

## **REMERCIEMENTS**

*Au terme de ce travail, je souhaite remercier les nombreuses personnes qui de près ou de loin m'ont aidé et soutenu dans l'accomplissement de ce travail de fin d'étude.*

*Le Professeur Philippe Thonart pour m'avoir accueilli au sein de l'Unité de Bio-Industries.*

*Le Docteur Frank Delvigne, promoteur de ce travail, pour sa disponibilité et son œil avisé sur la progression de mon travail.*

*Le Docteur Stéphane Guillouet de l'INSA de Toulouse pour le choix de la thématique abordée au cours de ce travail.*

*Le laboratoire de l'Unité de biologie moléculaire pour la mise à disposition du cytomètre de flux.*

*Sam Telek et Benoit Massaux pour leur précieuse assistance lors de la réalisation des productions de levure en salle de fermentation.*

*L'ingénieur Sébastien Gofflot du C.R.A.W. pour sa contribution dans le dosage des co-produits de fermentation par HPLC.*

*Les ingénieurs Annick Lejeune, Céline Pierart, Alison Brognaux et Christophe Thiry pour le partage de leur expérience et de leurs connaissances.*

*D'une manière générale, l'ensemble du personnel de l'Unité de Bio-Industries pour l'accueil, la convivialité et l'ambiance détendue des pauses café.*

*Antoine, Pierre, Lorraine et toute la clique pour la motivation mutuelle entretenue au long de notre labeur.*

*L'Association Générale des étudiants pour tous ces moments formidables passés à Gembloux.*

*Mathilde pour son soutien et ses encouragements durant ces six derniers mois.*

*Enfin, mes parents pour m'avoir permis d'accomplir ces études et pour la confiance qu'ils m'ont accordée au cours de ces cinq années!*

## RESUME

La technologie *scale-down* permet de reproduire à l'échelle du laboratoire les hétérogénéités générées par les réacteurs de taille industrielle. Dans ce type de bioréacteur, la production *fed-batch* de *Saccharomyces cerevisiae* sur glucose induit l'apparition de l'effet *scale-down*. Il s'agit d'une diminution de la synthèse de biomasse au profit de la production d'éthanol ainsi qu'une augmentation de la durée de culture par rapport à un réacteur de référence dans lequel l'opération de mélange est parfaite.

Dans une étude récente, FERIA-GERVASIO *et al.*, (2008) observent qu'en présence d'un substrat mixte composé de glucose et d'acide oléique, la production d'éthanol est retardée au profit de la synthèse de biomasse suite à un pulse de glucose dans un chimostat en limitation glucose. L'idée de ce travail de fin d'étude est d'observer l'impact de l'acide oléique sur l'effet *scale-down* dans une production *fed-batch* de *Saccharomyces cerevisiae* (*boulardii*).

La méthodologie est répartie en 3 volets:

- la mise au point d'un protocole de conditionnement des levures à l'acide oléique
- la production *fed-batch* de levure à partir d'un substrat mixte composé de glucose et d'acide oléique en réacteur *scale-down*
- la modélisation informatique des gradients de glucose ressentis par les levures au cours de leurs déplacements dans le réacteur

Outre l'étude de la cinétique de croissance des levures, une analyse phénotypique originale des levures a été réalisée au cours de chaque culture grâce à la cytométrie en flux.

Au terme de ce travail, la coloration des vacuoles au fluoro-isothiocyanate a permis d'observer indirectement l'induction des peroxysomes inférée par le conditionnement des levures grâce à la cytométrie en flux. Ensuite, il a été démontré que dans une culture en réacteur *scale-down* précédée d'un conditionnement, l'acide oléique atténuait naturellement la production d'éthanol au profit de la synthèse de biomasse par rapport à une levure cultivée sur glucose en réacteur *scale-down*. La cytométrie en flux n'a pas recensée une influence négative de l'acide oléique sur la viabilité cellulaire des levures. Finalement, la simulation des gradients de glucose éprouvés par les levures dans le réacteur *scale-down* avec acide oléique a démontré que les levures font face à des fluctuations importantes de substrat dans la boucle de recirculation.

Mots-clés : *scale-down*, acide oléique, effet Crabtree, cytométrie de flux, *Saccharomyces cerevisiae*

## ABSTRACT

*Scale-down* technology allows to simulate heterogeneities created in an industrial reactor at a laboratory scale. In this kind of bioreactor, *fed-batch* production of *Saccharomyces cerevisiae* on glucose induces the apparition of the *scale-down* effect. It means a decrease in biomass synthesis and an increase in ethanol production as time of culture in comparison with an ideal bioreactor where the mixing operation is perfect.

In a recent study, FERIA-GERVASIO *et al.*, (2008) notice that ethanol production is delayed on behalf biomass synthesis when a glucose pulse occurs in a chemostat glucose/oleic acid. The goal of this work is to study the modulation of the *scale-down* effect by the presence of oleic acid in a *fed-batch* production of *Saccharomyces cerevisiae (boulardii)*.

The methodology is separated in three parts:

- development of a yeast conditioning protocol with oleic acid
- yeast production with a mixed substrate composed of glucose and oleic acid in a *scale-down* reactor
- computer simulation of glucose gradients experienced by yeast during their displacement in the bioreactor

In addition to the measurements performed to describe growth kinetic of yeast on this mixed substrate, an original phenotypic analysis of yeast has been achieved throughout each culture thanks to flow cytometry.

At the end of this work, vacuoles staining with fluoro-isothiocyanate has revealed the induction of peroxisomes inferred during the yeast conditioning by flow cytometry. Then, it was demonstrated that in a culture in a *scale-down* reactor preceded by the conditioning, oleic acid naturally reduces ethanol production for the benefit of the biomass synthesis in comparison with a yeast cultivated on glucose only in *scale-down* reactors. Flow cytometry has not identified a negative influence of oleic acid on cell viability. Finally, simulation of glucose gradients experienced by yeast in the *scale-down* reactor with oleic acid has demonstrated that yeast feel important extracellular fluctuations in the recycle loop.

Keywords : *scale-down*, oleic acid, Crabtree effect, flow cytometry, *Saccharomyces cerevisiae*

## TABLES DES MATIERES

I	Introduction .....	1
II	Synthèse bibliographique .....	3
II.1	Technologies pour la mise en place d'une culture <i>fed-batch</i> et son extrapolation à l'échelle industrielle.....	3
II.1.1	Cinétique de croissance microbienne .....	3
II.1.2	Le mode de culture <i>fed-batch</i> .....	4
II.1.3	Le bioréacteur.....	6
II.1.4	Dimensionnement d'un bioréacteur .....	7
II.1.5	Les approches de l'extrapolation .....	8
II.2	Impact des conditions de mélange du bioréacteur .....	10
II.2.1	Les phénomènes de transfert .....	11
II.2.2	Les critères de performance de l'opération mélange .....	11
II.3	Adaptations métaboliques de la levure face au stress des procédés.....	13
II.3.1	Généralités du métabolisme nutritionnel chez la levure.....	14
II.3.2	Besoins nutritionnels .....	14
II.3.3	La respiration et la fermentation .....	15
II.3.4	Métabolisme et régulation du glucose chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	17
II.3.5	Métabolisme de l'acide oléique chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	19
II.4	Adaptations morphologiques de la levure face aux stress des procédés .....	22
II.4.1	L'enveloppe cellulaire .....	22
II.4.2	Le cytoplasme et le cytosquelette.....	22
II.4.3	Système sécrétoire et vacuoles .....	23
II.4.4	La mitochondrie .....	23
III	Objectifs du travail de fin d'étude .....	24
IV	Matériel et méthodes .....	24
IV.1	Methodologie suivie .....	24
IV.2	Souche et milieux de cultures utilisés .....	25
IV.3	Mise au point d'un protocole de conditionnement des levures.....	27
IV.3.1	Matériel .....	27
IV.3.2	Protocoles .....	28
IV.4	Mise en œuvre des cultures <i>fed-batch</i> de <i>S. boulardii</i> .....	31
IV.4.1	Description du bioréacteur de référence .....	32
IV.4.2	Description du bioréacteur <i>scale-down</i> .....	33
IV.4.3	Culture <i>fed-batch</i> sans oléate (témoin) .....	33

IV.4.4	Culture <i>fed-batch</i> avec oléate .....	34
IV.4.5	Régulation de l'ajout de substrat au cours de la culture <i>fed-batch</i> .....	35
IV.5	Modélisation de l'hydrodynamique des réacteurs .....	36
IV.5.1	Détermination de la distribution des temps de séjour .....	36
IV.5.2	Simulation de la concentration en glucose au cours du temps .....	36
IV.5.3	Simulation du déplacement d'une levure dans le réacteur <i>scale-down</i> .....	37
IV.6	Protocole des différentes analyses effectuées .....	38
IV.6.1	Mesure de la concentration en biomasse .....	38
IV.6.2	Mesure de la viabilité cellulaire .....	38
IV.6.3	Observation de la prolifération des peroxyosomes .....	39
IV.6.4	Analyse des échantillons par cytométrie de flux .....	40
IV.6.5	Dosage de l'éthanol .....	40
V	Résultats et discussions .....	41
V.1	Mise au point d'un protocole de conditionnement des levures à l'acide oléique .....	41
V.1.1	Objectif .....	41
V.1.2	Démarche suivie et description générale du conditionnement .....	42
V.1.3	Analyse phénotypique des levures conditionnées par cytométrie en flux .....	42
V.1.4	Résultats .....	46
V.1.5	Conclusion .....	54
V.2	Impact de l'acide oléique sur les cultures <i>fed-batch</i> de <i>S. cerevisiae (boulardii)</i> en réacteur <i>scale-down</i> .....	55
V.2.1	Objectif .....	55
V.2.2	Méthodologie et description des réacteurs utilisés .....	56
V.2.3	Résultats .....	57
V.2.4	Conclusion .....	69
V.3	Simulation des concentrations en glucose rencontrées par les levures dans le réacteur <i>scale-down</i> avec acide oléique .....	70
V.3.1	Objectifs .....	70
V.3.2	Démarche suivie .....	70
V.3.3	Résultats .....	71
VI	Conclusions et perspectives .....	73
VII	Références bibliographiques .....	75
VIII	Annexes .....	80
VIII.1	Droites de corrélation entre la densité optique et la matière sèche .....	80
VIII.1.1	Milieu de culture sans acide oléique .....	80
VIII.1.2	Milieu de culture avec acide oléique .....	80

VIII.2	Dosage de l'éthanol.....	81
VIII.3	Conditionnement <i>batch</i> des levures dans un milieu tréhalose/l'acide oléique .....	82
VIII.4	Mortalité cellulaire des levures en cours de culture <i>fed-batch</i> .....	84
VIII.4.1	Réacteur de référence .....	84
VIII.4.2	Réacteur <i>scale-down</i> .....	84
VIII.5	Activité métabolique des levures en fin de culture <i>fed-bach</i> .....	85
VIII.5.1	Réacteur de référence .....	85
VIII.5.2	Réacteur <i>scale-down</i> .....	85
VIII.6	Simulation stochastique du déplacement des cellules dans le réacteur <i>scale-down</i>	86

## LISTE DES FIGURES

Figure 1. Evolution du taux de croissance ( $\mu$ ) en fonction du substrat (THONART, 2009).....	3
Figure 2. Courbe de cinétique microbienne (THONART, 2009).....	4
Figure 3. Régulation indirecte de l'ajout de substrat (la pompe s'active si la pO <sub>2</sub> est supérieure à 30 %). .....	6
Figure 4. Géométrie standard d'un bioréacteur (THONART, 2009).....	7
Figure 5. Illustration du gradient de concentration créé dans un bioréacteur lors d'un apport de substrat (DELVIGNE, 2010). .....	10
Figure 6. Phénomènes de transfert au sein d'un bioréacteur agité (DELVIGNE, 2010). .....	11
Figure 7. Evolution du temps de mélange en fonction de la puissance volumique fournie au fluide pour des réacteurs de tailles diverses (DELVIGNE, 2006). .....	13
Figure 8. Métabolisme du carbone chez la levure (WALKER, 1998).....	15
Figure 9. Bilan chimique de la respiration et de la fermentation. ....	16
Figure 10. Capacité respiratoire limite de la levure <i>S. cerevisiae</i> . (a) représente un excès de glucose convertit en éthanol (SONNLEITNER et KÄPPELI, 1986). .....	18
Figure 11. Devenir de l'acide oléique dans une cellule de levure (FERA-GERVASIO <i>et al.</i> , 2008).....	21
Figure 12. Fiole utilisée pour le conditionnement des levures + système de prélèvement et mesure de la pO <sub>2</sub> . .....	27
Figure 13. Protocole de conditionnement <i>batch</i> des levures au glucose et glucose/acide oléique.....	29
Figure 14. Protocole de conditionnement <i>fed-batch</i> des levures au glucose et glucose/acide oléique..	30
Figure 15. Protocole de conditionnement <i>batch</i> des levures au tréhalose et tréhalose/acide oléique. ..	31
Figure 16. Schéma d'un réacteur de référence et d'un réacteur <i>scale-down</i> . .....	33
Figure 17. Schéma décrivant la mise en œuvre des cultures <i>fed-batch</i> sans acide oléique en réacteur de référence et en réacteur <i>scale-down</i> . .....	34
Figure 18. Schéma décrivant la mise en œuvre des cultures <i>fed-batch</i> avec acide oléique en réacteur de référence et en réacteur <i>scale-down</i> . .....	35
Figure 19. Dispositif de mesure de la DTS expérimentale.....	36

Figure 20. Evaluation de la mortalité cellulaire. a) Cytogramme (FSC,FL3) d'un témoin positif. b) Cytogramme (FSC,FL3) d'un échantillon en croissance exponentielle. C) Photographie par microscopie à fluorescence d'un échantillon en fin de culture. ....	43
Figure 21. Evaluation de l'activité métabolique par coloration au FUN-1. a) Cytogramme (FL3,FL1) d'un échantillon en phase de croissance exponentielle. b) Photographie x40 au microscope à fluorescence.....	44
Figure 22. Coloration des vacuoles cellulaires au fluoro-isothiocyanate (FITC). a) Cytogramme (SSC,FL3) d'un échantillon en phase de croissance exponentielle. b) Photographie de cellules en croissance exponentielle à l'aide de la microscopie à fluorescence (x100).....	46
Figure 23. Résultats du conditionnement <i>batch</i> . a) Profil de la pression en oxygène dissout. b) Rendements de bioconversion. c) Evolution de la densité optique au cours du conditionnement. ....	47
Figure 24. Evolution de la mortalité cellulaire au cours du conditionnement <i>batch</i> . ....	48
Figure 25. Résultats du conditionnement <i>fed-batch</i> . a) Profil de la pression en oxygène dissout. b) Rendements de bioconversion. c) Evolution de la densité optique au cours du conditionnement. ....	49
Figure 26. Evolution de la mortalité cellulaire au cours du conditionnement <i>fed-batch</i> .....	50
Figure 27. Résultats du conditionnement <i>batch</i> tréhalose/acide oléique. a) Profil de la pression en oxygène dissout. b) Rendements de bioconversion. c) Evolution de la densité optique au cours du conditionnement. ....	52
Figure 28. Evolution de la mortalité cellulaire au cours du conditionnement <i>batch</i> tréhalose/acide oléique. ....	53
Figure 29. Evolution de la fluorescence émise par la vacuole au cours du conditionnement <i>batch</i> tréhalose/acide oléique. ....	54
Figure 30. Evolution de différents paramètres au cours des cultures témoins en réacteur <i>scale-down</i> et en réacteur de référence. a) Profil de la pression en oxygène dissout. b) Courbe de croissance. c) Evolution de la teneur en éthanol dans le milieu de culture (g/litre).....	59
Figure 31. Caractérisation du réacteur <i>scale-down</i> a) Modèle hydrodynamique d'un réacteur <i>scale-down</i> , le réacteur est compartimenté en zones parfaitement mélangées (n=150 et q=10,9 litre/h) (DELVIGNE <i>et al.</i> , 2010) b) DTS des cellules dans la boucle de recirculation. ....	60
Figure 32. Evolution de différents paramètres au cours des cultures d'essai en réacteur <i>scale-down</i> et en réacteur de référence. a) Profil de la pression en oxygène dissout. b) Courbe de croissance. c) Evolution de la teneur en éthanol dans le milieu de culture (g/litre).....	61
Figure 33. Cytogrammes illustrant l'évolution de la fluorescence des vacuoles au cours du conditionnement en réacteur de référence et en réacteur <i>scale-down</i> . ....	63



Figure 34. Comparaison des teneurs en biomasse (a) et en éthanol (b) dans le réacteur de référence pour le témoin et l'essai. c) Valeur des rendements de bioconversion et de la productivité cellulaire au cours du <i>fed-batch</i> . .....	65
Figure 35. Comparaison de l'évolution de la pO <sub>2</sub> entre le témoin et l'essai dans le réacteur de référence. ....	66
Figure 36. Comparaison des teneurs en biomasse (a) et en éthanol (b) dans le réacteur <i>scale-down</i> pour le témoin et l'essai. c) Valeur des rendements de bioconversion et de la productivité cellulaire au cours du <i>fed-batch</i> . ....	67
Figure 37. Analyse fine et comparaison d'une oscillation de pO <sub>2</sub> entre le témoin et l'essai dans un réacteur <i>scale-down</i> . ....	67
Figure 38. Cytogramme de coloration à l'iodure de propidium. a) Témoin positif. b) Echantillon de levures en croissance exponentielle dans un réacteur <i>scale-down</i> . ....	69
Figure 39. Evolution de la concentration en glucose dans chaque CPM du réacteur <i>scale-down</i> avec acide oléique. ....	71
Figure 40. Simulation des concentrations en glucose rencontrées par une cellule au cours de son déplacement dans le réacteur. ....	72

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Sources et fonctions des éléments essentiels.....	14
Tableau 2. Composition d'un milieu 863.....	25
Tableau 3. Composition des solutions intervenant dans l'obtention du milieu CFM.....	26
Tableau 4. Composition de la solution de sels principaux pour un milieu tampon CFM à pH 5,5.....	27
Tableau 5. Récapitulatif des différents conditionnements testés (DO = densité optique, MS = matière sèche, PI = iodure de propidium, NR = Nile Red et FITC = fluoro-isothiocyanate). ....	28
Tableau 6. Récapitulatif des réacteurs testés pour l'étude de l'influence de l'acide oléique sur l'extrapolation des cultures <i>fed-batch</i> de <i>S. boulardii</i> . ....	31
Tableau 7. Valeurs des paramètres de régulation des cultures <i>fed-batch</i> . ....	32
Tableau 8. Paramètres du FACS définis pour l'analyse des différentes colorations. ....	40
Tableau 9. Récapitulatif des cultures réalisées.....	57
Tableau 10 Durée moyenne des temps d'ajouts et nombre d'ajouts dans les réacteurs <i>scale-down</i> et de référence pour les cultures sans acide oléique.....	58
Tableau 11. Durée moyenne des ajouts et nombre d'ajouts dans les réacteurs d'essai <i>scale-down</i> et de référence pour les culture avec acide oléique.....	61

## LISTE DES ABREVIATIONS

%	pourcent
°C	degré celsius
$\mu$	taux de croissance
$\mu\text{M}$	micro-molaire
$\mu_{\text{max}}$	taux de croissance maximal
a	aire interfaciale
$\text{\AA}$	angström
ADN	Acide Désoxy Ribonucléique
Aldp	acétaldéhyde-déshydrogénase
ATP	adénosine triphosphate
$C_1^0$	concentration maximale en oxygène dissout
CAT	carnitin acetyl transport
Cl	concentration en oxygène dissout
coA	coenzyme A
CPM	compartiment parfaitement mélangé
CS	cytrate synthase
d	diamètre du mobile d'agitation
$\text{dm}^3$	décimètre cube
DO	densité optique
DTS	distribution des temps de séjour
FITC	fluoro-isothiocyanate
FSC	forward scatter canal
g	gramme
GFP	green fluorescent protein
h	heure
HPLC-RI	High performance liquid chromatography -refractor indice
kg	kilogramme
$K_1$	coefficient de transfert global
$k_{1a}$	coefficient volumique de transfert d'oxygène
$K_s$	coefficient d'affinité du substrat
l	litre
$\text{m}^3$	mètre cube
ml	millilitre
mM	milli-molaire
$m_s$	coefficient de maintenance
MS	matière sèche
N	vitesse d'agitation
$N_p$	nombre de puissance
$N_{qc}$	nombre de circulation
$N_{qp}$	nombre de pompage
NR	nile red
ORE	Oleate Response Element
OTR	Oxygen Transfert Rate
OUR	Oxygen Uptake Rate
P	puissance
P/V	puissance volumique
PBS	phosphate buffer solution
Pdcp	pyruvate décarboxylase
PDH	pyruvate déshydrogénase
PFA	paraformaldéhyde

PHB	poly-hydroxybutyrate
PI	propidium iodide
pO <sub>2</sub>	pression en oxygène dissout
q	débit
Q <sub>0</sub>	consommation de l'oxygène dissout par les microorganismes
Q <sub>c</sub>	débit de circulation
Q <sub>e</sub>	débit d'entraînement
Q <sub>p</sub>	débit de pompage
Re	nombre de Reynolds
rpm	round per minute
r <sub>s</sub>	vitesse de consommation du substrat
r <sub>x</sub>	vitesse de division cellulaire
s	seconde
S	concentration en substrat
SSC	side scatter canal
T°	température
t <sub>c</sub>	temps de circulation
t <sub>p</sub>	temps de pompage
T <sub>s</sub>	temps de séjour
UE	Union européenne
V	volume de culture
V <sub>l</sub>	volume de liquide
W	Watt
X	concentration en biomasse
y <sub>x/s</sub>	rendement de bioconversion
ρ	viscosité

# I INTRODUCTION

Depuis toujours, le potentiel biotechnologique de la levure *Saccharomyces cerevisiae* n'a cessé de révéler de nouvelles applications. De la fabrication du pain et de la bière à la production de protéines hétérologues, *Saccharomyces cerevisiae* représente encore actuellement un intérêt considérable dans de nombreux domaines tels que le secteur médical, agroalimentaire, énergétique et de la recherche fondamentale. Le marché mondial de la levure, mené par des groupes comme COFALEC en UE, représente plus de 2,5 millions de tonnes annuelles.

