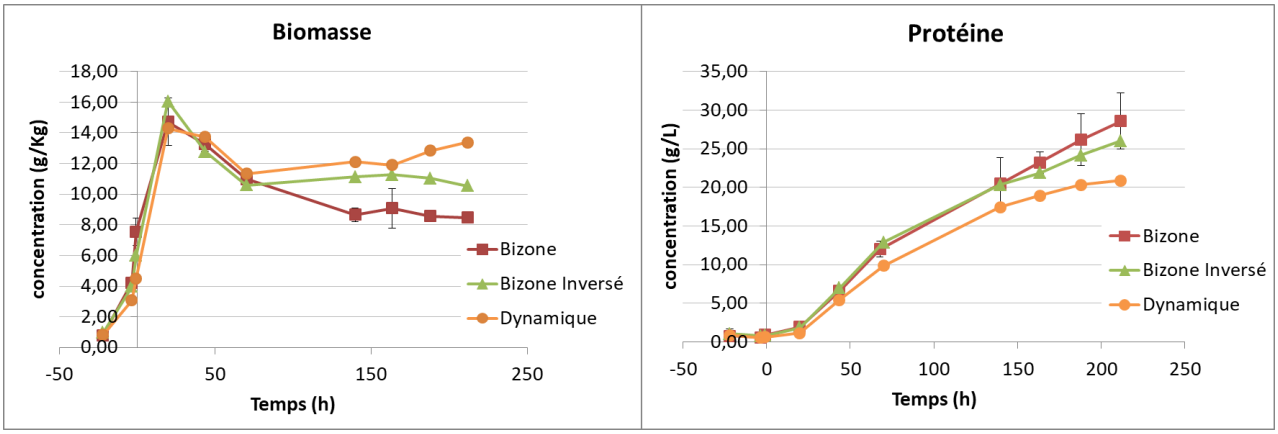


Figure.III.15. Comparaison des cinétiques de croissance et de production de protéines pour les cultures en mode Bizone (en rouge), en mode Bizone Inversé (en vert) et en système de variation dynamique de la pO_2 (en orange).
Les barres d'erreur représentent les écart-types.

La Figure III.16 permet de comparer les vitesses spécifiques de production de cellulases dans les trois conditions d'hétérogénéité, avec une valeur significativement plus faible en conditions de Variation Dynamique par rapport à la condition Bizone (63 %) et à la condition Bizone Inversé (39 %). Le rendement de production des cellulases par rapport au lactose est également affecté, avec une valeur réduite pour le système de Variation Dynamique de la pO_2 de 88 % par rapport au système Bizone et de 84 % par rapport au système Bizone Inversé.

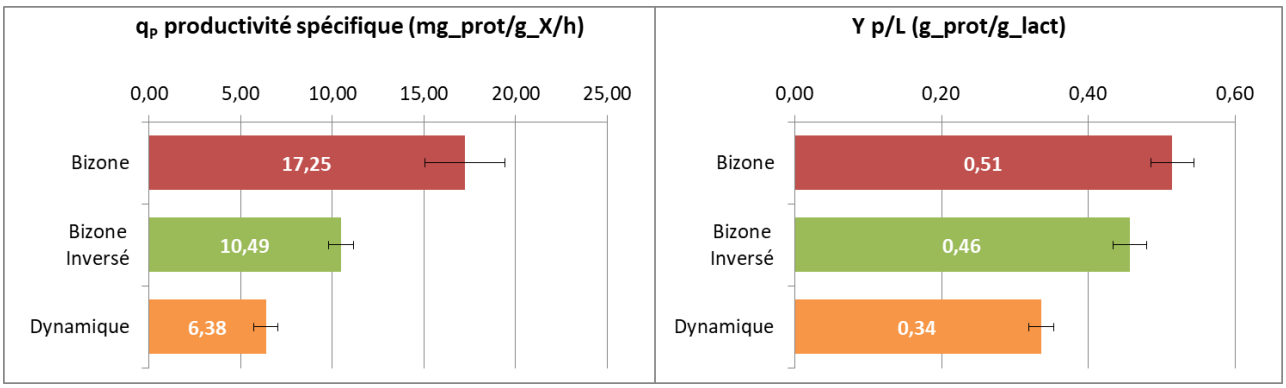


Figure III.16. Comparaison du taux de production moyen (q_p) et du rendement de conversion de lactose en protéines ($Y_{P/L}$ ou $Y_{P/S}$) pour les cultures en mode Bizone (en rouge), en mode Bizone Inversé (en vert) et en mode de Variation Dynamique de la pO_2 (en orange).
Les barres d'erreur représentent les écart-types.

Les résultats confirment donc que la condition générant une Variation Dynamique de la pO_2 dans un bioréacteur unique impacte de façon beaucoup forte tous les critères caractéristiques des cultures, par rapport aux systèmes Bizone et Bizone Inversé, et ce alors

que les durées d'exposition aux conditions d'anaérobiose (ou de faible pO_2) ne sont sensiblement pas différentes.

III.4.6. Discussion des résultats

La comparaison des résultats obtenus pour les approches Bizone et Variation dynamique de la pO_2 permet d'observer qu'ils sont très différents, alors que les temps d'exposition aux conditions d'aérobiose et d'anaérobiose étaient relativement similaires (Tableau III.6). Ces résultats peuvent être modérés en considérant que, pour le système de Variation Dynamique de la pO_2, le champignon est exposé à une phase de limitation en oxygène plus longue, avec une pO_2 inférieure à 10 % pendant 7 minutes et une pO_2 inférieure à 20 % pour une durée d'environ 12,5 minutes. En dépit de ce fait, si l'on compare les résultats obtenus lors de la culture en mode de Variation Dynamique de la pO_2 avec ceux du système Bizone Inversé qui présentait un temps de séjour de 11,5 minutes en zone non-aérée, la production d'enzymes reste significativement inférieure.

Cette apparente divergence entre les résultats obtenus dans les systèmes à deux compartiments d'un côté et le bioréacteur unique de l'autre, indique que la réponse biologique du champignon face aux gradients d'oxygène pourrait être corrélée à la distribution du temps de séjour dans les zones aérées et non-aérées.

Ainsi, deux hypothèses peuvent être formulées pour expliquer ces comportements.

Une première hypothèse est basée sur l'existence d'une différence des temps de séjour réels des cellules individuelles en limitation en oxygène selon les configurations.

Ainsi, lors de l'expérience réalisée avec une Variation Dynamique de la pO_2, toute la population de champignons subit une absence d'oxygène dissous pendant toute la durée de 2,5 min, ainsi qu'une limitation en oxygène pendant 7 minutes ($pO_2 < 10$ %) ou 12,5 minutes ($pO_2 < 20$ %). Alors que lors des expériences réalisées avec le système à deux compartiments, le temps de séjour dans le compartiment non-aéré correspond au temps de séjour moyen du champignon dans ce compartiment, ce qui signifie qu'une partie seulement des cellules subit réellement la limitation en oxygène pendant 2,5 min. Cette analyse laisse à penser que la réponse métabolique du champignon à la limitation en oxygène est liée à la durée et à l'intensité de cette limitation, et qu'elle dépend de la distribution des temps de séjour des microorganismes dans les zones aérées et non-aérées.

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Oosterhuis et al. 1985 lors d'une étude sur l'effet des gradients d'oxygène sur *Gluconobacter oxydans*. Les auteurs attribuent cette différence entre les deux approches au fait que, dans le système constitué d'un bioréacteur unique auquel est appliquée une fréquence de fluctuation de la pO_2 fixée, le liquide est entièrement dégazé à l'azote. Cela se traduit par des périodes répétées à une pO_2 réellement égale à 0 % de la saturation pour toutes les cellules microbiennes contenues dans le bioréacteur, alors que pour les systèmes à deux compartiments, toutes les cellules ne sont pas exposées ensembles et pour la même durée à l'absence d'oxygène. Dans une étude plus récente, Limberg et al. 2016 ont constaté que les systèmes bizone avec deux réacteurs agités génèrent des gradients complexes lors de cultures de *Corynebacterium glutamicum*. Cela serait dû au fait que cette configuration présente un niveau élevé de re-mélange, ce qui fournit une gamme étendue de distribution de temps de séjour (Limberg et al. 2016). Selon l'auteur, et en accord avec les constatations de Oosterhuis et al. 1985, cette approche Bizone permet de bien représenter les différents temps d'exposition des cellules microbiennes aux hétérogénéités rencontrés au sein des réacteurs à grande échelle. Toutefois, notre étude montre aussi que l'utilisation d'un bioréacteur unique permet de simuler de façon plus intense les hétérogénéités en termes de pression partielle en oxygène dissous lors de cultures de *T. reesei*.

Ces résultats obtenus à l'échelle macroscopique peuvent être reliés à des données antérieures obtenues à l'échelle intracellulaire. Ainsi, Bonaccorsi et al., 2006 ont étudié la réponse transcriptionnelle de *T. reesei* soumis à des limitations en oxygène, lors de cultures continues en bioréacteur unique agité et alimenté avec une solution de glucose. En conditions de faible disponibilité en oxygène dans le milieu (1 à 0,1 $mgO_2.L^{-1}$), ces auteurs ont observé une répression des gènes impliqués dans la synthèse de protéines, la maintenance de la structure des cellules et la division cellulaire. En conditions d'anoxie (absence totale d'oxygène), cet effet était encore plus prononcé et a provoqué une inhibition de la transcription d'une grande partie des gènes impliqués dans la synthèse des enzymes de la voie glycolytique et du cycle de Krebs, ce qui a fini par engendrer une accumulation de glucose dans le milieu (Bonaccorsi et al. 2006). L'auteur a également observé que lors de la ré-oxygénation du milieu après 2 h d'anoxie, il y a eu une réactivation des gènes nécessaires à la consommation de glucose par le métabolisme oxydatif (Bonaccorsi et al. 2006).

Nos résultats expérimentaux sont en accord avec ces constations, puisqu'ils montrent que la production de cellulases est plus affectée en conditions de Variation Dynamique de la pO_2, la seule méthode qui a permis une exposition du champignon à des périodes d'anoxie, bien que sur une durée inférieure à celles utilisées par Bonaccorsi et al. 2006. Cela montre également que le champignon est robuste, car capable de recommencer la métabolisation du substrat carboné même après une longue période en absence d'oxygène.

Une seconde hypothèse est basée sur l'existence d'un transfert d'oxygène entre le bioréacteur aéré et le bioréacteur non-aéré pour les systèmes Bizone.

Lors des cultures *T. reesei,* un phénomène d'expansion du moût de fermentation lié à l'aération (hold-up) a été observé (Figure III.17).

Figure III.17. Photo d'une culture agitée et aérée de *T. reesei* TR3060 en fed-batch conventionnel montrant l'aspect du moût de fermentation expansé

Ce phénomène est favorisé par les conditions d'opération (aération et agitation), mais aussi par la sécrétion de surfactants par le champignon. En effet, *T. reesei*, comme d'autres champignons filamenteux, produit des hydrophobines (Bailey et al. 2002), qui favorisent l'incorporation de petites bulles de gaz dans le milieu. Selon Gabelle 2012 et Fyferling 2007, ces microbulles auraient un impact sur le transfert d'oxygène, d'une part parce que leur temps de séjour dans le milieu est plus important que celui des grosses bulles, et d'autre part parce que la surface spécifique d'échange entre le gaz et le milieu liquide est plus important.

Afin d'étudier cette hypothèse, une approche de modélisation des phénomènes observés expérimentalement est proposée au chapitre V. Cette étude de modélisation a été menée afin de mieux comprendre cette caractéristique particulière du moût de fermentation d'intégrer des petites bulles responsables du hold-up, et de mettre en évidence les possibles effets de la présence de ces petites bulles sur le transfert d'oxygène dans les différentes approches scale-down présentées dans ce chapitre.

III.5. Conclusions

Dans cette partie de l'étude, l'effet de variations de concentration en oxygène dissous sur la production d'enzymes a été étudié au cours de cultures de *T. reesei*. Trois approches expérimentales ont permis de montrer des réponses similaires du champignon à une limitation en oxygène, avec une réduction plus ou moins importante de la concentration en cellulases produites, de la vitesse spécifique de production des cellulases et du rendement de conversion du lactose en protéines. Cependant, les diminutions observées diffèrent selon le système utilisé, à cause d'une part de l'existence d'une distribution des cellules aux faibles concentrations en oxygène, et d'autre part de l'existence de microbulles dans le milieu de culture, rendant difficile l'atteinte d'une réelle anaérobiose dans les systèmes Bizone. De plus, la réponse biologique différente obtenue lors des expériences réalisées avec ces systèmes Bizone par rapport au bioréacteur unique montre que la réponse physiologique du champignon est plus complexe à analyser et est liée à la distribution du temps de séjour dans les zones aérées et non-aérées. Une explication permettant d'approfondir ces phénomènes sera discutée dans le chapitre V.

Enfin, la faible sensibilité du champignon vis-à-vis des hétérogénéités en oxygène en phase de production d'enzymes a été démontrée lors des expériences utilisant un système Bizone. Ces résultats ouvrent des perspectives en termes de choix technologique à l'échelle industrielle. En particulier, l'utilisation de bioréacteurs de type colonne à bulles ou airlift est une alternative intéressante aux bioréacteurs CSTR, car ces technologies permettent d'utiliser des tailles de fermenteurs plus élevées et sont moins couteuses à l'investissement. En revanche, elles démontrent des temps de mélange plus élevés, d'où un risque plus grand d'hétérogénéités. Dans le cas des cultures de *T. reesei* pour la production de cellulases, nos résultats suggèrent que ce risque restera modéré, en raison de la faible sensibilité du champignon aux hétérogénéités en oxygène, telle que démontrée dans notre étude.

IV. Etude de l'effet des gradients d'oxygène sur l'hétérogénéité des populations en bioréacteurs *Bizone*

IV.1. Introduction

A l'échelle industrielle, la production de bioproduits, tels que les enzymes, est le plus souvent réalisée dans des grands bioréacteurs en utilisant des microorganismes hyper-producteurs. L'expansion clonale de ces microorganismes hyper-performants peut favoriser l'apparition de variants peu ou non producteurs, cette hétérogénéité phénotypique étant un problème majeur dans le contexte des bioproductions industrielles. Ce phénomène peut être influencé par plusieurs facteurs tels que l'état métabolique des cellules, la composition du milieu de culture et la disponibilité en oxygène dissous dans le milieu (Glick, 1995). Selon Rugbjerg and Sommer (2019), la présence de variants dans les cultures industrielles peut entraîner une réduction du rendement de production et/ou de la qualité des produits, ce qui fait de l'homogénéité génétique « un paramètre crucial, mais souvent négligé, dans le scale-up des procédés ». Selon Delvigne et Goffin (2014), les raisons de l'apparition de ces hétérogénéités de population évoquées pourraient porter à la fois sur l'histoire individuelle de chaque cellule au sein du bioréacteur et sur la mise en place d'une réponse coordonnée de la population pour répondre aux stress liés au procédé pour se protéger. La stochasticité dans l'expression des gènes et au niveau des réactions métaboliques sont les sources principales de l'hétérogénéité des populations, ces dernières étant fortement liées aux hétérogénéités du microenvironnement que les microorganismes peuvent rencontrer dans les grands bioréacteurs (Delvigne et al., 2014).

Concernant les champignons filamenteux, plusieurs études ont mis en évidence des hétérogénéités des micro-colonies issues de cultures liquides, caractérisées principalement par des différences de morphologie et d'expression des gènes. Selon Wösten et al. (2013), l'hétérogénéité entre les hyphes est un mécanisme permettant d'augmenter les chances de survie de certains hyphes lorsque les colonies sont exposées à des conditions de stress. Les champignons filamenteux sont ainsi capables de déclencher différents mécanismes afin de

conserver de l'énergie pour survivre dans des environnements hypoxiques (Hillmann et al., 2015). Les résultats antérieurs montrent que le manque d'oxygène peut favoriser une différenciation morphologique des colonies chez *Aspergillus* (McCormick et al., 2012).

Toutefois, la plupart des études publiées portent sur le genre Aspergillus, et peu d'informations concernant *Trichoderma reesei* ont pu être trouvées, alors que des hétérogénéités de morphologie des colonies ont été observées lors de nos essais avec cette espèce, en conditions d'hétérogénéité de concentration en oxygène dissous. L'objectif de cette partie du travail est donc d'approfondir les connaissances sur ces hétérogénéités chez *Trichoderma reesei* TR3060, à la fois sur le plan morphologique, sur la capacité de production d'enzymes des différents types de colonies et sur leur transcriptome.

La démarche expérimentale mise en œuvre a comporté 5 phases. Dans un premier temps, des échantillons ont été prélevés au cours d'une expérience simulant des gradients d'oxygène en système *Bizone* (telle que décrite au chapitre III) puis étalés sur milieu solide afin d'obtenir des conidies, qui ont été cryoconservées pour des analyses ultérieures. Les colonies cryo-conservées ont ensuite été caractérisées sur le plan morphologique afin d'identifier et de quantifier les phénotypes présents dans le moût au long de la culture. Lors d'une troisième phase, des cultures liquides en micro-cuves ont été réalisées avec les deux types de colonies identifiés, dans le but de caractériser les différences éventuelles de capacité de sécrétion de cellulases entre ces deux phénotypes identifiés. Dans un quatrième temps, des cultures liquides en bioréacteurs ont été menées en mode fed-batch en présence de substrat inducteur, dans des conditions parfaitement contrôlées (pH, température, pO_2,…), afin de caractériser les cinétiques de croissance, de consommation de substrat carboné et de sécrétion de cellulases par les phénotypes différents. Enfin, une analyse transcriptomique a été conduite afin de mieux comprendre, au niveau intracellulaire, les différences phénotypiques observées.

Les essais ayant été conduits en fin de thèse, certaines expériences n'ont pas pu être dupliqués, ce qui limite *a priori* la portée des conclusions de l'étude. De plus, certaines conditions Témoin n'ont pas pu être mises en œuvre. Les résultats présentés ici seront donc présentés avec toutes les précautions, et devront être confirmés par des essais complémentaires.

IV.2. Matériels et Méthodes

A l'issue d'une expérience en mode *Bizone* simulant des gradients d'oxygène en mode fed-batch, des échantillons du moût de culture ont été collectés durant les 11 jours de culture, comme illustré dans la Figure IV.1. Le système *Bizone* (détaillé au chapitre III) est composé d'un bioréacteur aéré d'un volume utile de 3 L connecté à un bioréacteur limité en oxygène d'un volume utile de 1 L, et le moût de culture circule entre ces deux zones. Les cellules de *T. reesei* sont donc exposées, à chaque cycle, à une condition d'hypoxie pendant environ 2,5 minutes avant de revenir en zone riche en oxygène pendant environ 10,5 minutes.

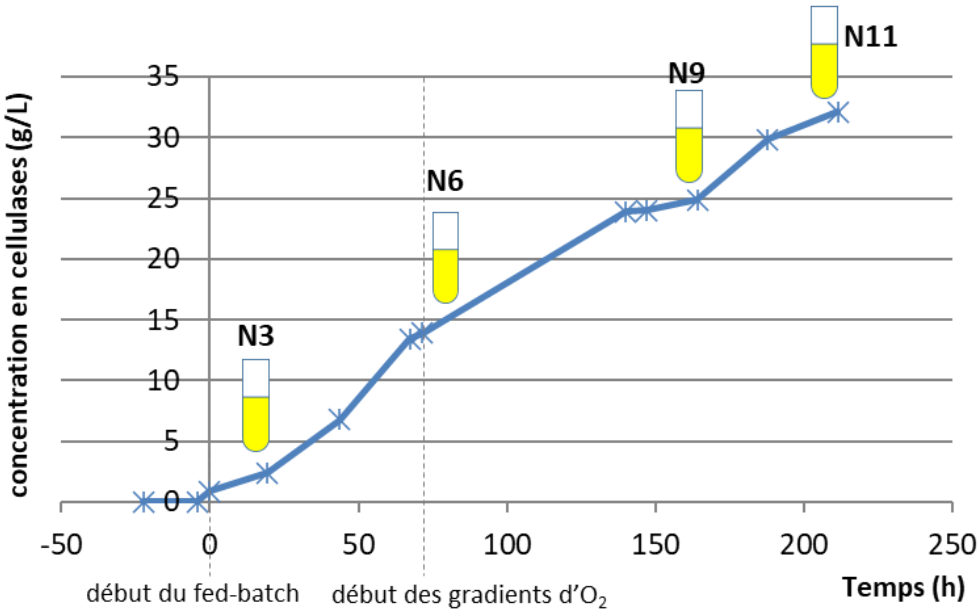


Figure IV.1. Evolution de la concentration en cellulases lors de la phase fed-batch d'une culture de *T. reesei* TR3060 conduite en bioréacteur *Bizone*.
Courbe adaptée des résultats issus du chapitre III) et prélèvements (N3, N6, N9 et N11) effectués lors de cette culture.

Lors de cette culture, quatre échantillons (N3, N6, N9 et N11) ont été prélevés à 19, 72, 164 et 212 heures après le début du fed-batch. Les analyses décrites par la suite ont été réalisées sur ces 4 échantillons.

IV.3. Identification du phénotype macroscopique des sous-populations présentes lors d'une culture de *T. reesei* TR3060 simulant des gradients d'oxygène

IV.3.1. Isolement des colonies

Due à l'impossibilité de réaliser les nombreuses analyses décrites par la suite de façon

concomitante aux expériences *Bizone* et afin de pouvoir réaliser l'analyse phénotypique, les échantillons récoltés ont dû passer par une étape de sporulation, suivie d'un isolement des colonies et de repiquages afin de pouvoir les conserver et de les analyser ultérieurement. Une approche similaire a été utilisé par Chan Ho Tong, 2017 lors de son étude sur la reproduction de *Trichoderma reesei*. La Figure IV.2 illustre et résume les 3 étapes qui sont décrites ci-dessous.

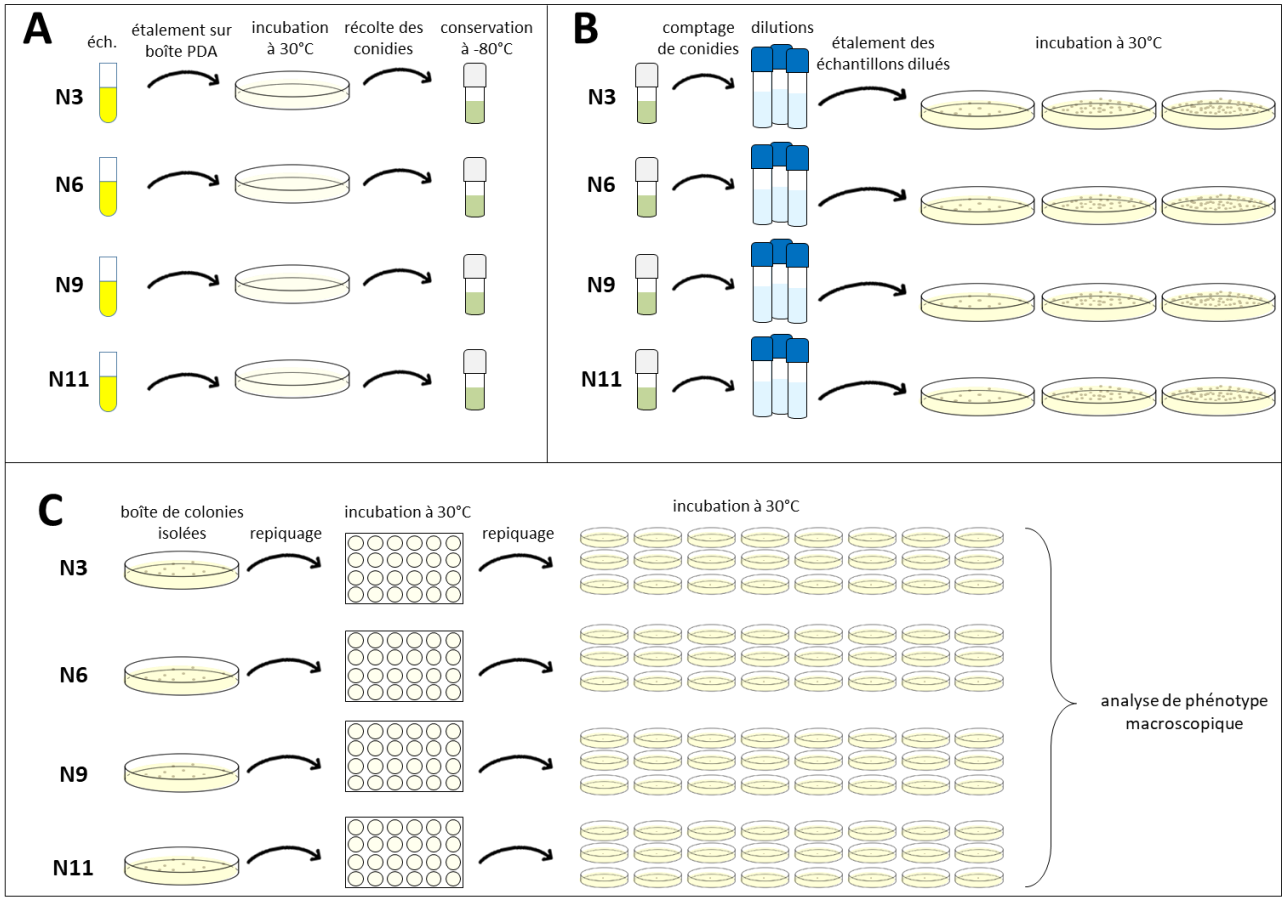


Figure IV.2. Illustration des étapes d'isolement et d'identification des différents phénotypes macroscopiques observés lors de cultures de *T. reesei* TR3060.

Les échantillons N3, N6, N9 et N11 issus de l'expérience *Bizone* ont tout d'abord été étalés sur des boîtes de Pétri contenant un milieu de culture solide PDA (*Potato Dextrose Agar*, Becton, Dickson and Company, Sparks, MD, EUA). Après incubation pendant 1 semaine à 30°C pour stimuler la production et la maturation des conidies, celles-ci ont été récoltées dans une solution stérile de CTS50, dont la composition est présentée dans au Tableau IV.1, puis stockées à -80°C dans des cryotubes (Figure IV.2, étape A). La concentration en conidies des 4 échantillons a été déterminée par comptage au microscope optique (objectif x40), à l'aide d'une cellule de Malassez.

Tableau IV.1. Composition de la solution de CTS50

Composé	Quantité	Fournisseur
Saccharose	13,7 g	Sigma-Aldrich
Tris HCl 1M pH 7,5	10 mL	VWR International
$CaCl_2$ 1M	5 mL	VWR International
H_2O milliQ	Qsp 100 mL	
Solution autoclavée pendant 30 min à 110°C		

Les contenus des 4 cryotubes ont ensuite été dilués et étalés sur de nouvelles boîtes de Pétri contenant du milieu PDA afin d'obtenir 10, 50 et 100 colonies isolées par boîte (Figure IV.2, étape B).

Parmi les colonies isolées obtenues, 24 colonies de chaque condition (N3, N6, N9 et N11) ont été repiquées dans des plaques 24 puits (VWR, Radnor, PA, EUA) contenant du milieu PDA (Figure IV.2, étape C). Après incubation à 30°C pendant 4 à 5 jours, les colonies issues de chaque puits ont été repiquées au centre de nouvelles boîtes PDA. Ces nouvelles boîtes ensemencées ont alors été incubées à 30°C pendant 4 à 5 jours, afin de permettre l'analyse du phénotype macroscopique des colonies isolées.

IV.3.2. Analyse morphologique du phénotype des colonies

Cette analyse a consisté en une observation visuelle et une description de la morphologie des différents types de macro-colonies développées sur les boîtes de milieu PDA. Cette observation a porté sur deux critères : le diamètre des colonies et leur densité.

Lorsque les phénotypes morphologiques différents ont été identifiés et caractérisés, une quantification des exemplaires de chaque type de morphologie a été effectuée sur les échantillons issus de l'étape C, dans les conditions N3, N6, N9 et N11.

IV.3.3. Etude de la capacité de sécrétion de cellulases des sous-populations isolées

La capacité des différents phénotypes morphologiques de *T. reesei* TR3060 à produire des cellulases a été étudiée sur des cellules préalablement cultivées en micro-cuves, par dosage des cellulases dans les surnageants.

IV.3.3.1. Cultures liquides en micro-cuves

Afin d'analyser la capacité de sécrétion de cellulases des différentes sous-populations identifiées, les colonies isolées de l'étape précédente (Figure IV.2, étape C) ont été repiquées

dans deux plaques de 24 puits (VWR) contenant 2 mL du milieu liquide inducteur F45 (Jourdier et al., 2013), dont la composition est présentée au Tableau IV.2.

Tableau IV.2. Composition du milieu inducteur F45

Composé	Quantité	Fournisseur
K_2HPO_4	4,35 g	VWR International
$(NH_4)_2SO_4$	2,1 g	VWR International
$MgSO_4$, $7H_2O$	0,15 g	VWR International
Corn steep	0,75 g	Roquette Frères
Lactose	5 g	VWR International
Milieu Solka-floc®	5 g	VWR International
Acide maléique	5,8 g	VWR International
H_2O de ville	Qsp 500 mL	
Broyage du milieu, correction du pH à 6 et autoclavage pendant 30 min à 110°C		
Eléments traces 1000X (Tableau IV.3)	500 µL	

Tableau IV.3. Composition de la solution d'éléments traces 1000X

Composé	Quantité	Fournisseur
$FeSO_4$, $7H_2O$	0,50 g	Sigma-Aldrich
$MnSO_4$, H_2O	0,14 g	VWR International
$ZnSO_4$, $7H_2O$	0,14 g	VWR International
$CoCl_2$	0,37 g	Alfa Aesar
H_2O milliQ	Qsp 100 mL	

Après incubation à 30°C sous agitation à 150 rpm dans des incubateurs Multitron II (Infors, Bottmingen, Suisse) pendant 7 jours, la concentration en cellulases produites a été dosée sur le contenu de chaque micro-cuve, selon la méthode de Lowry (détaillée au chapitre III.2.5).

IV.3.3.2. *Dosage des cellulases*

Le dosage des cellulases a été effectué selon la méthode décrite au chapitre III.2.5.

IV.3.4. Caractéristiques cinétiques des sous-populations isolées

Les caractéristiques cinétiques des différents phénotypes morphologiques de *T. reesei* TR3060 ont été étudiées lors de cultures en bioréacteurs des colonies isolées à l'étape C. Pour

des raisons de temps imparti pendant la thèse, les cultures n'ont pas pu être dupliquées, ce qui devra être fait dans le futur.

IV.3.4.1. Cultures en bioréacteurs

IV.3.4.1.1. Description des bioréacteurs utilisés

Afin de déterminer les caractéristiques cinétiques des deux sous-populations identifiées, celles-ci ont été cultivées séparément en milieu liquide dans des bioréacteurs agités Dasgip (Eppendorf, Hambourg, Allemagne) de 1,5 L, dont les dimensions sont : 110 mm de diamètre et 255 mm de hauteur. Ces bioréacteurs sont équipés de deux mobiles d'agitation : un mobile de type Rushton à 6 pales, de diamètre externe 46 mm et un mobile de type oreille d'éléphant à 3 pales, de diamètre externe 50 mm. La Figure IV.3 présente une photo de la cuve du bioréacteur utilisé.