Dans ce contexte, le défi majeur est de mettre au point des bioprocédés relatifs à la synthèse de biomasse microbienne dans le but d'atteindre des rendements maximaux. Les deux difficultés rencontrées par l'industriel sont d'une part l'optimisation des paramètres de culture (composante biologique) et d'autre part l'optimisation de l'opération de mélange dans les bioréacteurs (composante physique).

Une des particularités de *S. cerevisiae* est de présenter un métabolisme mixte en présence d'oxygène. Pour des faibles concentrations en glucose, la levure développe un métabolisme purement oxydatif/respiratoire produisant uniquement de la biomasse et du dioxyde carbone. Pour des concentrations en glucose supérieures à une valeur seuil, la levure présente un métabolisme respiro-fermentaire provoquant la formation d'éthanol, d'acétate, de glycérol et de biomasse. Ce phénomène, appelé effet Crabtree ou transition respiro-fermentaire doit être maîtrisé par l'industriel dont l'intérêt est de produire de la biomasse et éviter la formation de co-produits.

La culture de *Saccharomyces cerevisiae* est réalisée en condition aérobie dans un bioréacteur agité au cours d'un procédé *fed-batch*. Celui-ci consiste à ajouter progressivement du substrat (glucose) dans le milieu de culture de manière à ne pas dépasser la valeur seuil de la bascule respiro-fermentaire. Néanmoins, l'ajout séquentiel de glucose dans le haut de la cuve génère un gradient de concentration dans le plan axial du bioréacteur. Effectivement, l'extrapolation des cultures à l'échelle industrielle (m<sup>3</sup>) s'accompagne d'une perte d'efficacité de l'opération de mélange par rapport à un réacteur de laboratoire (dm<sup>3</sup>). Connaissant leur sensibilité à l'effet Crabtree, les levures en déplacement dans le réacteur rencontrent des zones d'hétérogénéités et redirigent le glucose excédentaire vers la voie fermentaire. Ce phénomène se traduit par une production d'éthanol accrue au détriment de la synthèse de biomasse et d'une diminution de la productivité cellulaire.

Récemment, des chercheurs français (INSA TOULOUSE) ont découvert qu'en présence d'un substrat mixte composé de glucose et d'acide oléique, la production d'éthanol était retardée de 15 minutes au profit de la production de biomasse suite à un pulse de glucose dans un chémostat en limitation glucose (FERIA-GERVASIO *et al.*, 2008). L'acide oléique est un acteur complexe impliqué dans de nombreuses réactions physiologiques au sein de la levure. Il provoque notamment l'induction de peroxysomes et la transcription de gènes impliqués dans le transport du carbone vers la mitochondrie. Les peroxysomes sont des organites cytoplasmiques participant à la  $\beta$ -oxydation des acides gras en acétyl-coA. EVERS *et al.*, (1991) ont également observé que les conditions imposées par le chémostat atténuent l'effet glucose et permettaient à la levure d'assimiler l'acide oléique. Le travail de FERIA-GERVASIO *et al.*, (2008) constitue l'un des premiers succès de la modification naturelle de la bascule respiro-fermentaire.

La thématique de cette étude s'inscrit dans l'analyse systémique de la transition respiro-fermentaire de la levure *S. cerevisiae*. L'objectif de ce travail vise à vérifier l'hypothèse selon laquelle la présence de l'acide oléique confère à la levure la capacité de retarder la bascule respiro-fermentaire lors des excès de glucose générés par les gradients de concentration au sein des réacteurs industriels. Pour ce faire, le recours à la technologie *scale-down* permettra de reproduire à l'échelle du laboratoire les conditions hydrodynamiques industrielles.

La première partie de ce travail sera consacrée à une synthèse bibliographique faisant état des connaissances au sujet de l'extrapolation des bioréacteurs, de l'impact des conditions de mélange sur la physiologie cellulaire et des adaptations métaboliques des levures face aux stress des procédés. Le deuxième chapitre détaillera la méthodologie suivie lors de cette étude. La troisième partie sera réservée à la présentation des résultats et à leurs interprétations. Elle se subdivisera en plusieurs sections consacrées respectivement à la mise au point d'un protocole de conditionnement des levures à l'acide oléique, à la modulation de l'effet *scale-down* par ajout d'acide oléique et à la simulation des gradients de glucose expérimentés par les levures en déplacement dans un réacteur *scale-down* avec acide oléique. Le dernier chapitre exposera les conclusions et les perspectives de ce mémoire.

## II SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

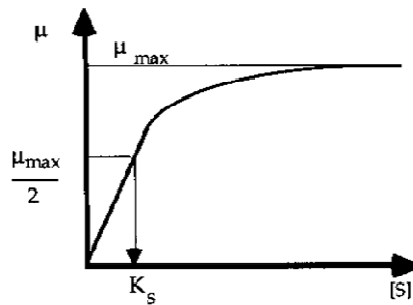
### II.1 TECHNOLOGIES POUR LA MISE EN PLACE D'UNE CULTURE *FED-BATCH* ET SON EXTRAPOLATION À L'ÉCHELLE INDUSTRIELLE

Dans cette partie, la mise en application des cultures cellulaires *fed-batch* en bioréacteur est décrite de manière à cibler les paramètres conditionnant l'extrapolation du modèle de laboratoire au modèle industriel. La complexité du génie biochimique réside dans l'interaction de deux composantes (DELVIGNE, 2006):

- la composante biologique impliquant le développement de la population microbienne au sein du bioréacteur
- la composante physique incluant l'optimisation des phénomènes de transfert au sein du bioréacteur

#### II.1.1 CINÉTIQUE DE CROISSANCE MICROBIENNE

Une population microbienne se développe au sein d'un bioréacteur en suivant une courbe de croissance basée sur la cinétique enzymatique de Michaelis-Menten. Le modèle de cinétique microbienne proposé par Monod est une boîte noire dans laquelle se déroule une série de réactions enzymatiques. Le substrat étant l'unique facteur limitant, l'enzyme la plus lente conditionne la vitesse de croissance d'un microorganisme (Figure 1):



**Figure 1. Evolution du taux de croissance ( $\mu$ ) en fonction du substrat (THONART, 2009).**

Le taux de croissance ( $\mu$ ) exprime la vitesse de division cellulaire et peut-être déduit par l'analyse de la courbe de croissance:

$$\mu_x = \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt}$$

avec  $\mu$  le taux de croissance ( $h^{-1}$ ) et  $X$  la concentration en biomasse ( $g/l$ )

La courbe de croissance type, relative au microorganisme étudié, est réalisée dans des conditions standards:

- culture en mode *batch* (sans apports de substrat ni prélèvements de milieu)
- réacteur parfaitement mélangé assurant une homogénéité parfaite
- conditions de cultures (pH, température, pression osmotique) favorables au développement du microorganisme étudié et maintenues constantes

La croissance d'une population microbienne comprend 6 phases (Figure 2):

- *Phase de latence (I)*: adaptation des cellules aux conditions imposées, pas de division cellulaire
- *Phase de départ (II)*: démarrage de la croissance avec une augmentation progressive de la vitesse de division cellulaire
- *Phase de croissance exponentielle (III)*: taux de croissance maximum ( $\mu_{\max}$ ) atteint et constant, physiologie et composition des cellules inchangées
- *Phase de ralentissement (IV)*: diminution du taux de croissance suite à l'épuisement du substrat
- *Phase stationnaire (V)*: arrêt de la croissance et concentration cellulaire maximale atteinte, conservation de l'activité métabolique, différenciation, production de métabolites secondaires, etc.
- *Phase de déclin (VI)*: autolyse des cellules

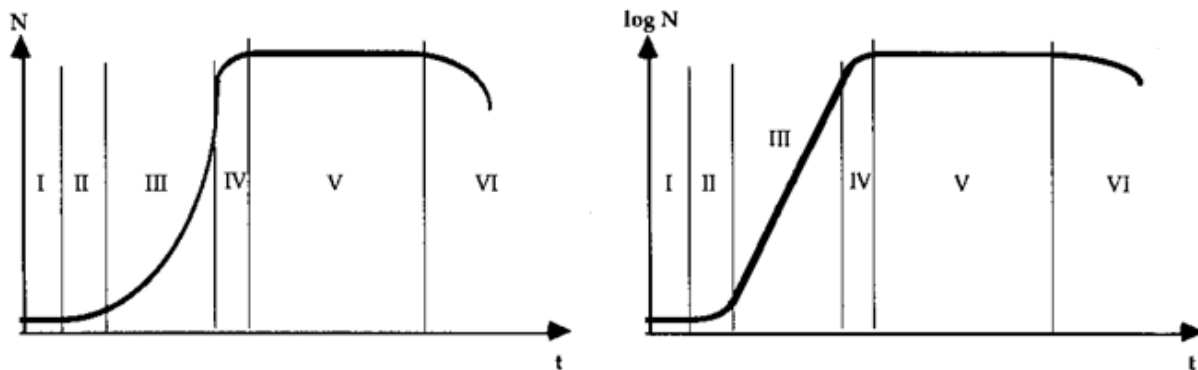


Figure 2. Courbe de cinétique microbienne (THONART, 2009).

Ce modèle de cinétique microbienne proposé par Monod est très simple car en réalité, la croissance microbienne est influencée par de nombreux paramètres tels que la température, le pH, la pression en oxygène dissout et l'agitation (PRESCOTT *et al.*, 1995).

### II.1.2 LE MODE DE CULTURE FED-BATCH

La levure de boulangerie étant Crabtree positive (Section II.3.43), le substrat (glucose) doit être ajouté progressivement dans le bioréacteur afin que l'oxydation du substrat soit la seule et unique voie métabolique possible. Ce mode de culture appelé *fed-batch*, est toujours précédé d'une phase *batch* durant laquelle la levure consomme les nutriments présents dans le milieu. Le *fed-batch* démarre lorsque les cellules, en pleine croissance exponentielle, ont épuisé le substrat limitant (glucose). Les évolutions de la concentration en biomasse et en substrat sont déterminées par les équations suivantes:



- en phase *batch*  $r_x = \frac{dX}{dt} = \mu \cdot X \Rightarrow r_x = X \cdot \mu_{\max} \frac{S}{S + K_s}$  et

$$\frac{dS}{dt} = -r_s = -\frac{r_x}{Y_{x/s}} - m_s \cdot X$$

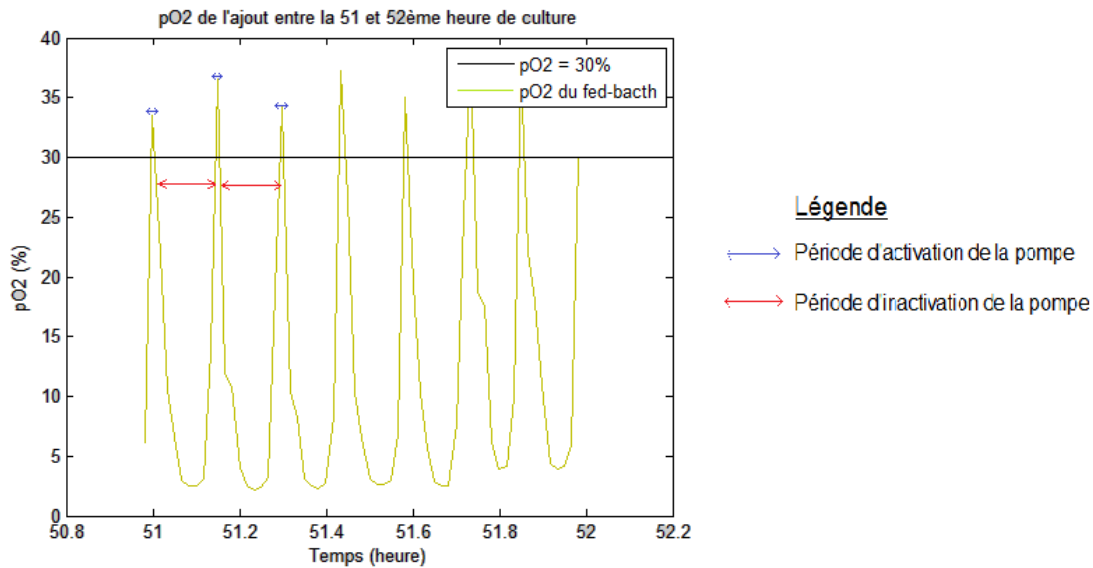
- puis en phase *fed-batch* (attention, il faut prendre en compte la dilution due à l'ajout)

$$\frac{dX}{dt} = r_x - \frac{dV}{dt} \cdot \frac{X}{V} \quad \text{et} \quad \frac{dS}{dt} = -r_s - \frac{dV}{dt} \cdot \frac{S}{V} + \frac{dV}{dt} \cdot \frac{S_a}{V}$$

avec  $\mu$  le taux de croissance ( $h^{-1}$ ),  $X$  la concentration en biomasse (g/l),  $r_x$  et  $r_s$  les vitesses de division cellulaire et de consommation en substrat (g/l.h),  $S$  la concentration en substrat en (g/l),  $K_s$  (g/l) la concentration en substrat pour laquelle  $\mu = \frac{\mu_{\max}}{2}$ ,  $V$  le volume de culture ( $m^3$ ),  $Y_{x/s}$  le rendement de bioconversion (g de biomasse/g de substrat) et  $m_s$  le coefficient de maintenance ( $h^{-1}$ ).

Le principe d'optimisation de la culture *fed-batch* est de maintenir une concentration faible en substrat dans le milieu de culture de sorte que la levure soit obligée de respirer le glucose pour produire de la biomasse. Plusieurs types de régulation existent:

- sans contrôle: une équation régulant l'ajout de la solution nutritive est déterminée préalablement afin de maintenir un taux de croissance maximum en-dessous du taux de dilution critique
- avec contrôle direct: la concentration en substrat limitant dans le milieu est suivie de manière continue afin de la maintenir constante au cours de la culture
- avec contrôle indirect: activation de la pompe d'ajout en fonction des paramètres qui dépendent de la concentration en substrat limitant:
  - o mesure de la pression en oxygène dissout: en présence de substrat, la pO2 chute car les cellules respirent. Une fois que le substrat est épuisé, la pO2 remonte. La pompe d'ajout s'active uniquement lorsque la pO2 est supérieure à une valeur prédéterminée (voir Figure 3). Cette régulation génère des oscillations de pO2
  - o mesure du coefficient respiratoire (QR): le QR permet de donner une idée de l'état physiologique de la levure:  $QR = \frac{CO_2 \text{ produit par la culture}}{O_2 \text{ consommé par la culture}}$ . Trois cas possibles sont distingués:  $QR > 1$  signifie que la levure produit de l'éthanol et exerce la fermentation,  $QR < 1$  indique que la levure respire l'éthanol produit car elle est en manque de glucose et  $QR = 1$  signale que la levure crée uniquement de la biomasse, il s'agit du cas idéal. Le contrôle s'effectue via un capteur relié au régulateur de la pompe d'ajout.



**Figure 3. Régulation indirecte de l'ajout de substrat (la pompe s'active si la pO<sub>2</sub> est supérieure à 30 %).**

### II.1.3 LE BIORÉACTEUR

La mise en place d'une culture *fed-batch* est possible grâce au bioréacteur. Celui-ci est une cuve cylindrique hermétique stérile possédant un axe rotatif sur lequel est/sont fixé(s) un/des mobiles d'agitation assurant l'opération de mélange du fluide au sein de la cuve afin d'optimiser les trois phénomènes de transfert ayant cours lors de la culture (Section II.2.1). Les mobiles d'agitation peuvent exercer deux actions différentes selon leur nature radiale ou axiale. Le mobile radial expulse le fluide perpendiculairement à l'axe d'agitation et entraîne des phénomènes de cisaillement et de turbulence qui assurent une bonne dispersion gaz-liquide. Le mobile axial fait circuler le fluide parallèlement à l'axe d'agitation et garantit une bonne homogénéisation. Pour assurer l'oxygénation du milieu de culture, le bioréacteur est muni d'un anneau "*sparger*" situé en-dessous du premier mobile d'agitation, qui insuffle de l'air du bas vers le haut de la cuve. Pour une culture *fed-batch*, l'ajout de substrat est réalisé par le haut de la cuve via une pompe péristaltique. La régulation des paramètres tels que le pH et la température est effectuée par des capteurs spécifiques (sonde pH et PT100) connectés respectivement à la pompe d'ajout d'acide/de base et à la double enveloppe/au serpentin.

La géométrie d'un bioréacteur est caractérisée par une série de paramètres qui respectent une configuration standard (Figure 4). La conformité des dimensions de la cuve, du mobile d'agitation et des contres-pales permet de faciliter la reproductibilité et l'extrapolation des résultats lors d'un *scale-up* (THONART, 2009) (Section II.1.5.2).

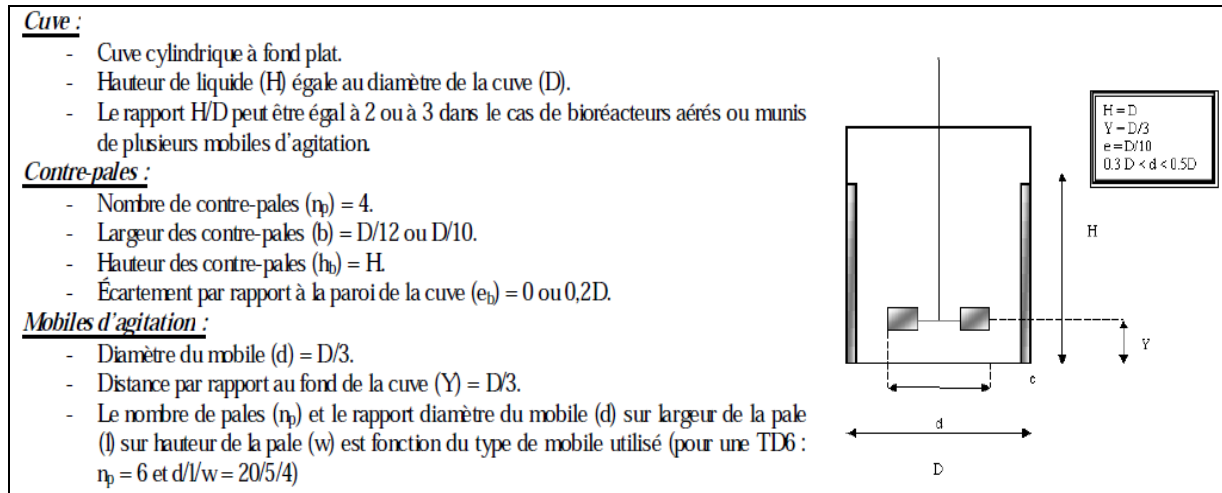


Figure 4. Géométrie standard d'un bioréacteur (THONART, 2009).

### II.1.4 DIMENSIONNEMENT D'UN BIOREACTEUR

Lors de la mise en œuvre d'une production de levure, la première étape consiste à dimensionner les différents éléments constitutifs du bioréacteur en vue d'optimiser le procédé. Dans le génie chimique et biochimique, l'opération de mélange est le paramètre critique du procédé responsable des phénomènes de transferts intervenant au sein du réacteur. L'optimisation de l'opération de mélange est réalisée grâce à l'analyse dimensionnelle dont Vaschy-Buckingham a démontré le théorème. Cet outil très utile réduit le nombre de variables impliquées dans un phénomène en construisant des variables adimensionnelles. Les nombres adimensionnels ont la particularité d'être indépendants de la taille du phénomène étudié, c'est pourquoi ils sont intéressants pour la modélisation et l'extrapolation des bioréacteurs (THONART, 2009).