Figure IV.3. Photo d'un bioréacteur agité Dasgip de 1,5 L (Eppendorf, Hambourg, Allemagne), équipé de deux mobiles d'agitation (de type Rushton et oreille d'éléphant)

IV.3.4.1.2. Conditions de culture

Les milieux de culture et de préculture utilisés pour les fermentations en bioréacteur dans la présente étude sont identiques à ceux décrits dans le chapitre III.2.2.

Les cultures ont été réalisées en deux étapes selon le protocole classique d'IFPEN (Jourdier et al., 2013) : une phase de croissance en batch, suivie d'une phase de production

de cellulases en fed-batch. La phase de croissance a été réalisée dans un volume total de milieu de culture de 800 mL à une concentration initiale en glucose de 30 $g.L^{-1}$. Cette étape a été réalisée à une température de 27°C, une vitesse d'agitation de 800 rpm et un pH 4,8 automatiquement ajusté par une solution de NH_4OH 5,5 N. Le débit d'aération a été fixé à 20 $L.h^{-1}$. La durée de cette phase était de 35 h. Ensuite, la phase de production de cellulases a été initiée par la mise en place d'une alimentation continue, soit par une solution de lactose, soit par un mélange [75 % glucose + 25 % lactose], à une concentration de 210 $g.L^{-1}$, et à un débit de 2 $mL.h^{-1}$. Durant cette étape, le pH a été maintenu à 4,0, la température à 25°C et l'agitation à 1000 rpm. Le débit d'aération a été fixé à 20 L. h^{-1}. Au total, 8 cultures ont été réalisées, soit 2 cultures avec chaque sous-population, avec chacune des 2 compositions de milieu.

IV.3.4.2. Mesures en ligne en bioréacteur

La température a été mesurée en ligne grâce à une sonde de température IPT100 (Dasgip) préalablement étalonnée. Cette sonde est connectée au système de régulation de température du bioréacteur, qui permet de maintenir la température à une valeur constante par bain-marie.

Le pH du milieu de culture a été suivi en ligne par une sonde de pH 405-DPAS-SC-K8S (Mettler-Toledo, Urdorf, Suisse), après étalonnage par deux solutions tampons.

La pO_2 du milieu a été mesurée en ligne par une sonde ampérométrique InPro 6820 (Mettler-Toledo). Son étalonnage est préalablement réalisé dans le milieu de culture après autoclavage, en 2 points : tout d'abord à pO_2 = 0 % après injection d'azote dans le milieu puis à pO_2 = 100 % après injection d'air comprimé dans les conditions d'agitation. Au cours de la culture, le débit d'injection d'air et l'agitation sont maintenus constants de façon à avoir une pO_2 supérieure à 30 % dans le milieu.

La composition des gaz en sortie de bioréacteur a été déterminée en ligne par un analyseur GA4 (Dasgip). Dans ce type d'analyseur, les teneurs en O_2 et CO_2 sont mesurées par galvanométrie et par absorbance infrarouge, respectivement.

IV.3.4.3. Mesures hors ligne pour les cultures en bioréacteur

Les mesures effectuées hors ligne comprennent les mesures des concentrations en biomasse, en sucres et en protéines. Ces analyses ont été réalisées selon les méthodes présentées au chapitre III.2.5.

IV.3.5. Analyse transcriptomique

Afin de comprendre les différences observées entre les sous-populations hétérogènes, des analyses transcriptomiques ont été réalisées. Elles permettent de quantifier les niveaux d'expression des gènes différemment exprimés dans les différentes souches.

Les échantillons issus des cultures en bioréacteur des deux sous-populations identifiées sont soumis à une extraction de leur ARN, les gènes exprimés de façon différentielle (gènes DE, pour différentiel d'expression) sont retenus et leur fonction est alors identifiée. Tous les échantillons ont été analysés en duplicat.

IV.3.5.1. Préparation du matériel biologique et séquençage

Pour la préparation des ARN, le mycélium est filtré et, pour chaque réplicat, environ 100 mg de matériel biologique sont placés dans un tube de 2 mL et congelés dans l'azote liquide pour être conservé à -80 °C. L'extraction, la quantification et le contrôle qualité de l'ARN sont effectués selon la méthode décrite par Ivanova et al., 2017.

La préparation des banques, le séquençage Illumina, le traitement des données, l'alignement et les analyses différentielles ont été réalisées à la plateforme génomique de l'Institut de Biologie de l'École Normale Supérieure selon les protocoles décrits dans Ivanova et al., 2017. Les ARN messagers (polyA+) ont été purifiés à partir de 1 µg d'ARN total en utilisant l'oligo(dT). Les banques RNA-seq ont été réalisée avec le kit Illumina True-seq stranded mRNA (Illumina) et multiplexées par 6. Le séquençage a été effectué par un séquenceur HiSeq1500 (Illumina) et la taille de lectures était de 75pb. Le traitement des données a été réalisé avec l'outil Eoulsan (Jourdren et al., 2012). Avant alignement, les polyN ont été éliminés et les séquences ayant une taille inférieure à 40 pb ou présentant une qualité moyenne inférieure à 30 ont été éliminées. L'alignement des lectures a été réalisé sur le génome de *T. reesei* (version 2 de la plateforme en ligne JGI) (*https://mycocosm.jgi.doe.gov/Trire2/Trire2.info.html*).

IV.3.5.2. Identification et classification des gènes avec un différentiel d'expression

Les gènes sélectionnés comme ayant un différentiel d'expression (DE) présentent un ratio de log2 de 2 et une p-value ajustée inférieure à 0,01. La fonction de ces gènes a été identifiée à l'aide d'une base de données du génome de *T. reesei* annotée manuellement et propriété d'IFPEN.

IV.4. Résultats et discussion

IV.4.1. Identification et quantification de deux phénotypes macroscopiques

IV.4.1.1. Identification de différents phénotypes

Lorsque la souche industrielle *T. reesei* TR3060 est repiquée au centre d'une boîte PDA, elle forme une macro-colonie compacte qui ne s'étale pas complètement sur la gélose après incubation à 30°C pendant 5 jours. Sur la surface de cette macro-colonie, on observe un tapis de spores de coloration pouvant varier de blanche à verte, comme le montre la Figure IV.4.

Figure IV.4. Phénotype macroscopique de la souche TR3060 en milieu PDA après incubation à 30°C pendant 5 jours.
Photo sur fond noir.

Sur les échantillons issus de l'expérience simulant des gradients d'oxygène en mode *Bizone* (après l'étape C), deux phénotypes différents ont été observés, coexistant dans le moût de culture de cette expérience. Ces deux phénotypes, nommés TR3060-P et TR3060-G développent des macro-colonies avec des caractéristiques différentes en milieu solide, comme le montre la Figure IV.5. Le phénotype TR3060-P forme des colonies compactes, similaires à celles de la souche de départ (TR3060) alors que le phénotype TR3060-G forme des colonies plus étalées, occupant la totalité (ou la quasi-totalité) de la superficie du milieu gélosé sur la boîte. Ce deuxième phénotype est considéré comme un variant de la souche de départ.

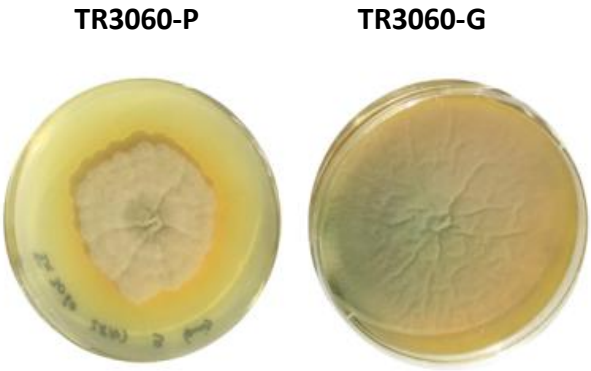


Figure IV.5. Morphologie des phénotypes TR3060-P et TR3060-G en milieu PDA après incubation à 30°C pendant 5 jours.

IV.4.1.2. Quantification des deux phénotypes observés

Les proportions des deux phénotypes ont été mesurées dans deux échantillons prélevés à deux temps de culture différents : 19 h après le début du fed-batch (N3) et avant la mise en place des gradients d'oxygène, puis 212 h après (N11), soit 140 h après l'application des gradients d'oxygène. Le Tableau IV.4 présente le résultat de la quantification des phénotypes observés dans ces deux conditions.

Tableau IV.4. Quantification des colonies TR3060-P et TR3060-G dans les conditions N3 et N11

Condition	Nombre total de colonies	% colonies TR3060-P	% colonies TR3060-G
N3 (t_{fb} = 19 h)	221	98 %	2 %
N11 (t_{fb} = 212 h)	118	76 %	24 %

t_{fb} = temps après le début du fed-batch

Cette analyse permet d'observer une évolution de la distribution des phénotypes au cours de la culture fed-batch, en conditions d'hétérogénéité d'apport en oxygène. Le phénotype variant TR3060-G représentait seulement 2 % des colonies dans la condition N3, donc avant l'application des gradients d'oxygène, contre 24 % dans la condition N11, c'est-à-dire après 140 h d'exposition cyclique en conditions limitées en oxygène (hypoxie). Cette observation indique que l'exposition à des conditions d'hypoxie a potentiellement favorisé le développement du phénotype G. Cependant, cette condition n'ayant pu être répétée, et une culture Témoin réalisée en conditions d'oxygénation constantes n'ayant pas pu être réalisée, cette observation doit être vérifiée avant d'être validée.

Dans le but d'effectuer des analyses complémentaires, des conidies de chaque

phénotype (TR3060-P et TR3060-G) ont été récoltées et cryoconservées à partir des boîtes PDA contenant les colonies isolées.

IV.4.2. Analyse de la capacité de sécrétion de cellulases par les deux sous-populations identifiées

Les conidies cryoconservées des phénotypes isolées TR3060-P et TR3060-G ont été cultivées en microplaques 24 puits contenant le milieu liquide inducteur F45. L'objectif de cette étape était d'investiguer si, en plus d'une différence morphologique, les deux sous-populations présentaient des différences de capacité sécrétoire de cellulases. Sept micro-cultures de chaque phénotype ont été réalisées à partir de 7 colonies différentes du phénotype TR3060-G et du phénotype TR3060-P. Une micro-culture avec la souche industrielle TR3060 est ajoutée comme Témoin.

La Figure IV.6 montre les concentrations en cellulases obtenues après 7 jours de culture à partir des 15 micro-cultures. Une différence de capacité sécrétoire des deux phénotypes est observée. Ainsi, la concentration finale en cellulases pour les cultures des clones TR3060-P était de 2,05 ± 0,30 $g.L^{-1}$ alors que pour les clones TR3060-G, la concentration en cellulases était seulement 0,73 ± 0,24 $g.L^{-1}$, une valeur presque trois fois inférieure. On observe également que la capacité de production de cellulases par les clones TR3060-P est très proche du témoin (2,01 $g.L^{-1}$), ce qui indique que le phénotype TR3060-P présente des caractéristiques de production similaires à celle de la souche industrielle, alors que les caractéristiques de production du phénotype TR3060-G sont fortement dégradées.

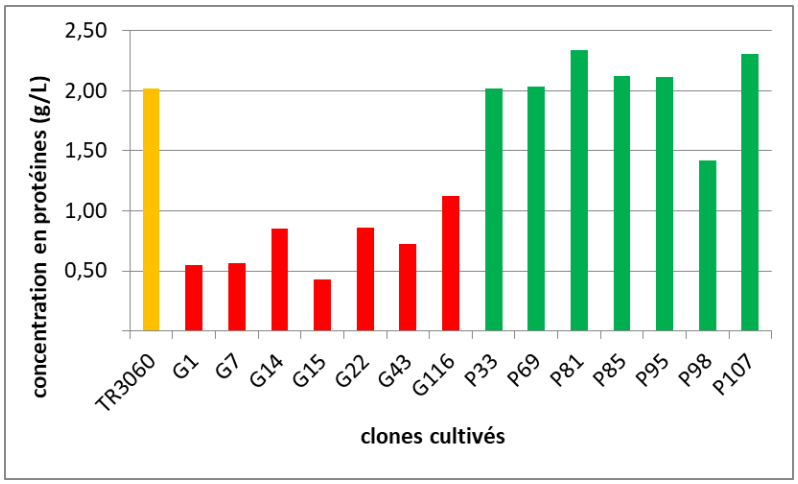


Figure IV.6. Résultat des dosages de cellulases dans des cultures liquides en microplaque réalisées à 30°C, 150 rpm pendant 7 jours, avec à la souche industrielle TR3060 (Témoin, en orange), 7 clones du variants TR3060-P (en rouge) et 7 clones TR3060-G (en vert).

Enfin, plus la faible production de cellulases par le phénotype TR3060-G peut être associée à la différence de morphologie observée précédemment. Considérant que la morphologie des clones TR3060-G est une conséquence du stress hypoxique subi par les cellules, on peut supposer que ce stress induit, soit une réduction de la synthèse des cellulases, soit une réduction de la capacité de métabolisation du lactose chez ce variant, par rapport au phénotype TR3060-P. Une validation de ces hypothèses est cependant nécessaire et peut être obtenue à partir de cultures en bioréacteurs contrôlés.

IV.4.3. Caractérisation des cinétiques des deux sous-populations

Afin d'analyser les cinétiques caractéristiques des phénotypes TR3060-P et TR3060-G, 8 cultures en bioréacteurs ont été menées en parallèle.

IV.4.3.1. Démarche expérimentale

Les phases de croissance des deux variants ont été conduites en présence de glucose pendant environ 25-30 h, dans les mêmes conditions. Ensuite, les deux sous-populations ont été cultivées en mode fed-batch, alimenté avec une solution de lactose pur afin de suivre les cinétiques de production de cellulases et de consommation du lactose par ces deux phénotypes. Les deux sous-populations ont été également cultivées en mode fed-batch alimenté avec une solution composée de 75 % de glucose et 25 % de lactose. Ce choix a été motivé par le fait que la sous-population TR3060-G avait une faible production de cellulases lors des cultures en micro-cuves, indiquant possiblement une faible capacité de métabolisation du lactose. Ainsi, l'intention était de fournir du glucose comme source carbonée facilement métabolisable par ce variant, en mélange avec le lactose qui sert de substrat inducteur de la production de cellulases. Ces deux séries d'expériences ont été dupliquées. Le Tableau IV.5 résume les conditions des expériences effectuées.

Tableau IV.5. Résumé des conditions des cultures réalisées en bioréacteur pour caractériser les cinétiques des phénotypes TR3060-P et TR3060-G

Phénotype cultivé	Composition de la phase fed-batch	Codes des expériences
TR3060-P	100 % lactose ; [S] = 222 $g.L^{-1}$	PL1 et PL2
	75 % glucose + 25 % lactose ; [S] = 184 $g.L^{-1}$	PGL1 et PGL2
TR3060-G	100 % lactose ; [S] = 222 $g.L^{-1}$	GL1 et GL2
	75 % glucose + 25 % lactose ; [S] = 184 $g.L^{-1}$	GGL1 et GGL2

[S] = concentration totale du substrat injecté en fed-batch

L'observation des cultures en fermenteur au bout de 60 h montre que la souche TR3060-G a commencé à sporuler, ce qui génère un changement de couleur du milieu qui passe de l'orangé au vert (Figure IV.7). Le pH du moût a également augmenté, nécessitant des corrections avec de l'acide très régulièrement.

Figure IV.7. Photos des cultures des variants TR3060 P (à gauche) et TR3060 G (à droite) en fed-batch alimenté avec du lactose pur.
On peut noter que le variant TR3060 G acquiert une couleur verte alors que le variant TR3060 P garde une couleur orangée.

Des échantillons ont été collectés tout au long des expériences, ils ont permis d'établir les cinétiques de production de biomasse, de production de cellulases et de consommation des sucres. Certains échantillons, prélevés à des moments clefs des expériences, ont également été utilisés pour des analyses de transcriptome. Les moments de prélèvement ont été choisis à partir du comportement de la souche TR3060 en culture fed-batch avec du lactose pur : soit à 15 h après le début de fed-batch quand le champignon est en train d'adapter son métabolisme à la production de cellulases à partir du lactose (Portnoy et al., 2011), et à 63 h après le début de fed-batch, quand le champignon est déjà bien adapté et produit des cellulases à une vitesse maximale.

IV.4.3.2. Comparaison des cinétiques obtenues en présence ce lactose 100 %

Les Figure IV.8.A, B, C & D présentent les cinétiques des deux variants lors de cultures (dupliquées) en fed-batch alimentées avec une solution de lactose pur.

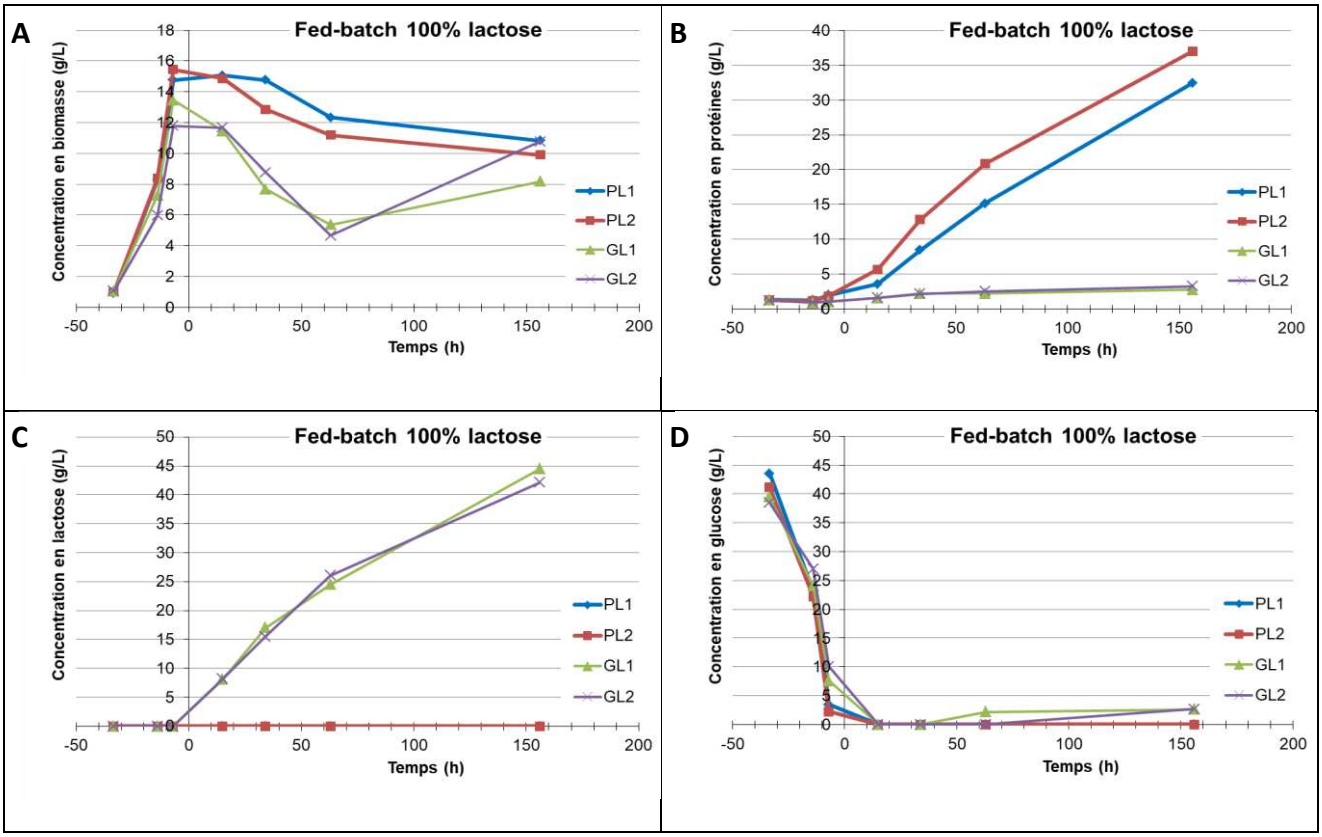


Figure IV.8. Cinétiques de production de biomasse (A) et de cellulases (B) et de consommation de lactose (C) et de glucose (D) lors des cultures PL1 et PL2 réalisées avec des clones de la souche TR3060-P et lors des cultures GL1 et GL2 réalisées avec des clones de la souche TR3060-G. Les cultures sont réalisées en fed-batch (le temps zéro représente le début du fed-batch) avec une solution de lactose à 222 $g.L^{-1}$ injectée à un débit de 2 $mL.h^{-1}$

On observe dans les Figure IV.8.A et B que, dans les 60 premières heures après le début de l'alimentation avec du lactose, les cultures avec le variant TR3060-G présentent une forte réduction de la biomasse, qui passe de 12,62 ± 1,18 $g_X.L^{-1}$ à 5,01 ± 0,49 $g_X.L^{-1}$, et une faible production de protéines (2,34 ± 0,24 $g_{prot}.L^{-1}$). Ce comportement est très éloigné de celui observé avec le variant TR3060-P pour la même période, pour lesquelles la diminution de la biomasse est plus modérée, passant de 15,11 ± 0,48 $g_X.L^{-1}$ à 11,77 ± 0,81 $g_X.L^{-1}$ alors que la production de protéines est plus performante (17,99 ± 4,05 $g_{prot}.L^{-1}$).

Des Figure IV.8.C et D, on observe que, au cours des 60 premières heures de fed-batch, il n'y a pas d'accumulation ni de lactose, ni de glucose avec le variant TR3060-P, alors qu'il y a une rapide accumulation de lactose dans le milieu mais pas d'accumulation de glucose avec le variant TR3060-G. Cela permet de confirmer l'hypothèse que le phénotype TR3060-G a une capacité très réduite d'utilisation du lactose comme source de carbone, ce qui affecte négativement sa capacité de production de cellulases. Cependant, on peut remarquer dans les Figure IV.8.A, B & C, qu'après 60 h de fed-batch, il y a une légère reprise de croissance dans

les cultures TR3060-G, accompagnée d'un léger accroissement de la production de protéines et d'un ralentissement de l'accumulation de lactose dans le milieu. On observe également, dans la Figure IV.8.D, une légère accumulation de glucose dans le milieu, témoignant d'une reprise partielle de la capacité de ce variant à métaboliser le lactose en monomères (glucose et galactose), mais sans l'utiliser efficacement pour produire des cellulases. Ces modifications ne sont toutefois pas suffisantes pour permettre au variant TR3060-G d'atteindre les performances de la souche TR3060-P en termes de production d'enzymes.

IV.4.3.3. Comparaison des cinétiques obtenues en présence de lactose 25 % et glucose 75 %

Les Figure IV.9.A, B, C & D présentent les cinétiques obtenues lors de cultures en fed-batch alimentées avec un mélange 75 % de glucose et 25 % lactose, avec les deux des phénotypes TR3060-P et TR3060-G.

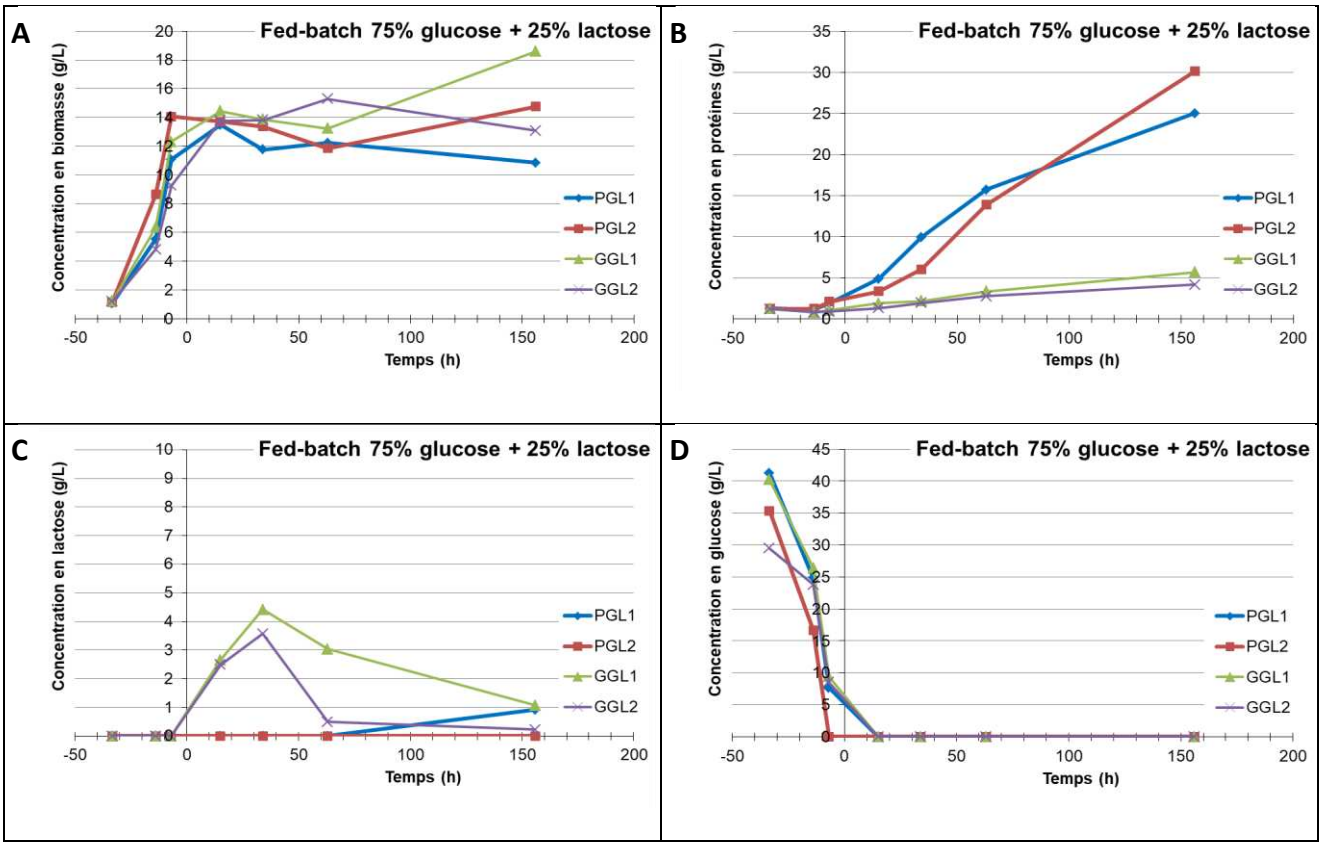


Figure IV.9. Cinétiques de production de biomasse (A) et de cellulases (B) et de consommation de lactose (C) et de glucose (D) lors des cultures PGL1 et PGL2 réalisées avec des clones de la souche TR3060-P et lors des cultures GGL1 et GGL2 réalisées avec des clones de la souche TR3060-G. Les cultures sont réalisées en fed-batch (le temps zéro représente le début du fed-batch) avec une solution de 75 % glucose + 25 % lactose à 184 $g.L^{-1}$ injectée à un débit de 2 $mL.h^{-1}$

L'analyse de ces 4 figures permet d'observer que, bien que les cinétiques de production de biomasse et de consommation de glucose par les deux phénotypes soient similaires (Figure IV.9.A et D), la souche TR3060-G présente toujours une plus faible capacité de production de cellulases (4,91 ± 1,06 $g_{prot}.L^{-1}$) par rapport à a souche TR3060-P (27,56 ± 3,61 $g_{prot}.L^{-1}$) (Figure IV.9.B). Une accumulation de lactose se produit dans les 50 premières heures d'alimentation avec le mélange glucose-lactose dans les cultures avec la souche TR3060-G, alors que ce n'est pas le cas avec le variant TR3060-P. Après ce temps, il y a une consommation du lactose accumulé, ce qui indique que la souche TR3060-G a été capable de s'adapter pour métaboliser le lactose après une période de 50 h. Cependant, cela n'améliore pas suffisamment la capacité de la souche à produire des cellulases à partir de ce sucre, qui reste très faible comparé à la souche TR3060-P.

Un autre point intéressant est la forte capacité de production de cellulases par le variant TR3060-P dans les cultures alimentées avec le mélange 75 % glucose 25 % lactose. A l'issue de ces cultures, la concentration finale en protéines est de 27,56 ± 3,61 $g_{prot}.L^{-1}$. Cette valeur est inférieure d'environ 20 % à la concentration finale obtenue dans les cultures alimentées avec du lactose pur (34,73 ± 3,20 $g_{prot}.h^{-1}$) alors que la quantité de substrat inducteur utilisée est 5 fois moins élevée (46 $g.L^{-1}$ au lieu de 222 $g.L^{-1}$). Les rendements de conversion du lactose en cellulases passent ainsi de 0,156 $g.g^{-1}$ en présence de lactose pur à 0,6 $g.g^{-1}$ en présence du mélange lactose/glucose. Ce phénomène est cohérent avec les observations précédemment décrites par Jourdier et al. (2013) avec la souche *T. reesei* CL847.

IV.4.4. Identification des gènes avec un différentiel d'expression entre les deux variants isolés

Afin d'identifier les gènes démontrant une différence d'expression entre les deux variants morphologiques, l'expression des gènes de la souche TR3060-P a été comparée à celle du variant phénotypique TR3060-G, après 15 heures et 63 heures après le début du fed-batch, dans les deux conditions d'alimentation (lactose pur et mélange glucose 75 % et lactose 25 %). Les comparaisons réalisées dans cette étude sont représentées sur la Figure IV.10.

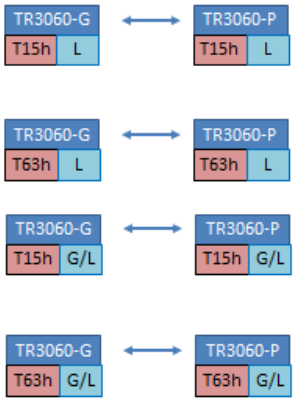


Figure IV.10. Représentation des comparaisons d'expression réalisées dans cette étude.
(L pour lactose 100 %, G/L pour le mélange glucose 75 % + lactose 25 %)

IV.4.4.1. Comparaison de l'expression des gènes entre les deux variants

L'analyse comparative des résultats obtenus, en termes de gènes ayant un différentiel d'expression DE, est proposée à la Figure IV.11.

Cette figure montre le nombre de gènes présentant un différentiel d'expression « up » (plus exprimés dans la souche TR3060-G) et « down » (plus exprimés dans la souche TR3060) pour tous les essais concernant les 2 variants TR3060-P et TR3060-G, avec une alimentation en lactose pur ou avec un mélange lactose et glucose. Le nombre de gènes DE « up » et « down » communs entre les temps de prélèvements est également présenté.

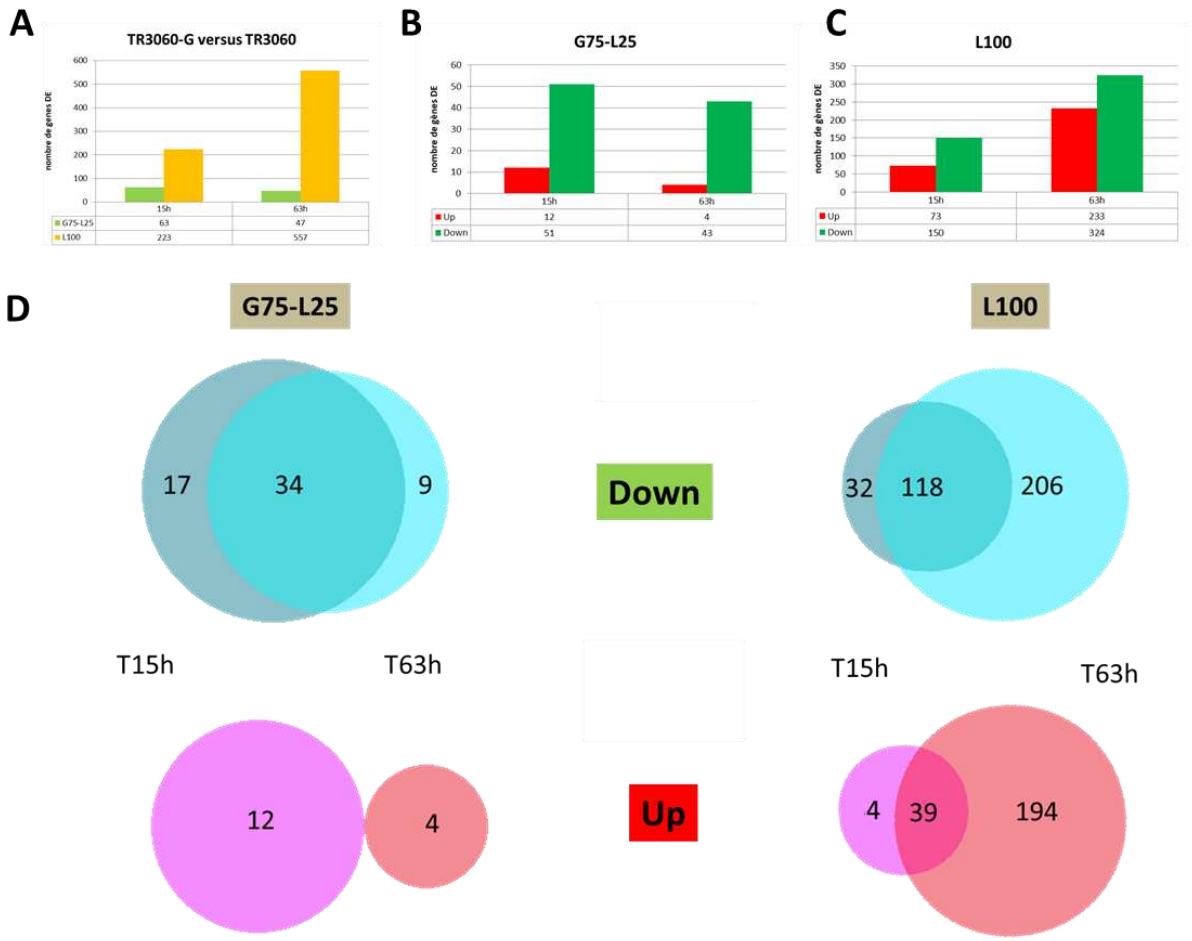


Figure IV.11. A : Gènes montrant un différentiel d'expression (DE) entre les 2 variants, dans les deux conditions d'alimentation.
A : gènes DE « up » et « down » pour tous les essais concernant les 2 variants (TR3060-P à gauche, TR3060-G à droite) ; B : gènes DE « up » et « down » pendant l'alimentation en mélange ; C : gènes DE « up » et « down » pendant l'alimentation en pure lactose ; D : visualisation du nombre de gènes DE « up » et « down » communs entre les temps de prélèvements à l'aide d'un diagramme de Venn. Dans ces graphes, les gènes dits « up » sont plus exprimés dans la souche TR3060-G tandis que les gènes dits « down » sont plus exprimés dans la souche TR3060

IV.4.4.2. Analyse comparative de l'expression des gènes entre les deux substrats

Le nombre total de gènes différentiellement exprimés obtenu pour chaque comparaison est présenté sur la Figure IV.11.A. Dans la condition d'alimentation en mélange glucose-lactose, un faible nombre de gènes est différentiellement exprimés (63 à T 15 h et 47 à T 63 h), avec peu de changement au cours du temps. Par contraste, en alimentation lactose pur, le nombre de gènes différentiellement exprimés est beaucoup plus important (223 à T 15 h et 557 à T 63 h), et il augmente fortement au cours du temps. Ces différences entre les deux alimentations en fed-batch sont en adéquation avec les cinétiques observées lors des

fermentations, plus actives en présence de lactose pur qu'en présence du mélange lactose-glucose.

IV.4.4.3. Analyse comparative de l'expression des gènes entre les deux variants

Dans la Figure IV.11.B qui compare les variants cultivés en présence du mélange glucose 75 % lactose 25 %, un nombre faible de gènes (16) est surexprimé dans la souche TR3060-G et ces gènes sont différents entre les deux temps de prélèvements (Figure IV.11.D). Parmi ces 16 gènes, 11 ont un peptide signal de sécrétion prédit indiquant que les protéines sont probablement extracellulaires ou dans la paroi de la cellule. Il est intéressant de noter la présence de l'orthologue de *Con-13* de *Neurospora crassa* dans cette liste. Ce gène est spécifiquement exprimé lors de la conidiation dans *N. crassa* (Hager and Yanofsky, 1990).

Un nombre plus élevé de gènes est plus exprimé dans la souche TR3060-P (51 à T 15 h et 43 à T 63 h) et la plupart des gènes différentiellement exprimés (34) sont communs entre les deux temps de prélèvement (Figure IV.11.D). Ces 34 gènes comprennent 17 glycoside hydrolases (GH) dont *CBH1*, *CBH2*, *EGL1*, *EGL2* et *BGL1*, 4 transporteurs de sucres et 6 enzymes auxiliaires (*CIP1&2*, *CEL61A1B*, *AXE1* et *SWO1*). Les 17 gènes spécifiques à T 15 h incluent aussi 5 GH, 3 transporteurs de sucres tandis qu'aucune fonction enrichie ne peut être identifiée dans les gènes spécifiques de T 63 h (9 gènes).

Dans la Figure IV.11.C qui compare les variants obtenus en présence de lactose pur, le nombre de gènes surexprimés dans la souche TR3060-G est plus faible que dans la souche TR3060-P, mais il augmente au cours du temps (73 à T 15 h et 233 à T 63 h). Seuls 39 gènes sont communs entre les deux temps de prélèvement (Figure IV.11.D). Ce set de gènes comprend 7 glycoside hydrolases (GH), 4 transporteurs de sucres et 2 facteurs de transcription *MedA/acon-3* et *AZF1*. Dans *N. crassa*, il a été montré que le gène *acon-3* est nécessaire pour le développement des conidiophores (Sun et al., 2019). Il est possible que la surexpression de ce gène dans la souche TR3060-G soit responsable de la conidiation précoce de cette souche dans les conditions étudiées. Il est plus surprenant de retrouver le gène *AZF1* dans ce groupe car, lors d'une étude précédente ayant conduit à un dépôt de brevet (Bidard and Margeot, 2017), il avait été établi que la surexpression d'*AZF1* conduisait à une augmentation de la production de cellulases. Le groupe de gènes spécifiques du temps T 63 h (194 gènes) comprends 11 GH non caractérisées, 6 transporteurs principalement d'acides aminés et 9 facteurs de transcriptions dont les orthologues de *Flbc* et *NsdC* impliqués dans les

développement sexuel et asexuel d'*Aspergillus nidulans* (Kim et al., 2009; Kwon et al., 2010), les orthologues *sgr-30* (Tian et al., 2016) de *N. crassa* et *ClrC* de *Penicillium oxalicum* (Lei et al., 2016) impliqués dans la régulation des gènes de synthèse des cellulases et les orthologues de *res-1* de *N. crassa* (Fan et al., 2015) et *rpnR* d'*Aspergillus niger* (Aerts et al., 2019) liés à la sécrétion des cellulases.

Dans la souche TR3060-P, de nombreux gènes sont plus exprimés que dans le variant TR3060-G et ce nombre augmente au cours du temps (150 à T 15 h et 324 à T 63 h) avec 118 gènes en commun entre les deux temps de prélèvement. Pratiquement l'intégralité du set de gènes identifiés dans le mélange sont aussi différentiellement exprimés en présence de lactose pur. Les principaux facteurs de régulation des gènes de cellulases ou d'hémicellulases identifiés dans la littérature sont présents dans ce groupe : *Clr2* (Beier et al., 2020), *Ace3*, *AmyR* (Tani et al., 2001), *Xyr1*, *PMH25* (Häkkinen et al., 2014), *RXE1* (Wang et al., 2019).

IV.4.4.4. Interprétation des résultats

Les analyses de cette étude transcriptomique permettent de dégager quelques résultats notables. Le nombre de gènes différentiellement exprimés en présence du mélange glucose 75 % lactose 25 % est très faible ce qui signifie que le métabolisme des deux variants étudiés présente peu de variation en présence de ces substrats. Toutefois, la souche TR3060-G ne produit plus les cellulases, enzymes auxiliaires et transporteurs de sucres indispensables à la constitution du cocktail enzymatique permettant de dégrader la cellulose. Pour la suite, il pourrait être intéressant d'utiliser cette souche pour l'étude mécanistique de production de cellulases indépendamment des autres processus tels que l'induction ou la sécrétion.

Dans les gènes plus exprimés dans la souche TR3060-G en mélange lactose/glucose ou en lactose pur, de nombreux gènes liés au développement sexuel et asexuel ont été identifiés. Ceci est cohérent avec le phénotype de conidiation précoce observé lors des fermentations.

Enfin, dans les gènes sous-exprimés dans le variant TR3060-G, la présence des principaux facteurs de transcription liés à la production de cellulases et hémicellulases est notable, ce qui est cohérent avec la faible capacité de production de cellulases de cette souche.

IV.5. Commentaires et discussion des résultats obtenus

Une hétérogénéité de population au sein de la souche de *T. reesei* TR3060 a été détectée et quantifiée lors de cultures conduites en présence de gradients d'oxygène (passage des cellules d'une phase oxygénée pendant 10,5 min à une phase non oxygénée pendant 2,5 min). Elle se traduit à 3 niveaux : sur la morphologie des colonies, sur leur capacité à produire des cellulases et sur l'expression de certains gènes.

En considérant tout d'abord les différences morphologiques, l'accroissement de la proportion d'un variant (TR3060-G), formant des colonies de taille bien supérieure à celles observées avec la souche initiale, est observé après plusieurs heures de culture en conditions cycliques d'hypoxie. Cette observation indique que le champignon adapte sa morphologie lorsqu'il subit un stress hypoxique de longue durée. Elle mériterait cependant d'être confirmée par des analyses en cours de culture, notamment par cytométrie en flux (Delvigne et Goffin, 2014 ; Bouchat et al. 2021). Ce résultat est en accord avec de précédentes observations réalisées avec le genre *Aspergillus*. Selon Wösten et al., 2013, l'hétérogénéité entre les hyphes est une stratégie cellulaire permettant d'augmenter les chances de survie de certaines hyphes lorsque les colonies sont exposées à des conditions de stress. Les champignons filamenteux sont en effet capables de déclencher différents mécanismes afin de conserver de l'énergie pour survivre dans des environnements hypoxiques (Hillmann et al., 2015). McCormick et al., 2012 ont observé qu'*Aspergillus fumigatus* est capable de s'adapter à des conditions d'hypoxie en bloquant la sporulation et en produisant massivement des hyphes aériennes ce qui fait que les colonies acquièrent un aspect « pelucheux ». Dans le cas de *T. reesei*, la réponse au stress semble différer de celle d'*Aspergillus*, en se traduisant par un accroissement du diamètre des colonies.

Le phénotype TR3060-G a été isolé pour la première fois lors d'une expérience simulant des gradients d'oxygène (expérience *Bizone*). Afin de tracer l'apparition de ce phénotype, une étude interne a été réalisée par l'équipe de Biologie Moléculaire d'IFPEN. A partir de cette étude il a été observé que le phénotype G était présent à une proportion de 6 % dans la banque de spores utilisée pour réaliser l'expérience simulant des gradients d'oxygène. Malgré la présence de ce variant depuis le début de la culture, sa proportion n'a pas été affectée lors de cultures oxygénées, alors qu'elle a augmenté significativement lors de l'application de périodes d'hypoxie (section IV.4.1). On peut donc supposer que ce

phénomène est favorisé par l'exposition répétée du moût de culture à des conditions d'hypoxie. Cependant, l'expérience n'ayant pu reproduite, il sera nécessaire de réaliser des expériences supplémentaires afin de vérifier cette hypothèse. De plus, il sera nécessaire d'appliquer le protocole d'analyse présenté dans ce chapitre sur des expériences témoin, réalisées en conditions de culture oxygénées, et utilisant la même banque de spores utilisée pour l'expérience *Bizone*, afin de suivre l'évolution des phénotypes sans la présence du stress liés à la faible oxygénation du milieu.

Une autre étude réalisée par l'équipe de Biologie Moléculaire d'IFPEN a permis de séquencer l'ADN de la souche TR3060-G. Des mutations ont été identifiées, qui pourraient être à l'origine des modifications phénotypiques. Parmi les gènes ayant subi des mutations, quelques-uns informent sur ce phénotype variant :

- *TrA1011W* (ID120412), orthologue de *MutS* (4A en 3A) et positionné sur le chromosome 1. Ce gène intervient dans la réparation de l'ADN (Dahal et al., 2017) ;
- *TrB0812W* (ID110535), *ACE3* ayant subi la délétion d'un nucléotide G et positionné sur le chromosome 2. Il code pour un facteur de transcription activateur de la production de cellulases et d'hémicellulases (Häkkinen et al., 2014) ;
- *TrG0870C* (ID77513), orthologue de *AGE2* de *Saccharomyces cerevisiae* par délétion de 39 nucléotides, et positionné sur le chromosome 7. Il jouerait un rôle dans la sécrétion de molécules (Poon et al., 2001).

La seconde différence entre les colonies porte sur leur capacité à produire des cellulases, à consommer le lactose. Le variant similaire à la souche initiale sur le plan morphologique (TR3060-P) croît et produit des cellulases à un niveau similaire à celui de la souche initiale, alors que le variant de plus grosse taille (TR3060-G) produit beaucoup moins de cellulases et voit sa concentration cellulaire finale affectée, lorsqu'elle est cultivée en présence de lactose seul, alors que les taux de croissance sont similaires entre les souches. En présence du mélange des deux sucres, ce phénomène est également observé, mais il est moins marqué. Cette différence entre les 2 variants peut être expliquée par un début de dégénérescence de la souche initiale faisant apparaitre le variant TR3060-G (« cheater » en anglais, que l'on peut traduire par « tricheur »). Ce terme a été défini par Reusser (1963) comme le fait de perdre la capacité de produire des composés chimiques souhaitables. Il s'agit d'un phénomène déjà observé chez *Trichoderma reesei* (Martzy et al, 2021). L'origine principale des phénomènes de dégénérescence décrits dans la littérature est d'origine

génétique ou épigénétique, en conséquence de différents stress comme les carences en substrats (carbonés ou O_2) ou les autres types de stress (thermiques, acides ou alcalins, …) (Peng and Liang ; 2020, Bouchat et al., 2022).

Concernant le variant TR3060-G, différentes hypothèses pourraient permettre d'expliquer les faibles productions de cellulases observées lorsqu'il est isolé et cultivé en l'absence du variant TR3060-P : Réduction de la capacité des cellules à internaliser le lactose, diminution de la synthèse des enzymes, ou diminution de l'activité des enzymes chez la souche TR3060-G. Les résultats obtenus à ce niveau ne permettent pas de déterminer laquelle (ou lesquelles) de ces hypothèses peu(ven)t être retenues, même s'il est possible qu'elles agissent en synergie. En effet, la faible capacité de ce variant à consommer le lactose peut être directement reliée à sa faible capacité à synthétiser les cellulases. Cette interprétation est en partie appuyée par une étude transcriptomique, qui a permis d'observer une plus faible présence de facteurs de transcription liés à la production de cellulases et d'hémicellulases dans la souche TR3060-G, comparé à la souche TR3060-P. Cette partie de l'étude confirme en outre les résultats obtenus lors des cultures en bioréacteur ainsi que l'hypothèse de sous-population « tricheuse ».

Il est à noter que la capacité de métaboliser le glucose par le variant TR3060-G, ne semble pas être affectée, et que son taux de croissance est équivalent à celui du variant TR3060-P. Il est possible de conclure que la présence dans une culture des deux phénotypes (TR3060-P et TR3060-G) peut avoir un impact sur les performances globales du procédé si la sous-population TR3060-G consomme le glucose à la place de la sous-population TR3060-P et si elle est présente en proportion élevée. L'impact peut être relativement peu important sur la phase de production d'enzymes si seul le substrat lactose est utilisé comme source de carbone, puisque le variant non producteur (cheater) est incapable de bien le métaboliser. Ce dernier pourrait toutefois profiter de l'hydrolyse extracellulaire du lactose réalisée par TR3060-P, entrer en concurrence avec la souche productrice et impacter le rendement en cellulases produites.

IV.6. Conclusions

L'effet des gradients d'oxygène sur l'hétérogénéité des populations en bioréacteur *Bizone* a été investigué dans cette étude. Les différentes étapes d'analyse ont permis, dans un premier temps, d'identifier et d'isoler le variant TR3060-G, qui présente une morphologie

macroscopique différente de celle de la souche industrielle TR3060, elle-même similaire à celle du variant TR3060-P. Cette analyse a également permis d'observer la présence de ce variant depuis le début de l'expérience *Bizone*, soit à 15 h après le début du fed-batch (et donc avant l'application des gradients d'oxygène) mais en petite quantité (2 % des colonies). Cependant, après une exposition à des conditions cycliques d'hypoxie pendant 140 h, le pourcentage de colonies de ce phénotype variant était de 24 %, ce qui indique que les conditions d'hypoxie peuvent potentiellement avoir favorisé l'apparition de ce phénotype.

Dans un deuxième temps, des clones des deux phénotypes identifiés ont été cultivés en micro-cuves et en bioréacteurs, et les résultats obtenus ont permis d'observer une nette diminution de la capacité de sécrétion de cellulases par le variant TR3060-G. Cette diminution est due principalement au fait que ce variant démontre une très faible capacité de consommation du lactose, ce qui provoque un fort ralentissement de son développement et peut accélérer le mécanisme de conidiation (sporulation). Cependant, sa capacité de métaboliser le glucose ne semble pas être affectée. A partir de ces informations, il est possible de conclure que la présence dans une culture des deux phénotypes (TR3060 et son variant TR3060-G) peut avoir un impact significatif sur la production de cellulases en mode fed-batch alimenté avec une solution de lactose.

L'étude transcriptomique a permis d'observer une plus faible présence de facteurs de transcription liés à la production de cellulases et d'hémicellulases dans la souche TR3060-G, comparé à la souche TR3060, ce qui confirme les résultats obtenus lors des cultures en bioréacteur. Une plus forte expression des gènes liée au développement sexuel et asexuel a été observée pour la souche variante, phénomène également observé lors des cultures en bioréacteurs alimentés avec une solution de lactose pur.

Enfin, les résultats obtenus dans cette étude ont permis d'apporter des explications aux différences phénotypiques des deux variants isolés, aux niveaux intra- et extracellulaires. Toutefois, malgré les indices que l'exposition à des conditions de limitation en oxygène puisse favoriser l'apparition du phénotype TR3060-G, il est tôt pour établir un lien entre l'hypoxie et la modification phénotypique. Des expériences supplémentaires sont nécessaires pour vérifier l'hypothèse émise, d'une part pour dupliquer certains essais, et d'autre part pour mettre en œuvre des cultures Témoin appropriées.

V. Modélisation des cinétiques de *Trichoderma reesei* lors de l'application de gradients d'oxygène selon différentes approches scale-down

V.1. Introduction

Modéliser consiste à traduire un phénomène complexe par un ensemble d'équations basées sur différentes hypothèses simplificatrices. Dans le domaine des procédés, un modèle comporte en général un ensemble d'équations algébriques et/ou différentielles issues des bilans matières et modèles cinétiques et les transferts. Dans le domaine des bioprocédés, la modélisation est un outil important pour la compréhension des phénomènes biologiques. A partir d'un modèle établi et validé, il est ainsi possible de réaliser des simulations pour tester différentes configurations et conditions opératoires. Un modèle peut également servir de base pour les études d'optimisation d'un procédé. Enfin, la modélisation peut être un très bon moyen de capitalisation de la connaissance, une modélisation représentative pouvant être considérée comme un bon outil de compréhension d'un phénomène.

Cependant, la modélisation des bioprocédés est complexe en raison des caractéristiques particulières des systèmes vivants (liées à leur métabolisme). En effet, ces procédés biologiques sont des systèmes évolutifs, en fonction de l'avancement des cultures et selon les conditions d'opération utilisées, et présentent une variabilité plus grande que les systèmes non biologiques.

Dans cette partie de l'étude, nous nous sommes intéressés à la modélisation des phénomènes se déroulant lors des cultures de *Trichoderma reesei* en bioréacteur en vue de la production de cellulases, dans le but de représenter les effets des gradients de concentration en oxygène dissous rencontrés en réacteurs industriels, selon une approche scale-down.

Nous allons tout d'abord présenter le modèle cinétique développé par IFPEN (Rousset 2019), qui a servi de base à la modélisation mise en œuvre durant cette thèse. Ce modèle fonctionnel a été développé pour des cultures réalisées dans des conditions classiques où le milieu de culture est visqueux et la pO_2 est maintenue au-dessus de 30 % de la saturation, et dont les bilans de matière sont décrits. Le modèle cinétique IFPEN ayant été développé pour

ces cultures classiques, il n'est pas capable de représenter les cinétiques biologiques lors de cultures subissant des oscillations de la concentration en oxygène dissous dans le milieu. Nous proposons donc, dans ce chapitre, des ajustements à ce modèle cinétique pour mieux représenter le comportement de *T. reesei* lors de l'application de gradients d'oxygène, en termes de croissance, de consommation des substrats et de production de cellulases. Nous présentons ensuite les bilans matières que nous avons établis en nous appuyant sur les expériences scale-down présentées au chapitre III (configurations *Bizone* et *Bizone inversé,* et bioréacteur unique avec *Variation Dynamique de la* pO_2), et qui ont permis d'aboutir aux équations différentielles permettant de compléter le modèle.

La comparaison entre les simulations effectuées avec le modèle et les résultats des expériences réalisées permettra de tirer quelques conclusions quant au comportement attendu du champignon filamenteux dans des fermenteurs industriels dans lesquels peuvent exister des gradients d'oxygène dissous, du fait d'un temps de mélange plus importants lié à la viscosité des milieux et à la taille des fermenteurs.

V.2. Modèle cinétique initialement développé par IFPEN

Une étape clef dans le développement d'un modèle est l'identification des cinétiques apparentes caractéristiques du microorganisme étudié. Dans cette partie de la thèse, les cinétiques de production de biomasse et de protéines, et de consommation de substrat carboné et d'oxygène ont été établies pour *Trichoderma reesei*. Elles s'appuient sur les travaux de Rousset (2019).

Deux hypothèses simplificatrices ont été prises en compte pour les établir : (1) l'hétérogénéité au sein de la population de microorganismes n'est pas prise en compte, celle-ci est alors caractérisée par un « état moyen » et peut être décrite avec un modèle cinétique global ; (2) le micro-organisme répond instantanément à des changements d'environnement.

V.2.1. Cinétique de production de biomasse

La loi de Monod (1942) est le modèle mathématique traditionnellement utilisé pour représenter la cinétique de croissance des micro-organismes en milieux aqueux. Elle établit le taux de croissance μ (h^{-1}) comme une fonction de la concentration en substrat limitant S (g L^{-1}) et s'écrit :

$$\mu = \mu_{max} \cdot \frac{[S]}{K_{s\mu} + [S]} \quad \text{(V.10)}$$

où $K_{s\mu}$ (g L^{-1}) est la constante de saturation du substrat pour la croissance, et μ_{max} le taux de croissance maximum (h^{-1}).

L'équation de Monod est souvent adaptée pour inclure des termes de dépendance à différents substrats ou d'inhibition par certains composants présents dans le milieu, comme l'oxygène, le CO_2 ou des métabolites. *Trichoderma reesei* étant un champignon aérobie, le modèle de Monod doit inclure deux termes de dépendance à la concentration en substrat carboné [S] et à l'oxygène dissous [O_2]. Ainsi, l'équation qui décrit la croissance du champignon s'écrit :

$$\mu = \mu_{max} \cdot \frac{[S]}{K_{s\mu} + [S]} \cdot \frac{[O_2]}{K_{O_2\mu} + [O_2]} \quad \text{(V.11)}$$

où $K_{O_2\mu}$ (g L^{-1}) est la constante de saturation de l'oxygène pour la croissance.

V.2.2. Cinétique de production de cellulases

De façon analogue au taux de croissance, la vitesse spécifique de production de protéines q_p (g_P g_X^{-1} h^{-1}) peut être calculée par l'équation V.12:

$$q_p = q_{pmax} \cdot \frac{[S]}{K_{sp} + [S]} \cdot \frac{[O_2]}{K_{O_2p} + [O_2]} \quad \text{(V.12)}$$

Où q_{pmax} (g_P g_X^{-1} h^{-1}) correspond à la vitesse spécifique de production maximale théorique. K_{sp} et K_{O_2p} (g L^{-1}) sont, respectivement, les constantes de saturation du substrat carboné et de l'oxygène pour la production des cellulases.

Comme mentionné précédemment, lors des cultures suivant le protocole IFPEN (Jourdier, 2012), la production de cellulases est induite en présence de très faibles concentrations de lactose, ce qui caractérise un effet inhibiteur par le substrat inducteur. De plus, la production de cellules est également diminuée lorsque la concentration en biomasse atteint des valeurs élevées (> 30 g/L). Ainsi, des termes d'inhibition doivent être ajoutés au modèle caractérisant la cinétique de production de protéines pour donner origine à l'équation V.13.

$$q_p = \left((q_{pmax} - q_{pmin}) \cdot \frac{K_{iXP}}{K_{iXP} + [X]} + q_{pmin}\right) \cdot \frac{[S]}{K_{SP} + [S]} \cdot \frac{[O_2]}{K_{O_2P} + [O_2]} \cdot \frac{K_{iSP}}{K_{iSP} + [S]} \quad \text{(V.13)}$$

Où q_{pmin} (g_P g_X^{-1} h^{-1}) est la vitesse spécifique de production minimum théorique. Les constantes K_{iXP} et K_{iSP} (g L^{-1}) représentent, respectivement, les constantes d'inhibition de la production de cellulases par la biomasse et par le substrat inducteur. Les constantes K_{SP} et K_{O_2P} (g L^{-1}) sont les constantes de saturation de la production de cellulases, liées au sucre et à l'oxygène, respectivement. La variable *X* (g L^{-1}) représente la concentration en biomasse.

V.2.3. Cinétique de consommation du substrat carboné

La cinétique de consommation du substrat carboné par *T. reesei* est définie par le modèle de Pirt généralisé (Muthuvelayudham et Viruthagiri 2007), qui sépare la consommation de sucre en 3 voies : croissance $\left(\frac{\mu}{Y_{X/S}}\right)$, production de protéines $\left(\frac{q_P}{Y_{P/S}}\right)$ et maintenance des cellules m_S (en g_S g_X^{-1} h^{-1}), selon l'équation V.14.

$$q_S = \frac{\mu}{Y_{X/S}} + \frac{q_P}{Y_{P/S}} + m_S \qquad \text{(V.14)}$$

Où $Y_{X/S}$ (g_X g_S^{-1}) et $Y_{P/S}$ (g_P g_S^{-1}) sont, respectivement, les rendements instantanés de production de biomasse et de production de protéines rapportés au substrat consommé.

V.2.4. Cinétique de consommation d'oxygène

La vitesse spécifique de consommation d'oxygène q_{O_2} (g_X g_{O2}^{-1} h^{-1}) est définie, de façon analogue à celle caractérisant la consommation du substrat carboné, par l'équation V.15.

$$q_{O_2} = \frac{\mu}{Y_{X/O_2}} + \frac{q_P}{Y_{P/O_2}} + \left(Y^m_{O_2/S} \cdot m_S\right) \qquad \text{(V.15)}$$

Où Y_{X/O_2}(g_X g_{O2}^{-1}) et Y_{P/O_2} (g_P g_{O2}^{-1}) sont, respectivement les rendements instantanés de production de biomasse et de production de protéines rapportés à l'oxygène consommé. $Y^m_{O_2/S}$ (g_{O2} g_S^{-1}) correspond au rendement théorique de consommation d'oxygène rapporté au substrat consommé pour la maintenance. Cette valeur varie selon le sucre présent dans le milieu.

V.2.5. Valeurs des constantes biologiques de *T. reesei* prises en compte dans les modèles

Les paramètres caractéristiques de la souche *T. reesei* TR3060 dans les conditions de pH et de température des expériences, utilisés pour les calculs des cinétiques, sont présentés

dans le Tableau V.1. Ils proviennent de travaux internes IFPEN (Rousset, 2019).

Tableau V.1. Valeurs des paramètres des modèles pour *T. reesei* TR3060 (Rousset, 2019)

	Valeur	Unité
μ_{max}	0,08	h^{-1}
$K_{s\mu}$	1,0	$g_S\ L^{-1}$
q_{pmax}	0,025	$g_P\ g_X^{-1}\ h^{-1}$
q_{pmin}	0,01	$g_P\ g_X^{-1}\ h^{-1}$
K_{iXP}	30,0	$g_X.L^{-1}$
K_{iSP}	1,0	$g_S.L^{-1}$
K_{SP}	0,001	$g_S.L^{-1}$
$K_{O_2\mu}$	0,0005	$g_{O2}.L^{-1}$
K_{O_2P}	0,0005	$g_{O2}.L^{-1}$
$Y_{x/s}$	0,5	$g_X.g_S^{-1}$
$Y_{p/s}$	0,5	$g_P.g_S^{-1}$
m_S	0,01	$g_S.g_X^{-1}.h^{-1}$
Y_{x/O_2}	1,04	$g_X.g_{O2}^{-1}$
Y_{p/O_2}	1,22	$g_P.g_{O2}^{-1}$
$Y^m_{O_2/lac}$	1,12	$g_{O2}.g_S^{-1}$

V.3. Bilans matière pour les cultures classiques

V.3.1. Ecriture des bilans matière

Pour développer les bilans de matière dans un bioprocédé, l'équation générale pour composant i s'écrit :

$$\frac{dm_i}{dt} = r_i \cdot V_L + (C_{in}.Q_{in} - C_{out}.Q_{out}) \tag{V.16}$$

Où $\frac{dm_i}{dt}$ (en g h^{-1}) représente la variation de masse de i dans le temps, r_i est la vitesse de variation de la concentration de i (en g L^{-1} h^{-1}) liée soit à une réaction, soit à un transfert, V_L (en L) est le volume de liquide, Q_{in} (en L h^{-1}) est le débit d'entrée et Q_{out} (en L h^{-1}) est le débit de sortie, C_{in} la concentration de i en entrée et C_{out} la concentration de i en sortie.