Généralement, les critères choisis pour évaluer l'efficacité de l'opération de mélange sont la puissance d'agitation, le temps de circulation et le temps de pompage. L'opération de mélange fait intervenir un nombre élevé de variables: la vitesse d'agitation, les dimension du mobile et de la cuve, la viscosité du fluide, la masse volumique, etc. Grâce à Vaschy-Buckingham, les 16 variables dont dépend la qualité du mélange sont réduites à 13 nombres adimensionnels qui caractérisent l'opération. Parmi eux, le nombre de puissance ( $N_p$ ) décrit comme une fonction du nombre de Reynolds ( $Re$ ) exprimant le régime d'écoulement. Le nombre de puissance devient une variable indépendante pour des régimes turbulents ( $Re > 10^4$ ) et dépend uniquement du type de mobile d'agitation. Il permet de calculer la puissance dissipée par l'agitation  $P = N_p * \rho * N^3 * d^5$

Avec  $P$  la puissance dissipée (W),  $N_p$  le nombre de puissance,  $N$  la vitesse d'agitation ( $s^{-1}$ ),  $d$  le diamètre du mobile d'agitation (m) et  $\rho$  la masse volumique du liquide ( $kg/m^3$ )

Similairement, la méthode est utilisée pour déterminer les temps de circulation ( $t_c$ ) et de pompage ( $t_p$ ) du fluide au sein du réacteur. Les nombres adimensionnels relatifs aux actions de pompage ( $N_{qp}$ ) et de circulation ( $N_{qc}$ ) sont indépendants du nombre de Reynolds mais divergent en fonction du mobile d'agitation  $Q_c = N_{qc} * N * d^3$  et  $Q_p = N_{qp} * N * d^3$

Connaissant le volume de la cuve, on déduit facilement les temps de circulation et de pompage

$$t_c = \frac{V_L}{Q_c} \text{ et } t_p = \frac{V_L}{Q_p} \Rightarrow Q_c = Q_p + Q_e$$

Avec  $N_{qc}$  le nombre de circulation,  $N_{qp}$  le nombre de pompage,  $t_c$  et  $t_p$  les temps de circulation et pompage (s),  $Q_c$ ,  $Q_p$  et  $Q_e$  les débits de circulation, de pompage et d'entraînement ( $m^3/s$ ) et  $V_L$  le volume de liquide ( $m^3$ ) (THONART, 2009).

La connaissance du temps de circulation rend compte du temps mis par un microorganisme pour revenir à un endroit déterminé du réacteur. Pour un réacteur de petite taille,  $t_c$  reste constant. Néanmoins, lorsque le volume accroît, les chemins empruntés par une particule ou un microorganisme sont nombreux. Par conséquent, les temps de circulation se distribuent selon une loi normale (DELVIGNE, 2006).

En règle générale, la puissance, les débits de pompage et de circulation sont utilisés pour élaborer des modèles hydrodynamiques caractérisant les hétérogénéités rencontrées dans un bioréacteur lors de son extrapolation.

## **II.1.5 LES APPROCHES DE L'EXTRAPOLATION**

Dans un premier temps, l'ingénieur préfère optimiser les procédés industriels à petite échelle pour des raisons de temps et d'argent. Le génie chimique utilisait une approche classique se basant sur des relations empiriques pour extrapoler les conditions rencontrées en laboratoire. Cependant, l'apparition des phénomènes de gradient dans les bioréacteurs nécessite l'emploi de modèles hydrodynamiques plus élaborés pour l'extrapolation du procédé à l'échelle industrielle (DELVIGNE, 2006).

### **II.1.5.1 L'APPROCHE CLASSIQUE**

L'approche classique de l'extrapolation se base sur l'empirisme des phénomènes rencontrés à petites échelles en intégrant l'analyse des similitudes et l'analyse dimensionnelle. Ces deux principes avancent l'égalité de certains paramètres spécifiques, lors de la transition à grande échelle, tels que la puissance volumique ( $P/V$ ), le temps de mélange, le stress hydrodynamique, etc. Cependant, il est impossible d'assurer simultanément une qualité similaire pour tous les phénomènes de transfert lors du *scale-up* (Section II.2.1). Il est donc nécessaire de choisir la variable la plus influencée par l'extrapolation au détriment des autres (GARCIA-OCHOA *et al.*, 2010).

### **II.1.5.2 L'APPROCHE "SCALE-DOWN"**

L'approche *scale-down* de l'extrapolation des cultures à l'échelle industrielle est expérimentale. Elle consiste à reproduire à l'échelle du laboratoire les conditions hydrodynamiques rencontrées lors de l'agrandissement des cuves. L'augmentation de la taille des réacteurs engendre des modifications hydrodynamiques entraînant l'apparition d'hétérogénéités, l'augmentation du temps de mélange et la variabilité des temps de circulations. Dans l'approche *scale-down*, le génie biochimique tient compte de l'impact de ces transformations sur la physiologie cellulaire (Section II.2).

Effectivement, les cellules circulant alternativement dans des zones mélangées et partiellement mélangées sont contraintes à adopter un métabolisme "oscillatoire". Par conséquent, les résultats observés à l'échelle de laboratoire dans des conditions parfaitement homogènes diffèrent de ceux obtenus à l'échelle industrielle.

Au sein d'un bioréacteur, 4 types de gradients physiques/chimiques apparaissent lors de la transition à l'échelle industrielle:

- la pression en oxygène dissout
- l'apport de substrat
- le pH
- la température

Dans ce contexte, l'intérêt de la technologie *scale-down* est de fournir des outils permettant de simuler ces gradients et de prévoir le comportement des cellules lors de leurs passages à l'échelle industrielle (NEUBAUER et JUNNE, 2010). Les paramètres d'optimisation de l'opération de mélange sont calculés sur base de ce type de réacteur. Ainsi, le biais de l'approche classique est partiellement corrigé. A l'heure actuelle, les bioréacteurs *scale-down* proposent une panoplie de techniques pour reproduire les cultures à grandes échelles, parmi elles:

- les réacteurs combinés: ce système est composé d'une partie agitée homogène connectée à une partie non-mélangée présentant des hétérogénéités. Au cours de leurs déplacements, les microorganismes expérimentent des gradients de concentration dans la partie non-mélangée. Cette dernière peut être une boucle de recirculation dans laquelle l'ajout de substrat s'effectue au début de celle-ci afin de créer artificiellement un gradient de substrat. Accessoirement, des dispositifs performants assurent un suivi continu de certains paramètres dans des zones précises du bioréacteur (pO<sub>2</sub>, pH, métabolites, etc.).
- les microréacteurs: dans la recherche, la longue durée des cultures en réacteur représente l'inconvénient principal des expérimentations menées pour optimiser les procédés. La technologie des microréacteurs emploie des outils améliorant le *screening*. A l'échelle industrielle, les productions de microorganismes sont opérées généralement par un système *fed-batch* dont le contrôle majeur repose sur la régulation de l'apport de substrat. La technologie des microréacteurs, à l'échelle du millilitre, développe des systèmes de relargage automatique du substrat. Par exemple, l'apport de glucose dans le milieu de culture peut-être contrôlée par l'association d'un complexe enzymatique avec polymère emprisonnant du glucose.
- la simulation informatique: la modélisation de la dynamique des fluides et du déplacement des microorganismes au sein du réacteur est mise au point grâce à des tests traceurs et à la simulation informatique. Ce nouvel aspect de la technologie *scale-down* ne considère plus le bioréacteur comme une boîte noire. Ainsi, le volume spatial du bioréacteur est divisé en un certain nombre de zones parfaitement mélangées. Cette vision du bioréacteur permet par exemple de simuler l'évolution des gradients de concentration expérimentés par les microorganismes (NEUBAUER et JUNNE, 2010).

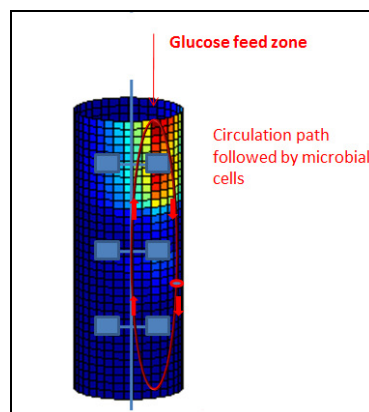
## II.2 IMPACT DES CONDITIONS DE MÉLANGE DU BIORÉACTEUR

Tant à l'échelle de laboratoire qu'à l'échelle industrielle, de mauvaises conditions de mélange dans un bioréacteur influencent la croissance microbienne. Des conditions parfaites de mélanges à l'échelle du laboratoire sont possibles grâce au faible volume du bioréacteur. Néanmoins, ceci n'est plus vrai lors de l'extrapolation à l'échelle industrielle. Effectivement, le "*scale-up*" (transition du stade de réacteur pilote de faible volume à la cuve industrielle de grande taille) induit de nombreuses modifications:

- augmentation de la taille du réacteur et du système d'agitation
- augmentation de l'échelle de temps (temps de circulation, durée de la culture, temps de mélange, etc.)
- variabilité des chemins empruntés par la levure au sein du réacteur
- apparition d'hétérogénéités menant à des gradients de concentration (Figure 5), de température, etc. (Exemple: gradient de concentration suite à un pulse de substrat dans les cultures *fed-batch*)

Toutes ces variations d'ordres physique (configuration de la cuve, agitation, température, aération, etc.) et chimique (pH, substrat, formation de mousse, potentiel rédox, etc.) ont un impact sur la physiologie du microorganisme car ils provoquent des conditions de stress (stress hydrodynamique, stress de température, gradient d'oxygène, etc.) (JUNKER, 2004). En outre, l'étude de l'extrapolation fait intervenir trois composantes (DELVIGNE, 2006):

- une première composante hydrodynamique pour l'homogénéisation du bioréacteur
- une deuxième composante hydrodynamique pour suivre le déplacement des microorganismes au sein du bioréacteur
- une troisième composante décrivant l'impact de la superposition des deux premières composantes sur la physiologie du microorganisme



**Figure 5. Illustration du gradient de concentration créé dans un bioréacteur lors d'un apport de substrat (DELVIGNE, 2010).**

### II.2.1 LES PHÉNOMÈNES DE TRANSFERT

L'opération de mélange effectuée par les mobiles d'agitation placés sur l'axe rotatif assure à elle seule les trois phénomènes de transfert intervenant dans le bioréacteur (Figure 6):

- transfert de chaleur: la cuve à double enveloppe/les serpentins régule(nt) la température assurant la croissance optimale des microorganismes. L'agitation améliore le transfert de chaleur en réduisant la résistance de couche limite à la surface de l'échangeur.
- transfert de quantité de mouvement: les pales des mobiles d'agitation transmettent la quantité de mouvement au fluide et aux particules solides en suspension. Le temps de mélange est un paramètre utile pour mesurer l'efficacité de l'agitation dans un bioréacteur. En effet, il rend compte du temps requis pour homogénéiser la cuve suite à une pulse de substrat, dans le cas d'une régulation *fed-batch*.
- transfert de masse : le transfert du milieu liquide vers la levure d'un substrat soluble comme le glucose se réalise aisément. Par contre, le transfert d'oxygène de la phase gazeuse vers la phase liquide puis vers la levure est plus complexe à optimiser du fait de la faible concentration en oxygène dissout à saturation. Le paramètre quantifiant l'efficacité du transfert d'oxygène dans un bioréacteur est le  $k_L a$ .

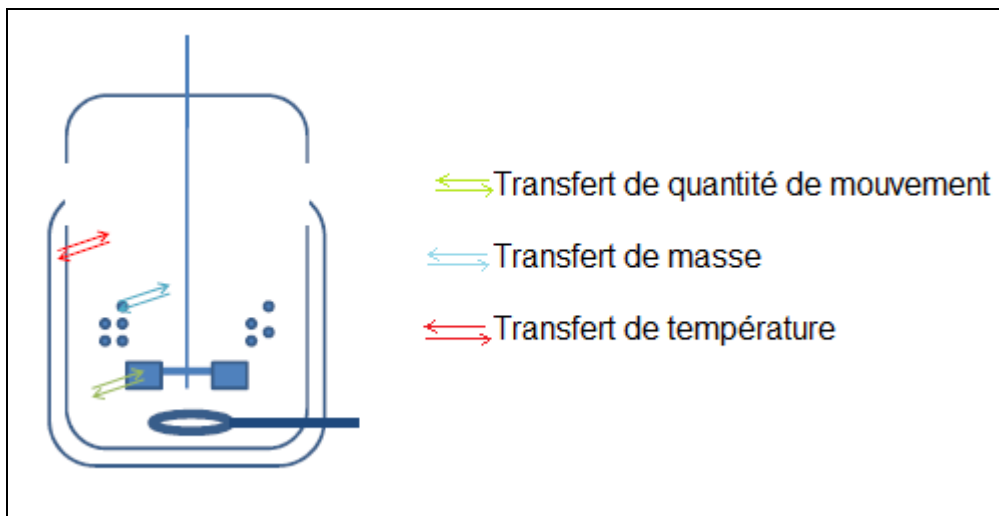


Figure 6. Phénomènes de transfert au sein d'un bioréacteur agité (DELVIGNE, 2010).

### II.2.2 LES CRITERES DE PERFORMANCE DE L'OPERATION MELANGE

L'efficacité de l'homogénéisation du substrat et du transfert d'oxygène peut être quantifiée par deux critères de performance: le temps de mélange et le  $k_L a$ . Ces deux paramètres, fortement affectés lors de l'extrapolation des cultures à l'échelle industrielle, sont déterminants dans la caractérisation de l'opération de mélange.

### II.2.2.1 LE $k_L a$

Le coefficient volumique de transfert d'oxygène:  $k_L a$  ( $s^{-1}$ ), employé pour l'optimisation du transfert d'oxygène est tiré de l'équation décrivant l'évolution de la concentration en oxygène dissout dans le milieu selon le modèle du double film:

$$\frac{dC_L}{dt} = \frac{q}{V_L} = k_L a \cdot (C_L^0 - C_L) - Q_0$$

Avec  $q$  le flux d'oxygène passant de la phase gazeuse à la phase liquide ( $\text{mole/s.m}^3$ ),  $V_L$  le volume effectif de liquide ( $\text{m}^3$ ),  $C_L^0$  la concentration maximale en oxygène dissout ( $\text{moles/m}^3$ ),  $C_L$  la concentration en oxygène dissout,  $k_L$  le coefficient de transfert global ( $\text{m/s}$ ),  $a$  l'aire interfaciale ( $\text{m}^2/\text{m}^3$ ) et  $Q_0$  la consommation de l'oxygène dissout par les microorganismes ( $\text{g/l.h}$ )

L'étape limitante du transfert de masse étant le passage de l'oxygène à travers de film liquide à l'interface gaz-liquide, la vitesse de transfert d'oxygène est directement proportionnelle au  $k_L a$  et à  $C_L^0 - C_L$  (GARCIA-OCHOA *et al.*, 2010).

Dans les bioprocédés aérobies, une alimentation continue en oxygène est nécessaire car la quantité d'oxygène dissout dans le milieu liquide est inférieure à la quantité d'oxygène requise par les microorganismes pour respirer (OUR: *Oxygen Uptake Rate*). Le taux de transfert d'oxygène de la phase gazeuse à la phase liquide conditionne la quantité d'oxygène dissout et l'activité métabolique de la levure (OTR: *Oxygen Transfer Rate*). Le paramètre de performance évaluant l'OTR est le  $k_L a$ . Dans un bioréacteur, l'air est insufflé en dessous du mobile d'agitation de manière à ce que les bulles d'air soient réduites et dispersées grâce au cisaillement des pâles en mouvement. L'objectif est d'augmenter l'aire interfaciale et le temps de circulation des bulles d'air dans le réacteur en régulant le débit d'air et la vitesse d'agitation. La maximalisation du  $k_L a$  s'avère importante pour les cultures *fed-batch* dans lesquelles l'OUR est élevée suite aux hautes densités cellulaires. Plusieurs techniques expérimentales permettent d'estimer la valeur globale du  $k_L a$ . Les cuves de grandes tailles entraînent l'apparition de gradients d'oxygène modifiant la physiologie du microorganisme qui les rencontre. Des baisses de rendements sont alors observées dans les bioprocédés (GARCIA-OCHOA *et al.*, 2010).

### II.2.2.2 LE TEMPS DE MELANGE

Dans le cas d'une culture *fed-batch*, lorsque l'ajout de substrat carboné s'effectue par intermittences (par le dessus du réacteur), l'apparition de gradients de concentration est observée dans le plan axial du réacteur. Il faut attendre un certain temps (temps de mélange) avant d'obtenir un degré d'homogénéisation. Le temps de mélange augmente avec l'agrandissement de la cuve du bioréacteur, diminue avec la puissance volumique et dépend de la combinaison des types de mobiles utilisés (Figure 7). Plus la taille du réacteur augmente, plus le fluide doit parcourir des grandes distances rapidement pour maintenir le temps de mélange. Cependant, la vitesse d'entraînement du fluide, c'est-à-dire la vitesse d'agitation, est proportionnelle à la puissance volumique. A partir d'une certaine échelle, la puissance fournie est limitée à cause des contraintes mécaniques, impliquant l'augmentation du temps de mélange et l'apparition de gradients de concentration au sein du bioréacteur.



L'apparition de gradients de concentration au sein d'un bioréacteur peut notamment induire une diminution du rendement de biomasse dans le cas d'une culture de *Saccharomyces cerevisiae*, qui produit de l'éthanol dans les hautes concentrations du gradient (DELVIGNE, 2006).

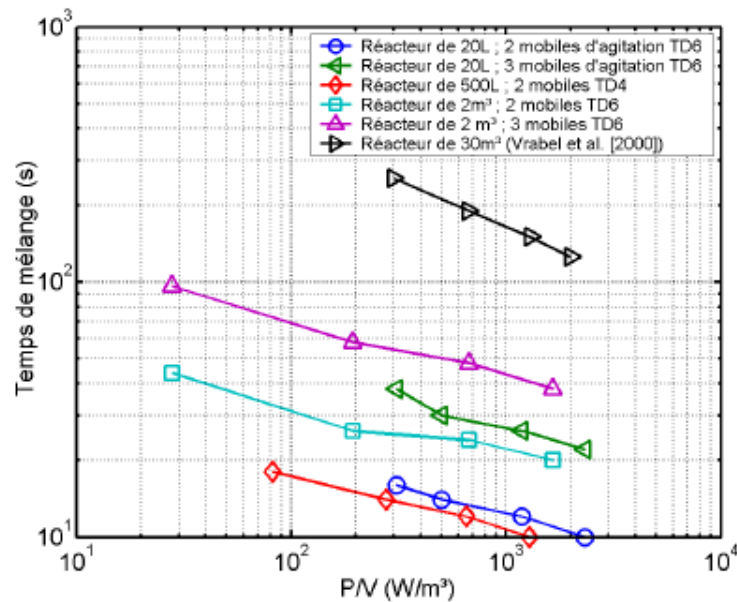


Figure 7. Evolution du temps de mélange en fonction de la puissance volumique fournie au fluide pour des réacteurs de tailles diverses (DELVIGNE, 2006).

### II.3 ADAPTATIONS MÉTABOLIQUES DE LA LEVURE FACE AU STRESS DES PROCÉDÉS

Lors d'une culture cellulaire, une cellule est constamment sujette à des stress provoqués par les conditions imposées du bioréacteur. On recense généralement les stress d'ordre (BOOTH, 2002):

- nutritionnels en cas de carence en un élément du substrat indispensable au développement de la levure (Exemple: limitation de la source de carbone).
- physiques pour des paramètres tels que la température, la pression osmotique et le pH qui ne sont pas à leurs valeurs optimum. Le stress hydrodynamique existe aussi pour des conditions de mélanges excessives.
- chimiques lorsqu'un substrat est en excès (effet Crabtree) ou lorsqu'une substance chimique inhibe ou ralentit certaines fonctions métaboliques essentielles.

Ses stress induisent des modifications au sein du métabolisme cellulaire. Heureusement, la faculté d'adaptation de la levure lui permet d'évoluer dans une multitude de conditions différentes. Il est dès lors important pour l'industriel de connaître et de maîtriser les facteurs de stress du microorganisme. Dans cette partie, le métabolisme nutritionnel de la levure sera largement décrit, plus spécialement l'effet Crabtree et le métabolisme de l'acide oléique.