Dans les fermentations en mode fed-batch, le débit de sortie pour chacun des composés caractéristiques de la culture est nul, ce qui entraîne une variation du volume de la culture. De plus, suivant le protocole IFPEN (Rousset, 2019), le bioréacteur est alimenté uniquement avec une solution de substrat inducteur (lactose) et par une solution de base pour maintenir le pH. Ainsi, les concentrations en biomasse et en protéines à l'entrée sont nulles. L'oxygène contenu dans l'air injecté dans le réacteur est transféré de la phase gazeuse à la

phase liquide (milieu) et est partiellement utilisé par champignon.

Les équations générales traduisant la variation de la concentration de chaque composant $[i]$ lors d'un procédé fed-batch sont présentées ci-dessous.

$$\frac{dm_i}{dt} = \frac{d([i] \cdot V_L)}{dt} = [i] \cdot \frac{dV_L}{dt} + V_L \cdot \frac{d[i]}{dt} \quad \text{(V.17)}$$

$$\frac{d[i]}{dt} = \frac{1}{V_L} \cdot \frac{dm_i}{dt} - \frac{[i]}{V_L} \cdot \frac{dV_L}{dt} \quad \text{(V.18)}$$

Appliquées aux composants d'une culture de *T. reesei* (biomasse, protéines, substrat carboné inducteur, oxygène dissous), ces équations générales deviennent :

$$\frac{d[X]}{dt} = \mu \cdot [X] - \frac{[X]}{V_L} \cdot \Delta Q_v \quad \text{(V.19)}$$

$$\frac{d[P]}{dt} = q_p \cdot [P] - \frac{[P]}{V_L} \cdot \Delta Q_v \quad \text{(V.20)}$$

$$\frac{d[S]}{dt} = -q_s \cdot [S] + \frac{Q_{fb} \cdot [S_{fb}] - [S] \cdot \Delta Q_v}{V_L} \quad \text{(V.21)}$$

$$\frac{d[O_2]}{dt} = kLa \cdot ([O_2]_{sat} - [O_2]) - q_{O_2} \cdot [X] - \left(\frac{[O_2]}{V_L}\right) \cdot \Delta Q_v \quad \text{(V.22)}$$

$$\Delta Q_v = \frac{dV_L}{dt} = Q_{base} + Q_{fb} - Q_{evp} \quad \text{(V.23)}$$

Où $[O_2]_{sat}$ (g L^{-1}) est la concentration saturante en oxygène dans l'eau. $[S_{fb}]$ (g L^{-1}) correspond à la concentration de la solution de lactose injectée dans le bioréacteur pendant la phase de production et Q_{fb} (L h^{-1}) son débit d'injection. ΔQ_v (L h^{-1}) correspond à la variation du volume de liquide à l'intérieur du réacteur par unité de temps. Q_{base} (L h^{-1}) est le débit d'ammoniac introduit dans le bioréacteur et Q_{evp} (L h^{-1}) est le débit d'évaporation par la sortie d'air. Les deux premiers débits (Q_{fb} et Q_{base}) sont connus à partir des données expérimentales (mesures en ligne), alors que le dernier (Q_{evp}) est calculé en effectuant un bilan massique de la vapeur d'eau, comme démontré dans l'équation V.24 :

$$Q_{gaz,in} \cdot H_{a,in} + Q_{evp} = Q_{gaz,out} \cdot H_{a,out} \quad \text{(V.24)}$$

Où $Q_{gaz,in}$ *et* $Q_{gaz,out}$ (L h^{-1}) correspondent, respectivement, au débit d'entrée et de sortie de gaz (air, diazote ou un mélange des deux). $Q_{gaz,in}$ est connu et $Q_{gaz,out}$ est supposé être égal à $Q_{gaz,in}$. $H_{a,in}$ et $H_{a,out}$ sont, respectivement, l'humidité absolue de l'air (ou du diazote ou du mélange des deux) à l'entrée et à la sortie du bioréacteur. Pour simplifier les calculs, il a été supposé que les gaz à l'entrée étaient secs, ce qui signifie que leur humidité était nulle. L'humidité du gaz de sortie est alors calculée par l'équation V.25 :

$$H_{a,out} = \frac{Pi}{P - Pi} \tag{V.25}$$

Où Pi (atm) correspond à la pression partielle de l'eau et P (atm) est la pression totale à l'intérieur du bioréacteur.

Il a été également supposé que l'air était saturé d'humidité à la sortie du bioréacteur, ce qui signifie que son humidité relative est de 100 % et que donc Pi est égal à la pression de vapeur de l'eau P_v (atm). Par conséquent, Pi est remplacé par P_v dans l'équation V.25. Pour des raisons de simplification, il a été assumé aussi que l'azote avait les mêmes propriétés hygroscopiques que l'air. Dans les conditions d'opération (27°C et 1 atm), la pression de vapeur P_v vaut 26,74 mm Hg.

Enfin, dans le cas où plusieurs fermenteurs sont connectés entre eux, des termes caractérisant les entrées et les sorties de chacun d'eux sont ajoutés aux bilans des différentes espèces.

V.3.2. Confrontation des simulations obtenues aux résultats expérimentaux

La Figure V.1 montre les résultats expérimentaux obtenus lors d'une culture classique de *T. reesei*, confrontés aux résultats simulés en utilisant le modèle initial IFPEN, dont les équations et les valeurs des constantes biologiques sont présentées dans les sections V.2 et V.3. Cette figure montre que, malgré sa simplicité, le modèle représente bien les cinétiques de croissance et de production de cellulases pour les cultures classiques de *T. reesei*.

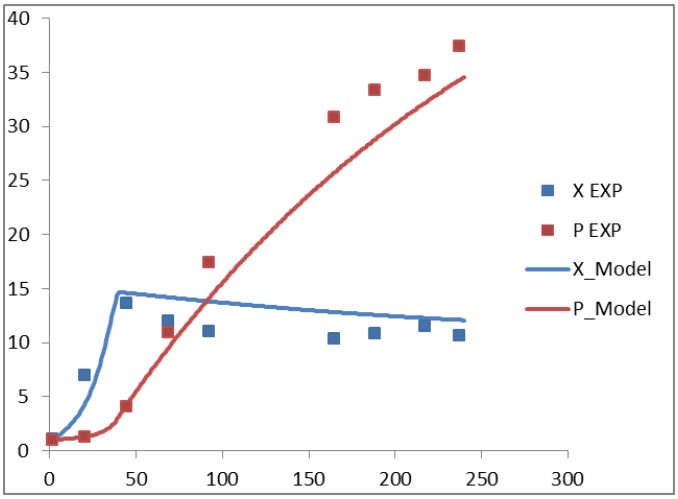


Figure V.1. Cinétique de croissance et de production de protéines pour une culture de *T. reesei*. La phase batch débute avec 30 g/L de glucose ; le fed-batch débute 35 heures après l'inoculation avec un débit d'alimentation de 2 $mL.h^{-1}$ d'une solution de lactose à 220 $g.L^{-1}$. Les carrés bleus et les cercles rouges correspondent, respectivement, aux valeurs expérimentales de concentration en biomasse X et en protéines P. Les lignes continues bleue et rouge correspondent aux concentrations de X et de P simulées en utilisant le modèle initial IFPEN.

Le modèle cinétique IFPEN, présente cependant certaines faiblesses, comme une certaine incertitude quant à la sensibilité à la pO_2, et une prédiction perfectible de la transition entre croissance et production, notamment en termes d'évolution des concentrations en biomasse et en protéines.

V.4. Modélisation des cinétiques de *Trichoderma reesei* lors de l'application de gradients d'oxygène en phase de production

Dans cette partie du manuscrit, les données expérimentales des différentes approches employées pour simuler des gradients d'oxygène présentées au chapitre III, ont été utilisées pour ajuster le modèle cinétique IFPEN à ces problématiques d'hétérogénéité. L'objectif de ces simulations est de mieux comprendre l'impact (ou l'absence d'impact) des gradients d'oxygène sur la croissance de *Trichoderma reesei*, la consommation du substrat carboné et de l'oxygène et la production de cellulases, selon les approches expérimentales employées pour simuler ces gradients d'oxygène (bioréacteur unique avec *Variation Dynamique de la* pO_2 ou bioréacteurs *Bizone* ou *Bizone Inversé*). Il est important de souligner que, pour cette partie de l'étude, seule la phase de production a été modélisée.

V.4.1. Réajustement des cinétiques apparentes

Les équations caractéristiques des cinétiques apparentes de croissance, de production de protéines et de consommation du substrat carboné et de l'oxygène sont bien définies par le modèle cinétique IFPEN (eq. V.11, V.13, V.14 et V.15). Cependant, il est nécessaire de réécrire le terme de maintenance (m_S en $g_S\ g_X^{-1}\ h^{-1}$) en y ajoutant un terme de dépendance à l'oxygène et au substrat, une fois que le champignon est exposé à des conditions pauvres en oxygène lors des expériences. Cette nouvelle équation permet d'établir que, lorsque l'oxygène disponible diminue, la quantité de substrat qui est consommée pour faire de la maintenance diminue également.

$$m_S = m_{S\ max} \frac{[S]}{K_{Sm} + [S]} + \frac{[O_2]}{[O_2] + K_{O_2 m}} \qquad \text{(V.26)}$$

Où $m_{S\ max}$ (en $g_S\ g_X^{-1}\ h^{-1}$) correspond la valeur maximale du taux de maintenance m_S. K_{Sm} est la constante de saturation du substrat carboné ($g\ L^{-1}$) pour la maintenance et $K_{O_2 m}$ la constante de saturation d'oxygène pour la maintenance ($g\ L^{-1}$).

Les valeurs de ces paramètres ont été déterminées, en considérant la phase de production des cellulases :

- $m_{S\ max}$ a été considéré égal à m_S du modèle initial IFPEN (Rousset 2019), donc $m_{S\ max} = 0{,}01\ \mathrm{g}_S \cdot \mathrm{g}_X{}^{-1} \cdot \mathrm{h}^{-1}$
- K_{Sm} a été considéré égal à K_{SP} du modèle initial IFPEN (Rousset 2019), donc $K_{Sm} = 0{,}001\ \mathrm{g}_S \cdot \mathrm{L}^{-1}$
- $K_{O_2 m} = 0{,}0005\ \mathrm{g}_{O_2} \cdot \mathrm{L}^{-1}$, valeur permettant d'atteindre le q_{pmax} caractéristique de la souche lors des simulations utilisant les conditions des cultures classiques (fed-batch en bioréacteur unique à pO_2 = 40 %)

V.4.2. Bilans de matière selon les différentes approches scale-down utilisées

En phase de production, les bilans de matière sur la phase liquide pour la biomasse, les protéines et le substrat sont bien décrits par les équations V.19, V.20 et V.21 présentées dans la section V.3, et ce, quelle que soit l'approche scale-down utilisée pour représenter les gradients d'oxygène (*Bizone, Bizone Inversé* ou *Variation Dynamique de la pO_2*). Le calcul des débits d'évaporation et des variations de volume de liquide dans les bioréacteurs, les bilans

matière sur l'oxygène en phase liquide et en phase gazeuse et le K_La doivent en revanche être établis de façon spécifique pour les configurations étudiées.

V.4.2.1. Rappel des configurations reproduisant les hétérogénéités de pO_2

Pour tous les bilans décrits dans cette section, le bioréacteur aérobie est toujours noté $r1$ et le bioréacteur anaérobie est noté $r2$. Il est important de rappeler que deux types de bioréacteurs ont été utilisés pour les expériences simulant des gradients d'oxygène : un bioréacteur F2P (capacité utile 3 L) et un bioréacteur Biolafitte (capacité utile 1 L), décrits dans le chapitre III. Dans l'approche *Bizone*, le réacteur F2P représente la zone aérobie ($r1$) alors que le réacteur Biolafitte correspond à la zone anaérobie ($r2$). Dans le cas de l'approche *Bizone Inversé*, les rôles de bioréacteurs sont inversés, c'est-à-dire que le réacteur F2P représente la zone anaérobie ($r2$) et le réacteur Biolafitte correspond à la zone aérobie ($r1$). Dans l'approche *Variation Dynamique de la pO_2*, le système est composé uniquement d'un bioréacteur de type F2P.

V.4.2.2. Calcul des débits d'évaporation dans les différentes configurations

Pour le système de *Variation Dynamique de la pO_2*, le débit d'évaporation d'eau peut être calculé directement par l'équation V.24, puisqu'il est composé d'un seul bioréacteur.

Pour les systèmes *Bizone* et *Bizone Inversé*, le calcul du débit d'évaporation à partir de l'équation V.24 s'appuie sur des paramètres $Q_{gaz,in}$ et $Q_{gaz,out}$ spécifiques de chaque bioréacteur, comme illustré à la Figure V.2.

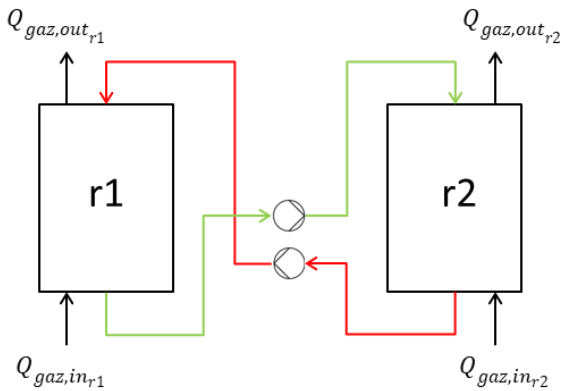


Figure V.2. Représentation schématique des débits d'entrée et de sortie de gaz pour les expériences de type Bizone et Bizone Inversé.
Zone aérobie (r1) et zone anaérobie (r2)

Ces paramètres sont obtenus à partir des équations suivantes :

$$Q_{gaz,in} = Q_{gaz,in_{r1}} + Q_{gaz,in_{r2}} \quad (V.27)$$

$$Q_{gaz,out} = Q_{gaz,out_{r1}} + Q_{gaz,out_{r2}} \quad (V.28)$$

Où $Q_{gaz,in_{r1}}$ et $Q_{gaz,in_{r2}}$ (L min^{-1}) sont les débits d'entrée de gaz dans les réacteurs $r1$ et $r2$, et $Q_{gaz,out_{r1}}$ et $Q_{gaz,out_{r2}}$ (L min^{-1}) sont les débits de sortie de gaz dans les réacteurs $r1$ et $r2$.

Les valeurs des débits d'air et de gaz sont présentées dans le Tableau V.2.

Tableau V.2. Valeurs des débits d'injection de gaz dans les bioréacteurs

Configuration des bioréacteurs	Débit total d'entrée de gaz par réacteur (L min^{-1})	Proportion de débit d'air et de diazote par réacteur (L min^{-1})
Variation Dynamique de la pO₂	$Q_{gaz,in} = 0{,}25$	$Q_{\mathrm{air}\ in}$ et $Q_{\mathrm{N_2}\ in}$ variables
Bizone	$Q_{gaz,in_{r1}} = 0{,}25$	$Q_{\mathrm{air}\ in_r1} = 0{,}15$ $Q_{N_2\ in_r1} = 0{,}10$
	$Q_{gaz,in_{r2}} = 0{,}25$	$Q_{N_2\ in_r2} = 0{,}25$
Bizone inversé	$Q_{gaz,in_{r1}} = 0{,}25$	$Q_{\mathrm{air}\ in_r1} = 0{,}13$ $Q_{N_2\ in_r1} = 0{,}12$
	$Q_{gaz,in_{r2}} = 0{,}25$	$Q_{N_2\ in_r2} = 0{,}25$

Les valeurs des débits d'évaporation sont exprimées dans le Tableau V.3.

Tableau V.3. Valeurs des débits d'évaporation Q_{evp} calculés

Configuration des bioréacteurs	Paramètre	Débit d'évaporation (L min^{-1})
Variation Dynamique de la pO₂	Q_{evp}	$1{,}68 \cdot 10^{-6}$
Bizone	$Q_{evp\ r1}$ $Q_{evp\ r2}$	$3{,}54 \cdot 10^{-6}$ $5{,}76 \cdot 10^{-6}$
Bizone Inversé	$Q_{evp\ r1}$ $Q_{evp\ r2}$	$3{,}06 \cdot 10^{-6}$ $5{,}76 \cdot 10^{-6}$

V.4.2.3. Calcul des variations de volume de liquide dans les systèmes Bizone et Bizone Inversé

Dans les systèmes à deux compartiments, l'évaporation génère une variation de volume différente selon la configuration retenue.

Pour le système *Bizone*, le volume de liquide dans le réacteur *r2* est maintenu constant, donc on considère que la quantité d'eau évaporée des deux bioréacteurs est soustraite du volume total du réacteur *r1*.

$$\frac{dV_{L\,r1}}{dt} = Q_{fb} + Q_{base} - Q_{evap} \tag{V.29}$$

Où Q_{evap} est calculé par :

$$Q_{evap} = Q_{evap_r1} + Q_{evap_r2} \tag{V.30}$$

$$\frac{dV_{L\,r2}}{dt} = 0 \tag{V.31}$$

Pour le système *Bizone Inversé*, le volume de liquide dans le réacteur *r1* est maintenu constant, donc on considère que la quantité d'eau évaporée des deux bioréacteurs est soustraite du volume total du réacteur *r2*.

$$\frac{dV_{L\,r2}}{dt} = Q_{fb} + Q_{base} - Q_{evap} \tag{V.32}$$

$$Q_{evap} = Q_{evap_r1} + Q_{evap_r2} \tag{V.33}$$

$$\frac{dV_{L\,r1}}{dt} = 0 \tag{V.34}$$

V.4.2.4. Bilan matière sur l'oxygène en phase liquide incluant les petites bulles de gaz

Pendant les cultures de *Trichoderma reesei,* une expansion du milieu de fermentation est observée, liée à la présence de toutes petites bulles de gaz dans le moût. Dans les milieux visqueux aérés, la formation de ces microbulles stagnantes, qui provoquent une rétention gazeuse résiduelle est mentionnée dans la littérature (Gabelle 2012; Fyferling 2007). Selon Fyferling (2007), la capacité d'absorption gazeuse d'un liquide dit homogène peut être faussée à cause de la tendance du gaz à s'accumuler dans la phase gazeuse constituée par les microbulles. En effet, ces petites bulles ont des temps de séjour très importants (de l'ordre de l'heure) et peuvent donc être considérées comme une phase homogène en équilibre avec le liquide (Gabelle 2012; Fyferling 2007; Heijnen, Van't Riet et Wolthuis 1980). De plus, *T. reesei*,

comme des nombreux autres champignons filamenteux, produit des hydrophobines extracellulaires, qui sont des protéines amphipolaires capables de stabiliser ces bulles microscopiques de gaz dans les milieux liquides (Bailey et al. 2002; Zhang et al. 2019).

L'observation des lignes reliant les deux fermenteurs du protocole en bizone ayant mis en évidence la présence massive de ces microbulles, il a paru indispensable d'intégrer leur présence dans le milieu de culture, ainsi que le transport d'oxygène associé.

Un bilan de matière a été effectué dans le but d'identifier la variation de la concentration en oxygène dissous dans le milieu, en considérant que, dans les moûts des cultures de *T. reesei,* trois phases coexistent :

- La phase liquide contenant la biomasse (fraction volumique αL)
- La phase gazeuse composée des grandes bulles de gaz qui transfèrent l'oxygène vers la phase liquide (fraction αb)
- La phase gazeuse constituée des petites bulles qui sont à l'équilibre avec la phase liquide (fraction αp).

Le hold-up global αG peut être considéré comme la somme des fractions αb et αp. Cependant, dans le milieu de culture de *Trichoderma reesei,* les microbulles constituent une fraction majoritaire de la phase gazeuse et sont donc les principales responsables de l'augmentation du hold-up (Cappello et al. 2020). Pour simplifier les calculs, la fraction de grandes bulles (αb) a été considérée suffisamment minoritaire dans le hold-up gaz total pour être négligée, et en conséquence, le hold-up global est simplifié comme étant égal au hold-up lié aux petites bulles :

$$\alpha\mathrm{G} = \alpha\mathrm{p} \qquad \text{(V.35)}$$

La fraction volumique caractéristique de la phase liquide αL peut être estimée de l'équation V.36 :

$$\alpha\mathrm{L} = 1 - \alpha\mathrm{p} \qquad \text{(V.36)}$$

Le volume de la phase liquide (V_L) et le volume des petites bulles (V_p) sont alors calculés, respectivement par les équations V.37 et V.38 :

$$V_L = V_T \cdot \alpha\mathrm{L} \qquad \text{(V.37)}$$

$$V_p = V_T \cdot \alpha p \tag{V.38}$$

Dans un bioréacteur de volume total $V_T = V_L + V_p$, le bilan matière sur l'oxygène est déterminé donc sur le volume $[(\alpha L + \alpha p) \cdot V_T]$.

On considère également que les petites bulles sont instantanément à l'équilibre avec le milieu liquide, c'est-à-dire que l'oxygène contenu dans les petites bulles est transféré directement vers le liquide. Ainsi, la variation de la concentration en oxygène dissous dans un bioréacteur de volume V_T s'écrit :

$$\frac{d([O_{2\,L}] \cdot V_L)}{dt} + \frac{d([O_{2\,p}] \cdot V_p)}{dt} = OTR \cdot V_L - q_{O_2} \cdot [X] \cdot V_L \tag{V.39}$$

Où :

$$OTR = k_L a \cdot \left([O_{2\,sat}] - [O_{2L}]\right) \tag{V.40}$$

Où $[O_{2\,L}]$ correspond à la concentration en oxygène dissous dans le liquide, $[O_{2\,p}]$ est la concentration en oxygène en phase gaz dans les petites bulles. V_L est le volume de liquide et V_p le volume des petites bulles d'air dans la phase liquide. Le coefficient volumétrique de transfert d'oxygène $k_L a$ est calculé à partir des équations présentées dans la section V.4.2.6 et la valeur de la concentration saturante en oxygène dissous $[O_{2\,sat}]$ est calculée à partir des équations présentées dans la section V.4.2.5.

A partir des équations V.39 et V.40, on obtient l'équation V.41 :

$$\frac{d([O_{2\,L}] \cdot V_L)}{dt} + \frac{d([O_{2\,p}] \cdot V_p)}{dt} = k_L a \cdot \left([O_{2\,sat}] - [O_{2\,L}]\right) \cdot V_L - q_{O_2} \cdot [X] \cdot V_L \tag{V.41}$$

Si on substitue l'équation V.38 dans l'équation V.41, on obtient :

$$\left(\frac{d[O_{2\,L}]}{dt} \cdot V_L + \frac{[O_{2\,L}]}{dt} \cdot dV_L\right) + \left(\frac{d[O_{2\,p}]}{dt} \cdot V_T \cdot \alpha p + \frac{[O_{2\,p}]}{dt} \cdot dV_T \cdot \alpha p\right) = k_L a \cdot \left([O_{2\,sat}] - [O_{2\,L}]\right) \cdot V_L - q_{O_2} \cdot [X] \cdot V_L \tag{V.42}$$

A partir de l'équation V.37, en substituant αL par l'équation V.36, on obtient :

$$V_T = V_L/(1-\alpha p) \tag{V.43}$$

La substitution de l'équation V.43 dans l'équation V.42, permet d'arriver à l'équation V.44 :

$$\left(\frac{d[O_{2\,L}]}{dt}\cdot V_L + \frac{[O_{2\,L}]}{dt}\cdot dV_L\right) + \left(\frac{d[O_{2\,p}]}{dt}\cdot V_L\cdot\frac{\alpha p}{(1-\alpha p)} + \frac{[O_{2\,p}]}{dt}\cdot dV_L\cdot\frac{\alpha p}{(1-\alpha p)}\right) = k_L a\cdot\left([O_{2\,sat}]-[O_{2\,L}]\right)\cdot V_L - q_{O_2}\cdot[X]\cdot V_L \tag{V.44}$$

Si on isole les termes de variation de la concentration en oxygène dissous, on obtient :

$$d[O_{2\,L}] + d[O_{2\,p}]\cdot\frac{\alpha p}{(1-\alpha p)} = k_L a\cdot\left([O_{2\,sat}]-[O_{2\,L}]\right)\cdot dt - q_{O_2}\cdot[X]\cdot dt - \frac{dV_L}{V_L}\left([O_{2\,L}] + [O_{2\,G}]\cdot\frac{\alpha p}{(1-\alpha p)}\right) \tag{V.45}$$

La concentration en oxygène en phase gaz dans les petites bulles peut être obtenue à partir de la loi d'action de masses appliquée à l'équilibre chimique entre les phases gazeuse et liquide (loi d'Henry), comme indiqué dans l'équation V.46. Dans cette équation, A est estimé à 38,6 (adimensionnel) dans les conditions de culture, caractérisées par une teneur en oxygène de 21 % en phase gaz à l'équilibre, correspondant à une concentration en oxygène de 7 mgL^{-1} à la saturation.

$$[O_{2\,p}] = A\cdot[O_{2\,L}] \tag{V.46}$$

On peut alors remplacer $[O_{2\,p}]$ par l'équation V.46 dans l'équation V.45 :

$$d[O_{2\,L}]\left(1 + A\cdot\frac{\alpha p}{(1-\alpha p)}\right) = k_L a\cdot\left([O_{2\,sat}]-[O_{2\,L}]\right)\cdot dt - q_{O_2}\cdot[X]\cdot dt - \frac{dV_L}{V_L}\cdot[O_{2\,L}]\cdot\left(1 + A\cdot\frac{\alpha p}{(1-\alpha p)}\right) \tag{V.47}$$

Cela permet d'exprimer la variation de la concentration en oxygène dissous dans le milieu liquide en fonction du temps grâce à l'équation V.48) :

$$\frac{d[O_{2\,L}]}{dt} = \left(k_L a\cdot\left([O_{2\,sat}]-[O_{2\,L}]\right) - q_{O_2}\cdot[X]\right)\cdot\left(\frac{(1-\alpha p)}{(1+(A-1)\cdot\alpha p)}\right) - \frac{dV_L}{dt}\cdot\frac{[O_{2\,L}]}{V_L} \tag{V.48}$$

Où V_L et $\frac{dV_L}{dt}$ sont calculés par les équations V.49 et V.50.

$$V_{L\,t+dt} = V_{L\,t} + dV_L \tag{V.49}$$

$$\frac{dV_L}{dt} = Q_{fb} + Q_{base} - Q_{evap} \tag{V.50}$$

Les calculs du coefficient volumétrique de transfert d'oxygène $k_L a$ et de la fraction de gaz relative aux petites bulles αp sont présentés dans la section V.4.2.6. On remarque que le terme $\frac{(1-\alpha p)}{(1+(A-1)\cdot\alpha p)}$ vient pondérer les variations de concentration en oxygène dissous, et joue le rôle d'un tampon entre la variation des concentrations $[O_{2\ sat}]$ et $[O_{2\ L}]$.

<u>*Cas particulier des systèmes Bizone et Bizone Inversé*</u>

Pour les systèmes *Bizone* et *Bizone Inversé*, composés chacun de deux bioréacteurs, il est nécessaire d'établir un bilan de matière pour chaque bioréacteur afin de tenir compte des lignes de recirculation.

Les termes exprimant le débit massique de recirculation d'un composant i s'écrivent : $Q_{r\ 1-2}.[i]_{r1}$ et $Q_{r\ 2-1}.[i]_{r2}$; où $Q_{r\ 1-2}$ est le débit de recirculation de moût du réacteur 1 vers le réacteur 2 et $[i]_{r1}$ est la concentration du composant i dans le réacteur 1. $Q_{r\ 2-1}$ est le débit recirculation de moût du réacteur 2 vers le réacteur 1 et $[i]_{r2}$ est la concentration du composant i dans le réacteur 2.

Dans le bioréacteur aérobie (*r1*), la pO_2 est contrôlée par un système PID et maintenue à 40 %, donc la valeur de la concentration en oxygène dissous dans le réacteur *r1* $[O_{2\ L_r1}]$ ne varie pas. Cependant, le bioréacteur dit anaérobie (*r2*) reçoit constamment du moût contenant des petites bulles riches en oxygène et de l'oxygène dissous provenant du réacteur *r1*. Simultanément, lors que le milieu liquide est pompé du réacteur *r2* vers le *r1*, il y a également une sortie de petites bulles et potentiellement d'oxygène dissous résiduel $[O_{2\ L_r2}]$. Ces entrées et sorties d'oxygène sont prises en compte dans l'équation V.51 pour le calcul de la variation de la concentration en oxygène dissous dans le bioréacteur anaérobie $[O_{2\ L_r2}]$:

$$\frac{d[O_{2\ L_r2}]}{dt} = \left(k_L a_{\ r2}.\left([O_{2\ sat_r2}] - [O_{2\ L_r2}]\right) - q_{O_2}.[X] + \frac{A}{V_{L,R2}}\cdot\left(Q_{rg1-2}.[O_{2\ L_r1}] - Q_{rg2-1}.[O_{2\ L_r2}]\right) + \frac{1}{V_{L,R2}}\cdot\left(Q_{r2-1}.[O_{2\ L_r1}] - Q_{r1-2}.[O_{2\ L_r2}]\right)\right).\frac{(1-\alpha p_{r2})}{(1+(A-1).\alpha p_{r2})} - \frac{dV_{L,R2}}{dt}\cdot\frac{[O_{2\ L_r2}]}{V_{L,R2}} \tag{V.51}$$

Où $V_{L,R2}$ est le volume de liquide dans le bioréacteur *r2* et αp_{r2} est le hold-up lié aux petites bulles dans ce réacteur.

Les équations permettant de calculer les valeurs de la concentration en oxygène

dissous dans le liquide $[O_{2\,L}]$, de la fraction de gaz relative aux petites bulles αp et du coefficient volumétrique de transfert d'oxygène $k_L a$ pour chaque réacteur (r1 et r2) sont présentées dans les sections V.4.2.5 et V.4.2.6, respectivement.

Les débits massiques de gaz circulant entre les deux bioréacteurs, $Q_{rg\,1-2}$ et $Q_{rg\,2-1}$ correspondant, respectivement au débit de gaz pompé du réacteur *r1* vers le *r2* et du réacteur *r2* vers le *r1* sont donnés par les équations V.52 et V.53 :

$$Q_{rg\,1-2} = Q_{r\,1-2} \cdot \alpha b_{r1} \qquad \text{(V.52)}$$

$$Q_{rg\,2-1} = Q_{r\,2-1} \cdot \alpha b_{r2} \qquad \text{(V.53)}$$

Le Tableau V.4 présente les valeurs des débits massiques entre les deux réacteurs, $Q_{r\,1-2}$,$Q_{r\,2-1}$, $Q_{rg\,1-2}$ et $Q_{rg\,2-1}$. Les valeurs de $Q_{r\,1-2}$ et $Q_{r\,2-1}$ ont été mesurées expérimentalement et les valeurs de $Q_{rg\,1-2}$ et $Q_{rg\,2-1}$ ont été calculées à partir des équations V.52 et V.53.