### II.3.1 GÉNÉRALITÉS DU MÉTABOLISME NUTRITIONNEL CHEZ LA LEVURE

L'énergie présente dans les liaisons covalentes du substrat est translatée et stockée dans les molécules d'ATP durant les voies cataboliques (oxydatives ou *réductives*) afin de réaliser les voies de synthèse anaboliques (demandeuses d'énergie) qui permettront à la levure de se reproduire ou de se maintenir dans son environnement. Les paramètres conditionnant la croissance d'une levure sont d'ordres nutritionnels et environnementaux. La combinaison de ceux-ci engendre une multitude de milieux caractérisant l'espèce ou la souche de levure qui va s'y développer (WALKER, 1998).

### II.3.2 BESOINS NUTRITIONNELS

La production industrielle de levure implique une bonne connaissance de leurs besoins nutritionnels. La formulation d'une levure de boulangerie donnée par BERRY (1988) ( $C_{47}H_{6,3}O_{33}N_8P_{1,2}Sel_{4,5}$ ) permet déterminer les éléments essentiels à leur croissance. Parmi eux, on distingue les macronutriments disponibles à  $10^{-3}$  M dans le milieu et les micronutriments disponibles à partir de  $10^{-6}$  M. Ci-joint, un tableau récapitulatif des éléments essentiels et de leurs sources dans l'environnement.

**Tableau 1. Sources et fonctions des éléments essentiels.**

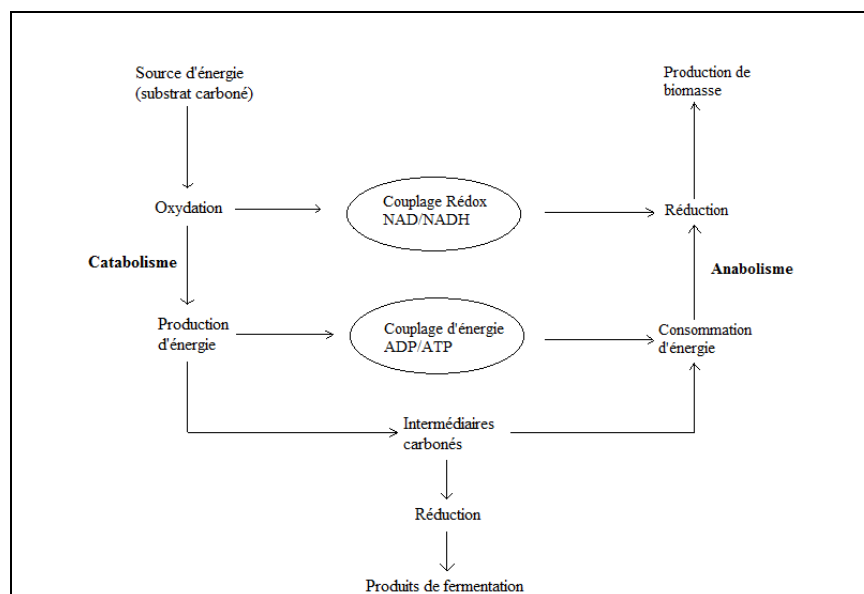
Macronutriments		
Élément	Sources	Fonctions cellulaires
Carbone	sucres simples, polysaccharides, acides gras	élément structural en combinaison avec O, H et N; source d'énergie du métabolisme
Hydrogène	hydrates de carbones, protons de l'environnement acide, etc.	régulation du pH intracellulaire, force proton-motrice
Oxygène	air	oxydant ultime de la respiration, synthèse des stérols, etc.
Azote	sels d'ammonium, urée, acides aminés	composant des protéines et enzymes
Phosphore	phosphates	acides nucléiques, phospholipides, transduction d'énergie
Soufre	sulfates, méthionine	acides aminés et vitamines
Potassium	sels de potassium	équilibre ionique, activité enzymatique
Magnésium	sels de magnésium	activité enzymatique
Calcium	sels de calcium	transduction de signal
Micronutriments		
Cuivre	sels de cuivres	pigment rédox
Fer	sels de fer	hémoprotéines, cytochromes
Manganèse	sels de manganèse	activité enzymatique
Zinc	sels de zinc	activité enzymatique
Nickel	sels de nickel	activité uréase

Afin d'améliorer le taux de croissance d'une population de levures, il est nécessaire d'ajouter des facteurs de croissance tels que les vitamines (biotine, thiamine, etc.) jouant le rôle de cofacteurs dans certaines réactions enzymatiques importantes.

Dans une levure, l'acquisition des besoins nutritionnels est réalisée via un système de transport sélectif. Au niveau de la membrane plasmique, quatre grands types de mécanismes régulent l'entrée et la sortie des métabolites: la diffusion simple et facilitée, les canaux de diffusion et le transport actif. Une fois au sein de la cellule, les métabolites peuvent être stockés (vacuole), complexés par des chélatants, ou directement utilisés par les voies anaboliques ou cataboliques (WALKER, 1998).

### II.3.3 LA RESPIRATION ET LA FERMENTATION

La levure *Saccharomyces cerevisiae* a la particularité d'être aérobie facultative, c'est-à-dire qu'elle peut se développer dans des conditions anoxiques en réalisant la fermentation. De plus, elle possède un métabolisme mixte qui lui permet de réaliser simultanément la respiration et la fermentation dans des conditions aérobies. Ce phénomène appelé effet Crabtree sera décrit plus loin. Au cours de la respiration et/ou fermentation, la levure stocke l'énergie du substrat sous forme d'adénosine triphosphate, une molécule facilement mobilisable pour réaliser les réactions endergoniques du métabolisme. La dégradation oxydative du substrat lors des voies cataboliques génère des NADH qui seront oxydés à nouveau lors des synthèses *réductives* de l'anabolisme. La formation d'intermédiaires carbonés tout au long des voies cata- et anaboliques sert de base aux biosynthèses cellulaires. La figure 8 résume le métabolisme du carbone au sein de la levure.



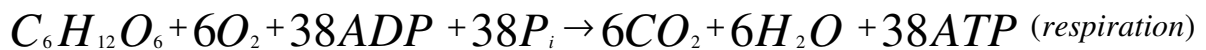
**Figure 8. Métabolisme du carbone chez la levure (WALKER, 1998).**

La respiration du substrat est divisée en plusieurs étapes distinctes comprenant successivement (WALKER, 1998):

- la glycolyse au cours de laquelle la conversion du sucre en pyruvate produit deux molécules d'ATP et deux NADH. Elle se déroule dans le cytoplasme.
- l'entrée du pyruvate dans la matrice mitochondriale suivi de sa décarboxylation en acétyl-CoA par la pyruvate déshydrogénase.

- le passage de l'acétyl-CoA dans le cycle de Krebs et la production de NADH et de dioxyde de carbone.
- la chaîne de transport des électrons provenant de la ré-oxydation des NADH au sein de la membrane mitochondriale et la réduction de l'oxygène en eau. Elles vont créer un gradient de protons permettant la formation d'ATP lors d'un procédé appelé phosphorylation oxydative.

Dans le processus de fermentation, l'absence d'oxygène entraîne la décarboxylation et la réduction du pyruvate en produits de fermentation (exemple: éthanol) ainsi que la régénération de NAD<sup>+</sup> nécessaire à la glycolyse, étape commune à la fermentation et respiration. *Saccharomyces cerevisiae* emprunte également la voie des hexoses mono-phosphates (voie de Warburg-Dickens) ou le cycle des pentoses phosphates pour by-passer la glycolyse lors de la fermentation en générant des NADH mais aussi des riboses nécessaires à la synthèse des nucléotides. La figure 9 donne les équations bilans de la fermentation et de la respiration.



**Figure 9. Bilan chimique de la respiration et de la fermentation.**

La production *fed-batch* de biomasse à partir de *Saccharomyces cerevisiae* est un procédé aérobie nécessitant un métabolisme oxydatif du substrat. Néanmoins, *S. cerevisiae* possède un métabolisme mixte qui lui permet de réaliser simultanément la respiration et la fermentation en milieu aérobie quand la concentration en glucose dépassent un seuil critique. Ce phénomène appelé effet Crabtree provoque une production d'éthanol en présence d'oxygène ainsi qu'une baisse du rendement de bioconversion  $Y_{X/S}$ . D'une manière générale, la fermentation est régulée par divers mécanismes chez les levures (WALKER, 1998):

- l'effet Crabtree à court-terme et long-terme désigne une fermentation alcoolique aérobie pour des concentrations en glucose élevées.
- l'effet Pasteur définit une inhibition de la fermentation alcoolique et une diminution du flux glycolytique en présence d'oxygène.
- l'effet Kluyver empêchant la fermentation des sucres autres que le glucose en condition anaérobies.
- l'effet Custer décrivant une stimulation de la fermentation en présence d'oxygène lorsque la balance rédox NAD<sup>+</sup>/NADH est déséquilibrée, la production d'éthanol régénère alors des NAD<sup>+</sup>.

Les deux derniers effets ne sont pas rencontrés chez *Saccharomyces cerevisiae*. Un autre phénomène appelé "diauxie" survient lorsque la levure consomme à nouveau l'éthanol produit dans le cycle de Krebs, une fois que la concentration en glucose diminue dans le milieu. Durant cette phase de "diauxie", la répression catabolique exercée par l'effet glucose s'atténue (PHAM *et al.*, 1998).

### **II.3.4 MÉTABOLISME ET RÉGULATION DU GLUCOSE CHEZ SACCHAROMYCES CEREVISIAE**

Au cours de ce travail, *Saccharomyces cerevisiae* est produit à partir d'un substrat mixte composé de glucose et d'acide oléique d'où l'importance d'étudier le métabolisme de la levure face à ces deux substrats.

#### **II.3.4.1 TRANSPORT DU GLUCOSE**

Il existe chez les levures deux systèmes de transport du glucose à travers la membrane plasmique. Le premier permet au glucose d'entrer sans apport d'énergie par diffusion facilitée via le gradient de concentration de part et d'autre de la membrane. Le second transport implique l'utilisation d'une molécule d'ATP assurant le fonctionnement d'un système proton symport. Ces deux mécanismes d'assimilation présentent donc une affinité différente pour le glucose, faible pour la diffusion facilitée et forte pour le système proton symport. Cela permettrait de faire la distinction entre les levures Crabtree positives et négatives. Les Crabtree positives font face aux afflux de glucose uniquement grâce à un système de diffusion facilitée et sembleraient donc incapables de contrôler le flux glycolytique (FIECHTER et SEGHEZZI, 1992).

#### **II.3.4.2 EFFET GLUCOSE**

Chez *Saccharomyces cerevisiae*, le glucose exerce un effet répressur sur les autres sources de carbone assimilables. Le glucose est la source de carbone préférentielle. Sa présence dans un milieu induit une répression sur les mécanismes impliqués dans (GANCEDO, 1998):

- la transcription et traduction des gènes codant pour certaines protéines de transport du carbone
- l'assimilation des autres sources de carbone
- la respiration cellulaire
- des enzymes impliquées dans de nombreuses voies métaboliques

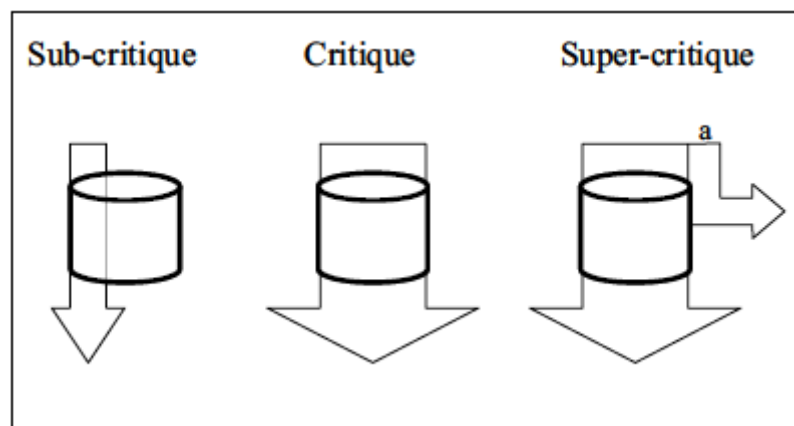
Ce phénomène incite la cellule à devenir une machine à dégrader le glucose. L'effet glucose porte le nom également de répression catabolique. Le principal responsable est le gène répressur *MIG1* codant pour la protéine Mig1p. Ce polypeptide se trouve dans le noyau en présence de glucose et empêche les gènes réprimés par le glucose d'être transcrits, en venant se fixer sur leurs promoteurs. La répression catabolique est levée en absence de glucose lorsque le complexe Snf1 phosphoryle Mig1p qui est expulsé du noyau vers le cytoplasme (TREITEL *et al.*, 1998).

#### **II.3.4.3 EFFET CRABTREE**

L'effet Crabtree, déjà cité précédemment, désigne un métabolisme respiro-fermentaire se déroulant lorsque la vitesse d'apport du glucose dépasse une valeur seuil. Ce phénomène doit être maîtrisé dans les technologies productrices de biomasse et de protéines hétérologues dans lesquelles la formation des coproduits est indésirable. La nécessité de la culture *fed-batch* s'avère indispensable et le glucose est ajouté au milieu de culture de manière à ne pas dépasser le taux de dilution critique. On distingue 2 types d'effet Crabtree:

- Effet Crabtree court-terme: il a lieu à des taux de dilution inférieurs au taux de dilution critique lorsqu'on observe une production instantanée d'éthanol suivie du retour progressif vers un métabolisme respiratoire lors d'un pulse de glucose.
- Effet Crabtree long-terme: il se déroule à des taux de dilution supérieurs au taux de dilution critique lorsqu'on observe une production d'éthanol continue et une chute du rendement de bioconversion  $Y_{X/S}$ .

L'explication de l'effet Crabtree est très complexe car il n'existe pas un unique facteur limitant. L'hypothèse d'une capacité respiratoire limitée provient sans doute de la corrélation de plusieurs mécanismes impliqués dans cette voie. La saturation des voies empruntées pour la respiration lors d'un excès de glucose entrainerait le glucose excédentaire vers la voie *réductive* qui le convertirait en éthanol (Figure 10).



**Figure 10. Capacité respiratoire limitée de la levure *S. cerevisiae*. (a) représente un excès de glucose convertit en éthanol (SONNLEITNER et KÄPPEL, 1986).**

Néanmoins, il s'agit d'une boîte noire car la respiration renferme une multitude de voies métaboliques à savoir:

- La chaîne respiratoire: l'hypothèse d'une chaîne respiratoire limitante est écartée car l'ajout d'un acide faible comme le benzoate libère des protons court-circuitant l'ATP synthase et augmente la vitesse de consommation de l'oxygène sans pour autant interférer avec la chaîne de transport des électrons (VERDUYN, 1992). Les chercheurs se sont tournés vers le pyruvate qui est la plaque tournante du métabolisme respiratoire.
- Le transport du pyruvate à travers la membrane mitochondriale: le gène *YL006* code pour le transporteur du pyruvate à travers la membrane mitochondriale, cependant aucune sur- ou sous-expression de ce gène n'a été testée jusqu'à présent (HILDYARD et HALESTRAP, 2003).
- La pyruvate déshydrogénase: la PDH catalyse la conversion du pyruvate en acétyl-CoA et alimente le cycle de Krebs en acétyl-CoA. Des études menées sur des mutants privés de l'activité PDH indiquent une croissance possible sur glucose mais avec un rendement en biomasse plus faible (PRONK *et al.*, 1996).

- Le by-pass de la pyruvate déshydrogénase: cette voie implique plusieurs enzymes dont la pyruvate décarboxylase (Pdcp), l'acétaldéhyde-déshydrogénase (Aldp) et l'acétyl-CoA synthase qui transforme le pyruvate en acétyl-CoA et NADH. Aucune amplification de ces enzymes n'a permis d'augmenter le taux de dilution critique. Il a été conclu que l'enzyme limitante se situait en aval de l'acétyl-CoA synthase (PRONK *et al.*, 1996).
- Les voies anaplérotiques: l'aspartate (STUCKA *et al.*, 1991) et la pyruvate carboxylase sont essentielles pour approvisionner le cycle de Krebs lorsque la cellule est en présence de glucose. Cependant, une surexpression n'entraîne aucune différence sur la transition respiro-fermentaire (BAUER *et al.*, 1999).

La surexpression des enzymes clés de la respiration n'ayant pas donné de résultat satisfaisant pour retarder la bascule respiro-fermentaire, BLOM *et al.* (2000) ont étudié le problème plus en amont en sur-exprimant le facteur Hap4p. Celui-ci est une protéine, associée à un complexe activateur de la transcription des gènes codant pour des enzymes clés des voies respiratoires, telles que des enzymes du cycle de Krebs. Cette expérience de surexpression constitue l'un des seuls succès dans l'augmentation du taux de dilution critique. Ces dernières années, FERIA-GERVASIO *et al.*, (2008) se sont concentrés davantage sur le transport de l'acétyl-CoA du cytosol vers la mitochondrie. Leur stratégie fut non pas de réaliser la surexpression d'un gène mais d'utiliser un co-substrat capable de stimuler les enzymes impliquées dans le transport de l'acétyl-CoA. Dans le cas d'un chémostat oxydatif glucose/acide oléique, ils ont observé un retard de la transition respiro-fermentaire après l'ajout d'un pulse de glucose. Le délai d'environ 15 minutes du shift métabolique entraîne une diminution de 33% de la production d'éthanol et la redirection de ce flux de carbone vers la formation de biomasse. Cette observation constitue clairement une diminution de l'effet Crabtree court-terme provoquée par l'utilisation d'un substrat mixte glucose/acide oléique.

### ***II.3.5 MÉTABOLISME DE L'ACIDE OLÉIQUE CHEZ SACCHAROMYCES CEREVISIAE***

La levure *Saccharomyces cerevisiae* a la capacité de se développer sur un milieu où l'unique source de carbone est l'oléate (TROTTER, 2001). Outre le rôle de l'acide oléique comme source d'énergie, il est essentiel au métabolisme des lipides et génère une série de changements physiologiques et morphologiques au sein de la levure:

- La synthèse des lipides (CASEY *et al.*, 1993)
- La formation de la membrane plasmique (LOCKSHON *et al.*, 2006; WRIESSNEGGER *et al.*, 2007; ROSENBERGER *et al.* 2009): une partie de l'acide oléique est incorporé dans les phospholipides membranaires afin d'assurer la fluidité de la membrane.
- L'induction de la prolifération des peroxyosomes (ERDMANN *et al.*, 1989 et 1995; SALEEM *et al.*, 2008): les peroxyosomes, organites cellulaires, sont le siège de nombreuses réactions du métabolisme des levures (cycle du glyoxylate,  $\beta$ -oxydation, dégradation du peroxyde d'hydrogène, etc.). En présence d'acide oléique seul, on observe une diminution de leur taille mais un accroissement de leur nombre dans le

cytoplasme. Notons également que les peroxysomes ont la capacité de contrôler la composition en acides gras de la membrane (LOCKSHON *et al.*, 2006)

- La stimulation de la biogénèse des corps d'inclusions lipidiques (ROSENBERGER *et al.*, 2009; CONNERTH *et al.*, 2010): l'accumulation d'acide gras au sein du cytoplasme étant toxique, la levure transforme les acides gras non-polaires sous forme de triglycérides dans le réticulum endoplasmique et les stocke au sein de particules lipidiques. Ces corps d'inclusion sont délimités par plusieurs couches d'esters de stérol et d'une membrane de surface constituée d'une simple couche de phospholipides. Les peroxysomes intimement liés avec les corps d'inclusion lipidiques peuvent alors former des "gnarls" dont la fonction est de réaliser la  $\beta$ -oxydation à haut régime (BINNS *et al.*, 2006).
- La régulation des gènes possédant un ORE (GURVITZ et ROTTENSTEINER, 2006; SALEEM *et al.*, 2008). L'ORE (*Oleate Responsive Element*), est une séquence d'ADN palindromique située dans la région promotrice de certains gènes codant pour des protéines et enzymes impliquées dans la prolifération/régulation des peroxysomes. Les gènes possédant cet ORE sont activés par le complexe protéique Pip2-Oaf1p lui-même dépendant de la présence de l'acide oléique.

### II.3.5.1 TRANSPORT ET BETA-OXYDATION DE L'ACIDE OLÉIQUE DANS LES PEROXYSOMES

Lorsque l'acide oléique est apporté en tant que substrat limitant, l'intégralité de celui-ci est dégradé en acétyl-CoA grâce à la  $\beta$ -oxydation au sein des peroxysomes (TROTTER, 2001). L'acétyl-CoA est alors transporté au sein de la mitochondrie pour être incorporé dans le cycle de Krebs afin de générer de l'ATP. Dans ce cas, l'acide oléique est entièrement respiré pour la production de biomasse.

Dans un premier temps, l'acide oléique doit franchir la membrane plasmique. Deux mécanismes de transport sont proposés dans la littérature pour la levure *Yarrowia lipolytica* (FICKERS *et al.*, 2005):

- La diffusion facilitée lorsque la concentration est inférieure à 10  $\mu$ M
- La diffusion simple pour des concentrations supérieures à 10  $\mu$ M

L'entrée d'un acide gras dans le peroxysome est fonction de la longueur de la chaîne hydrocarbonée et deux mécanismes interviennent (HETTEMA *et al.*, 1996):

- L'acide gras à longue chaîne (chaîne supérieure ou égale à 14 carbones) est d'abord greffé au coenzyme A grâce à une acyl-CoA synthétase (Faap1p ou Faap4p) dans le cytoplasme. L'acyl-CoA formé entre alors dans le peroxysome via les transporteurs Pax1p et Pax2p.
- L'acide gras à courte chaîne rentre d'abord dans le peroxysome via le transporteur Pex11p. Une acyl-CoA synthétase (Faap2p) le transforme en acyl-CoA.

L'activation de l'acide gras en acyl-CoA permet à un système enzymatique multifonctionnel de produire des acétyl-CoA au cours de la  $\beta$ -oxydation (KUNAU *et al.*, 1995).



### II.3.5.2 TRANSPORT DE L'ACÉTYL-CO<sub>A</sub> DU PEROXYISOME VERS LA MITOCHONDRIE

Une fois l'acétyl-CoA formé dans le peroxyisome, celui prend la destination de la mitochondrie via deux voies:

Il est soit intégré au cycle du glyoxylate peroxyosomal dans lequel les intermédiaires, le succinate et le citrate (génééré par la citrate synthétase Cit2p), sont connectés au cycle de Krebs via un transporteur membranaire mitochondrial, plus exactement la protéine Acr1p et la protéine Ctp1p pour le succinate et le citrate respectivement (PALMIERI *et al.*, 1997; XU *et al.*, 2000).

Il est soit converti en acétyl-carnitine via l'enzyme Cat2p (une carnitine acétyl-transférase) et expulsé du peroxyisome dans le cytosol. L'acétyl-carnitine cytosolique peut soit rentrer directement dans la mitochondrie via une protéine de transport Crc1p soit être converti en isopropylmalate et transporté dans la mitochondrie via l' $\alpha$ -isopropylmalate-synthétase cytoplasmique (Leu4p) et mitochondriale (Leu9p) (CASALONE *et al.*, 2000).

La levure utilise parallèlement les deux voies pour transporter l'acétyl-CoA du peroxyisome vers la mitochondrie. Le double mutant  $\Delta$ Cat2p $\Delta$ Cit2p ne se développe pas sur un milieu dont l'unique source de carbone est l'acide oléique (VAN ROERMUND *et al.*, 2003). La figure 11 schématise le devenir de l'oléate dans une cellule de levure.

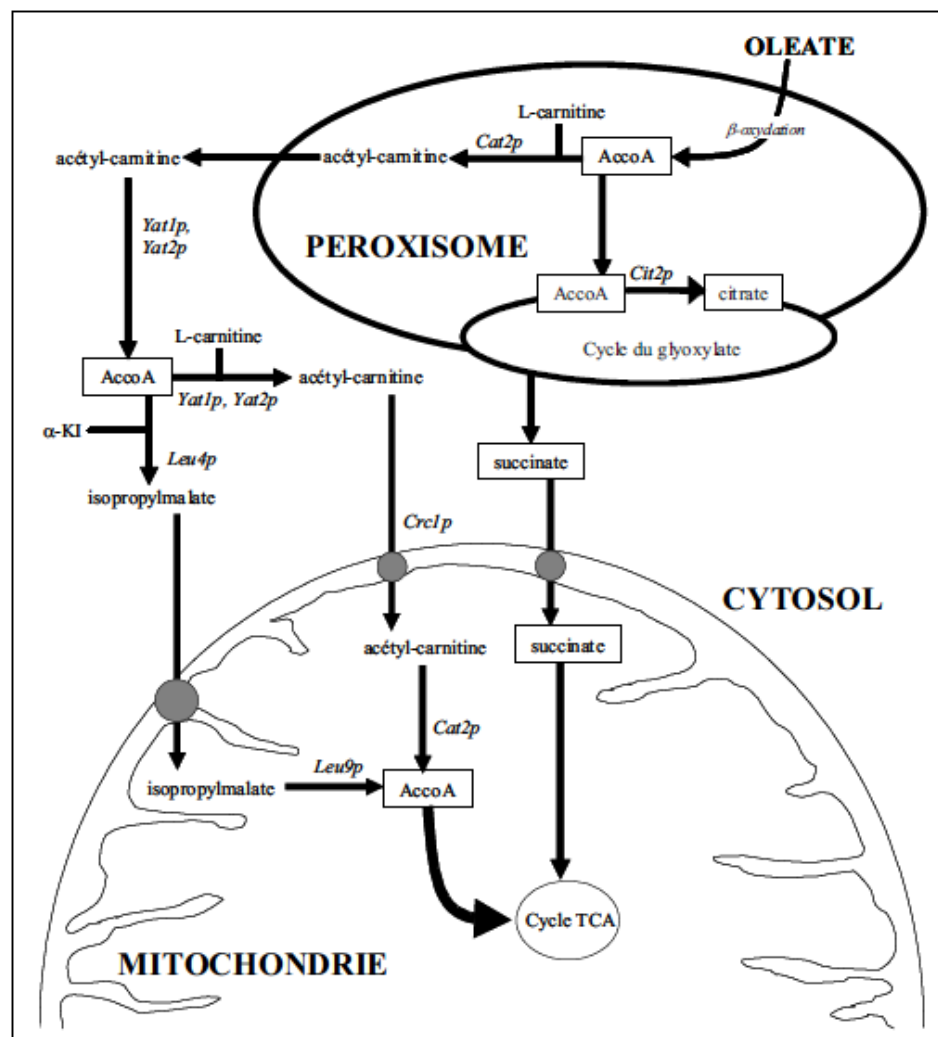


Figure 11. Devenir de l'acide oléique dans une cellule de levure (FERA-GERVASIO *et al.*, 2008).

## II.4 ADAPTATIONS MORPHOLOGIQUES DE LA LEVURE FACE AUX STRESS DES PROCÉDÉS

Pour s'adapter au stress, il arrive que la levure n'exerce pas uniquement des changements au niveau de ses voies métaboliques. Elle peut tout simplement effectuer une adaptation morphologique comme c'est le cas lors de la prolifération des peroxyosomes dans une levure qui se développe à partir d'un substrat carboné tel que l'acide oléique. Dans cette partie, les traits morphologiques de la levure sont décrits afin de présenter leur rôle dans la physiologie cellulaire.

### II.4.1 L'ENVELOPPE CELLULAIRE

Le milieu intracellulaire de la levure est séparé du milieu extracellulaire par une enveloppe incluant la membrane plasmique, le périplasma et enfin la paroi cellulaire. Occupant près de 15% du volume cellulaire, les composants de cette enveloppe régulent la perméabilité des intrants et extrants ainsi que les fluctuations de pression osmotique.

La membrane plasmique, épaisse de 7,5 nm, est constituée d'une double couche phospholipidique dans laquelle des protéines sont partiellement ou totalement incorporées. Ces protéines sont impliquées dans les processus de transport de solutés, de biosynthèse de la paroi cellulaire, dans la transduction des signaux transmembranaires ou servent de sites d'ancrage du cytosquelette. La composition en acide gras des phospholipides membranaires spécifie la tolérance de la levure aux conditions imposées par son environnement (Exemple: tolérance à l'éthanol pour les souches brassicoles).

Le périplasma ou espace périplasmique est une étroite région (35-45 Å) qui sépare la paroi de la membrane plasmique. Cet endroit regorge d'enzymes sécrétées dont les rôles sont l'hydrolyse des substrats ne franchissant pas la membrane plasmique. Citons l'invertase qui hydrolyse le saccharose en glucose et fructose ou bien la tréhalase hydrolysant le tréhalose en deux molécules de glucose.

La paroi, dernier élément de l'enveloppe cellulaire, fait partie des éléments différenciant une levure d'un eucaryote supérieur. De composition hétérogène (polysaccharides, protéines, lipides, phosphates inorganiques, etc.), la paroi est considérée comme un organe multifonctionnel impliqué dans la protection du protoplaste, la régulation de l'osmose, la reconnaissance et l'adhésion cellulaire, la chélation d'ions métalliques et le support d'une activité enzymatique spécialisée. Dans la technologie brassicole et boulangère, les phénomènes de floculation, flottation et agglomération relevant du domaine pariétal, suscitent un vif intérêt car ils influencent le procédé de fabrication (WALKER, 1998).

### II.4.2 LE CYTOPLASME ET LE CYTOSQUELETTE

Délimité par la membrane plasmique, le cytoplasme est un milieu aqueux acide, pH 5.25 (CIMPRICH *et al.*, 1995) contenant une multitude de molécules de poids différents en solution (métabolites de l'ana- et catabolisme) ou en suspension (organites, ribosomes, corps lipidiques, etc.). Le cytosquelette quant à lui confère la structure et l'organisation au sein du cytoplasme (microtubules et microfilaments).

### ***II.4.3 SYSTEME SECRETOIRE ET VACUOLES***

La membrane plasmique, le réticulum endoplasmique et les appareils de Golgi sont les organites clés du transport des protéines intra- et extracellulaires. Une fois la synthèse des protéines terminée, le polypeptide formé subit une maturation dans les organites précités au cours de laquelle des modifications post-transcriptionnelles (glycosylation, réarrangement spatial, etc.) lui donnent sa conformation finale. Durant son trajet dans le cytoplasme, la protéine est acheminée d'organites en organites via des vésicules formées par endocytose. Dans le cas de l'expression d'un gène hétérologue, il est important de comprendre les mécanismes de sécrétion afin d'optimiser le procédé de récupération de la protéine produite.

La vacuole, délimitée du cytoplasme par une membrane appelée tonoplaste, est le lieu d'une activité intense. D'une part, elle possède une capacité protéolytique grâce à ses protéases intravacuolaires. D'autre part, c'est un endroit de stockage d'acides aminés, de polyphosphates et d'ions métalliques impliqués dans l'osmorégulation et la régulation homéostatique du cytosol (WALKER, 1998).

### ***II.4.4 LA MITOCHONDRIE***

Véritable lieu de la respiration cellulaire, cet organite mime la centrale énergétique de la levure en produisant l'ATP, carburant des réactions endergoniques. La forme de la mitochondrie, sa taille et son nombre dépendent des conditions de croissance. Elle est au carrefour du métabolisme respiro-fermentaire. La concentration en substrat et en oxygène dans le milieu soumet une levure anaérobie facultative à emprunter des voies métaboliques de types fermentaires, respiratoires ou respiro-fermentaires. Les rôles de la mitochondrie sont différents lors de la fermentation, elle possède notamment des cytochromes impliqués dans la synthèse de l'ergostérol, des enzymes impliquées dans la désaturation des corps gras et dans la synthèse d'acides aminés et des bases puriques et pyrimidiques. Elle est capable d'apporter une adaptation physiologique face au stress causés par l'éthanol, les radicaux libres, etc. (WALKER, 1998).

### III OBJECTIFS DU TRAVAIL DE FIN D'ETUDE

Le travail de fin d'étude s'intéresse à l'extrapolation d'une production de levure à l'échelle industrielle. Dans ce cadre, l'extrapolation est réalisée grâce à l'utilisation de la technologie *scale-down* dont le principe est de reproduire les conditions de culture et les effets rencontrés à l'échelle industrielle (m<sup>3</sup>) au niveau du laboratoire (dm<sup>3</sup>). Le microorganisme employé est *Saccharomyces cerevisiae*, une levure au potentiel biotechnologique énorme connue pour son métabolisme respiro-fermentaire et sa sensibilité à l'effet Crabtree (Section II.3.4.3). Cette particularité est un inconvénient majeur car l'opération de mélange au niveau industriel génère des hétérogénéités de substrat accentuant le phénomène. Ce mémoire s'insère dans la continuité d'un travail entrepris par des chercheurs de l'INSA de Toulouse. FERIA-GERVASIO *et al.*, (2008) ont découvert que l'acide oléique pouvait naturellement retarder la bascule respiro-fermentaire de *Saccharomyces cerevisiae* en présence de fortes concentrations en glucose. Le travail de fin d'étude a pour objectif d'étudier la modulation de l'effet *scale-down* d'une production *fed-batch* de levure à l'aide d'une solution d'ajout composée de glucose et d'acide oléique.

L'étude comprend trois parties:

- Mise au point d'un protocole de conditionnement des levures à l'acide oléique
- Impact de l'acide oléique sur l'extrapolation d'une culture *fed-batch* de *S. cerevisiae* (*boulardii*) à l'échelle industrielle grâce à la technologie *scale-down*
- Simulation des gradients de glucose expérimentés par les levures au cours de leurs déplacements dans le réacteur.

## IV MATERIEL ET METHODES

### IV.1 MÉTHODOLOGIE SUIVIE

Dans un premier temps, les manipulations ont été consacrées à la recherche d'un protocole de conditionnement des levures. Dans un deuxième temps, les manipulations se sont concentrées sur la réalisation de cultures *fed-batch* en réacteur *scale-down*. Pour ce faire, un conditionnement préalable des levures à l'acide oléique a été effectué avant de démarrer la culture *fed-batch*. Finalement, des simulations via l'utilisation du logiciel MATLAB ont été effectuées dans le but de modéliser les gradients expérimentés par les levures au cours de leurs déplacements dans le bioréacteur.

Afin d'étudier la physiologie cellulaire des levures au cours des cultures, différents paramètres sont suivis en continu et des échantillons, prélevés à intervalles réguliers, sont soumis à des analyses diverses:

- mesure de la pression en oxygène dissout, de la température et du pH
- mesure de la biomasse sèche et de la densité optique
- dosage de l'éthanol au long des cultures
- coloration spécifique de certaines fonctions physiologiques cellulaires mises en évidence par la cytométrie en flux

De manière à atteindre les objectifs fixés, trois modes de culture en fiole ont été testés pour la partie concernant le conditionnement des levures à l'acide oléique. Quatre cultures *fed-batch* en bioréacteur de deux litres ont été effectuées pour la partie se rapportant à la modulation de l'effet *scale-down* par ajout d'acide oléique. De manière à mettre en évidence les modifications physiologiques occasionnées par la présence de l'acide oléique, chaque culture de levure envisagée est réalisée en parallèle avec une culture témoin dans laquelle la source de carbone est uniquement du glucose. L'extrapolation des productions de levure en mode *fed-batch* est opérée grâce à la technologie *scale-down* et les résultats obtenus sont comparés à une culture dans un réacteur de référence. L'opération de mélange est considérée parfaite et fournit des conditions de cultures idéales dans le réacteur de référence. Finalement, La modélisation du déplacement des levures et des gradients de concentration se base sur un modèle stochastique dans lequel la transition entre deux événements est gouvernée par des probabilités.

## IV.2 SOUCHE ET MILIEUX DE CULTURES UTILISÉS

Au cours des manipulations menées lors de ce travail de fin d'étude, nous avons utilisé la souche de levure *Saccharomyces cerevisiae (boulardii)*. Cette souche est un probiotique notamment utilisé pour traiter les troubles du système digestif comme les diarrhées.

*Boulardii* est ensemencé sur boîte de pétri dans un milieu 868 solide à 30°C. Après 48h, une colonie est prélevée et mise dans 100 ml de milieu 863 à 30°C et 100 rpm. Après 8-16h, 30 ml de milieu de culture sont prélevés et mélangés à 20 ml de glycérol stérile afin de remplir des *working seeds* conservant les souches à -80°C. D'un point de vue pratique, l'utilisation des *workings seeds* ne requiert pas un ensemencement sur boîte avant le démarrage d'une préculture et assure la reproductibilité des résultats de fermentation.

Ci-dessous, la composition du milieu 863 liquide.

**Tableau 2. Composition d'un milieu 863.**

Milieu 863 (pour 1 litre)	
Solution 1 (950 ml)	
Extrait de levure	10 g
Peptone	10 g
Solution 2 (50 ml)	
Glucose	20 g

Afin d'éviter la réaction de Maillard, la solution 1 est autoclavée séparément de la solution 2. Puis, la solution 2 est ajoutée stérilement à la solution 1.

Pour obtenir le milieu 868 solide, 20 g/litre d'agar sont ajoutés stérilement au milieu 863 liquide. Après stérilisation, les boîtes de pétri sont remplies jusqu'à la moitié avec le milieu encore chaud et liquide qui se solidifie lors du refroidissement.

Pour toutes les manipulations effectuées, les précultures sont réalisées à partir d'un *working seed* de *boulardii* ajouté stérilement à un volume de milieu 863 liquide. La préculture sert d'une part à démarrer la croissance des cellules afin d'atteindre la phase de croissance exponentielle. D'autre part, elle permet de diminuer le temps de latence lorsque ce stock de cellules est dilué dans un plus grand volume de milieu.

La préculture est ensuite inoculée dans un milieu CFM qui constitue le milieu de culture relatif à toutes les manipulations effectuées lors de ce travail. Le milieu CFM est obtenu en mélangeant les solutions suivantes:

**Tableau 3. Composition des solutions intervenant dans l'obtention du milieu CFM.**

<b>Milieu CFM</b>	
<b>Solution (1) : sels principaux (pour 900 ml)</b>	
Sulfate d'ammonium	12 g
Dihydrogénophosphate de potassium	6 g
Sulfate de magnésium	1 g
<b>Solution (2) : oligo-éléments (100 ml)</b>	
EDTA	1,5 g
Sulfate de zinc	0,45 g
Chlorure de manganèse	0,1 g
Chlorure de cobalt	0,03 g
Sulfate de cuivre	0,03 g
Molybdène di-sodique	0,4 g
Chlorure de calcium	0,45 g
Sulfate de fer II	0,3 g
Acide borique	0,1 g
<b>Solution (3) : vitamines (100 ml)</b>	
D-Biotine	100 mg
D,L acide pantothénique	100 mg
Acide nicotinique	100 mg
Myo-inositol	250 mg
Thiamine	100 mg
Pyrodoxine	100 mg
Acide p-aminobenzoïque	20 mg
<b>Solution (4) : extrait de levure (100ml)</b>	
Extrait de levure	1 g

Un litre de milieu CFM est obtenu en mélangeant 900 ml de la solution (1), 100 ml de la solution (4), 2 ml de la solution (2) et 2 ml de la solution (3). Les solutions (1) et (4) sont stérilisées à l'autoclave. Les solutions (2) et (3) sont filtrées stérilement sous le flux à l'aide d'une membrane stérile à 0,45 µm.

Lors des expériences conduites au laboratoire, plusieurs substrats carbonés furent employés:

- le glucose monohydrate (ROQUETTE)
- l'acide oléique (VWR PROLABO)
- le D-(+)-tréhalose dihydrate (SIGMA-ALDRICH)

Le substrat carboné est ajouté stérilement sous le flux dans le milieu CFM. Les quantités sont précisées dans les protocoles.

Remarque : lors du conditionnement *fed-batch* en fiole (Section IV.3.2.2), le milieu CFM est tamponné à pH 5,5 à l'aide d'hydrogénophosphate di-potassique et de dihydrogénophosphate de potassium afin de limiter l'acidification du milieu de culture, nocive pour les levures. La solution des sels principaux du milieu CFM est remplacée par celle présentée dans le tableau 4.

**Tableau 4. Composition de la solution de sels principaux pour un milieu tampon CFM à pH 5,5.**

Solution de sels principaux à pH 5,5 pour milieu CFM (1 litre)	
Dihydrogénophosphate de potassium	16 g
Hydrogénophosphate di-potassique	3,05 g
Sulfate d'ammonium	12 g
Sulfate de magnésium	1 g

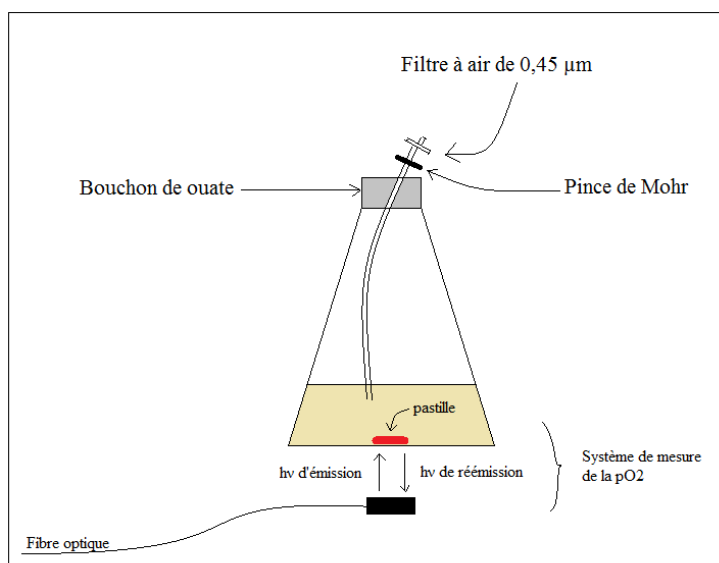
Les pesées supérieures à 1 g sont réalisées sur une balance SARTORIUS BL 1500 S (d = 0,01 g), tandis que les pesées inférieures à 1 g sont effectuées sur une balance METTLER TOLEDO AG204 DELTARANGE (d = 0,1 mg).