Tableau V.4. Valeurs mesurées de $Q_{r\,1-2}$ et $Q_{r\,2-1}$ et résultats calculés de $Q_{rg\,1-2}$ et $Q_{rg\,2-1}$

Configuration des bioréacteurs	Paramètre	Débits massiques (L min^{-1})
Bizone	$Q_{r\,1-2}$	1,99 10^{-1}
	$Q_{r\,2-1}$	1,99 10^{-1}
	$Q_{rg\,1-2}$	3,5 10^{-2}
	$Q_{rg\,2-1}$	7,38 10^{-2}
Bizone Inversé	$Q_{r\,1-2}$	1,99 10^{-1}
	$Q_{r\,2-1}$	1,99 10^{-1}
	$Q_{rg\,1-2}$	7,38 10^{-2}
	$Q_{rg\,2-1}$	3,51 10^{-2}

V.4.2.5. *Bilan matière sur l'oxygène sur la phase gazeuse*

V.4.2.5.1. Configuration basée sur une Variation Dynamique la pO_2

Lors des expériences réalisées sur la base d'une *Variation Dynamique de la pO_2*, les débits d'air et d'azote changeaient toutes les minutes afin d'atteindre les consignes définies : alternance de pO_2 = 40 % pendant environ 12,5 min puis de pO_2 = 0 % pendant environ 2 min.

Les fractions instantanées d'oxygène entrant dans le bioréacteur ont été calculées à l'aide de l'équation V.54 en fonction des débits d'entrée d'air et de diazote pour un cycle

d'alternance. Il a été considéré que ce cycle se répète jusqu'à la fin de l'expérience. L'air a été considéré comme un gaz parfait composé de 21 % molaire d'oxygène et de 79 % molaire de diazote, ce qui permet de calculer la fraction molaire d'oxygène f_{O_2} par l'équation V.54 :

$$f_{O2} = \frac{Q_{air_{in}} \cdot 21\ \%}{(Q_{air_{in}} + Q_{N_{2\ in}})} \tag{V.54}$$

Les fractions molaires calculées ont été utilisées pour calculer les concentrations saturantes en oxygène dissous instantanées $[O_{2\ sat}]$ à partir de l'équation V.55.

$$[O_{2\ sat}] = K_H \cdot P_{O_2} \cdot MM_{O_2} \tag{V.55}$$

Où K_H est la constante d'Henry pour l'oxygène (mol L^{-1} atm^{-1}), MM_{O_2} est la masse molaire de l'oxygène (g mol^{-1}) et P_{O_2} est la pression partielle d'oxygène dans le milieu qui peut être calculée à partir de la pression totale P_t et de la fraction molaire de l'oxygène f_{O_2}.

$$P_{O_2} = P_t \cdot f_{O_2} \tag{V.56}$$

Le profil de variation de la concentration saturante en oxygène dissous $[O_{2\ sat}]$ par cycle, tel que relevé expérimentalement, peut être observé dans la Figure V.3.

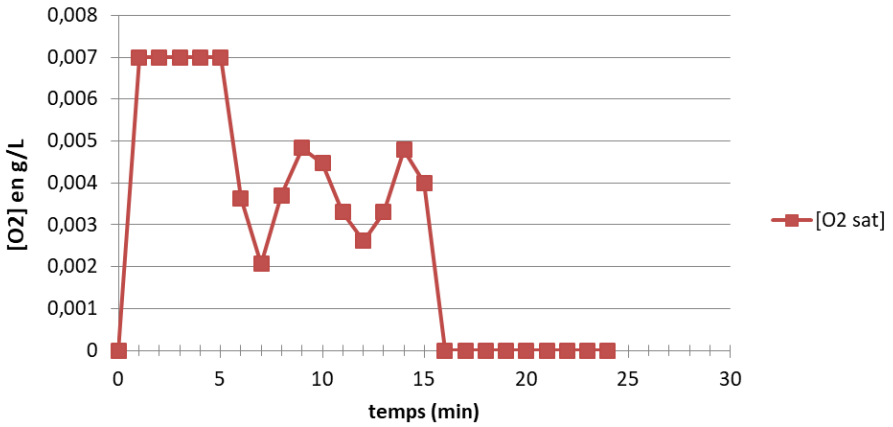


Figure V.3. Variation de la concentration saturante en oxygène dissous $[O_{2\ sat}]$ pendant 1 cycle de 24 min

V.4.2.5.2. Configurations Bizone et Bizone Inversé

Pour les systèmes *Bizone* et *Bizone Inversé*, il a été nécessaire d'inclure dans les bilans la fraction de gaz qui recircule entre les deux bioréacteurs.

Les débits d'injection de gaz dans les bioréacteurs, $Q_{gaz,in_{r1}}$ et $Q_{gaz,in_{r2}}$ donnés dans le Tableau V.2 ont été utilisés pour calculer les débits d'entrée de l'oxygène dans les deux bioréacteurs $Q_{O_2\ in_r1}$ et $Q_{O_2\ in_r2}$, en supposant, comme pour le système de *Variation Dynamique de la pO₂*, que l'air est un gaz parfait composé de 21 % molaire d'oxygène et de 79 % molaire de diazote. Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau V.5.

Tableau V.5. Paramètres corrélés aux conditions d'opération pour les approches *Bizone* et *Bizone Inversé*. Valeurs calculées à partir des débits $Q_{\text{air}\ in_r1}$ et $Q_{\text{air}\ in_r2}$ du Tableau V.2.

Approche	Paramètre	Débits de gaz (g s^{-1})
Bizone	$Q_{O_2\ in_r1}$	6,87 10^{-4}
	$Q_{N_2\ in_r1}$	2,26 10^{-3}
	$Q_{O_2\ in_r2}$	0
	$Q_{N_2\ in_r1}$	4,77 10^{-3}
Bizone Inversé	$Q_{O_2\ in_r1}$	5,95 10^{-4}
	$Q_{N_2\ in_r1}$	1,96 10^{-3}
	$Q_{O_2\ in_r2}$	0
	$Q_{N_2\ in_r1}$	4,77 10^{-3}

Les variations de concentration en oxygène en phase gaz en fonction du temps dans chaque bioréacteur $\frac{d[O_{2\ G_r1}]}{dt}$ et $\frac{d[O_{2\ G_r2}]}{dt}$ sont décrites par les équations V.57 et V.58:

$$\frac{d[O_{2\ G_r1}]}{dt} = \frac{\left(Q_{O_2 in_r1} - Q_{O_2 out\ r1} - k_L a_{r1} \cdot \left([O_{sat_r1}] - [O_{2\ L_r1}]\right) \cdot V_{L\ r1}\right)}{V_{gaz\ r1}} \quad \text{(V.57)}$$

$$\frac{d[O_{2\ G_r2}]}{dt} = \frac{\left(Q_{O_2 in\ r2} - Q_{O_2 out\ r2} - k_L a_{r2} \cdot \left([O_{sat_r2}] - [O_{2\ L_r2}]\right) \cdot V_{L\ r2}\right)}{V_{gaz\ r2}} \quad \text{(V.58)}$$

Les valeurs des concentrations saturantes dans chaque bioréacteur $[O_{sat_r1}]$ et $[O_{sat_r2}]$ sont obtenues à partir des équations V.59 et V.60 :

$$[O_{sat_r1}] = K_H \cdot P_t \cdot f_{O_2 r1} \cdot MM_{O2} \quad \text{(V.59)}$$

$$[O_{sat_r2}] = K_H \cdot P_t \cdot f_{O_2 r2} \cdot MM_{O2} \quad \text{(V.60)}$$

Avec :

$$f_{O_2} = \frac{[O_{2\,G}]}{MM_{O2}} \cdot \frac{R \cdot T}{P_t} \tag{V.61}$$

Où R correspond à la constante des gaz parfaits, T est la température de fonctionnement (K), f_{O_2} est la fraction molaire de l'oxygène et $[O_{2\,G}]$ correspond à la concentration en oxygène en phase gazeuse dans le bioréacteur.

Les calculs des variables $k_L a_{r1}$, $k_L a_{r2}$, αp_{r1} et αp_{r2} sont décrits dans la section V.4.2.6.

Les débits de sortie de l'oxygène de chaque bioréacteur ($Q_{O_{2_{out}}r1}$ et $Q_{O_{2_{out}}r2}$) sont calculés par les équations :

$$Q_{O_{2_{out}}r1} = \frac{Q_{N_2\,out\,r1}}{MM_{N2}} \cdot \frac{(1 - f_{O_2})}{f_{O_2}} \cdot MM_{O2} \tag{V.62}$$

$$Q_{O_{2_{out}}r2} = \frac{Q_{N_2\,out\,r2}}{MM_{N2}} \cdot \frac{(1 - f_{O_2})}{f_{O_2}} \cdot MM_{O2} \tag{V.63}$$

Où les débits de sortie de diazote $Q_{N_2\,out_r1}$ et $Q_{N_2\,out_r2}$ peuvent être calculés par les équations V.64 et V.65 :

$$Q_{N_2\,out_r1} = Q_{N_2\,in_r1} + \left(Qr_{2-1} \cdot (1 - f_{O_2\,r2}) - Qr_{\,1-2} \cdot (1 - f_{O_2\,r1})\right) \cdot MM_{N2} \tag{V.64}$$

$$Q_{N_2\,out_r2} = Q_{N_2\,in_r2} + \left(Qr_{1-2} \cdot (1 - f_{O_2\,r1}) - Qr_{\,2-1} \cdot (1 - f_{O_2\,r2})\right) \cdot MM_{N2} \tag{V.65}$$

Le volume de gaz dans chaque réacteur peut être calculé par :

$$V_{gaz\,r1} = V_{L\,r1} \cdot \left(\frac{\alpha b_{r1}}{1 - \alpha b_{r1}}\right) \tag{V.66}$$

$$V_{gaz\,r2} = V_{L\,r2} \cdot \left(\frac{\alpha b_{r2}}{1 - \alpha b_{r2}}\right) \tag{V.67}$$

$$V_{L\,r1_{t+dt}} = V_{L\,r1_t} + dV_{L\,r1} \quad \text{(V.68)}$$

$$V_{L\,r2_{t+dt}} = V_{L\,r2_t} + dV_{L\,r2} \quad \text{(V.69)}$$

Où $V_{L\,r1}$ et $V_{L\,r2}$ sont les volumes de liquide dans les réacteurs *r1* et *r2* (déterminés au paragraphe (V.4.2.2). αb_{r1} et αb_{r2} sont les fractions de grosses bulles de gaz dans les réacteurs *r1* et *r2*, respectivement (valeurs présentées dans la section V.4.2.6).

V.4.2.6. Calcul du coefficient volumétrique de transfert d'oxygène kLa et du hold-up

Le hold-up est un paramètre important à prendre en compte dans les bioprocédés à cause de son influence sur le transfert d'oxygène et sur la productivité (Hofmeester 1988).

Les valeurs du coefficient volumétrique de transfert d'oxygène (k_La) et du hold-up correspondant aux grosses bulles (αb) ont été identifiées en prenant en compte les caractéristiques du moût de fermentation en phase de production mais aussi les caractéristiques de chaque bioréacteur utilisé pour les expériences simulant les gradients d'oxygène, dont le protocole expérimental est présenté dans le chapitre III.

La viscosité apparente μ_{app} (Pa.s) a été calculée par la corrélation d'Ostwald-de Waele :

$$\mu_{app} = K \cdot \dot{\gamma}^{n-1} \quad \text{(V.70)}$$

Où K est l'indice de consistance (Pa.s^n), n l'indice d'écoulement, et $\dot{\gamma}$ le taux de cisaillement moyen (s^{-1}). Ces paramètres définissent la rhéologie du milieu et peuvent varier au cours de la fermentation. Comme pour cette partie de l'étude, seule la phase de production a été modélisée, ces deux paramètres ont été considérés comme constants et ont été identifiés en considérant les caractéristiques du moût en phase de production. Ainsi, selon (Rousset, 2019), n est égal à 0,2 et K est calculé en fonction de la concentration en biomasse $[X]$ (g L^{-1}) selon l'équation V.71 (Données internes IFPEN) :

$$K = 0{,}003 \cdot [X]^2 \quad \text{(V.71)}$$

Le taux de cisaillement ($\dot{\gamma}$) a été calculé par la corrélation de (Metzner et Otto 1957) valable pour les bioréacteurs d'un volume inférieur à 5 m^3, comme présenté dans l'équation V.72. Bien que cette corrélation ait été établie en régime laminaire, elle est également

largement utilisée en régime turbulent (Gabelle et al. 2012).

$$\dot{\gamma} = 11{,}5 \cdot \mathrm{N} \tag{V.72}$$

Où N est la vitesse d'agitation du mobile d'agitation (s^{-1}).

La puissance totale transmise au mélange en conditions aérées P_g (W) a été calculée à partir de l'équation V.73 :

$$\mathrm{P}_g = \mathrm{RPD} \cdot \mathrm{P}_u + \mathrm{P}_a \tag{V.73}$$

Où P_u est la puissance requise sans d'aération (W) et P_a est la puissance liée à l'injection de gaz dans le bioréacteur par le bas du bioréacteur (W). *RPD* (*Relative Power Demand*, sans dimension) correspond au coefficient de réduction de la puissance dissipée en conditions aérées et en conditions non aérées (Gabelle et al. 2011). Ces deux puissances ont été calculés par les équations V.74 et V.75, respectivement :

$$\mathrm{P}_a = \rho_L \cdot \mathrm{g} \cdot \mathrm{V}_{\mathrm{sg}} \tag{V.74}$$

$$\mathrm{P}_u = \rho_L \cdot \mathrm{N}_p \cdot \mathrm{N}^3 \cdot \mathrm{D}^5 \tag{V.75}$$

Dans ces équations, V_{sg} correspond à la vitesse superficielle du gaz (m s^{-1}), ρ_L est la densité du liquide, ici considéré similaire à celle de l'eau (donc ρ_L = 1000 Kg m^{-3}), g représente l'accélération de gravité (g = 9,81 m s^{-2}). N_p est le nombre de puissance du mobile d'agitation (ici N_p= 2), N est la vitesse d'agitation (s^{-1}) et D est le diamètre du mobile d'agitation (m).

Le coefficient de puissance relative *RPD*, a été calculé avec la corrélation proposée par Gabelle et al. 2011, dont la précision est de 10 % en moyenne.

$$RPD = \left(\frac{P_g}{P_u}\right) = \max\left[\left(\frac{P_g}{P_u}\right)_{lim} . \exp\left(-15{,}36 \cdot \mathrm{N_p}^{0{,}16} \cdot \mathrm{Q_G}^{0{,}62} \cdot \mathrm{T}^{-1{,}7} \cdot \left(\frac{D}{T}\right)^{0{,}51}\right)\right] \tag{V.76}$$

Où T est le diamètre du bioréacteur (m) et Q_G est le débit de gaz injecté (m^3 s^{-1}).

Le rapport $\left(\frac{P_g}{P_u}\right)_{lim}$ est la valeur limite et constante de *RPD* à un fort débit de gaz (Paul et al., 2004) et dépend de la géométrie du mobile d'agitation (Cappello et al. 2020). Pour une configuration avec une seule turbine Rushton, Gabelle 2012 a mesuré une valeur de *RPD* de 0,33. Pour des motifs de simplification, il a été considéré que, pour les mobiles d'agitation du

type Rayneri utilisés dans cette étude, la valeur de $\left(\frac{P_g}{P_u}\right)_{lim}$ est la même que celle calculée par (Gabelle 2012) pour les turbines Rushton.

Enfin, le k_La (h^{-1}) et le hold-up (%) liés aux grosses bulles (α_G) ont été obtenus en utilisant la corrélation V.77 proposée par Cappello et al. 2020.

$$Z(\equiv \alpha_G, k_La) = c_1 \cdot \left(\frac{P_g}{V}\right)^{c_2} \cdot Vsg^{c_3} \cdot \mu_{app}{}^{c_4} \qquad (V.77)$$

Où $\left(\frac{P_g}{V}\right)$ correspond à la puissance volumétrique en conditions aérées (en W m^{-3}), V_{sg} à la vitesse superficielle du gaz (m s^{-1}) et μ_{app} à la viscosité apparente (Pa.s).

Les valeurs des constantes c1, c2, c3 et c4 permettant de calculer le k_La et hold-up lié aux grosses bulles αb ont été identifié par Cappello et al. 2020 pour une gamme de différents milieux modèles.

Les valeurs des constantes retenues pour le présent travail sont celles dont les caractéristiques du milieu modèle s'approchent le plus de celles du moût de fermentation de *T. reesei* en termes de caractéristiques rhéologiques, soit un milieu contenant du xanthane à une concentration de 0,50 % (Tableau V.6).

Tableau V.6. Valeurs des constantes retenues pour l'équation V.77 (Cappello et al. 2020)

	Milieux modèles	**c1**	**c2**	**c3**	**c4**	**CV (%)**
Hold-up (%)	B, B_{XG}	7,50 10^{-2}	0,17	0,35	-0,16	5,8
k_La (h^{-1})	W+ EtOH, XG + EtOH	5,86 10^{-4}	0,45	0,18	-0,48	17,7

W = eau, XG = gomme xanthane 0,50 %, B = moût filtré, B_{XG} = moût filtré avec gomme xanthane 0,50 %, EtOH = éthanol à une concentration de 0,05 % v/v.

Les valeurs des paramètres liés aux caractéristiques des bioréacteurs utilisés dans cette étude sont rappelées dans le Tableau V.7.

Tableau V.7. Paramètres liés à la configuration des bioréacteurs

Réacteur	**N (rpm)**	**Np**	**D (m)**	**T (m)**	**H (m)**
F2P	1000	2	0,08	0,16	0,22
Biolafitte	1000	2	0,055	0,11	0,26

Grâce à l'ensemble de ces données, il est alors possible de calculer les valeurs de k_La et du hold-up pour les deux types de bioréacteurs utilisés dans cette étude : F2P (capacité de 3 L) et Biolafitte (capacité de 1 L) (Tableau V.8).

Tableau V.8. Valeurs calculées de k_La et hold-up pour les deux types de bioréacteurs

Réacteur	k_La (h^{-1})	Hold-up (%)
F2P	382	2,9
Biolafitte	500	4,5

Cas particulier des configurations Bizone et Bizone Inversé

Dans le cas particulier des configurations de réacteurs *Bizone* et *Bizone Inversé*, la différence entre le hold-up des grosses bulles (αb) calculé pour le petit bioréacteur (Biolafitte) par rapport au grand bioréacteur (F2P) était de 35 %. Lors des expériences en laboratoire, le hold-up des petites bulles (αp) a été mesuré ponctuellement pour les 2 bioréacteurs, suivant la méthode présentée dans le chapitre III. Les valeurs de αp observées étaient de 27 % et 15 %, pour le petit et le grand bioréacteur, respectivement. La différence entre les hold-up mesurés est de 44 %, écart proche du rapport obtenu pour le hold-up des grosses bulles, estimé de la corrélation V.77. De plus, les valeurs de αb pour les grosses bulles dans les deux bioréacteurs (2,9 % et 4,5 %) étant très inférieures à celles mesurées expérimentalement pour αp, cela justifie le fait d'avoir négligé αb dans l'équation V.395.

Les valeurs calculées des k_La et αb et les valeurs mesurées de αp pour chaque approche de simulation des gradients d'oxygène sont résumées dans le Tableau V.9.

Tableau V.9. Valeurs calculées de K_La et αb et valeurs mesurées de αp pour chaque approche de simulation des gradients d'oxygène

Configurations de bioréacteurs	K_La (h^{-1})	αp (%)	αb (%)
Variation Dynamique de la pO_2	382	15	2,9
Bizone	k_La_{r1} = 382 k_La_{r2} = 500	$\alpha p_{r1} = 15$ $\alpha p_{r2} = 27$	$\alpha b_{r1} = 2{,}9$ $\alpha b_{r2} = 4{,}5$
Bizone Inversé	k_La_{r1} = 500 k_La_{r2} = 382	$\alpha p_{r1} = 27$ $\alpha p_{r2} = 15$	$\alpha b_{r1} = 4{,}5$ $\alpha b_{r2} = 2{,}9$

Il convient de souligner ici que le modèle cinétique développé en conditions quasi-stationnaires est utilisé à l'identique en conditions de *Variation dynamique de la pO_2* ou en réacteurs *Bizone* ou *Bizone Inversé*. Les mêmes hypothèses sous-jacentes ont alors été émises, alors qu'elles sont discutables. En effet, l'environnement « vu » par les microorganismes dans les configurations à deux réacteurs n'est pas stationnaire mais subit des variations temporelles de concentration en oxygène dissous de l'ordre de plusieurs minutes. En conséquence,

l'hypothèse d'une réponse instantanée des microorganismes est discutable. De même, le fait de connecter deux fermenteurs introduit des distributions de temps de séjour différentes dans chacun des bioréacteurs, et une hétérogénéité au sein de la population de microorganismes qui subissent des histoires et des environnements de substrats différents. Si besoin, ces points pourraient justifier des complexifications du modèle et l'introduction de bilans de populations ou de mécanismes de type « temps de réponse ». Mais le modèle développé reste cependant intéressant pour représenter qualitativement ou quantitativement les résultats obtenus expérimentalement.

V.5. Résultats et discussion

Les modèles développés ont été appliqués pour simuler les trois configurations de bioréacteurs représentant les variations de concentration en oxygène dissous pouvant être rencontrées dans les bioréacteurs de grande échelle : bioréacteurs *Bizone*, bioréacteurs *Bizone Inversé* et bioréacteur avec *Variation Dynamique de la* pO_2.

V.5.1. Simulations de l'approche bioréacteurs *Bizone*

Les modèles ont été appliqués pour simuler les cinétiques dans l'approche Bizone, caractérisée par le couplage d'un bioréacteur anaérobie de petit volume utile (0,5 L) et d'un bioréacteur aérobie de plus grand volume utile (2,5 L).

V.5.1.1. Simulation sans prise en compte du hold-up lié aux petites bulles

Le résultat de la simulation réalisée sans prendre en compte le hold-up lié aux petites bulles (αp) pour l'approche *Bizone* est exprimé dans la Figure V.4.

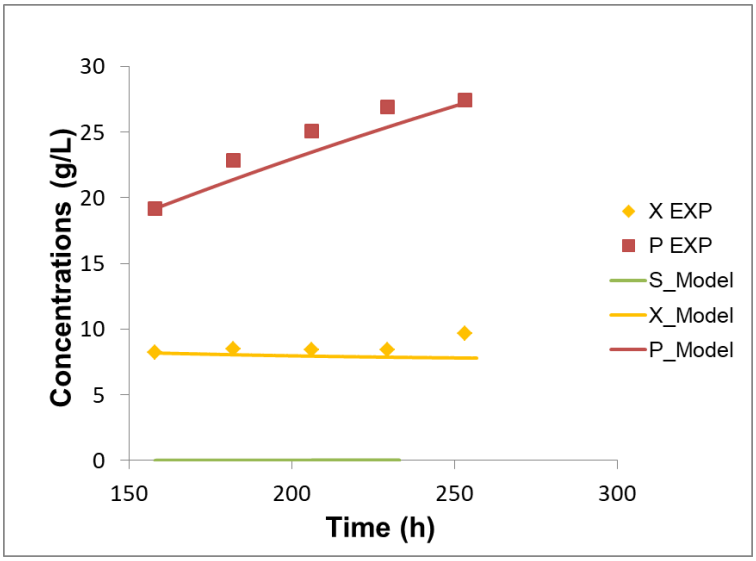


Figure V.4. Simulation de la croissance et de la production de protéines par *T. reesei* selon l'approche Bizone pour une culture dont q_{pmax}=0,025 gP.gX^{-1}.h^{-1} et KO_2p= 0,0005 gO_2.L^{-1}, avec $\alpha p_{r1} = 0$ et $\alpha p_{r2} = 0$.
Les points représentent les mesures expérimentales et les traits pleins le modèle (X : concentration en biomasse ; P : concentration en protéines ; S : concentration en lactose).

Les résultats de la Figure V.4 montrent que le modèle prédit correctement la croissance de *T. reesei*, sauf à la fin de la culture, mais que la production de cellulases est sous-estimée.

V.5.1.2. Simulation avec prise en compte du hold-up lié aux petites bulles dans les deux bioréacteurs

Le résultat obtenu lors de la simulation incluant le hold-up lié aux petites bulles dans chaque bioréacteur, αp_{r1}et αp_{r2} observés expérimentalement à des valeurs de 15 % et 27 %, respectivement (Tableau V.9), est présenté dans la Figure V.5

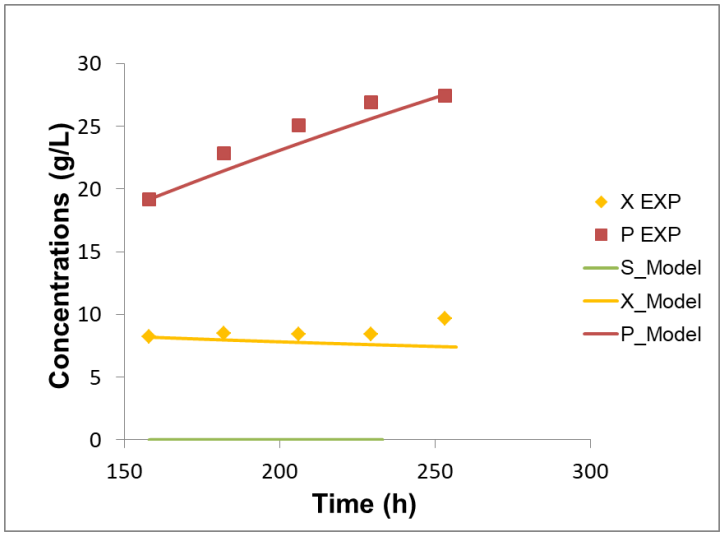


Figure V.5. Simulation de la croissance et de la production de protéines par *T. reesei* selon l'approche Bizone pour une culture dont q_{pmax}=0,025 gP.gX^{-1}.h^{-1} et KO_2p= 0,0005 gO_2.L^{-1}, avec $\alpha p_{r1} = 15\ \%$ et $\alpha p_{r2} = 27\ \%$.
Les points représentent les mesures expérimentales et les traits pleins le modèle (X : concentration en biomasse ; P : concentration en protéines ; S : concentration en lactose).

Les résultats obtenus par cette approche sont similaires à ceux obtenus sans considérer le hold-up. Dans cette configuration, la simulation reste imparfaite, avec notamment une sous-estimation de la production de cellulases.

V.5.1.3. Comparaison des résultats

La Figure V.6 compare les résultats relatifs aux taux de production q_p et aux taux de croissance µ obtenus lors de l'expérience témoin, lors de l'expérience en configuration *Bizone* et à l'issue des simulations avec le modèle en considérant, ou non, le hold-up lié aux petites bulles.

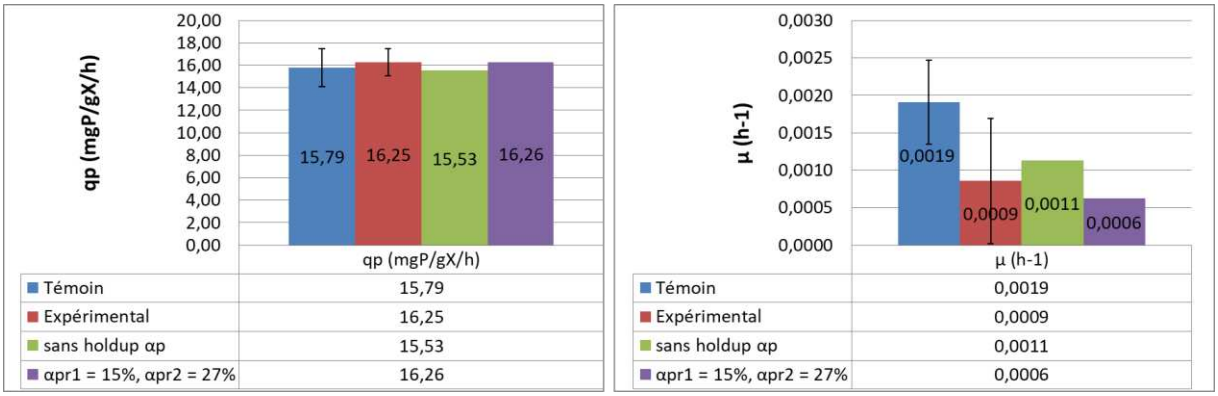


Figure V.6. Comparaison des résultats obtenus en configuration Bizone.
Les barres bleues correspondent aux valeurs expérimentales de q_p et µ pour l'expérience témoin. Les barres rouges correspondent aux valeurs expérimentales de q_p et µ pour l'expérience Bizone. Les barres vertes correspondent aux valeurs de q_p et de µ lors de la simulation sans hold-up lié aux petites bulles. Les barres violettes correspondent aux valeurs de q_p et de µ lors de la prise en compte du hold-up lié aux petites bulles avec $\alpha p_{r1} = 15\ \%$ en zone aérobie et $\alpha p_{r2} = 27\ \%$ en zone anaérobie.

Indépendamment de l'inclusion ou pas du hold-up lié aux petites bulles dans le modèle, les résultats relatifs au taux de production q_p et au taux de croissance µ sont pratiquement les mêmes et sont très proches de ceux obtenus expérimentalement et de la culture témoin. Ces résultats indiquent que, dans la configuration *Bizone*, caractérisée par un petit volume de bioréacteur anaérobie (0,5 L) par rapport au bioréacteur aérobie (2,5 L), le temps de séjour dans le réacteur anaérobie, de l'ordre de 2 mn, n'est pas suffisamment long pour affecter la production globale du système. Ce résultat confirme que ce type de configuration ne peut être retenu pour simuler efficacement les hétérogénéités liées aux concentrations en oxygène dissous.

V.5.2. Simulations de l'approche bioréacteurs *Bizone Inversé*

Les modèles ont été appliqués pour simuler les cinétiques dans l'approche *Bizone Inversé,* caractérisée par le couplage d'un bioréacteur anaérobie de grand volume utile (2,5 L) et d'un bioréacteur aérobie de petit volume utile (0,5 L).

V.5.2.1. Simulation sans prise en compte du hold-up lié aux petites bulles

La simulation prenant en compte uniquement les hold-up liés aux grosses bulles αb_{r1} et αb_{r2}, mesurés expérimentalement à 4,5 % et 2,9 % (Tableau V.8) pour les zones aérobie et anaérobie, respectivement, est présentée dans la Figure V.7.

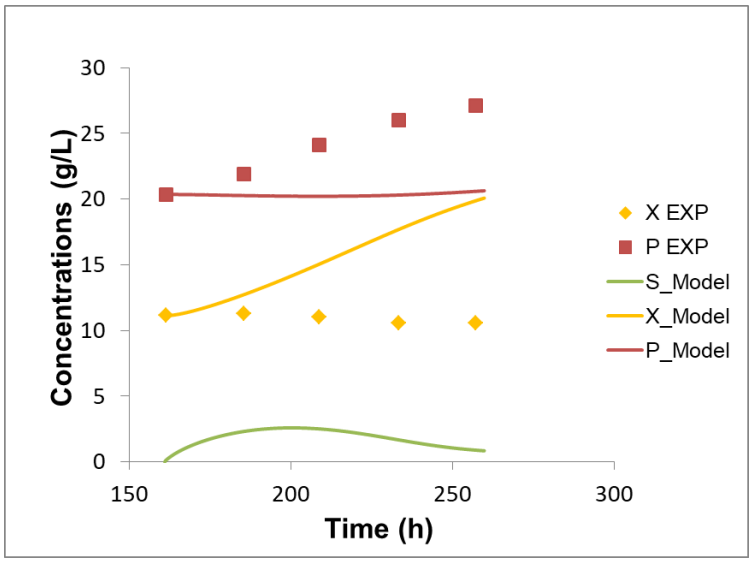


Figure V.7. Simulation de la croissance et de la production de protéines par *T. reesei* selon l'approche Bizone Inversé pour une culture dont q_{pmax}=0,025 gP.gX^{-1}.h^{-1} et KO_2p= 0,0005 gO_2.L^{-1}, avec $\alpha p_{r1} = 0$ et $\alpha p_{r2} = 0$.
Les points représentent les mesures expérimentales et les traits pleins le modèle (X : concentration en biomasse ; P : concentration en protéines ; S : concentration en lactose).

La Figure V.7 montre que le modèle sous-estime fortement la production de cellulases et surestime la croissance. Selon le modèle, comme le volume de la zone anaérobie est 5 fois plus important que celui de la zone aérobie, le champignon n'est plus en capacité de produire des cellulases du fait du manque d'oxygène, ce qui s'accompagne une accumulation transitoire du substrat carboné dans le milieu. Lorsque la concentration en substrat résiduel augmente, une reprise de croissance est alors induite dans la zone aérobie. Cependant, ces résultats sont très éloignés de ceux obtenus expérimentalement. Cela signifie donc qu'expérimentalement, il y a une activité cellulaire significative dans le bioréacteur anaérobie. Ce résultat confirme l'hypothèse d'un transport de gaz (et donc d'oxygène) du bioréacteur aérobie vers le bioréacteur anaérobie (et vice et versa) plus important que ceux considérés par le modèle retenu pour cette la simulation. Ce transport de gaz, qui s'explique par l'existence des petites bulles d'oxygène, doit donc être pris en compte pour bien représenter la situation expérimentale.

V.5.2.2. Simulation avec prise en compte du hold-up lié aux petites bulles dans le petit bioréacteur aérobie

La Figure V.8 montre le résultat de la simulation réalisée en considérant le hold-up lié aux petites bulles dans la zones aérobie (αp_{r1}). Trois valeurs ont été testées pour αp_{r1} : 20 %, 25 % et 30 %. Les cinétiques de croissance et de production pour les expériences en système *Bizone Inversé* sont présentées à la Figure V.8.

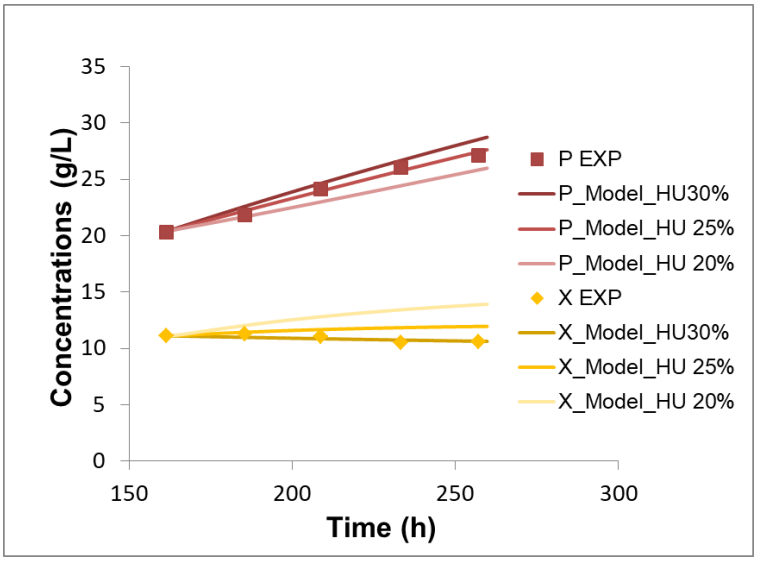


Figure V.8. Simulations de la croissance et de la production de protéines par *T. reesei* selon l'approche Bizone Inversé pour une culture dont q_{pmax}=0,025 gP.gX^{-1}.h^{-1} et KO_2p= 0,0005 gO_2.L^{-1} pour tester l'effet de différents αp_{r1} (20 %, 25 % et 30 %).
Les points représentent les mesures expérimentales et les traits pleins le modèle (X : concentration en biomasse ; P : concentration en protéines ; S : concentration en lactose).

D'après la Figure V.8, le modèle permet de bien représenter les cinétiques de croissance et de production de cellulases pour les expériences en système *Bizone Inversé*. La simulation relative aux concentrations en substrats, non visibles sur la Figure V.8, confirme que, d'un point de vue de modélisation, la prise en compte du hold-up lié aux petites bulles est nécessaire pour expliquer les données obtenues expérimentalement pour l'approche *Bizone inversé*. Lorsque la valeur du hold-up est fixée à 30 %, la simulation de la croissance est très proche des données expérimentales, alors que lorsque l'on considère la production de protéines, c'est un hold-up de 25 % qui représente le mieux cette variable. Ces deux valeurs sont proches de la valeur de αp_{r1} donnée au Tableau V.9 (27 %). Ce modèle traduit donc bien le fait que le milieu pompé du bioréacteur aérobie vers le bioréacteur anaérobie est chargé en microbulles contenant de l'oxygène. Ainsi, dans ce type de système, la zone dite « anaérobie » est en réalité micro-aérée, ce qui explique l'existence d'une activité cellulaire dans cette zone.

V.5.2.3. Simulation avec prise en compte du hold-up lié aux petites bulles dans chaque bioréacteur

Le résultat de la simulation incluant le hold-up lié aux petites bulles dans chaque bioréacteur αp_{r1} et αp_{r2}, dont les valeurs observées expérimentalement sont de 27 % et 15 %, respectivement (Tableau V.9), est présenté dans la Figure V.9.

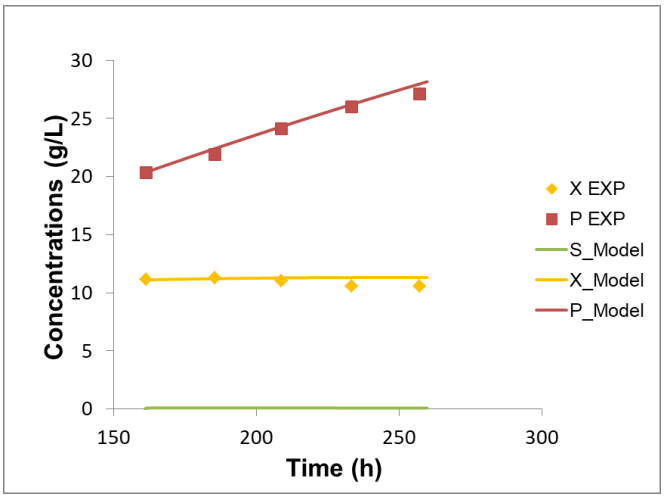


Figure V.9. Simulation de la croissance et de la production de protéines par *T. reesei* selon l'approche Bizone Inversé pour une culture dont q_{pmax}=0,025 gP.gX^{-1}.h^{-1} et KO_2p= 0,0005 $gO_2.L^{-1}$, avec $\alpha p_{r1} = 27$ % et $\alpha p_{r2} = 15$ %.
Les points représentent les mesures expérimentales et les traits pleins le modèle (X : concentration en biomasse ; P : concentration en protéines ; S : concentration en lactose).

Les résultats des simulations obtenus par cette approche sont très proches de ceux

obtenus expérimentalement, et confirment l'intérêt de prendre en compte le hold-up lié aux petites bulles pour simuler le comportement de *T. reesei* dans des conditions d'hétérogénéité de concentration en oxygène dissous.

V.5.2.4. Comparaison des résultats obtenus dans les différentes configurations

La Figure V.10 compare les résultats relatifs aux taux de production q_p et aux taux de croissance µ obtenus lors de l'expérience témoin, de l'expérience en configuration *Bizone Inversé* et des simulations avec le modèle en considérant, ou non, le hold-up lié aux petites bulles.

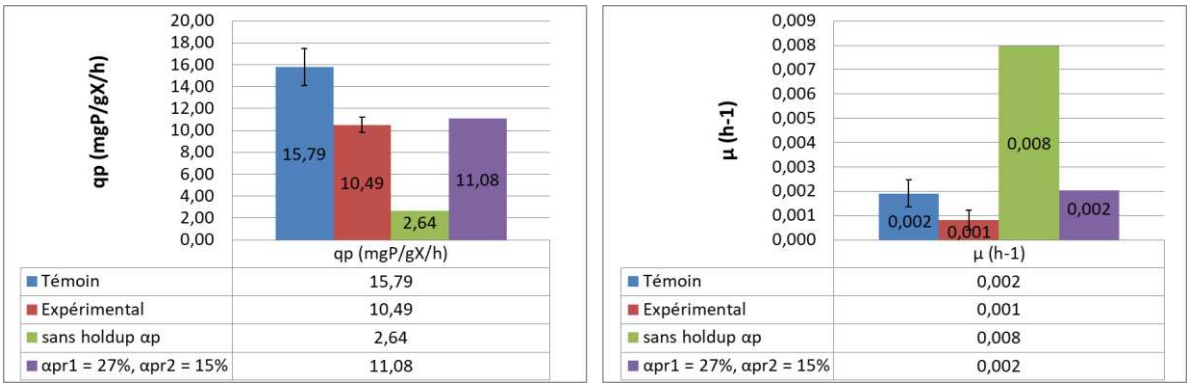


Figure V.10. Comparaison des résultats obtenus en configuration Bizone Inversé.
Les barres bleues correspondent aux valeurs expérimentales de q_p et µ pour l'expérience témoin. Les barres rouges correspondent aux valeurs expérimentales de q_p et µ pour l'expérience Bizone Inversé. Les barres vertes correspondent aux valeurs de q_p et de µ lors de la simulation de sans hold-up. Les barres violettes correspondent aux valeurs de q_p et de µ lors de la prise en compte de hold-up mesuré expérimentalement de 27 % en zone aérobie et de 15 % en zone aérobie.

La comparaison des résultats montre que la prise en compte du hold-up lié aux petites bulles dans les deux bioréacteurs permet de bien représenter les données expérimentales, alors que ce n'est pas du tout le cas s'il n'est pas pris en compte.

V.5.2.5. Comparaison des résultats obtenus en systèmes Bizone et Bizone Inversé

Dans le cas du système *Bizone inversé*, pour lequel le temps de séjour dans la zone anaérobie est environ 4 fois supérieur à celui du système *Bizone,* on observe une diminution d'environ 20 % du q_p (16,26 $mg_P.mg_X^{-1}.h^{-1}$ en configuration *Bizone*, au lieu de 11,08 $mg_P.mg_X^{-1}.h^{-1}$ en configuration *Bizone Inversé*). Ainsi, l'application transitoire d'une diminution de la pO_2 au cours de la culture de *T. reesei*, affecte la production de cellulases, mais de façon modérée. Ce résultat démontre une certaine robustesse de *T. reesei* face aux gradients d'oxygène. Ce résultat peut s'expliquer en partie par la particularité de son moût de culture,

qui est visqueux et donc capable de fournir un certain « stock » d'oxygène contenu dans les petites bulles maintenues en suspension dans le milieu, lorsque le champignon séjourne dans une zone pauvre en oxygène. Cette constatation ouvre d'intéressantes perspectives pour l'utilisation de grands bioréacteurs avec des temps de circulations très supérieurs à ceux des bioréacteurs agités.

V.5.3. Simulations de l'approche bioréacteur unique avec *Variation Dynamique de la pO_2*

Les modèles ont été appliqués pour simuler les cinétiques dans la configuration caractérisée par un bioréacteur unique d'un volume utile de 2,5 L, au sein duquel une alternance de phases d'aération (12,5 min) et d'arrêt d'aération (2,5 min) est appliquée pour simuler des gradients d'oxygène.

V.5.3.1. *Simulation sans prise en compte du hold-up lié aux petites bulles*

Le résultat de la simulation réalisée sans prendre en compte le hold-up lié aux petites bulles est représenté dans la Figure V.11, pour la configuration caractérisée par une *Variation Dynamique de la pO_2* dans un bioréacteur unique.

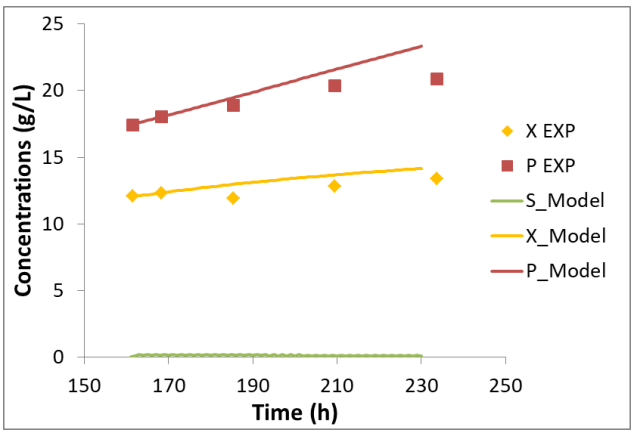


Figure V.11. Simulation de la croissance et de la production de protéines par *T. reesei* selon l'approche Variation Dynamique de la pO_2 pour une culture dont q_{pmax}=0,025 gP.gX^{-1}.h^{-1} et KO_2p= 0,0005 gO_2.L^{-1}, avec αp_{r1} nul.
Les points représentent les mesures expérimentales et les traits pleins le modèle (X : concentration en biomasse ; P : concentration en protéines ; S : concentration en lactose).

Ces courbes montrent que le modèle s'accorde bien aux données expérimentales au début de la culture, mais qu'ensuite, il surestime légèrement la croissance et, de façon

croissante, la production de cellulases par *T. reesei*. Il n'est donc pas parfaitement adapté à la représentation de la réalité expérimentale.

V.5.3.2. Simulation avec prise en compte du hold-up lié aux petites bulles

La simulation réalisée pour l'approche *Variation Dynamique de la* pO_2 dans un bioréacteur unique, incluant le hold-up lié aux petites bulles αp dont la valeur observée expérimentalement est de 15 %, est présentée à la Figure V.12.

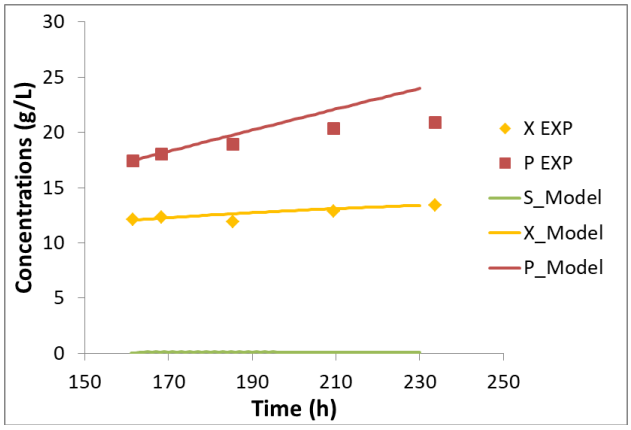


Figure V.12. Simulation de la croissance et de la production de protéines par *T. reesei* selon l'approche Variation Dynamique de la pO_2 pour une culture dont $q_{pma}x$=0,025 $gP.gX^{-1}.h^{-1}$ et KO_2p= 0,0005 $gO_2.L^{-1}$, avec $\alpha p_{r1} = 15\ \%$.
Les points représentent les mesures expérimentales et les traits pleins le modèle (X : concentration en biomasse ; P : concentration en protéines ; S : concentration en lactose).

Les résultats de la Figure V.12 montrent que la simulation représente bien la croissance du champignon, mais surestime la production de protéines. Il n'est donc pas adapté à la représentation de la réalité expérimentale.

V.5.3.3. Comparaison des résultats

La Figure V.13 compare les valeurs des taux de production q_p et des taux de croissance μ de l'expérience témoin, de l'expérience en configuration *Variation Dynamique de la* pO_2 et des simulations réalisées avec le modèle, en considérant ou non le hold-up lié aux petites bulles.

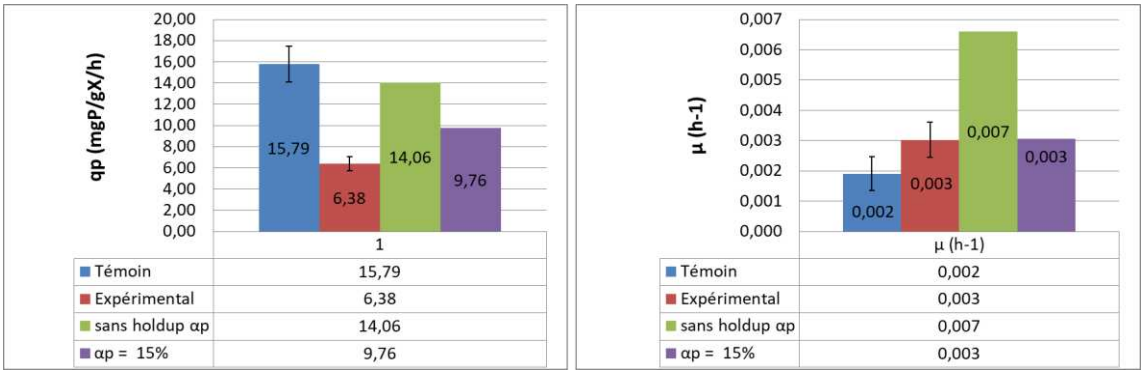


Figure V.13. Comparaison des résultats obtenus en configuration Variation Dynamique de la pO_2. Les barres bleues correspondent aux valeurs expérimentales de q_p et μ pour l'expérience témoin. Les barres rouges correspondent aux valeurs expérimentales de q_p et μ pour l'expérience de Variation Dynamique de la pO2. Les barres vertes correspondent aux valeurs de q_p et de μ lors de la simulation sans hold-up. Les barres violettes correspondent aux valeurs de q_p et de μ lors de la simulation avec hold-up (αp = 15 %).

Ces résultats indiquent que la prise en compte du hold-up lié aux petites bulles permet de mieux prédire la diminution de q_p observée lors de l'expérience en mode de *Variation Dynamique de la pO_2*, par rapport à la condition Témoin. Dans cette expérience, la désoxygénation a été effectuée par injection de diazote, pendant une durée de 2,5 min. Ainsi, pendant la phase de désoxygénation, l'oxygène contenu dans les petites bulles joue un rôle « tampon » sur la variation de la pO_2 en ralentissant la cinétique de désoxygénation du milieu. Pendant cette phase, les petites bulles s'imprègnent de diazote et, lors de la phase de ré-oxygénation, elles provoquent en retour, un ralentissement de la remontée de la pO_2 dans le milieu. Cependant, dans le modèle présenté ici, bien que le ralentissement de la désoxygénation soit bien modulé, le ralentissement de la ré-oxygénation n'est peut-être pas suffisamment bien représenté. Afin d'améliorer la précision du modèle, il serait nécessaire d'ajouter un terme de retard sur le bilan d'oxygène permettant de moduler le ralentissement de la ré-oxygénation du milieu à cause du diazote présent dans les petites bulles.

V.5.4. Analyses de sensibilité sur les variables KO_2p et αp

Des analyses de sensibilité ont été effectuées sur la variable K_{O_2p} qui conditionne l'effet de l'oxygène dissous sur la production d'enzymes et sur la variable αp qui représente le hold-up lié aux petites bulles (αp). Ces analyses permettent de vérifier que ces deux variables sont effectivement influentes dans le modèle

V.5.4.1. Analyse de sensibilité sur KO2p

Une analyse de sensibilité a été réalisée sur le paramètre K_{O_2p} en considérant les trois configurations mises en œuvre dans cette étude pour simuler les gradients d'oxygène : *Bizone*, *Bizone Inversé* et *Variation Dynamique de la pO₂*. Une variation de 10 % de la variable K_{O_2p} a été appliquée. Les résultats obtenus sur les valeurs des taux de production q_p et des taux de croissance µ sont présentés à la Figure V.14.

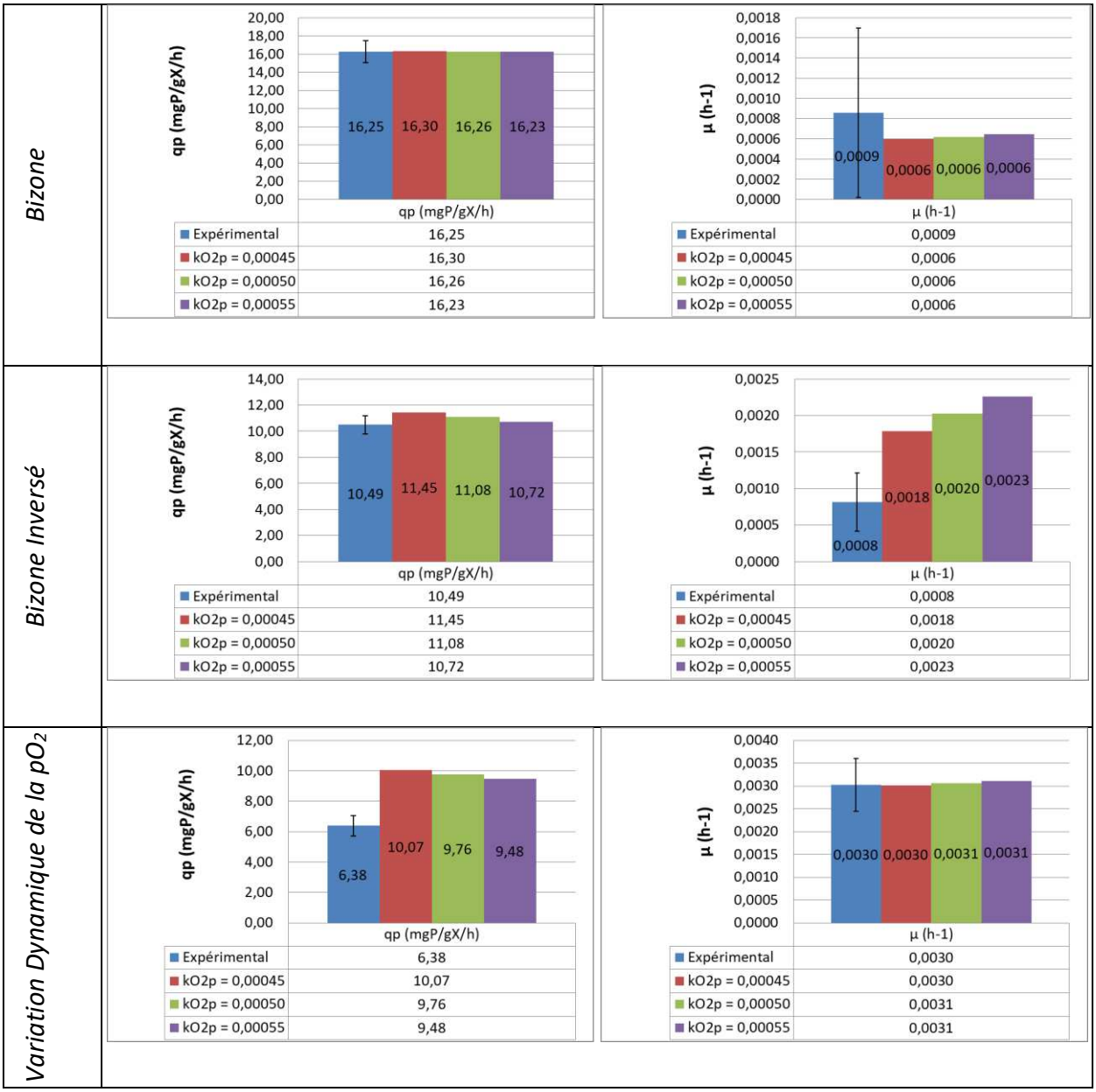


Figure V.14. Analyse de sensibilité sur K_{O_2p} pour les approches Bizone, Bizone Inversé et Variation Dynamique de la pO_2.

Les barres bleues correspondent aux résultats expérimentaux. Les barres vertes correspondent aux résultats des simulations pour $K_{O_2p} = 0{,}0005\ g\ O_2/L$. Les barres rouges et violettes correspondent, respectivement, aux résultats obtenus pour une variation de -10 % et de +10 % de la valeur de K_{O_2p}.

A partir de la Figure V.14, on observe que, pour le modèle *Bizone*, une variation de ± 10 % de K_{O_2p} provoque une très faible variation de ± 0.2 % de q_p et n'a pas d'effet significatif sur µ. Pour le modèle *Bizone Inversé,* une variation de ± 10 % de la valeur de K_{O_2p} provoque une variation de ± 3 % de q_p et de ± 15 % sur µ. Si ces pourcentages sont plus élevés ils restent toutefois modérés, et indiquent que le paramètre K_{O_2p} n'influe pas significativement sur le modèle. Pour la configuration *Variation Dynamique de la pO_2*, l'impact d'une variation de ± 10 % de la valeur de K_{O_2p} sur le q_p est de ± 3 % alors qu'aucun effet significatif n'a été observé sur µ.

L'analyse de sensibilité réalisée avec les trois configurations de bioréacteurs étudiées montre que les variables q_p et µ sont peu affectées lors d'une variation de ± 10 % de la valeur de K_{O_2p}. En conséquence, le paramètre K_{O_2p} n'influe pas significativement sur les modèles et peut donc être conservé à sa valeur initiale (Tableau V.1).

V.5.4.2. Analyse sensibilité sur le hold-up lié aux petites bulles

Le hold-up lié aux petites bulles (αp) a été mesuré ponctuellement lors des expériences. Pour cette raison, une analyse de sensibilité a été réalisée sur ce paramètre pour les trois configurations de bioréacteurs, en considérant une variation de ± 30 % de la variable αp. Les résultats sont présentés à la Figure V.15.

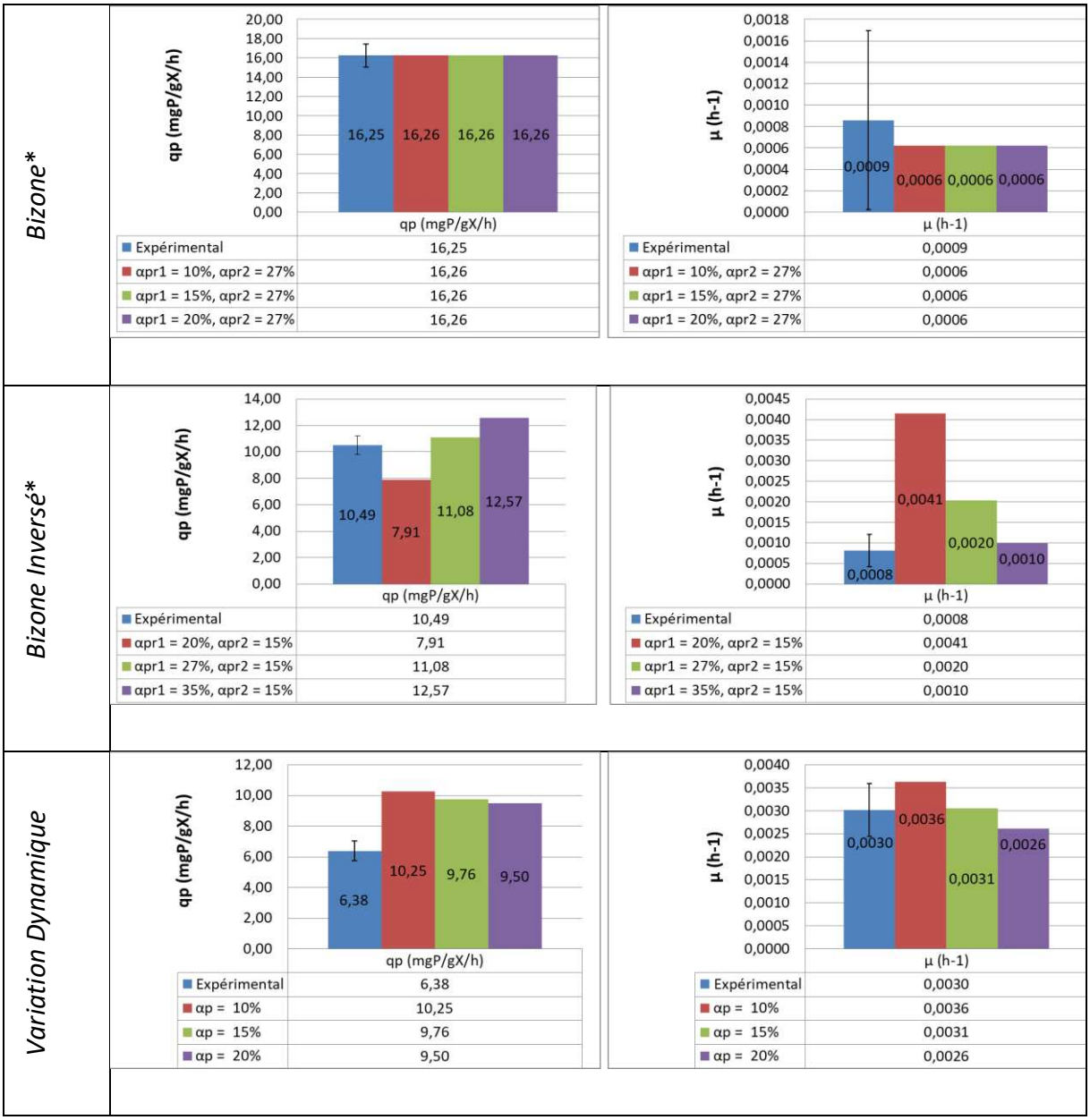


Figure V.15. Analyse d'incertitude sur αp pour les 3 modèles (Bizone, Bizone Inversé et Variation Dynamique de la pO_2).
Les barres bleues correspondent aux résultats expérimentaux. Les barres vertes correspondent aux résultats des simulations pour les αp mesurés expérimentalement. Les barres rouges et violettes correspondent, respectivement, aux résultats obtenus pour une variation d'environ -30 % et +30 % de la valeur de αp.
*Test d'incertitude réalisé uniquement en zone aérobie

La Figure V.15 montre qu'une variation de ± 30 % du paramètre αp n'entraine pas de variation significative des variables q_p et μ, pour les simulations en mode *Bizone*. En effet, le temps de séjour du champignon en zone anaérobie n'est pas suffisamment grand pour impacter le métabolisme du champignon. Ainsi, la présence ou non des petites bulles n'a pas d'impact direct sur la productivité en cellulases.