### IV.3 MISE AU POINT D'UN PROTOCOLE DE CONDITIONNEMENT DES LEVURES

Le raisonnement suivi et les résultats obtenus pour la mise au point du conditionnement des levures figurent dans la section V de ce travail de fin d'étude. La section "Matériels et méthodes" concernant le conditionnement décrit le matériel utilisé et les essais expérimentés.

#### IV.3.1 MATÉRIEL

Un incubateur à agitation orbitale (SANYO) a été utilisé pour l'étude concernant le conditionnement des levures. Les fioles de 1 litre employées sont munies de déflecteurs verticaux améliorant le transfert d'oxygène gaz-liquide. Une pastille, composée d'un fluorochrome sensible à l'oxygène dissout dans le milieu de culture, est collée au fond de la fiole et constitue avec la sonde optique (OXY4-MINI, PRESENS) un système de mesure continu de la pression en oxygène dissout dans le milieu. La stérilité à l'intérieur des fioles est maintenue par un bouchon d'ouate dans lequel passe un tuyau au bout duquel est fixé un filtre à air de 0,45  $\mu\text{m}$ . L'extrémité du tuyau est également fermée par une pince de MOHR. Ce système assure la prise stérile des prélèvements (Figure 12).



**Figure 12. Fiole utilisée pour le conditionnement des levures + système de prélèvement et mesure de la pO<sub>2</sub>.**

Pour les conditionnements *fed-batch*, la fiole contenant la solution d'ajout est raccordée stérilement par un tuyau qui passe également dans le bouchon de ouate de la fiole. La solution est ajoutée grâce une pompe péristaltique (WATSON MARLOW 101U/R) régulée par une équation d'ajout écrite dans un fichier MATLAB préalablement défini pour la culture *fed-batch* de *Saccharomyces boulardii*.

### IV.3.2 PROTOCOLES

Les schémas ci-dessous décrivent le protocole suivi lors de la mise au point du conditionnement. La démarche suivie est relativement identique pour chaque conditionnement: seuls l'origine du substrat carboné et le mode de culture diffèrent. En quelques mots, une préculture est constituée à partir d'un milieu liquide 863. Une fois terminée, la préculture est divisée en deux volumes égaux. Chaque volume est inoculé stérilement dans une fiole décrite ci-dessus. Une quantité précise d'acide oléique et de glucose est ajoutée dans la fiole d'essai et du glucose uniquement dans la fiole témoin. Les fioles sont ensuite placées dans l'incubateur orbital (30°C à 100 rpm). La pression en oxygène dissout est mesurée en continu et des prélèvements sont effectués à intervalles de temps réguliers. Les échantillons prélevés sont soumis à diverses analyses: viabilité, teneur en biomasse sèche, coloration de la vacuole et des corps gras d'inclusion. Le protocole des analyses effectuées est énoncé dans la section IV.6. La culture est terminée lorsque la pression en oxygène dissout remonte et se stabilise à 100 %. Ci-joint, le tableau reprend les différents types de conditionnement testés ainsi que les analyses réalisées.

**Tableau 5. Récapitulatif des différents conditionnements testés (DO = densité optique, MS = matière sèche, PI = iodure de propidium, NR = Nile Red et FITC = fluoro-isothiocyanate).**

	Mode de culture	Substrat(s) carboné(s)		Analyses
		Référence	Essai	
Conditionnement 1	<i>Batch</i>	glucose	glucose et acide oléique	DO, MS, coloration PI, NR
Conditionnement 2	<i>Fed-batch</i>	glucose	glucose et acide oléique	DO, MS, coloration, PI, NR
Conditionnement 3	<i>Batch</i>	tréhalose	Tréhalose et acide oléique	DO, MS, coloration FUN, PI, FITC

Remarque: il est à noter que dans cette partie le protocole de mesure de densité optique appliqué aux échantillons a été identique pour les échantillons avec et sans oléate. Cela induit une DO erronée légèrement supérieure pour les échantillons contenant de l'oléate. Néanmoins, cela ne fausse pas l'interprétation des courbes de croissance.



### IV.3.2.1 CONDITIONNEMENT *BATCH* DES LEVURES DANS UN MILIEU GLUCOSE/ACIDE OLÉIQUE

Ce conditionnement se déroule en phase *batch* uniquement. C'est-à-dire que rien n'est ajouté ni soutiré durant la culture.

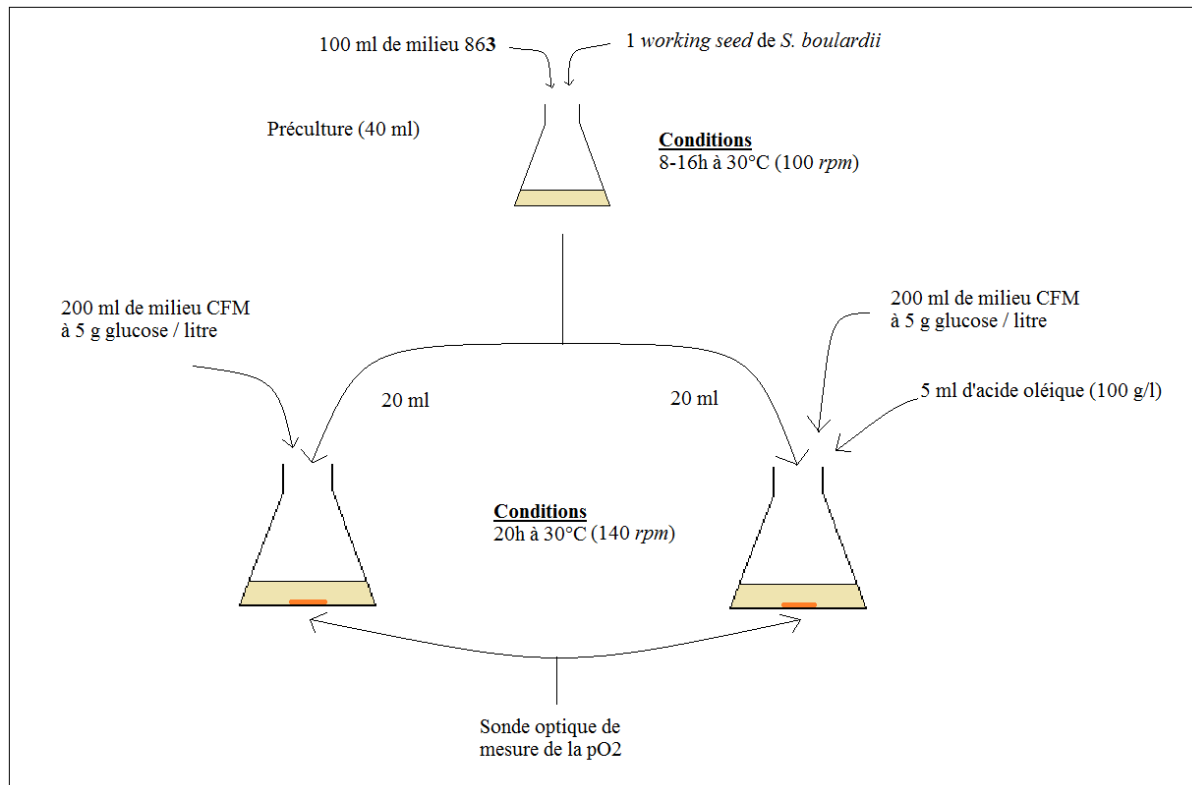


Figure 13. Protocole de conditionnement *batch* des levures au glucose et glucose/acide oléique.

### IV.3.2.2 CONDITIONNEMENT *FED-BATCH* DES LEVURES AVEC UN APPORT DE SUBSTRAT MIXTE GLUCOSE/ACIDE OLÉIQUE

Ce conditionnement nécessite une phase *batch* avant de démarrer la phase d'ajout du substrat dans le milieu. Les cellules atteignent la croissance exponentielle en consommant d'abord le substrat carbone limitant jusqu'à épuisement. Ensuite, la pompe péristaltique s'active pour ajouter le substrat en respectant une régulation préalablement définie dans un code MATLAB.

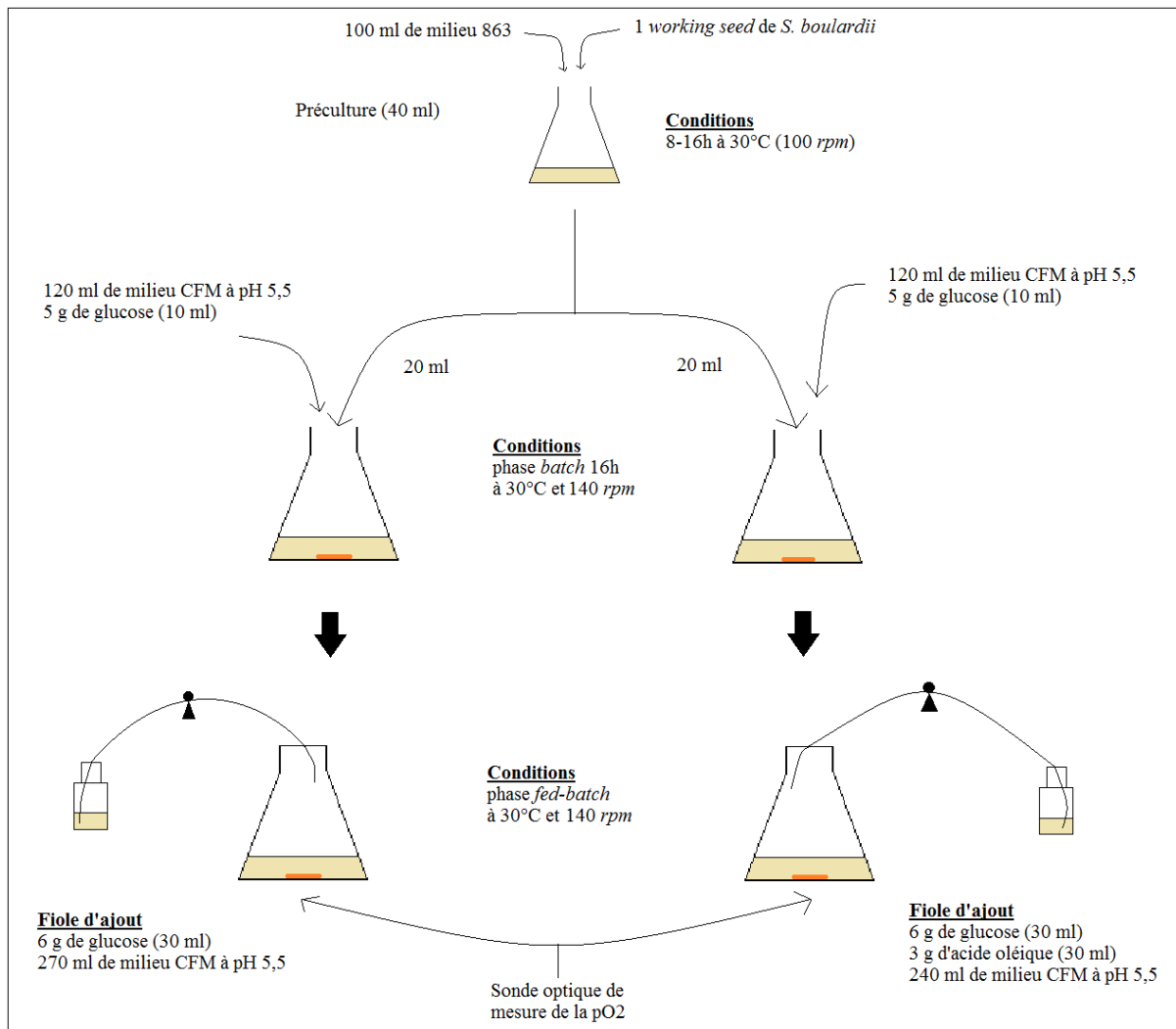


Figure 14. Protocole de conditionnement *fed-batch* des levures au glucose et glucose/acide oléique.

#### IV.3.2.3 CONDITIONNEMENT BATCH DES LEVURES DANS UN MILIEU TRÉHALOSE/ACIDE OLÉIQUE

Ce conditionnement a lieu uniquement en phase *batch*. Le glucose est remplacé par le tréhalose, un disaccharide de glucose. Le tréhalose est hydrolysé très lentement en deux molécules de glucose par la tréhalase, une enzyme extracellulaire produite par la levure. Ce relargage très lent de glucose dans le milieu mime parfaitement les conditions imposées par un chémostat en limitation glucose (MOURET JR *et al.*, 2005). Dans cette situation particulière, la levure est capable d'assimiler l'acide oléique présent dans le milieu afin de ne pas être en limitation de substrat.

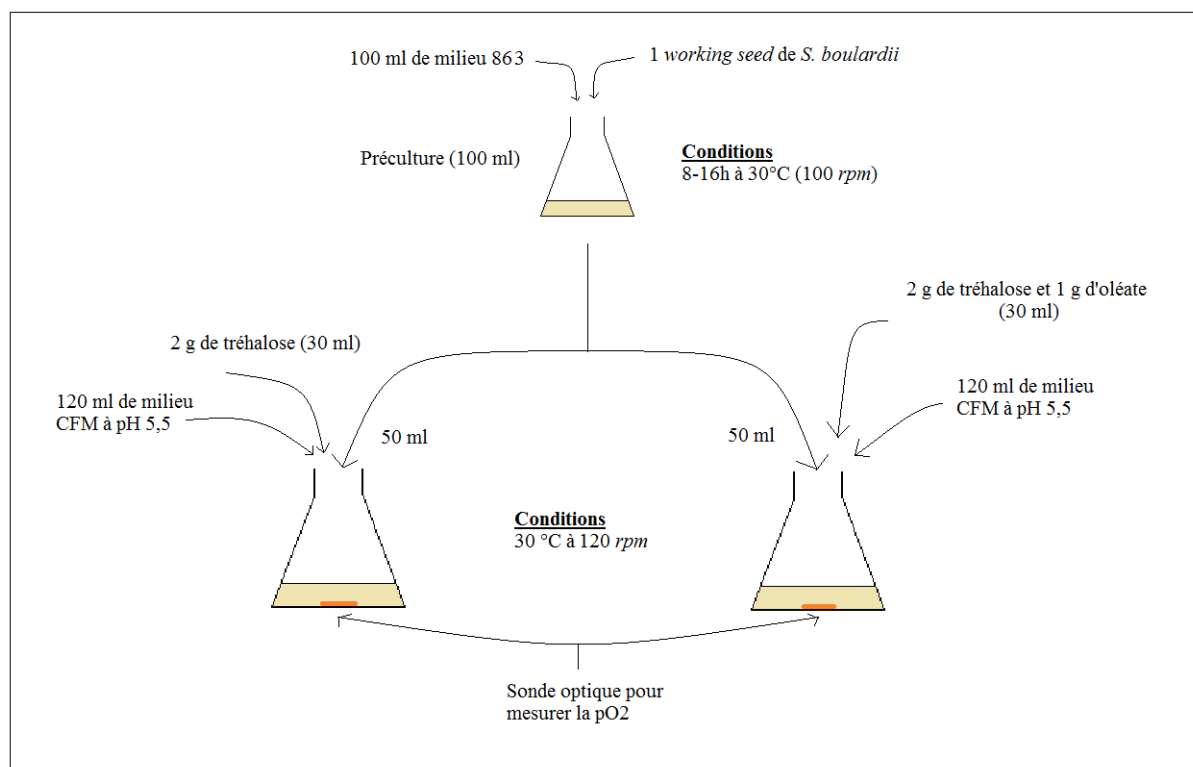


Figure 15. Protocole de conditionnement *batch* des levures au tréhalose et tréhalose/acide oléique.

#### IV.4 MISE EN ŒUVRE DES CULTURES *FED-BATCH* DE *S. BOULARDII*

Les cultures *fed-batch* sont accomplies en réacteur de référence et en réacteur *scale-down* dans le but d'observer l'impact de l'extrapolation sur la physiologie des levures et l'hydrodynamique du bioréacteur. L'objectif est d'étudier l'effet d'un substrat mixte glucose/acide oléique sur la physiologie des levures lors de l'extrapolation. Les résultats sont comparés à des cultures témoins exemptes d'acide oléique. Tout au long des cultures entreprises, des prélèvements du milieu variant de 2 à 10 ml sont effectués dans le but de suivre la physiologie des levures. Ces échantillons sont ensuite soumis à des analyses telles que des colorations, la mesure de la biomasse sèche, le dosage de l'éthanol etc. Le tableau 6 reprend les différentes cultures testées au cours de ce travail ainsi que les différentes analyses réalisées.

Tableau 6. Récapitulatif des réacteurs testés pour l'étude de l'influence de l'acide oléique sur l'extrapolation des cultures *fed-batch* de *S. boulardii*.

		Type de réacteur	Type de régulation	Nature(s) du substrat carboné	Analyses
Témoin	Réacteur 1	référence	indirecte (pO <sub>2</sub> )	glucose	DO, MS, coloration PI, FUN, éthanol
	Réacteur 2	<i>scale-down</i>	indirecte (pO <sub>2</sub> )	glucose	DO, MS, coloration PI, FUN, éthanol
Essai	Réacteur 3	référence	indirecte (pO <sub>2</sub> )	glucose et acide oléique	DO, MS, coloration PI, FUN, FITC, éthanol
	Réacteur 4	<i>scale-down</i>	indirecte (pO <sub>2</sub> )	glucose et acide oléique	DO, MS, coloration PI, FUN, FITC, éthanol

Le tableau 7 donne les paramètres de cultures utilisés pour la mise en œuvre de chaque culture *fed-batch*.

**Tableau 7. Valeurs des paramètres de régulation des cultures *fed-batch*.**

Valeurs des paramètres de culture	
pH	5
Température (°C)	30
Agitation ( <i>rpm</i> )	De 500 à 1100
Aération ( <i>vvm</i> )	De 0,5 à 1,2
Ajout de substrat	si pO <sub>2</sub> >30%

#### **IV.4.1 DESCRIPTION DU BIOREACTEUR DE REFERENCE**

Les productions de levures ont été opérées dans des bioréacteurs (BIOSTATBPLUS, SARTORIUS STEDIM) en verre de 2 litres (Diamètre = 0,13 m et Hauteur = 0,24 m). Le système de mélange est composé d'un axe rotatif sur lequel sont fixés deux mobiles d'agitation de type TD4 (turbine à pales droites). Un *sparger* situé juste en-dessous du premier mobile d'agitation assure l'oxygénation du milieu. Le bioréacteur est équipé d'un ordinateur interne assurant la régulation de différents paramètres incluant:

- le pH par ajout d'acide phosphorique 50% ou d'ammoniac quand l'électrode de verre enregistre des variations de pH
- la vitesse d'agitation appliquée au milieu de culture
- le débit d'air insufflé par le "*sparger*"
- l'ajout de substrat
- la température par un système de double enveloppe
- la pression en oxygène dissout par une sonde polarographique munie d'une membrane en téflon

L'ajout de substrat se fait par le haut de la cuve. Le bioréacteur dispose également d'un système de prise d'échantillon maintenant la stérilité à l'intérieur de la cuve. Du point de vue hydrodynamique, l'opération de mélange fournie par les mobiles d'agitation est considérée comme parfaite. Cela signifie qu'un pulse de substrat est homogénéisé instantanément ( $t_m \approx 0$ ) et que la distribution des temps de circulation possède un écart-type nul ( $t_c \approx \text{constante}$ ).

#### IV.4.2 DESCRIPTION DU BIOREACTEUR SCALE-DOWN

Pour rappel, le bioréacteur *scale-down* mime les hétérogénéités rencontrées lors de l'extrapolation. Il est composé d'une partie parfaitement mélangée, identique au réacteur de référence, et d'une section non-mélangée connectée au réacteur. La section non-mélangée est un tuyau en silicone d'une longueur de 12 m et d'un diamètre interne de 5 mm et externe de 8 mm dont l'une des extrémités est plongée dans le milieu de culture et l'autre est connectée au sommet de la cuve. La circulation du fluide à l'intérieur de la boucle se fait au moyen d'une pompe péristaltique (WATSON MARLOW BREDEL) dont le débit de fonctionnement est fixé à 80 rpm, soit 10,9 l/h. La boucle de recirculation du milieu de culture est caractérisée par un écoulement piston. Lors de la mise en route du *fed-batch*, l'ajout de substrat s'effectue au début de la boucle de recirculation. Il est à noter que la régulation des différents paramètres ( $pO_2$ , pH,  $T^\circ$ ,  $vvm$ , rpm) s'effectue uniquement dans la partie parfaitement mélangée du réacteur.

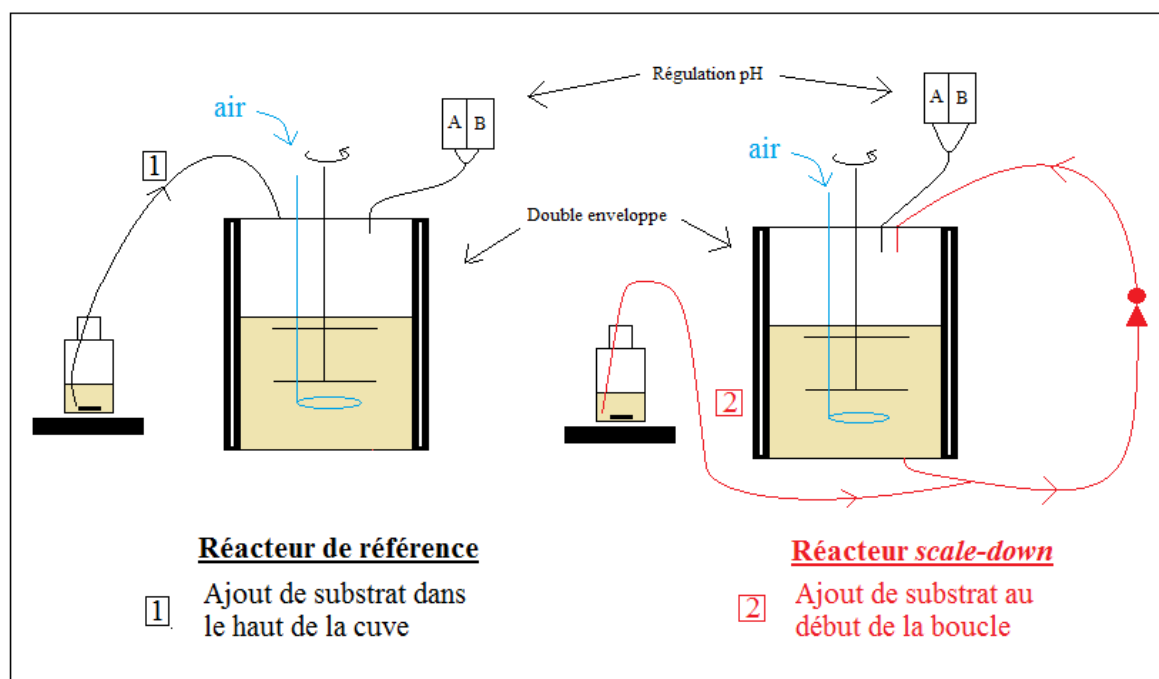


Figure 16. Schéma d'un réacteur de référence et d'un réacteur *scale-down*.

A la figure 16, la partie en rouge représente la partie-non mélangée du réacteur *scale-down* alors que la partie en noir symbolise la partie parfaitement mélangée du réacteur.

#### IV.4.3 CULTURE FED-BATCH SANS OLÉATE (TÉMOIN)

La culture *fed-batch* est précédée d'une phase *batch* durant laquelle les cellules consomment le substrat limitant et se multiplient pour atteindre la croissance exponentielle. L'apport de la solution *fed-batch* démarre une fois le glucose de la phase *batch* épuisé. La figure 17 schématise l'enchaînement des opérations pour la mise en œuvre de la culture *fed-batch*. Les conditions de culture et la composition des milieux y sont précisées.

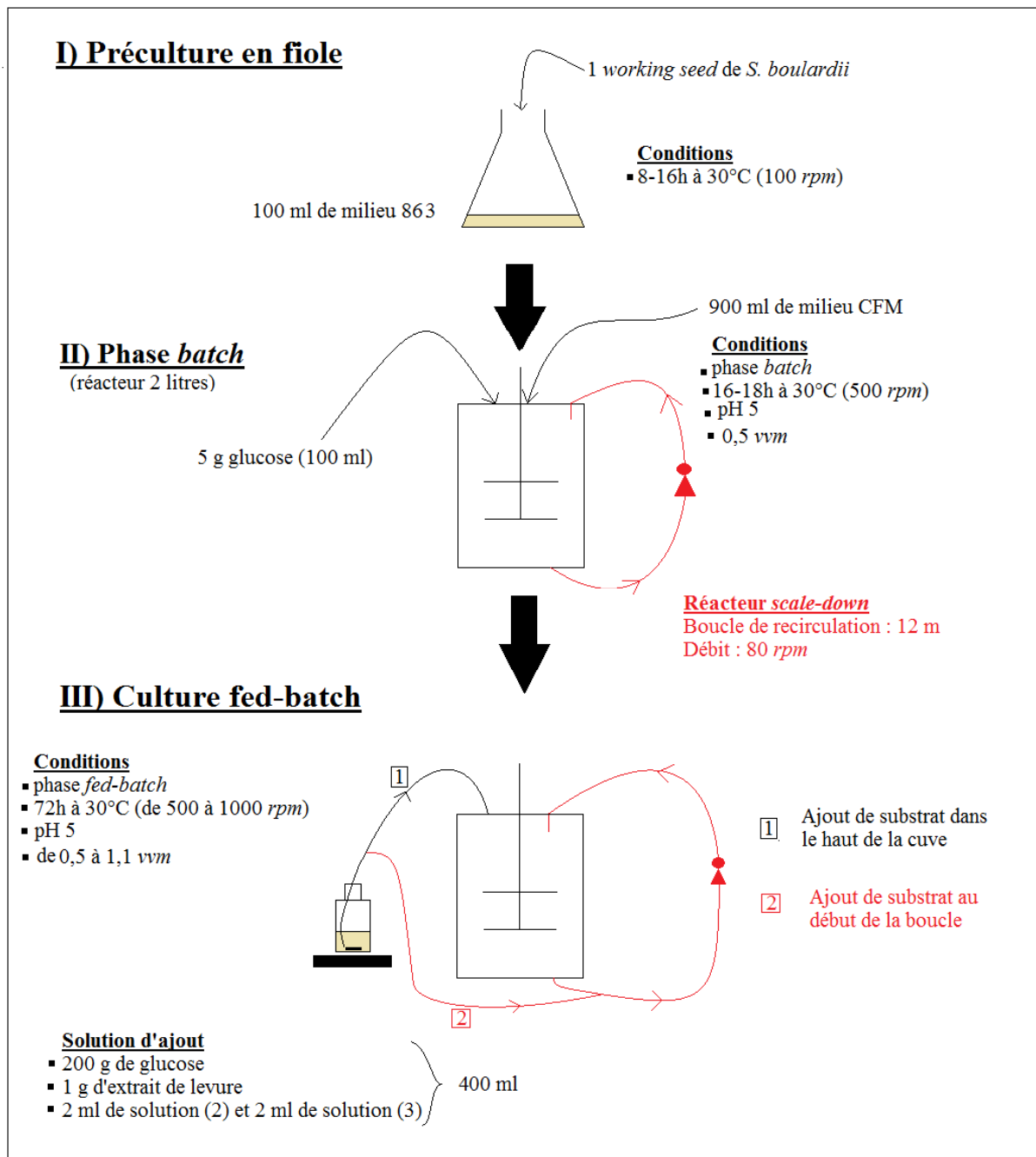


Figure 17. Schéma décrivant la mise en œuvre des cultures *fed-batch* sans acide oléique en réacteur de référence et en réacteur *scale-down*.

#### IV.4.4 CULTURE FED-BATCH AVEC OLÉATE

Contrairement aux cultures sans acide oléique, la phase *batch* est en réalité un conditionnement des levures à l'acide oléique précédant la culture *fed-batch* (Section IV.3.2.3). L'apport de substrat s'enclenche de la même manière que pour les cultures sans acide oléique. La fiole d'ajout est homogénéisée en continu à l'aide d'une puce magnétique car l'acide oléique n'est pas soluble dans la phase aqueuse. La figure 18 schématise l'enchaînement des opérations pour la mise en œuvre de la culture *fed-batch*. Les conditions de culture et la composition des milieux y sont précisées.

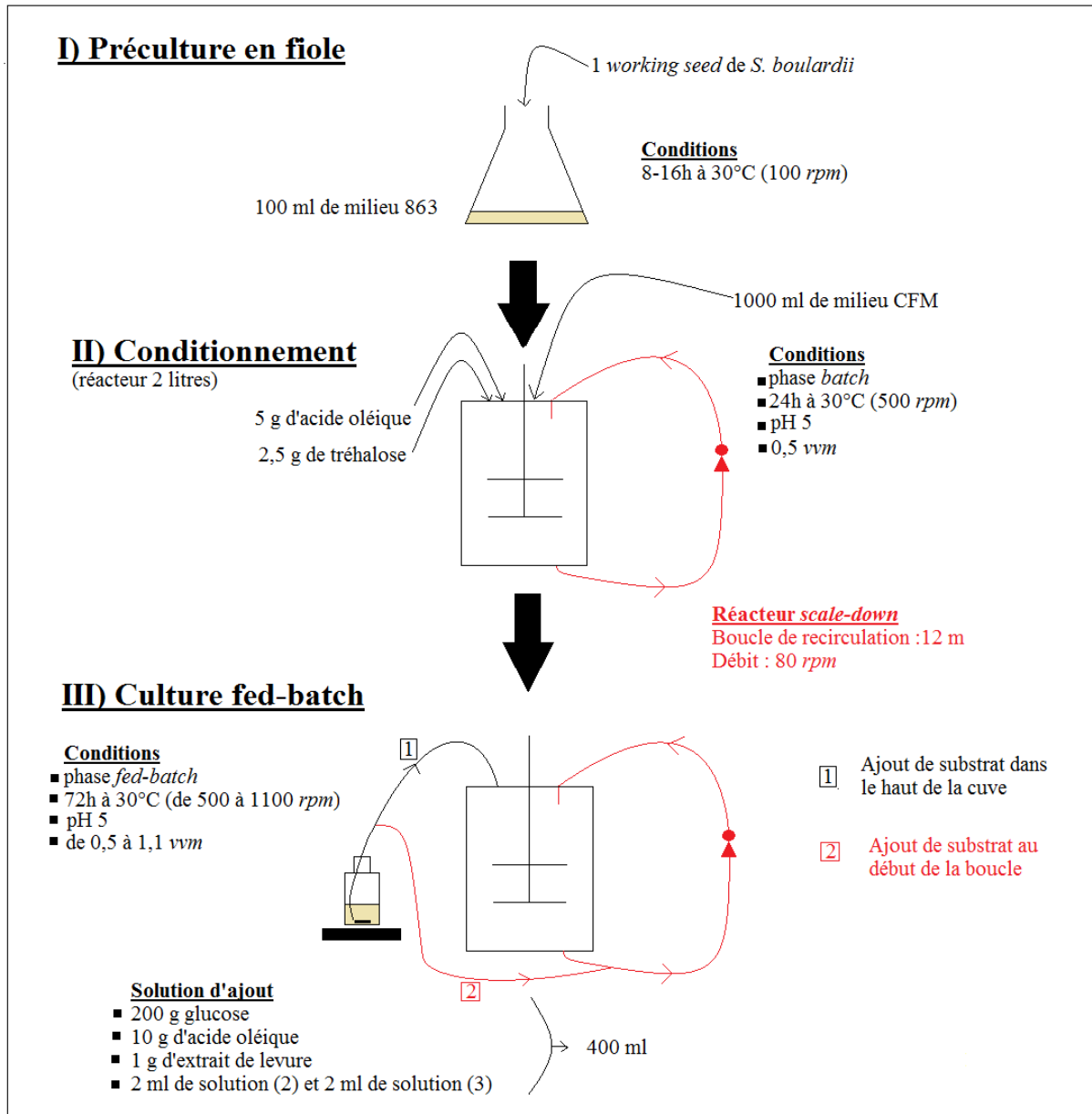


Figure 18. Schéma décrivant la mise en œuvre des cultures *fed-batch* avec acide oléique en réacteur de référence et en réacteur *scale-down*.

#### IV.4.5 RÉGULATION DE L'AJOUT DE SUBSTRAT AU COURS DE LA CULTURE FED-BATCH

La sensibilité de *Saccharomyces cerevisiae* à l'effet Crabtree implique un apport progressif du glucose dans le réacteur afin de ne pas dépasser la valeur seuil au-dessus de laquelle la levure commence à effectuer un métabolisme respiration-fermentaire. La pompe ajoutant le substrat dans le réacteur est régulée indirectement par la mesure de la pression en oxygène dissout dans le milieu de culture (Section II.1.2). Durant la phase *batch*, les cellules oxydent le glucose jusqu'à épuisement grâce à l'oxygène provenant de l'aération continue. Cette phase est marquée par une diminution de la  $pO_2$  jusqu'à un minimum suivi d'une remontée. La régulation *fed-batch* commence lorsque la  $pO_2$  dépasse la valeur seuil de 30%. Il y a ajout de substrat tant que la  $pO_2$  est supérieur à 30%.

En-dessous de cette valeur, la pompe est à l'arrêt. Les cellules en croissance exponentielle consomment le glucose ajouté et cela se traduit par une rechute de la pO<sub>2</sub> jusqu'à un minimum suivi d'une remontée. La pO<sub>2</sub> effectue des oscillations jusqu'à ce que la totalité de la solution d'ajout soit injectée. La production est terminée quand la pO<sub>2</sub> se stabilise à 100%.

## IV.5 MODÉLISATION DE L'HYDRODYNAMIQUE DES RÉACTEURS

### IV.5.1 DÉTERMINATION DE LA DISTRIBUTION DES TEMPS DE SÉJOUR

#### IV.5.1.1 MÉTHODE EXPÉRIMENTALE

1 ml d'une solution de billes fluorescentes (1 µm de diamètre) à 10<sup>9</sup> billes/ml est injectée au début de la boucle de recirculation. Vingt secondes après l'injection, des échantillons de 2 ml sont prélevés à la sortie de la boucle de recirculation toutes les cinq secondes pendant deux minutes. Le dispositif est illustré à la figure 19.

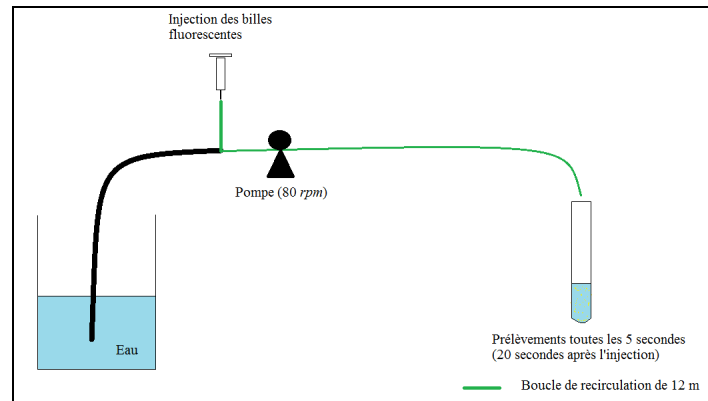


Figure 19. Dispositif de mesure de la DTS expérimentale.

L'intensité de la fluorescence de chaque échantillon est mesurée grâce la cytométrie en flux (FL1) et permet de générer une courbe de DTS expérimentale.

Le temps de séjour théorique d'un fluide dans une conduite caractérisée par un écoulement piston est égal à  $T_{\text{séjour}} = \frac{V_{\text{conduite}}}{Q_{\text{circulation}}}$ . Il est égal à 77 secondes pour la boucle de recirculation.

Avec  $V_{\text{conduite}}$  le volume de la conduite (m<sup>3</sup>) et  $Q_{\text{circulation}}$  le débit de recirculation (m<sup>3</sup>/s).

### IV.5.2 SIMULATION DE LA CONCENTRATION EN GLUCOSE AU COURS DU TEMPS

Le réacteur *scale-down* est caractérisé par un modèle hydrodynamique. La partie agitée est un compartiment parfaitement mélangé (CPM). La boucle de recirculation (longueur 12 m et diamètre interne 5 mm) est caractérisée par un écoulement piston et doit être modélisée comme une série de 150 CPM. L'évolution de la concentration en glucose  $C_M$  (g/m<sup>3</sup>) avec le temps  $t$ (s) dans le volume  $V_M$  (m<sup>3</sup>) de la partie agitée dépend du débit de flux entrant et sortant  $q$  (m<sup>3</sup>/s) du compartiment:

$$V_M \cdot \frac{dC_M}{dt} = q \cdot C_{T6} - q \cdot C_M$$



Dans la boucle de recirculation avec  $C_T$  ( $\text{g}/\text{m}^3$ ) la concentration dans un CPM de la boucle. L'indice  $n$  désigne le numéro du CPM.

$$V_{T2} \cdot \frac{dC_{T2}}{dt} = q \cdot C_{T1} - q \cdot C_{T2}$$

$$V_{Tn} \cdot \frac{dC_{Tn}}{dt} = q \cdot C_{Tn-1} - q \cdot C_{Tn}$$

Les paramètres des équations différentielles décrivant le bilan de masse de chaque compartiment sont rassemblés dans une matrice:

$$d \begin{bmatrix} C_M \\ C_{T1} \\ C_{T2} \\ \vdots \\ C_{Tn} \end{bmatrix} / dt = \begin{bmatrix} -q/V_m & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & q/V_m \\ q/V_{T1} & -q/V_{T1} & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & q/V_{T2} & -q/V_{T2} & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & \cdot & \cdot & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & \cdot & \cdot & \cdot & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & \cdot & \cdot & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & q/V_{Tn} & -q/V_{Tn} \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} C_M \\ C_{T1} \\ C_{T2} \\ \vdots \\ C_{Tn} \end{bmatrix}$$

Ce système d'équation peut être résolu numériquement afin de simuler la dynamique d'homogénéisation du glucose dans le réacteur *scale-down*, notamment pour la mesure de la DTS. Dans ce cadre, le modèle est utilisé afin de simuler la concentration en glucose éprouvée par les levures pendant une production *fed-batch* en réacteur *scale-down*. Dès lors, il faut tenir compte de l'addition du glucose, de la consommation du glucose et de la formation de biomasse. Les simulations sont écrites dans des codes MATLAB.

Ce modèle structuré hydrodynamique qualifié de déterministe est appliqué aux phénomènes de mélanges dans les bioréacteurs.

### **IV.5.3 SIMULATION DU DÉPLACEMENT D'UNE LEVURE DANS LE RÉACTEUR SCALE-DOWN**

Le déplacement des levures est simulé par un modèle stochastique. La division du réacteur *scale-down* en CPM est identique au modèle utilisé pour la simulation des gradients en glucose au cours du temps. Le fait d'employer des probabilités permet de tenir compte du caractère aléatoire du déplacement des levures entre les différents CPM du réacteur *scale-down*. La méthode suivie et les codes des simulations figurent dans l'annexe VIII.6. La simulation du déplacement est ensuite superposée à la simulation des gradients en glucose de manière à estimer la fréquence à laquelle les microorganismes sont soumis à des hautes concentrations.

## IV.6 PROTOCOLE DES DIFFÉRENTES ANALYSES EFFECTUÉES

### IV.6.1 MESURE DE LA CONCENTRATION EN BIOMASSE

La densité optique et la matière sèche sont proportionnelles à la concentration en biomasse dans le milieu de culture. Par ailleurs, la courbe de croissance d'une culture cellulaire peut-être déterminée par l'évolution de la densité optique ou de la matière sèche tout au long de la culture.

La densité optique est mesurée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 570 nm dans un appareil de type BECKMANN-COULTER. Pour les milieux exempts d'acide oléique, 200 µl de milieu de culture sont prélevés et introduits dans le puits d'une plaquette à 96 puits. Cependant, le protocole diffère pour les milieux de cultures contenant de l'acide oléique résiduel. L'immiscibilité de l'acide oléique en phase aqueuse fausse la mesure de densité optique. Dans un eppendorf d'1,5 ml, on ajoute 750 µl de propanol et 750 µl du milieu de culture. L'eppendorf est vortexé puis centrifugé pendant 3 minutes à 15000 *rpm*. Le surnageant est pesé et le culot de cellules est resuspendu dans le volume d'eau correspondant au volume de surnageant. La masse volumique du surnageant (eau-propanol) est de 0,915.

La matière/biomasse sèche (g/l) est dosée par gravimétrie. Un volume précis de milieu de culture est filtré sous vide à l'aide d'une pompe à eau sur une membrane (SUPOR-200 PALL CORPORATION) préalablement séchée et pesée, dont la taille maximale des pores est de 0,45 µm. Une fois la suspension cellulaire filtrée, la membrane est rincée à l'eau et séchée à l'étuve pendant 48h. La différence de masse avant et après séchage permet de déterminer la biomasse sèche dans le milieu de culture. Néanmoins, pour les milieux de cultures possédant une quantité d'acide oléique résiduel, le protocole de dosage est modifié car l'acide oléique se colmate au niveau de la membrane et fausse donc la mesure de matière sèche. L'acide oléique est extrait en ajoutant de l'hexane à un volume précis de milieu de culture dans un *falcon* de 15 ml. Le *falcon* est vortexé et centrifugé 5 minutes à 4000 *rpm*. Le culot de cellules est resuspendu dans de l'eau distillée avant filtration.