Pour le système *Bizone Inversé*, une diminution de 26 % de la valeur de αp provoque une baisse de 29 % du q_p et une augmentation de 50 % du μ. Cela montre que ce système est sensible aux variations du hold-up des petites bulles, qui se montrent essentielles pour expliquer la maintenance d'une activité du champignon dans le réacteur anaérobie.

Pour le système représentant la *Variation Dynamique de la pO_2* dans un bioréacteur unique, une variation de ± 30 % du αp entraine une faible variation de ± 5 % de q_p et de ± 16 % de μ. Ces variations restent modérées, cependant, il serait souhaitable de faire une analyse d'incertitude sur αp après optimisation de ce modèle afin de prendre en compte l'effet des petites bulles sur la cinétique de ré-oxygénation du milieu.

Au final, ces résultats indiquent que l'analyse de sensibilité réalisée avec les configurations *Bizone* et *Variation dynamique de la pO_2* montre que les variables q_p et μ sont peu affectées lors d'une variation de la valeur de αp. En revanche, le paramètre αp influe significativement sur les modèles en configuration *Bizone Inversé.* Il doit donc être considéré dans les modèles pour bien représenter la réalité.

V.6. Conclusions

Dans cette partie de l'étude, dans le but de mieux comprendre les résultats expérimentaux, trois modèles ont été développées afin de simuler le comportement de *T. reesei* soumis à des gradients d'oxygène selon les trois systèmes expérimentaux : *Bizone, Bizone Inversé* et *Variation Dynamique de la pO_2*. Les modèles montrent notamment la nécessité de de prendre en compte le hold-up correspondant aux petites bulles de gaz existantes dans le milieu de culture de *T. reesei*, en conditions de culture aérobies. Ces dernières constituent en effet une fraction importante de la phase gazeuse et sont donc les principales responsables de l'augmentation du hold-up, en cohérence avec les observations de Cappello et al. (2020) et de Fyferling (2007).

La modélisation correspondant à la configuration *Bizone* montre que le temps de séjour du champignon dans la zone dite anaérobie (petit bioréacteur), de l'ordre de 2,5 min, n'est pas suffisamment grand pour affecter négativement sa capacité de production de cellulases. Ainsi, l'inclusion de la fraction de petites bulles dans les calculs n'affecte pas les résultats de q_p et de μ. Cela est cohérent avec les résultats expérimentaux puisque les valeurs du taux de production q_p et du taux de croissance μ observées lors des expériences *Bizone* ne sont pas significativement différentes de celles obtenues pour les expériences Témoin.

La modélisation des phénomènes observés avec le modèle *Bizone Inversé* montre que la prise en compte de la fraction de petites bulles est fondamentale pour expliquer les résultats obtenus expérimentalement. En effet, la recirculation des petites bulles riches en oxygène provenant du réacteur aérobie vers le réacteur dit anaérobie (de plus grand volume) serait responsable d'un apport d'oxygène au champignon lors de son séjour dans la zone anaérobie, ce qui expliquerait que les cellules maintiennent une certaine activité dans cette zone. Ainsi, la mise en œuvre de cette modélisation permet de confirmer que le réacteur dit anaérobie est en réalité « micro-aéré ».

La modélisation du comportement du système en configuration *Variation Dynamique de la* pO_2 montre également que la prise en compte des petites bulles est essentielle pour expliquer les résultats expérimentaux. En effet, les petites bulles imprégnées de gaz ont un rôle tampon qui affecte les cinétiques de désoxygénation et de ré-oxygénation du milieu, entraînant d'une part, un ralentissement de la désoxygénation, mais aussi un ralentissement de la ré-oxygénation.

L'ensemble de ces résultats montrent donc que, sans la prise en compte des petites bulles, les modèles simulant les configurations *Bizone Inversé* et *Variation Dynamique de la* pO_2 surestiment l'impact de l'exposition du champignon aux conditions de limitation d'oxygène. La prise en compte des petites bulles dans les modèles se révèle alors cruciale pour bien représenter les résultats expérimentaux.

Néanmoins, il convient de rappeler que les modèles développés pour les approches étudiées (systèmes *Bizone* ou *Bizone Inversé* et approche *Variation Dynamique de la* pO_2) sont basés sur les mêmes hypothèses sous-jacentes (réponse instantanée du champignon aux changements environnementaux, comportement homogène de la population de microorganismes), alors qu'elles sont potentiellement simplistes. L'environnement réel aperçu par le champignon subit en effet des variations temporelles de l'ordre de plusieurs minutes et donc l'hypothèse que le microorganisme répond instantanément aux changements de la pO_2 est discutable. Pour les systèmes *Bizone* et *Bizone Inversé*, le fait d'avoir une recirculation du moût entre deux bioréacteurs entraîne des distributions de temps de séjour dans chacun des bioréacteurs, qui contiennent alors une hétérogénéité de cellules ayant été exposées à différents environnements. Ainsi, des améliorations pourraient être envisagées dans les modèles afin de mieux prendre en compte ces phénomènes, par exemple en analysant les populations à l'échelle de la cellule. Cependant, ces modèles assez simples

restent intéressants car ils ont permis d'expliquer de façon satisfaisante les résultats expérimentaux.

Cette étude a également permis de montrer que le champignon est assez robuste et qu'il résiste bien aux gradients d'oxygène, et ce notamment grâce à la présence des petites bulles qui jouent le rôle de réservoir d'oxygène dans les zones ou le transfert est faible ou nul. Seules des expositions à des carences prolongées en oxygène durant plusieurs minutes impactent négativement la production de protéines. Ce résultat est important pour l'extrapolation des cultures de *T. reesei* à des échelles où des hétérogénéités en oxygène dissous sont susceptibles d'apparaître.

VI. Discussion générale et perspectives

Les travaux mentionnés dans ce manuscrit s'inscrivent dans le cadre d'une des étapes clés du procédé de production du bioéthanol de deuxième génération (2G). Ce dernier constitue un bon candidat pour remplacer une partie des combustibles fossiles dans le secteur du transport et contribuer à assurer la transition énergétique en cours vers les énergies bas carbone. C'est également une molécule plateforme très intéressante pour la chimie (polyéthylène, mono éthylène glycol…). De plus, sa production est réalisée à partir de biomasse lignocellulosique qui n'entre pas en compétition avec les usages alimentaires. Cependant, du fait de la complexité de structure de cette biomasse lignocellulosique, les procédés mis en œuvre nécessitent une étape de prétraitement chimique et une étape d'hydrolyse enzymatique, impliquant au préalable la production de ces enzymes lignocellulolytiques. Afin que la production d'éthanol 2G devienne compétitive avec les procédés de production d'éthanol de première génération, il est nécessaire de réduire les coûts de production de l'éthanol 2G. L'une des voies possibles est de réduire les coûts de production des enzymes nécessaires à l'étape d'hydrolyse de la biomasse sur site, par réduction des coûts opératoires grâce à l'utilisation de substrats disponibles comme les hydrolysats cellulosiques et hémicellulosiques, à la simplification des étapes de downstream (pas d'étape de concentration des enzymes, de transport...).

A l'échelle industrielle, ces enzymes sont majoritairement produites en milieu liquide par le champignon *Trichoderma reesei,* qui est doté d'une forte capacité de sécrétion. Lors de sa croissance, le champignon filamenteux forme des structures tridimensionnelles enchevêtrées dans le milieu qui entraînent une augmentation de la viscosité du moût, limitant le transfert en oxygène. Le champignon étant aérobie strict, cela implique d'assurer un transfert d'oxygène suffisant tout au long de la culture. Extrapoler ce genre de procédé est complexe car il faut à la fois agiter fortement pour répondre aux besoins en oxygène du champignon mais pas trop afin de ne pas trop déstructurer les filaments pour ne pas risquer d'affecter négativement la production des cellulases. Il est à noter que dans le cas des procédés de fermentation en général, le lien entre les choix technologiques et la performance visée n'est pas aussi bien établi que pour les réacteurs chimiques (Gabelle 2012). En effet, les micro-organismes peuvent, dans certains cas, s'adapter aux non-idéalités rencontrées à

grande échelle. Dans d'autres cas, les micro-organismes peuvent être sensibles aux conditions présentes au sein de leur micro-environnement. Ainsi les performances de production obtenues à l'échelle laboratoire (1 - 30 L) peuvent, selon le cas, être reproduites ou non à l'échelle industrielle (300 - 500 m^3).

Le temps de mélange à l'échelle industrielle est aussi plus important qu'à l'échelle du laboratoire, puisqu'il passe d'un ordre de grandeur de la seconde à la minute (Formenti et al. 2014). Cette augmentation peut induire des hétérogénéités au sein du réacteur, lorsque le temps caractéristique de consommation de substrats est proche du temps de mélange, comme c'est le cas pour l'oxygène dans le cas des cultures de *Trichoderma*.

L'objectif de cette thèse était de comprendre l'impact de la dégradation de certains paramètres hydrodynamiques et physico-chimiques liée au changement d'échelle sur la physiologie de *Trichoderma reesei.*

Pour répondre à ces problématiques, la méthodologie *scale-down* a été mise en œuvre afin d'essayer de reproduire, à petite échelle, des contraintes rencontrées à l'échelle industrielle. Nous avons pour cela développé des outils de laboratoire dont l'objectif était de reproduire de façon maîtrisée les contraintes subies, tout en réalisant une analyse complète de leur impact sur la physiologie de *Trichoderma*.

L'étude de l'impact du cisaillement sur la production de cellulases a été réalisé en mode continu afin d'évaluer et de quantifier l'effet de deux niveaux de stress hydrodynamique sur les vitesses spécifiques de production d'enzymes (au niveau extracellulaire) et sur l'évolution de son protéome (au niveau intracellulaire).

L'effet des hétérogénéités physico-chimiques induites par le scale-up a quant à lui été étudié à l'aide de trois approches scale-down : (1) un système Bizone, constitué de deux bioréacteurs ayant chacun des concentrations différentes en oxygène dissous ; (2) un système Bizone inversé (équivalent au système Bizone mais en inversant la zone aérobie et anaérobie) et (3) un système de variation dynamique de la pO_2, caractérisé par un bioréacteur unique alimenté en air et en diazote de façon alternative, avec une fréquence fixe de fluctuation de la concentration en oxygène dissous (pO_2).

Ces études ont permis de répondre plus précisément aux 4 questions suivantes :

- Quel est l'impact du cisaillement sur la production d'enzymes par *T. reesei* ?
- Quel est l'effet des gradients en oxygène sur la production de cellulases ?

- Quel est l'effet des gradients d'oxygène sur l'hétérogénéité populationnelle ?
- Est-il possible de modéliser ces effets afin de mieux les prédire ?

Impact du cisaillement sur la physiologie de *T. reesei*

L'impact du cisaillement sur la physiologie de *Trichoderma* a été étudié au cours de la thèse de Nicolas Hardy (2013-2016) notamment mode en batch et en mode fed-batch. Afin de compléter ce travail, nous avons conduit des cultures en mode chémostat afin d'étudier les effets du stress hydrodynamique sur la capacité de production de cellulases de *T. reesei*. Nous avons généré des états stationnaires facilitant l'étude de l'effet de ce stress au niveau extracellulaire et intracellulaire. L'application de deux niveaux de stress a été réalisée en deux phases successives :

- Une phase à 700 rpm correspondant à la valeur d'*EDCFεmax* la plus basse (1884 $kW.m^{-3}.s^{-1}$) a été appliquée jusqu'à ce qu'un état d'équilibre soit atteint,
- Puis une phase à 1700 rpm correspondant à l'*EDCFεmax* plus élevé (38400 $kW.m^{-3}.s^{-1}$ a été mis en œuvre, jusqu'à l'obtention d'un état quasi-stationnaire. Dans cette condition, une baisse significative de la production de protéines a été observée.

Nous avons montré que les résultats obtenus en culture continue étaient comparables à ceux obtenus par Hardy (2016) en production en mode fed-batch. L'application de l'*EDCFεmax* le plus élevé a entraîné une baisse sur la concentration finale en cellulases (-21 %) dans le milieu, ainsi que sur le rendement de production (-20 %) et sur la vitesse spécifique de production de cellulases (-24 %). Ces effets, bien que significatifs, restent cependant modérés au regard de l'écart important de vitesse d'agitation, et donc du critère *EDCFεmax*.

L'analyse protéomique a permis d'expliquer en partie les effets observés. En effet la synthèse intracellulaire de toutes les enzymes impliquées dans l'activité cellulosique a été diminuée lorsque la vitesse d'agitation a été augmentée, alors que sont apparues des protéines de stress telles que la protéine chaperonne HSP60 (dont le rôle est de protéger les cellules des effets du stress hydrodynamique). Ces résultats démontrent qu'à un fort stress hydrodynamique, le champignon s'adapte : il déclenche des mécanismes de protection et de réparation des dommages au niveau intracellulaire et favorise son métabolisme central au détriment d'autres fonctions moins importantes. La combinaison de ces deux phénomènes explique la faible diminution de la biosynthèse des cellulases, même à des *EDCFεmax* très

élevés. Ces travaux ont fait l'objet d'une publication dans *Chemical Engineering Science* en 2021.

Effet des gradients en oxygène sur la production de cellulases

L'effet de variations de concentration en oxygène dissous sur la production d'enzymes a été étudié par les différentes approches expérimentales décrites ci-dessus (Bizone, Bizone inversé, système de variation dynamique de la pO_2). Elles ont permis de montrer un impact sur le champignon des limitations ou carences en oxygène. Nous avons en effet observé une réduction plus ou moins importante de la vitesse spécifique de production des cellulases et du rendement de conversion en protéines à partir du substrat carboné. Cependant, les diminutions observées ont été différentes selon le système utilisé. Différentes hypothèses ont été émises pour expliquer ces différences, comme l'existence d'une distribution des cellules aux faibles concentrations en oxygène, et le rôle des microbulles observées dans le milieu de culture (formées suite à la sécrétion de surfactants), rendant difficile l'atteinte d'une réelle anaérobiose dans les systèmes Bizone et Bizone inversé. La réponse biologique différente obtenue lors des expériences réalisées avec ces systèmes Bizone par rapport au bioréacteur unique montre que la réponse physiologique du champignon est plus complexe à analyser et est liée à la distribution du temps de séjour dans les zones aérées et non-aérées.

Effet des gradients d'oxygène sur l'hétérogénéité populationnelle

L'effet des gradients d'oxygène sur l'hétérogénéité des populations en bioréacteur Bizone a été investigué. Les différentes étapes d'analyse ont permis, dans un premier temps, d'identifier et d'isoler deux sous-populations : TR3060-P et TR3060-G. Le variant TR3060-G présentait une morphologie macroscopique après étalement sur boite, différente du variant TR3060-P. Nos travaux ont permis d'observer la présence de ce variant ou sous-population dès le début de l'expérience Bizone, soit quelques heures après le début du fed-batch (et donc avant l'application des gradients d'oxygène) mais en petite quantité (2 % des colonies). Cependant, après une exposition à des conditions cycliques d'hypoxie pendant 140 h, le nombre de colonies de ce phénotype variant était de 24 %, ce qui indique que les conditions d'hypoxie ont potentiellement favoriser ce variant, rappelant les phénomènes de diversification phénotypique décrit dans la littérature et menant à la présence de sous-populations de type tricheuses (cheaters) qui peuvent être responsables de l'hétérogénéité

de la production d'enzymes.

Les clones des phénotypes isolés (TR3060-G et TR3060-P) ont été cultivés en micro-cuves et en bioréacteurs, et les résultats obtenus ont permis d'observer une nette diminution de la capacité de sécrétion de cellulases par le variant TR3060-G. Cette diminution est due principalement au fait que ce variant démontre une faible capacité de consommation du lactose, ce qui provoque un ralentissement de son développement et peut accélérer le mécanisme de conidiation (sporulation). Cependant, sa capacité de métaboliser le glucose ne semble pas être affectée, et son taux de croissance est équivalent au variant TR3060-P. Il est possible de conclure que la présence dans une culture des deux phénotypes (TR3060-P et TR3060-G) peut avoir un impact sur les performances si la sous-population TR3060-G consomme le glucose à la place de la sous-population TR3060-P. L'impact peut être relativement important sur la phase de production d'enzymes si seul le substrat lactose est utilisé, puisque le variant non producteur (cheater) est incapable de bien le métaboliser mais pourrait profiter de l'hydrolyse extracellulaire du lactose réalisée par TR3060-P. Ces résultats ont été appuyés par une étude transcriptomique, qui a permis d'observer une plus faible présence de facteurs de transcription liés à la production de cellulases et d'hémicellulases dans la souche TR3060-G, comparé à la souche TR3060-P, ce qui confirme les résultats obtenus lors des cultures en bioréacteur ainsi que l'hypothèse de sous-population tricheuse.

Les résultats obtenus dans cette partie ont permis d'apporter des explications aux différences phénotypiques des deux variants isolés, aux niveaux intra- et extracellulaires. Toutefois, malgré les indices que l'exposition à des conditions de limitation en oxygène puisse favoriser l'apparition du phénotype TR3060-G, nous n'avons pas pu établir un lien entre l'hypoxie et la génération de la modification phénotypique en elle-même. Des expériences complémentaires sont nécessaires pour vérifier l'hypothèse émise.

Modélisation des effets des gradients d'oxygène dissous sur les cinétiques de *T. reesei*

Trois modèles ont été développés afin de simuler les cinétiques de *T. reesei* soumis à des gradients d'oxygène selon les systèmes expérimentaux mis en œuvre : Bizone, bizone inversé et Variation Dynamique de la pO_2.

Ces modèles sont originaux car permettant entre autres, de prendre en compte le hold-up correspondant aux petites bulles de gaz existantes dans le milieu de culture *de Trichoderma reesei* en conditions de culture aérobies, et liés à la production de surfactants, et

qui sont transportées d'un fermenteur à l'autre. L'ensemble des résultats de simulation montrent que, sans la prise en compte des petites bulles, les modèles simulant les configurations Bizone Inversé et Variation Dynamique de la pO_2 surestiment l'impact de l'exposition du champignon aux conditions de limitation d'oxygène. La prise en compte des petites bulles dans les modèles apparait cruciale pour bien représenter les résultats expérimentaux. Dans le cas du modèle Bizone Inversé, la recirculation des petites bulles riches en oxygène provenant du réacteur aérobie vers le réacteur dit anaérobie serait responsable d'un apport d'oxygène au champignon lors de son séjour dans la zone anaérobie, ce qui expliquerait que les cellules maintiennent une certaine activité dans cette zone. Ainsi, la mise en œuvre de cette modélisation permet de confirmer que le réacteur dit anaérobie est en réalité « micro-aéré ». Dans le cas du système en configuration Variation Dynamique de la pO_2, les petites bulles imprégnées de gaz auraient un rôle tampon qui affecte les cinétiques de désoxygénation et de ré-oxygénation du milieu. Elles entraînent d'une part, un ralentissement de la désoxygénation, mais aussi un ralentissement de la ré-oxygénation.

Même si ces modèles restent intéressants, car permettent d'expliquer de façon satisfaisante les résultats expérimentaux, il convient de rappeler qu'ils sont basés sur des hypothèses n'ayant pas été toutes validées. En effet nous avons considéré que le champignon répondait de façon instantanée aux changements environnementaux et notamment de la pO_2. Pour les systèmes Bizone et Bizone Inversé, le fait d'avoir une recirculation du moût entre deux bioréacteurs entraîne des distributions de temps de séjour différentes dans chacun des bioréacteurs (liés aux différences de volume des bioréacteurs), qui contiennent alors une hétérogénéité de cellules ayant été exposées à différents environnements. Ainsi, des améliorations pourraient être envisagées dans les modèles afin de mieux prendre en compte ces phénomènes.

Finalement, cette étude a permis de montrer que le champignon est assez robuste et qu'il résiste bien aux gradients d'oxygène, et ce notamment grâce à la présence des petites bulles qui jouent le rôle de réservoir d'oxygène dans les zones ou le transfert d'oxygène est faible ou nul. Seules des expositions à des carences prolongées en oxygène durant plusieurs minutes impactent négativement la production de protéines.

Les perspectives ouvertes par ce travail portent à la fois sur les aspects applicatifs en industrie et sur le plan fondamental.

En termes de choix technologique à l'échelle industrielle, la faible sensibilité du champignon vis-à-vis des hétérogénéités en oxygène en phase de production d'enzymes ouvre des perspectives. En particulier, l'utilisation de bioréacteurs de type colonne à bulles est une alternative intéressante aux bioréacteurs agités mécaniquement. En effet ces technologies démontrent des temps de mélange plus élevés avec un risque plus grand d'hétérogénéités mais acceptent des tailles de fermenteurs plus élevées, sont plus faciles à stériliser et sont moins coûteuses à l'investissement. Dans le cas des cultures de *T. reesei* pour la production de cellulases, nos résultats suggèrent que le risque d'utiliser cette technologie restera modéré.

Enfin d'un point de vue fondamental, un axe d'amélioration important consisterait à mieux analyser les conditions de fermentation responsables de la production des surfactants. De toute évidence, les interactions entre stress hydraulique, limitations en substrat et en oxygène, morphologie des champignons, rhéologie et production de surfactants pourraient être mieux comprises. Des études dédiées pourraient mener à une modélisation physique de ces interactions et à l'identification de conditions opératoires et des choix technologiques plus optimaux. Pour cela, il faudrait :

- Quantifier les effets de stress métaboliques ou physiques divers sur la production de surfactants (cisaillement, carences en substrat ou en oxygène)
- Quantifier l'effet des surfactants et de la rhéologie sur la taille des bulles, le transfert et l'expansion des milieux de fermentation
- Modéliser les interactions, au niveau métabolique et en termes de variation de tailles de bulles (prise en compte des surfactants et de la rhéologie dans les bilans de population de bulles par exemple)
- Intégrer dans un modèle de fermenteur hétérogène (multizone) avec métabolisme avancé, la production de surfactants et les transferts de matière.

Références bibliographiques

Adav, S.S., Ravindran, A., Chao, L.T., Tan, L., Singh, S., Sze, S.K., 2011. Proteomic analysis of pH and strains dependent protein secretion of *Trichoderma reesei*. J. Proteome Res. 10, 4579–4596. DOI: 10.1021/pr200416t

Aerts, D., van den Bergh, S.G., Post, H., Altelaar, M.A.F., Arentshorst, M., Ram, A.F.J., Ohm, R.A., Wösten, H.A.B., 2019. FlbA-regulated gene *rpnR* is involved in stress resistance and impacts protein secretion when *Aspergillus niger* is grown on xylose. Applied and Environmental Microbiology 85, 2–12. DOI: 10.1128/AEM.02282-18

Albaek, M.O., Gernaey, K.V., Hansen, M.S., Stocks, S.M., 2012. Evaluation of the energy efficiency of enzyme fermentation by mechanistic modeling. Biotechnol. Bioeng. 109 (4), 950–961. DOI: 10.1002/bit.24364

Amanullah, A., McFarlane, C.M., Emery, A.N., Nienow, A.W., 2001. Scale-down model to simulate spatial pH variations in large-scale bioreactors. Biotechnology and Bioengineering, 73(5), 390–399. DOI: 10.1002/bit.1072

Amanullah, A., Christensen, L.H., Hansen, K., Nienow, A.W., Thomas, C.R., 2002. Dependence of morphology on agitation intensity in fed-batch cultures of *Aspergillus oryzae* and its implications for recombinant protein production. Biotechnol. Bioeng. 77 (7), 815–826. DOI: 10.1002/bit.10181

Amanullah, A., Buckland, B., Nienow, A.W., 2004. Mixing in the fermentation and cell culture industries, in: Paul, E., Atiemo-Obeng, V., Kresta, S. (Eds.), Handbook of Industrial Mixing: Science and Practice. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken N.J., pp. 1071–1170. DOI: 10.1002/0471451452.ch18

Arvas, M., Pakula, T., Smit, B., Rautio, J., Koivistoinen, H., Jouhten, P., Lindfors, E., Wiebe, M., Penttilä, M., Saloheimo, M., 2011. Correlation of gene expression and protein production rate - a system wide study. BMC Genom. 12 (616), 1–25. DOI: 10.1186/1471-2164-12-616

Ahamed, A., Vermette, P., 2009. Effect of culture medium composition on *Trichoderma reesei*'s morphology and cellulase production. Bioresource technology 100 (23), 5979–5987. DOI: 10.1016/j.biortech.2009.02.070

Bailey, M. J., Askolin, S., Hörhammer, N., Tenkanen, M., Linder, M., Penttilä, M., Nakari-Setälä, T. ,2002. Process technological effects of deletion and amplification of hydrophobins I and

II in transformants of *Trichoderma reesei*. In: Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 58, n° 6, p. 721–727. DOI: 10.1007/s00253-002-0966-z

Bailey, M.J., Tähtiharju, J., 2003. Efficient cellulase production by *Trichoderma reesei* in continuous cultivation on lactose medium with a computer-controlled feeding strategy. Applied Microbiology and Biotechnology 62 (2-3), 156–162. DOI: 10.1007/s00253-003-1276-9

Beier, S., Hinterdobler, W., Bazafkan, H., Schillinger, L., Schmoll, M., 2020. CLR1 and CLR2 are light dependent regulators of xylanase and pectinase genes in *Trichoderma reesei*. Fungal Genetics and Biology : FG & B 136. DOI: 103315. 10.1016/j.fgb.2019.103315

Ben Chaabane F., Chaussepied B., 2011. Process for the continuous production of cellulases by a filamentous fungus using a carbon substrate obtained from an acid pretreatment. Patent US9249402B2.

Ben Chaabane, F., Marchal, R., 2013. Upgrading the hemicellulosic fraction of biomass into biofuel. Oil & Gas Science and Technology - Revue d'IFP Energies nouvelles, Institut Français du Pétrole (IFP), 68 (4), 663-680. DOI: 10.2516/ogst/2012093

Benkő, Z., Siika-aho, M., Viikari, L., Réczey, K., 2008. Evaluation of the role of xyloglucanase in the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates. Enzyme Microb. Technol. 43, 109–114. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2008.03.005

Bianco, L., Perrotta, G., 2015. Methodologies and perspectives of proteomics applied to filamentous fungi: From sample preparation to secretome analysis. Int. J. Mol. Sci. 16, 5803–5829. DOI: 10.3390/ijms16035803

Bidard, F., Margeot, A., 2017. Mutant strains of *Trichoderma reesei*: Brevet WO 2017/115033AI, IFP Energies Nouvelles. URL: <https://patents.google.com/patent/WO2017115033A1/fr>, 31 pp.

Böhm, L., Hohl, L., Bliatsiou, C., Kraume, M., 2019. Multiphase stirred tank bioreactors – New geometrical concepts and scale-up approaches. Chem. Ing. Tech. 91 (12), 1724–1746. DOI: 10.1002/cite.201900165

Bonaccorsi, E.D., Ferreira, A.J.S., Chambergo, F.S., Ramos, A.S.P., Mantovani, M.C., Farah, J.P., Simon et al. 2006. Transcriptional response of the obligatory aerobe *Trichoderma reesei* to hypoxia and transient anoxia. Implications for energy production and survival in the absence of oxygen. Biochemistry, 45(12), 3912–3924. DOI: 10.1021/bi052045o

Bouchat R., 2022. XYLANFACTORY - Optimisation de la culture d'une bactérie thermophile en bioréacteurs pour la production d'hémicellulases et la valorisation des xylanes des biomasses lignocellulosiques. Thèse de Doctorat, Université de Liège (Belgique) et Université de Reims Champagne Ardennes.

Bouchat, R., Vélard, F., Audonnet, S., Rioult, D., Delvigne, F., Rémond, C., Rakotoarivonina, H., 2022. Xylanase production by *Thermobacillus xylanilyticus* is impaired by population diversification but can be mitigated based on the management of cheating behavior. Microbial Cell Factories volume 21, 39. DOI: 10.1186/s12934-022-01762-z

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72, 248–254. DOI: 10.1006/abio.1976.9999

Brown, D.E., Zainudeen, M.A., 1977. Growth kinetics and cellulase biosynthesis in the continuous culture of *Trichoderma viride*. Biotechnol. Bioeng. 19 (7), 941–958. DOI: 10.1002/bit.260190702

Cappello, V., Plais, C., Vial, C., Augier, F., 2020. Bubble size and liquid-side mass transfer coefficient measurements in aerated stirred tank reactors with non-Newtonian liquids. Chemical Engineering Science, 211, 115280. DOI: 10.1016/j.ces.2019.115280

Cappello, V., 2020. Scale-up of gas-liquid agitated bioreactors: Three-dimensional modeling of hydrodynamics, mass transfer and kinetics. Doctoral dissertation, Université de Clermont-Auvergne. https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-03159254

Carlile, M.J., 1995. The Success of the hypha and mycelium, in: The Growing Fungus. Springer, Dordrecht, Pays-Bas.

Casadesús, J. and Low, D. A., 2013. Programmed heterogeneity: Epigenetic mechanisms in bacteria, Journal of Biological Chemistry, 288(20), 13929–13935. DOI: 10.1074/jbc.R113.472274

Chan Ho Tong, L., 2017. Amélioration du champignon cellulolytique *Trichoderma reesei* par reproduction sexuée. Dotoral dissertation, Rueil-Malmaison, France.

Chaudhuri, B.K., Sahai, V., 1994. Comparison of growth and maintenance parameters for cellulase biosynthesis by *Trichoderma reesei*-C5 with some published data. Enzyme Microb. Technol. 16, 1079–1083. DOI: 10.1016/0141-0229(94)90146-5

Chen, W., Syldath, U., Bellmann, K., Burkart, V., Kolb, H., 1999. Human 60-kDa heat-shock protein: A danger signal to the innate immune system. J. Immunol. Res. 162, 3212–3219.

Colonna, P., Duplan J.L., Legrand, J., Lenet, E., Boissonnet, G., Lorne, D. 2020. Biofuels in the nexus energy-environment-food. Academic Notes from the French Academy of Agriculture 3, 1–48.

Cox, P.W., 1998. Image analysis of the morphology of filamentous micro-organisms. Microbiology 144, 817–827. DOI: 10.1099/00221287-144-4-817

Dahal, B.K., Kadyrova, L.Y., Delfino, K.R., Rogozin, I.B., Gujar, V., Lobachev, K.S., Kadyrov, F.A., 2017. Involvement of DNA mismatch repair in the maintenance of heterochromatic DNA stability in *Saccharomyces cerevisiae*. PLoS genetics 13 (10), DOI: e1007074. 10.1371/journal.pgen.1007074

Delvigne, F., Zune, Q., Lara, A.R., Al-Soud, W., Sorensen, S.J. 2014. Metabolic variability in bioprocessing: Implications of microbial phenotypic heterogeneity. Trends in Biotechnology 32 (12), 608-616. DOI: 10.1016/j.tibtech.2014.10.002

Delvigne, F. and Goffin, P., 2014. Microbial heterogeneity affects bioprocess robustness: Dynamic single-cell analysis contributes to understanding of microbial populations. Biotechnology Journal 9 (1), 61-72. DOI: 10.1002/biot.201300119

dos Santos Castro, L., Pedersoli, W.R., Antoniêto, A. C. C., Steindorff, A.S., Silva-Rocha, R., Martinez-Rossi, N., Rossi, A., Brown, N.A., Goldman, G.H., Faça, V.M., Persinoti, G.F., Silva, R.N., 2014. Comparative metabolism of cellulose, sophorose and glucose in *Trichoderma reesei* using high-throughput genomic and proteomic analyses. Biotechnol. Biofuels 7 (41). DOI: 10.1186/1754-6834-7-41

Drougard, M., 2018. Compréhension et contrôle de la morphologie des champignons filamenteux en milieu liquide. Doctoral dissertation, IFPEN, Rueil-Malmaison, AgroParisTech, France. https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-03510230

Druzhinina, I.S., Kubicek C.P., 2017. Genetic engineering of *Trichoderma reesei* cellulases and their production. Microbial Biotechnology 10(6), 1485–1499. DOI: 10.1111/1751-7915.12726

Durand, H., Clanet, M., Tiraby, G., 1988. Genetic improvement of *Trichoderma reesei* for large scale cellulase production. Enzyme and Microbial Technology, 10(6), 341–346. DOI: DOI: 10.1016/0141-0229(88)90012-9

Enjalbert, B., Smith, D.A., Cornell, M.J., Alam, I., j, Nicholls, S., Brown, A.J.P., Quinn, J., 2006. Role of the Hog1 stress-activated protein kinase in the global transcriptional response to

stress in the fungal pathogen *Candida albicans*. Mol. Biol. Cell. 17, 1018–1032. DOI: 10.1091/mbc.e05-06-0501

Fekete, E., Karaffa, L., Kubicek, C.P., Szentirmai, A., Seiboth, B., 2007. Induction of extracellular beta-galactosidase (Bga1) formation by D-galactose in *Hypocrea jecorina* is mediated by galactitol. Microbiology (Reading, England) 153, 507–512. DOI: 10.1099/mic.0.2006/001602-0.

Fan, F., Ma, G., Li, J., Liu, Q., Benz, J.P., Tian, C., Ma, Y., 2015. Genome-wide analysis of the endoplasmic reticulum stress response during lignocellulase production in Neurospora crassa. Biotechnology for biofuels 8, 66. DOI: 10.1186/s13068-015-0248-5

Fernández-Alejandre, K.I., Flores, N., Tinoco-Valencia, R., Caro, M., Flores, C., Galindo, E., Serrano-Carreón, L., 2016. Diffusional and transcriptional mechanisms involved in laccases production by *Pleurotus ostreatus* CP50. Journal of Biotechnology 223, 42–49. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2016.02.029

Fyferling, M., 2007. Transfert d'oxygène en condition de culture microbienne intensive. Doctoral dissertation, INSA, Université de Toulouse, France.

Gabelle, J.-C., 2012. Analyse locale et globale de l'hydrodynamique et du transfert de matière dans des milieux à rhéologie complexe caractéristiques des milieux de fermentation. Doctoral dissertation, INSA, Université de Toulouse, France.

Gabelle, J.-C., Jourdier, E., Licht, R.B., Ben Chaabane, F., Henaut, I., Morchain, J., Augier, F., 2012. Impact of rheology on the mass transfer coefficient during the growth phase of *Trichoderma reesei* in stirred bioreactors. Chem. Eng. Sci. 75, 408–417. DOI: 10.1016/j.ces.2012.03.053

Ganesh, K., Joshi, J.B., Sawant, S.B., 2000. Cellulase deactivation in a stirred reactor. Biochem. Eng. J. 4, 137–141. DOI: 10.1016/S1369-703X(99)00045-5

Glick, B.R., 1995. Metabolic Load and Heterologous Gene Expression. Biotechnology advances 13 (2), 247–261. DOI: 10.1016/0734-9750(95)00004-A

Goller, S.P., Gorfer, M., Kubicek, C.P., 1998. *Trichoderma reesei* prs12 encodes a stress and unfolded-protein-response-inducible regulatory subunit of the fungal 26S proteasome. Current Genetics 33, 284–290. DOI: 10.1007/s002940050338

Grenville, R.K., Giacomelli, J.J., Padron, G., Brown, D.A.R., 2017. Mixing: Impeller performance in stirred tanks: Characterizing mixer impellers on the basis of power, flow, shear and efficiency. Chem. Eng. 124 (8), 42–51.

Gusakov, A.V., 2011. Alternatives to *Trichoderma reesei* in biofuel production. Trends in Biotechnology 29 (9), 419–425. DOI: 10.1016/j.tibtech.2011.04.004

Hager, K.M., Yanofsky, C., 1990. Genes expressed during conidiation in *Neurospora crassa*: molecular characterization of *con-13*. Gene 96, 153–159. DOI: 10.1016/0378-1119(90)90247-O

Häkkinen, M., Valkonen, M.J., Westerholm-Parvinen, A., Aro, N., Arvas, M., Vitikainen, M., Penttilä, M., Saloheimo, M., Pakula, T.M., 2014. Screening of candidate regulators for cellulase and hemicellulase production in *Trichoderma reesei* and identification of a factor essential for cellulase production. Biotechnology for biofuels 7 (14), 1–21. DOI: 10.1186/1754-6834-7-14

Hardy, N., 2016. Identification des critères d'extrapolation du procédé de production de cellulases par *Trichoderma reesei* en utilisant l'approche « scale-down ». Doctoral dissertation, AgroParisTech, Paris, France. https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01637274

Hardy, N., Augier, F., Nienow, A.W., Béal, C., Ben Chaabane, F., 2017a. Scale-up agitation criteria for *Trichoderma reesei* fermentation. Chem. Eng. Sci. 172, 158–168. DOI: 10.1016/j.ces.2017.06.034

Hardy, N., Henaut, I., Augier, F., Béal, C., Ben Chaabane, F., 2015. Rhéologie des champignons filamenteux: Un outil pour la compréhension d'un procédé de production de biocatalyseurs utilisés pour la production de bioéthanol. Rhéologie 27, 43–48.

Hardy, N., Moreaud, M., Guillaume, D., Augier, F., Nienow, A.W., Béal, C., Ben Chaabane, F., 2017b. Advanced digital image analysis method dedicated to the characterization of the morphology of filamentous fungus. Journal of Microscopy 266 (2), 126–140. DOI: 10.1111/jmi.12523

Harris, S.D., 2008. Branching of fungal hyphae: Regulation, mechanisms and comparison with other branching systems. Mycologia 100 (6), 823–832. DOI: 10.3852/08-177

Hassan, I.T.M., Robinson, C.W., 1977. Stirred-tank mechanical power requirement and gas holdup in aerated aqueous phases. American Institute of Chemical Engineers Journal, 23(1), 48-56.

Heijnen, J. J., Van't Riet, K., Wolthuis, A. J., 1980. Influence of very small bubbles on the dynamic k_{LA} measurement in viscous gas–liquid systems. Biotechnology and Bioengineering, 22, 1945–1956. DOI: 10.1002/bit.260220912

Herpoël-Gimbert, I., Margeot, A., Dolla, A., Jan, G., Mollé, D., Lignon, S., Mathis, H., Sigoillot, J.-C., Monot, F., Asther, M., 2008. Comparative secretome analyses of two *Trichoderma reesei* RUT-C30 and CL847 hypersecretory strains. Biotechnol. Biofuels 1 (18). DOI: 10.1186/1754-6834-1-18.

Hewitt, C.J., Boon, L.A., McFarlane, C.M., Nienow, A.W., 1998. The use of flow cytometry to study the impact of fluid mechanical stress on *Escherichia coli* W3110 during continuous cultivation in an agitated bioreactor. Biotechnol. Bioeng. 59 (5), 612–620. DOI: 10.1002/(sici)1097-0290(19980905)59:5<612::aid-bit12>3.0.co;2-b

Hillmann, F., Shekhova, E., Kniemeyer, O., 2015. Insights into the cellular responses to hypoxia in filamentous fungi. Current Genetics 61 (3), 441–455. DOI: 10.1007/s00294-015-0487-9

Hofmeester, J. J. M., 1988. Gas hold-up measurements in bioreactors. Trends in biotechnology, 6, 19-22. DOI: 10.1016/0167-7799(88)90109-6

IEA, 2022. Biofuel production by country/region and fuel type, 2016-2022, IEA, Paris https://www.iea.org/data-and-statistics/charts/biofuel-production-by-country-region-and-fuel-type-2016-2022

IFP Energies nouvelles, 2020. Quel avenir pour les biocarburants ? URL: <https://www.ifpenergiesnouvelles.fr/enjeux-et-prospective/decryptages/energies-renouvelables/quel-avenir-les-biocarburants>. Accessed 2 December 2020.

IPCC, 2022. Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC), Sixth Assessment Report (AR6), Group 1: The Physical Science Basis. https://www.ipcc.ch/report/ar6/wg1/ (consulté le 30/08/2022).

Ivanova, C., Ramoni, J., Aouam, T., Frischmann, A., Seiboth, B., Baker, S.E., Le Crom, S., Lemoine, S., Margeot, A., Bidard, F., 2017. Genome sequencing and transcriptome analysis of *Trichoderma reesei* QM9978 strain reveals a distal chromosome translocation to be responsible for loss of vib1 expression and loss of cellulase induction. Biotechnology for biofuels 10, 209. DOI: 10.1186/s13068-017-0897-7

Jourdier, E., 2012. Modélisation et optimisation de la production de cellulases par *Trichoderma reesei* pour les bioraffineries lignocellulosiques. Doctoral dissertation, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand, France.

Jourdier, E., Ben Chaabane, F., Poughon, L., Larroche, C., Monot, F., 2012a. Simple kinetic model of cellulase production by *Trichoderma Reesei* for productivity or yield maximization. Chemical Engineering Transactions 27, 313–318.

Jourdier, E., Poughon, L., Larroche, C., Monot, F., Ben Chaabane, F., 2012b. A new stoichiometric miniaturization strategy for screening of industrial microbial strains: application to cellulase hyper-producing *Trichoderma reesei* strains. Microbial Cell Factories 11, 70. DOI: 10.1186/1475-2859-11-70

Jourdier, E., Cohen, C., Poughon, L., Larroche, C., Monot, F., Ben Chaabane, F., 2013. Cellulase activity mapping of *Trichoderma reesei* cultivated in sugar mixtures under fed-batch conditions. Biotechnol. Biofuels 6 (79). DOI: 10.1186/1754-6834-6-79

Jourdren, L., Bernard, M., Dillies, M.-A., Le Crom, S., 2012. Eoulsan: a cloud computing-based framework facilitating high throughput sequencing analyses. Bioinformatics 28 (11), 1542–1543. DOI: 10.1093/bioinformatics/bts165

Jun, H., Guangye, H., Daiwen, C., 2013. Insights into enzyme secretion by filamentous fungi: Comparative proteome analysis of *Trichoderma reesei* grown on different carbon sources. J. Proteom. 89, 191–201. DOI: 10.1016/j.jprot.2013.06.014

Junne, S., Klingner, A., Kabisch, J., Schweder, T., Neubauer, P., 2011. A two-compartment bioreactor system made of commercial parts for bioprocess scale-down studies. Impact of oscillations on Bacillus subtilis fed-batch cultivations. Biotechnology Journal, 6(8), 1009–1017. DOI: 10.1002/biot.201100293

Jüsten, P., Paul, G.C., Nienow, A.W., Thomas, C.R., 1996. Dependence of mycelial morphology on impeller type and agitation intensity. Biotechnol. Bioeng. 52, 672–684. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0290(19961220)52:6<672::AID-BIT5>3.0.CO;2-L

Jüsten, P., Paul, G.C., Nienow, A.W., Thomas, C.R., 1998. Dependence of *Penicillium chrysogenum* growth, morphology, vacuolation, and productivity in fed-batch fermentations on impeller type and agitation intensity. Biotechnol. Bioeng. 59 (6), 762–775. DOI: 10.1002/(sici)1097-0290(19980920)59:6<762::aid-bit13>3.0.co;2-7

Juturu, V., Wu, J.C., 2014. Microbial cellulases: Engineering, production and applications. Renewable and Sustainable Energy Reviews 33, 188–203. DOI: 10.1016/j.rser.2014.01.077

Käß, F., Junne, S., Neubauer, P., Wiechert, W., Oldiges, M., 2014. Process inhomogeneity leads to rapid side product turnover in cultivation of *Corynebacterium glutamicum*. Microbial Cell Factories, 13(6) 1–10. DOI: 10.1186/1475-2859-13-6

Kashyap, P.L., Rai, A., Singh, R., Chakdar, H., Kumar, S., Srivastava, A.K., 2016. Deciphering the salinity adaptation mechanism in *Penicilliopsis clavariiformis* AP, a rare salt tolerant fungus from mangrove. J. Basic Microbiol. 56, 779–791. DOI: 10.1002/jobm.201500552.

Kim, H.-R., Chae, K.-S., Han, K.-H., Han, D.-M., 2009. The *nsdC* gene encoding a putative C_2H_2-type transcription factor is a key activator of sexual development in *Aspergillus nidulans*. Genetics 182 (3), 771–783. DOI: 10.1534/genetics.109.101667.

Kubicek, C.P., 2013. Systems biological approaches towards understanding cellulase production by *Trichoderma reesei*. J. Biotechnol. 163, 133–142. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2012.05.020.

Kumar, R., Singh, S., Singh, O.V., 2008. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 35, 377–391. DOI: 10.1007/s10295-008-0327-8.

Kwon, N.-J., Garzia, A., Espeso, E.A., Ugalde, U., Yu, J.-H., 2010. FlbC is a putative nuclear C_2H_2 transcription factor regulating development in *Aspergillus nidulans*. Molecular Microbiology 77 (5), 1203–1219. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2010.07282.x.

Lara, A., Galindo, E., Ramírez, O., Palomares, L., 2006. Living with heterogeneities in bioreactors: Understanding the effects of environmental gradients on cells. Mol. Biol. 34, 355–382. DOI: 10.1385/MB:34:3:355.

Leghlimi, H., 2013. Cellulase de souches fongiques issue du sol d'un milieu extrême (sol proche de sources thermales): Sélection des souches et étude des caractéristiques des enzymes, Reims, France.

Lei, Y., Liu, G., Yao, G., Li, Z., Qin, Y., Qu, Y., 2016. A novel bZIP transcription factor ClrC positively regulates multiple stress responses, conidiation and cellulase expression in Penicillium oxalicum. Research in Microbiology 167 (5), 424–435. DOI: 10.1016/j.resmic.2016.03.001.

Lejeune, R., Baron, G.V., 1995. Effect of agitation on growth and enzyme production of *Trichoderma reesei* in batch fermentation. Appl. Microbiol. Biotechnol. 43, 249–258. DOI: 10.1007/BF00172820

Lemoine, A., Delvigne, F., Bockisch, A., Neubauer, P., Junne, S., 2017. Tools for the determination of population heterogeneity caused by inhomogeneous cultivation conditions. J. Biotechnol. 251, 84–93. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2017.03.020.

Limayem, A., Ricke, S.C., 2012. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. Progress in Energy and Combustion Science 38 (4), 449–467. DOI: 10.1016/j.pecs.2012.03.002

Limberg, M.H., Pooth, V., Wiechert, W., Oldiges, M., 2016. Plug flow versus stirred tank reactor flow characteristics in two-compartment scale-down bioreactor. Setup-specific influence on the metabolic phenotype and bioprocess performance of *Corynebacterium glutamicum*. Engineering in Life Sciences, 16(7), 610–619. DOI: 10.1002/elsc.201500142

Lo, C.-M., Zhang, Q., Callow, N.V., Ju, L.-K., 2010. Roles of extracellular lactose hydrolysis in cellulase production by *Trichoderma reesei* Rut C30 using lactose as inducing substrate. Process Biochemistry 45 (9), 1494–1503. DOI: 10.1016/j.procbio.2010.05.031

Lopes Ferreira, N., Hudebine, D., Ben Chaabane, F., 2010. Chapitre 6 : Production de biocarburants à partir de ressources agricoles, in: Baumberger S. (coord.), Chimie verte et industries agroalimentaires : Vers une bioéconomie durable. Lavoisier Tech&Doc, Paris.

Lopes Ferreira, N.L., Margeot, A., Blanquet, S., Berrin, J.-G., 2014. Use of cellulases from *Trichoderma reesei* in the twenty-first century — Part I: Current industrial uses and future applications in the production of second ethanol generation, in: Gupta, V.K., Schmoll, M., Herrera-Estrella, A., Upadhyay, R.S., Druzhinina, I., Tuhoy, M.G. (Eds.), Biotechnology and Biology of *Trichoderma*. Elsevier, pp. 245–261.

Lynd, L.R., Weimer, P.J., van Zyl, W.H., Pretorius, I.S., 2002. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. Microbiology and Molecular Biology Reviews 66 (3), 506–577. DOI: 10.1128/MMBR.66.3.506-577.2002

McCormick, A., Jacobsen, I.D., Broniszewska, M., Beck, J., Heesemann, J., Ebel, F., 2012. The two-component sensor kinase TcsC and its role in stress resistance of the human-pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*. PloS one 7 (6), DOI: e38262. 10.1371/journal.pone.0038262

Macauley-Patrick, S., Finn, B., 2008. Modes of Fermenter Operation, in: Mc Neil, B., Harvey, M.L. (Eds.), Practical fermentation technology. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, pp. 69–95.

Mandels, M., Reese, E.T., 1957. Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon sources and metals. Journal of Bacteriology 73, 269–278. DOI: 10.1128/jb.73.2.269-278.1957

Mandels, M., Weber, J., 1969. The production of cellulases. In: Reese, E. T. et Hajny, G. J., (coord.), Cellulases and their applications. American Chemical Society, p. 391–414.

Marten, M., Velkvska, S., Khan, S., Ollis, D., 1996. Rheological, mass transfer, and mixing characterization of cellulase-producing *Trichoderma reesei* suspensions. Biotechnol. Prog. 12 (5), 602–611. DOI: 10.1021/bp950066b

Martzy, R. Mello-de-Sousa, T.M., Mach, R.L., Yaver, D., Mach-Aigner, A.R., 2021. The phenomenon of degeneration of industrial *Trichoderma reesei* strains. Biotechnology for Biofuels. BioMed Central, 14(1), 1–14. DOI: 10.1186/s13068-021-02043-4.

Metz, B., Kossen, N.W.F., van Suijdam, J.C., 1979. The rheology of mould suspensions, in: Advances in Biochemical Engineering. Springer, Berlin, Heidelberg.

Metzner, A. B., Otto, R. E., 1957. Agitation of non-Newtonian fluids. American Institute of Chemical Engineers Journal, 3(1), 3–10. DOI: 10.1002/aic.690090427

Ministère de la transition écologique, 2019. Les émissions de gaz à effet de serre des transports - L'environnement en France 2019, 22 p. URL: <https://ree.developpement-durable.gouv.fr/themes/defis-environnementaux/changement-climatique/emissions-de-gaz-a-effet-de-serre/article/les-emissions-de-gaz-a-effet-de-serre-des-transports>. Accessed 2 December 2020.

Ministère de la transition écologique, 2020. Biocarburants. URL: <https://www.ecologie.gouv.fr/biocarburants>. Accessed 2 December 2020.

Morales, M., Quintero, J., Conejeros, R., Aroca, G., 2015. Life cycle assessment of lignocellulosic bioethanol: Environmental impacts and energy balance. Renew. Sustain. Energy Rev. 42, 1349–1361. DOI: 10.1016/j.rser.2014.10.097

Mukataka, S., Kobayashi, N., Sato, S., Takahashi, J., 1988. Variation in cellulase-constituting components from *Trichoderma reesei* with agitation intensity. Biotechnol. Bioeng. 32, 760–763. DOI: 10.1002/bit.260320606

Müller, C., Spohr, A.B., Nielsen, J., 2000. Role of substrate concentration in mitosis and hyphal extension of *Aspergillus*. Biotechnology & Bioengineering 67 (4), 390. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0290(20000220)67:4<390:AID-BIT2>3.3.CO;2-F

Muthuvelayudham, R., Viruthagiri, T., 2007. Optimization and modeling of cellulase protein from *Trichoderma reesei* Rut C30 using mixed substrate. African Journal of Biotechnology, 6(1), 41–46.

Nagai, S., Onodera, M., Aiba, S., 1976. Kinetics of extracellular cellulase and amylase production from *Trichoderma sp*. European J. Appl. Microbiol. 3, 9–18.

Nevalainen, H., Peterson, R., 2014. Making recombinant proteins in filamentous fungi- are we expecting too much? Front. Microbiol. 5, 75. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00075.

Nitta, M., Shida, Y., Okada, H., Osumi, M., Ogasawara, W., 2012. Hyphal surface architecture and cell morphology of *Trichoderma reesei*. Journal of electron microscopy 61 (3), 187–192. DOI: 10.1093/jmicro/dfs037

Noorman, H., 2011. An industrial perspective on bioreactor scale-down: What we can learn from combined large-scale bioprocess and model fluid studies. Biotechnology Journal, 6 (8), 934–943. DOI: 10.1002/biot.201000406

Oosterhuis, N.M., Kossen, N.W., Olivier, A.P., Schenk, E.S., 1985. Scale-down and optimization studies of the gluconic acid fermentation by *Gluconobacter oxydans*. Biotechnology and Bioengineering, 27(5), 711–720. DOI: 10.1002/bit.260270521

Oosterhuis, N.M., 1984. Scale-up of bioreactors: A scale-down approach. Doctoral dissertation, TU Delft, Pays-Bas.

Pakula, T.M., Salonen, K., Uusitalo, J., Penttilä, M., 2005. The effect of specific growth rate on protein synthesis and secretion in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. Microbiology 151, 135–143. DOI: 10.1099/mic.0.27458-0

Patel, N., Choy, V., Malouf, P., Thibault, J., 2009. Growth of *Trichoderma reesei* RUT C-30 in stirred tank and reciprocating plate bioreactors. Process Biochemistry 44 (10), DOI: 1164–1171. 10.1016/j.procbio.2009.06.011

Paul, G.C., Thomas, C.R., 1998. Characterisation of mycelial morphology using image analysis, in: Schügerl K. (Ed.), Relation between morphology and process performances. Springer, Berlin, Heidelberg.

Peciulyte, A., Anasontzis, G.E., Karlström, K., Larsson, P.T., Olsson, L., 2014. Morphology and enzyme production of *Trichoderma reesei* Rut C-30 are affected by the physical and structural characteristics of cellulosic substrates. Fungal Genetics and Biology 72, 64–72. DOI: 10.1016/j.fgb.2014.07.011

Peng, M. and Liang, Z., 2020. Degeneration of industrial bacteria caused by genetic instability. World Journal of Microbiology and Biotechnology 36(8), 1–16. DOI: 10.1007/s11274-020-02901-7

Percival Zhang, Y.-H., Himmel, M.E., Mielenz, J.R., 2006. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. Biotechnology advances 24 (5), 452–481. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2006.03.003

Peterson, R., Nevalainen, H., 2012. *Trichoderma reesei* RUT-C30 – thirty years of strain improvement. Microbiology 158, 58–68. DOI: 10.1099/mic.0.054031-0

Pickart, C.M., 1999. Ubiquitin and the stress response, in: Latchman, D.S. (Ed.), Stress Proteins: Handbook of Experimental Pharmacology. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 133–152.

Poon, P.P., Nothwehr, S.F., Singer, R.A., Johnston, G.C., 2001. The Gcs1 and Age2 ArfGAP proteins provide overlapping essential function for transport from the yeast trans-Golgi network. The Journal of Cell Biology 155 (7), 1239–1250. DOI: 10.1083/jcb.200108075

Portnoy, T., Margeot, A., Seidl-Seiboth, V., Le Crom, S., Ben Chaabane, F., Linke, R., Seiboth, B., Kubicek, C. P., 2011. Differential regulation of the cellulase transcription factors XYR1, ACE2, and ACE1 in *Trichoderma reesei* strains producing high and low levels of cellulase. Eukaryotic cell, 10(2), 262-271. DOI: 10.1128/EC.00208-10

Quintanilla, D., Hagemann, T., Hansen, K., Gernaey, K.V., 2015. Fungal morphology in industrial enzyme production- Modelling and monitoring. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology 149, 29–54. DOI: 10.1007/10_2015_309

Raggam, R.B., Salzer, H.J.F., Marth, E., Heiling, B., Paulitsch, A.H., Buzina, W., 2011. Molecular detection and characterisation of fungal heat shock protein 60. Mycoses 54, 394-399. DOI: 10.1111/j.1439-0507.2010.01933.x

Reese, E.T., Ryu, D.Y., 1980. Shear inactivation of cellulase of *Trichoderma reesei*. Enzyme Microbiology and Technology 2(3), 239–240. DOI: 10.1016/0141-0229(80)90054-X

Reusser, F. (1963). Stability and degeneration of microbial cultures on repeated transfer. Advances in Applied Microbiology. Academic Press, 5(C), 189–215. DOI: 10.1016/S0065-2164(08)70011-X

Ribeiro, G.O., Gruninger, R.J., Badhan, A., McAllister, T.A., 2016. Mining the rumen for fibrolytic feed enzymes. Animal Frontiers 6 (2), 20–26. DOI: 10.2527/af.2016-0019

Rocha-Valadez, J., Galindo, E., Serrano-Carreón, L., 2007. The influence of circulation frequency on fungal morphology: dissipation rate cultures of *Trichoderma harzianum*. J. Biotechnol. 130 (4), 394–401. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2007.05.001

Roller, C., Maddalo, D., 2013. The molecular chaperone GRP78/BiP in the development of chemoresistance: mechanism and possible treatment. Front. Pharmacol. 4, e00010, 1–5. DOI: 10.3389/fphar.2013.00010

Rousset, R., 2019. Modèle de production d'enzymes 2019. Note technique. IFP Energies Nouvelles.

Rugbjerg, P., Sommer, M.O.A., 2019. Overcoming genetic heterogeneity in industrial fermentations. Nature Biotechnology 37 (8), 869–876. DOI: 10.1038/s41587-019-0171-6

Schroeder, J. W., Yeesin, P., Simmons, L. A., Wang, J. D., 2018. Sources of spontaneous mutagenesis in bacteria. Critical reviews in biochemistry and molecular biology, 53(1), 29-48. DOI: 10.1080/10409238.2017.1394262

Shang, F., Taylor, A., 2011. Ubiquitin-proteasome pathway and cellular responses to oxidative stress. Free Radical Biology and Medecine, 51, 5–16. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.03.031

Singhania, R.R., Sukumaran, R.K., Patel, A.K., Larroche, C., Pandey, A., 2010. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. Enzyme Microbiology and Technology 46 (7), 541–549. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2010.03.010

Soni, S.K., Sharma, A., Soni, R., 2018. Cellulases: Role in lignocelullosic biomass utilization, in: Lübeck, M. (Ed.), Cellulases. Humana Press, New York, NY.

Stappler, E., Walton, J.D., Beier, S., Schmoll, M., 2017. Abundance of secreted proteins of *Trichoderma reesei* is regulated by light of different intensities. Frontiers in Microbiology, 8, e02586, 1–14. DOI: 10.3389/fmicb.2017.02586

Staszczak, M., 2008. The role of the ubiquitin-proteasome system in the response of the ligninolytic fungus *Trametes versicolor* to nitrogen deprivation. Fungal Genetics and Biology 45, 328–337. DOI: 10.1016/j.fgb.2007.10.017

Stocks, S.M., Nienow, A.W., 2018. Scale-up, scale-down of stirred bioreactors, in: Berovic, M., Hewitt, C.J. (Eds.), Principles of comprehensive bioprocess engineering. (Exclusively for the participants of BEC 2018), University of Ljubljana, Slovenia, pp. 164–195.

Sun, X., Wang, F., Lan, N., Liu, B., Hu, C., Xue, W., Zhang, Z., Li, S., 2019. The Zn(II)2Cys6-type transcription factor ADA-6 regulates sonidiation, sexual development, and oxidative stress response in *Neurospora crassa*. Frontiers in Microbiology 10, 750. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00750

Takors, R., 2012. Scale-up of microbial processes: Impacts, tools and open questions. J. Biotechnol. 160 (1-2), 3–9. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2011.12.010

Tani, S., Katsuyama, Y., Hayashi, T., Suzuki, H., Kato, M., Gomi, K., Kobayhasi, T. Tsukagoshi, N., 2001. Characterization of the *amyR* gene encoding a transcriptional activator for the

amylase genes in *Aspergillus nidulans*. Current Genetics 39, 10–15. DOI: 10.1007/s002940000175

Tian, C., Lin, L., Li, J., Qi, X., Li, H., Xu, J., Liu, Q., e Gao, R., 2016. Method for enhancing protein production of filamentous fungi. Patent CN106190874A, Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy, 11 pages. <https://patents.google.com/patent/CN106190874A/en>

Tiwari, S., Thakur, R., Shankar, J., 2015. Role of heat-shock proteins in cellular function and in the biology of fungi. Biotechnology Research International, 1–11. DOI: 10.1155/2015/132635.

Wang, Y., Delettre, J., Corrieu, G., Béal, C., 2011. Starvation induces physiological changes that act on the cryotolerance of *Lactobacillus acidophilus* RD758. Biotechnology Progress 27 (2), 342–350. DOI: 10.1002/btpr.566

Wang, L., Lv, X., Cao, Y., Zheng, F., Meng, X., Shen, Y., Chen, G., Liu, W., Zhang, W., 2019. A novel transcriptional regulator RXE1 modulates the essential transactivator XYR1 and cellulase gene expression in *Trichoderma reesei*. Applied Microbiology and Biotechnology 103 (11), 4511–4523. DOI: 10.1007/s00253-019-09739-6

Wessels, J.G.H., 1993. Wall growth, protein excretion and morphogenesis in fungi. New Phytologist 123, 397–413. DOI: 10.1111/j.1469-8137.1993.tb03751.x

Wösten, H.A., Moukha, S.M., Sietsma, J.H., Wessels, J.G., 1991. Localization Localization of growth and secretion of proteins in *Aspergillus niger*. Journal of General Microbiology 137, 2017–2023. DOI: 10.1099/00221287-137-8-2017

Wösten, H.A.B., van Veluw, G.J., Bekker, C. de, Krijgsheld, P., 2013. Heterogeneity in the mycelium: implications for the use of fungi as cell factories. Biotechnology Letters 35 (8), 1155–1164. DOI: 10.1007/s10529-013-1210-x

Zhang, X., Blalock, B., Huberty, W., Chen, Y., Hung, F., Russo, P.S., 2019. Microbubbles and oil droplets stabilized by a class II hydrophobin in marine-like environments. Langmuir: the ACS Journal of Surfaces and Colloids, 35(12), 4380–4386. DOI: 10.1021/acs.langmuir.8b03777