### IV.6.2 MESURE DE LA VIABILITÉ CELLULAIRE

La viabilité cellulaire est un critère pertinent pour évaluer la qualité de la biomasse produite lors d'un procédé. Pourtant, sans la réalisation d'une coloration, la microscopie et la cytométrie de flux ne permettent pas de discerner les cellules mortes des vivantes. Dans le cadre de l'étude de viabilité, deux colorations ont été appliquées aux prélèvements: une à l'iodure de propidium et l'autre au FUN-1.

L'iodure de propidium pénètre dans les cellules dont la membrane est endommagée et colore le cytoplasme en rouge. Le FUN-1 diffuse à travers la membrane de toutes les cellules et fluoresce en vert. Si la cellule est métaboliquement active, le FUN-1 est métabolisé au niveau de la vacuole et celle-ci fluoresce alors en rouge.

En récapitulatif, l'iodure de propidium informe quelles sont les cellules mortes et endommagées tandis que le FUN-1 indique quelles sont les cellules métaboliquement actives. Bien qu'observable au microscope à fluorescence, l'analyse des échantillons par cytométrie de flux offre de nombreux avantages en terme de rapidité et d'efficacité.

#### IV.6.2.1 COLORATION À L'IODURE DE PROPIDIUM

La solution stock est préparée à partir de 10 mg d'iodure de propidium dissout dans 10 ml de PBS (*phosphate buffer solution*). Dans un eppendorf de 1,5 ml, 10  $\mu$ l de la solution stock sont ajoutés à 1 ml de milieu de culture préalablement centrifugé (1 minute à 14000 *rpm*) et resuspendu dans 1 ml de PBS après soustraction du surnageant. La solution est ensuite incubée pendant 15 minutes à 37°C puis les cellules sont rincées deux fois avec du PBS après centrifugation. L'échantillon est conservé à 4°C avant analyse. La dose de PI utilisée est efficace pour des concentrations cellulaires s'étendant de  $10^6 - 10^8$  cellules/ml.

#### IV.6.2.2 COLORATION AU FUN-1

La solution stock de FUN-1 à 10 mM est diluée 100 fois dans du PBS (10  $\mu$ l de solution stock dans 990  $\mu$ l de PBS). Dans un eppendorf de 1,5 ml, 150  $\mu$ l de la solution diluée de FUN-1 sont ajoutés à 850  $\mu$ l ml de milieu de culture préalablement centrifugé (1 minute à 14000 *rpm*) et resuspendu dans 850  $\mu$ l ml de PBS après soustraction du surnageant. La solution est ensuite incubée pendant 30 minutes à 37°C. Le colorant est ensuite fixé en conservant les cellules à 4°C de 8 à 16 heures dans 1 ml de pFA après centrifugation préalable (1 minute à 14000 *rpm*) et élimination du surnageant. Le culot de cellule est ensuite resuspendu dans 1 ml de PBS après centrifugation et stocké à 4°C avant analyse. La dose de FUN-1 utilisée est efficace pour des concentrations cellulaires s'étendant de  $10^6 - 10^8$  cellules/ml.

#### IV.6.3 OBSERVATION DE LA PROLIFÉRATION DES PEROXYSOMES

Le métabolisme d'une levure est propre au substrat carboné sur lequel elle se développe. En présence d'acide oléique, le nombre de peroxysomes augmente au sein de la levure car cet organelle réalise la respiration de l'oléate par la voie de la  $\beta$ -oxydation des acides gras. D'une part, la prolifération des peroxysomes est observable en cytométrie de flux car elle modifie l'indice de réfraction (SSC) de la cellule par rapport à une levure en croissance sur un milieu glucose (SMERALDI *et al.*, 1994). D'autre part, l'augmentation du nombre de peroxysomes provoque la diminution de la taille de la vacuole. Le fluoro-isothiocyanate (FITC) colore spécifiquement la vacuole (MESQUITA *et al.*, 1991). La diminution de fluorescence mesurée dans le canal FL1 corrobore la variation de taille de la vacuole (SMERALDI *et al.*, 1994).

##### IV.6.3.1 COLORATION AU FITC

La solution stock est composée de FITC à 1 mg/ml dissout dans du Tris/HCl 0,1 M à pH8. Dans un eppendorf de 1,5 ml, 10  $\mu$ l de la solution stock sont ajoutés à 1 ml de milieu de culture à pH 5 et incubés 30 minutes à 37°C. La solution est ensuite centrifugée (1 minute à 14000 *rpm*) et le surnageant éliminé. Le culot de cellules est resuspendu dans une solution de lavage à pH 7,2 composée de KCl à 140 mM, de Tris/HCl à 20 mM et de sorbitol à 1,2 M. La solution est à nouveau centrifugée et le culot de cellules est resuspendu dans du PBS. La solution est stockée 4°C avant analyse.

#### IV.6.4 ANALYSE DES ÉCHANTILLONS PAR CYTOMÉTRIE DE FLUX

Les échantillons colorés sont analysés par cytométrie en flux dans un appareil de type FACSCAN BECKSON. Le principe de la cytométrie est d'entraîner des cellules dans un flux liquide et de les faire défiler/traverser une par une dans un faisceau laser en les comptant et en les caractérisant. Le cytomètre collecte les signaux optiques résultant du passage des cellules dans le faisceau laser. En effet, le signal optique renseigne sur les propriétés optiques de la cellule : sa dimension (*FSC*) et sa granulométrie (*SSC*). Les fonctions ou structures cellulaires spécifiques peuvent être détectées par des marquages fluorescents grâce à trois canaux particuliers : *FL1*(jaune-vert), *FL2*(orange) et *FL3*(rouge).

**Tableau 8. Paramètres définis pour l'analyse des différentes colorations au FACSCAN BECKSON**

Paramètre	Colorants			
	Iodure de propidium	FUN-1	FITC	Nile Red
FSC	E-1 log	E-1 log	E-1 log	E-1 log
SSC	150 log	360 Lin	360 log	150 log
FL1	420	400	520	420
FL2	420	400	520	420
FL3	420	400	520	420

#### IV.6.5 DOSAGE DE L'ÉTHANOL

La concentration en éthanol dans le milieu de culture est déterminée par HPLC-RI (WATERS 2690). Les échantillons du milieu de culture (2 ml) destinés au dosage de l'éthanol sont centrifugés 3 minutes à 15000 *rpm*. Le surnageant est récupéré dans un eppendorf de 1,5 ml et conservé à -20°C avant analyse. Le dosage est réalisé par injection de 10 µl d'échantillon en tête de la colonne HPLC caractérisée par une phase stationnaire de type Aminex HPX87-H 300X 7.8 mm. Le débit de la phase mobile (eau MilliQ 0.005 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) est de 0,6 ml/minute et la température de colonne est de 50°C. L'élution respecte un mode isocratique et l'analyse dure 23 minutes. Le détecteur est un réfractomètre différentiel Waters 410 et les signaux sont traités par le logiciel EMPOWER (WATERS). La quantification est faite par calibration externe via l'injection d'une gamme de standards. La droite de calibration de l'éthanol figure dans l'annexe VIII.2.

## V RESULTATS ET DISCUSSIONS

### V.1 MISE AU POINT D'UN PROTOCOLE DE CONDITIONNEMENT DES LEVURES A L'ACIDE OLEIQUE

#### V.1.1 OBJECTIF

Le terme "conditionnement" utilisé dans ce travail décrit l'étape précédant la phase *fed-batch* (Section II.1.2) de la culture *S. cerevisiae (boulardii)*. Le but de ce conditionnement est d'induire la prolifération des peroxyosomes au sein de la cellule, afin de réduire l'effet Crabtree court-terme se déroulant lors de la phase *fed-batch* d'une culture en condition aérobie. Rappelons que l'effet Crabtree court-terme est généré principalement lors des ajouts de substrat dans les bioréacteurs de grandes tailles dans lesquels l'opération de mélange n'est pas parfaite. En effet, l'introduction d'un pulse de glucose à un seul endroit du bioréacteur crée des zones d'hétérogénéités. Ces gradients de concentration momentanés contraignent les levures s'y trouvant à respirer et fermenter le substrat simultanément. L'effet Crabtree désigne le franchissement/dépassement de la capacité respiratoire limite des levures, forçant celles-ci à rediriger le flux de carbone excédentaire vers la fermentation lors d'un pulse de glucose. Ce phénomène se traduit par une production d'éthanol et une diminution de la production de biomasse microbienne. Dans une étude récente, FERIA-GERVASIO *et al.* (2008) ont observé que l'effet Crabtree court-terme pouvait être réduit en ajoutant un co-substrat tel que l'acide oléique dans un chémostat oxydatif en limitation glucose. Cet acide gras insaturé stimule la prolifération des peroxyosomes au sein du cytoplasme et offre une nouvelle voie de transport du carbone vers la mitochondrie, site ultime de la respiration. L'objectif de ce chapitre est de mettre au point un protocole de conditionnement des levures à l'acide oléique.

L'intérêt d'un tel conditionnement à l'échelle industrielle est d'obtenir des levures naturellement résistantes à l'effet Crabtree court-terme rencontré lors de la phase *fed-batch* d'une production de levure. L'effet désiré de cette résistance naturelle est d'augmenter la production de biomasse microbienne tout en évitant d'utiliser des souches génétiquement modifiées. Les critères de choix du conditionnement sont:

- la simplicité de la mise en œuvre
- la rapidité/cout du conditionnement
- l'applicabilité à l'échelle industrielle

### **V.1.2 DEMARCHE SUIVIE ET DESCRIPTION GENERALE DU CONDITIONNEMENT**

La mise au point d'un protocole de conditionnement des levures à l'acide oléique est réalisée en fiole agitée de 1 litre (Section IV.3.1). L'analyse du profil de la pression en oxygène dissout (pO<sub>2</sub>) dans le milieu de culture a permis d'interpréter le comportement physiologique de la levure face au substrat. Différents paramètres ont été mesurés au cours de chaque conditionnement:

- La mesure de biomasse sèche et de densité optique.
- Des analyses phénotypiques permettant d'évaluer la viabilité cellulaire et l'induction des peroxyosomes par la cytométrie en flux.

La démarche suivie consiste à tester des cultures en fiole dans lesquelles la source de carbone provient à la fois du glucose et de l'acide oléique. Les cultures entreprises sont accomplies dans un incubateur à agitation orbitale (30°C à 120-140 *rpm*). De manière à observer/démontrer les modifications métaboliques subies par la levure sur le substrat mixte, chaque conditionnement est testé en parallèle avec un témoin dans lequel la source de carbone est uniquement à base de glucose. Le protocole de chaque conditionnement est décrit dans la section IV.3.2.

### **V.1.3 ANALYSE PHENOTYPIQUE DES LEVURES CONDITIONNEES PAR CYTOMETRIE EN FLUX**

Outre le suivi de la pression en oxygène dissout qui permet d'interpréter le comportement de la levure face au substrat, la cytométrie en flux s'avère être un moyen rapide et efficace pour distinguer des différences physiologiques et morphologiques au sein d'une population de cellules. Dans le cadre de ce travail, les critères auxquels nous nous sommes intéressés sont la viabilité cellulaire et l'induction des peroxyosomes.

En quelques mots, le principe de la cytométrie en flux est de générer un flux de cellules qui traversent une par une un faisceau laser. Lorsqu'une cellule coupe le faisceau, le détecteur discerne un événement qui est représenté par un point dans le cytogramme. En traversant le rayon lumineux, la cellule diffuse une partie de la lumière incidente et émet de la fluorescence provenant de l'organite qui a été coloré. Les rayons diffus et la fluorescence émise sont collectés par différents canaux de détection qui transmettent le signal à un ordinateur. Les résultats sont soit affichés sous forme de cytogrammes bidimensionnels (exemple : FL1,FL3) soit sous forme d'histogramme de fréquence d'un paramètre.

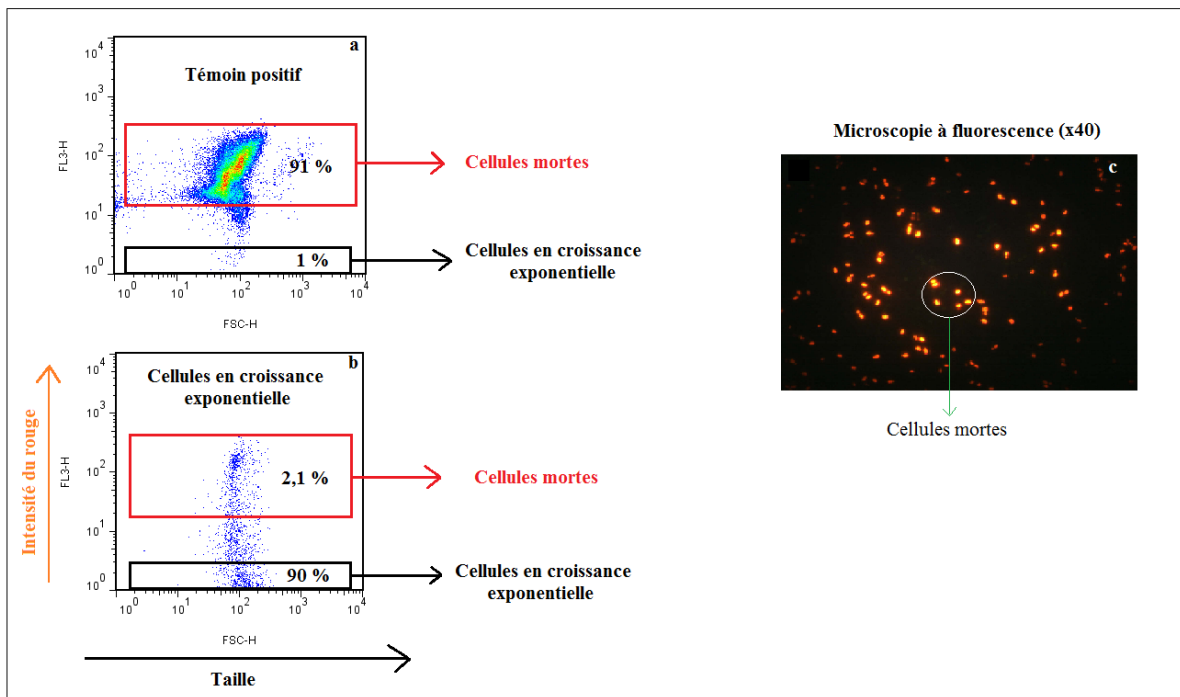
#### **V.1.3.1 VIABILITE CELLULAIRE**

La viabilité cellulaire est un critère pertinent pour évaluer la qualité de la biomasse produite au cours d'un procédé. Pourtant, sans la réalisation d'une coloration, la microscopie et la cytométrie de flux ne permettent pas de discerner les cellules mortes des vivantes. Dans le cadre de notre étude, la viabilité cellulaire est approchée sous deux angles différents:

- en évaluant le pourcentage de cellules mortes et endommagées au sein de la population par une coloration à l'iodure de propidium.
- en estimant la quantité de cellules métaboliquement actives au sein de la population grâce à une coloration au FUN-1 (EGGLESTON et MARSHALL, 2007; MILLARD *et al.*, 1997).

Les protocoles de coloration sont décrits dans la section IV.6.2.

L'iodure de propidium pénètre les cellules dont la membrane plasmique est endommagée et colore le cytoplasme en rouge (Figure 20c). L'analyse au cytomètre de flux de 30000 cellules par échantillon génère un cytogramme bidimensionnel. L'axe des ordonnées fournit l'intensité de la fluorescence rouge (canal FL3) et l'axe des abscisses renseigne sur la taille cellulaire (canal FSC). Afin de quantifier la fraction des cellules mortes dans un échantillon, nous avons réalisé un témoin positif pour lequel la mortalité cellulaire est totale. Pour ce faire, les cellules sont incubées une demi-heure à 80°C avant coloration. Le témoin positif sert à définir la zone du cytogramme dans laquelle chaque événement est une cellule morte (Figure 20a). Le pourcentage s'obtient alors en divisant le nombre d'événements appartenant à cette zone par 30000 (Figure 20b). Les cellules en phase de croissance exponentielle n'incorporent pas/peu de colorant car leur membrane plasmique est en bon état. Leur fluorescence dans le rouge est faible voir quasi nulle.

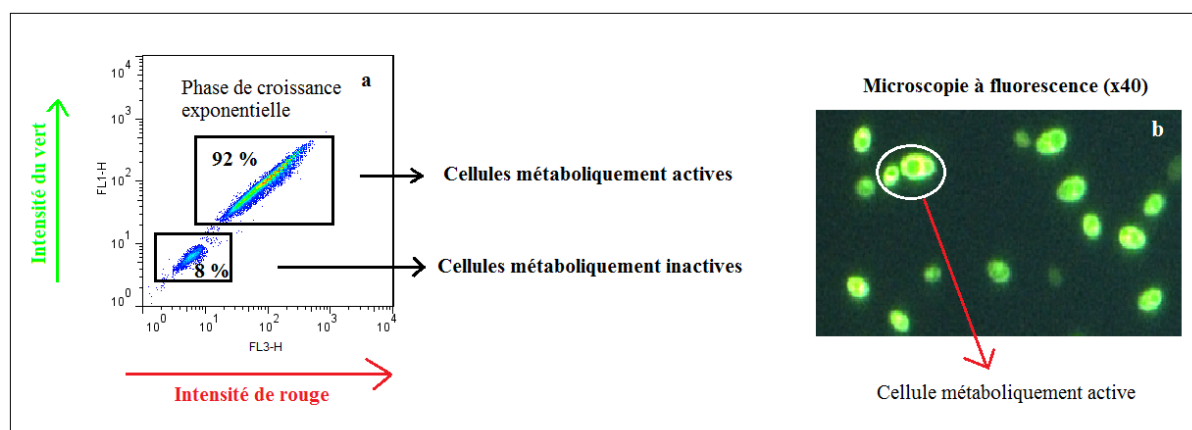


**Figure 20. Evaluation de la mortalité cellulaire. a) Cytogramme (FSC,FL3) d'un témoin positif. b) Cytogramme (FSC,FL3) d'un échantillon en croissance exponentielle. C) Photographie par microscopie à fluorescence d'un échantillon en fin de culture.**

Une cellule est métaboliquement active si elle est capable de se diviser et de répondre aux différents stress provoqués par l'environnement. Ce critère est particulièrement important pour des levures de brasserie et de boulangerie. Lors de l'incubation, le colorant FUN-1 intègre toutes les cellules et fluoresce en vert (Figure 21b). Si la cellule est métaboliquement active, des enzymes présentes dans la membrane du tonoplaste incorporent et métabolisent le FUN-1 au sein de la vacuole, qui fluoresce alors en rouge (Figure 21b). L'analyse au cytomètre de flux de 30000 cellules par échantillon génère un cytogramme bidimensionnel (Figure 21a). L'axe des ordonnées fournit l'intensité de la fluorescence verte (canal FL1) et l'axe des abscisses l'intensité de la fluorescence rouge (canal FL3). Deux zones distinctes apparaissent dans le cytogramme de la figure 21:

- la plus petite est caractérisée simultanément par une faible intensité rouge et verte. Cela signifie que ces cellules métabolisent très lentement le FUN-1 qu'elles ont incorporé. Par conséquent, les cellules appartenant à cette zone sont considérées comme métaboliquement inactives.
- la plus grande se distingue par une intensité élevée rouge et verte. Ces cellules assimilent facilement le colorant FUN-1 et le métabolisent rapidement dans la vacuole au cours de l'incubation. Ainsi, les cellules appartenant à cette zone sont considérées comme métaboliquement actives.

Le potentiel métabolique exprimé en % de cellules actives, est obtenu en divisant le nombre d'événements de la zone des cellules métaboliquement actives par le nombre total d'évènements.



**Figure 21. Evaluation de l'activité métabolique par coloration au FUN-1. a) Cytogramme (FL3,FL1) d'un échantillon en phase de croissance exponentielle. b) Photographie x40 au microscope à fluorescence.**

### V.1.3.2 MISE EN EVIDENCE DE L'INDUCTION DES PEROXYSOMES

L'acide oléique est un acteur très complexe du métabolisme de la levure car il intervient dans de nombreuses réactions physiologiques (Section II.3.5): synthèse des lipides, biogénèse des corps gras d'inclusion, induction des peroxysomes, etc. La voie des peroxysomes constitue un nouveau mode de transport du carbone vers la mitochondrie, site de la respiration cellulaire. Les peroxysomes sont des organites cellulaires qui interviennent dans de nombreuses réactions du métabolisme des levures (cycle du glyoxylate,  $\beta$ -oxydation des acides gras, dégradation du peroxyde d'hydrogène, etc.).



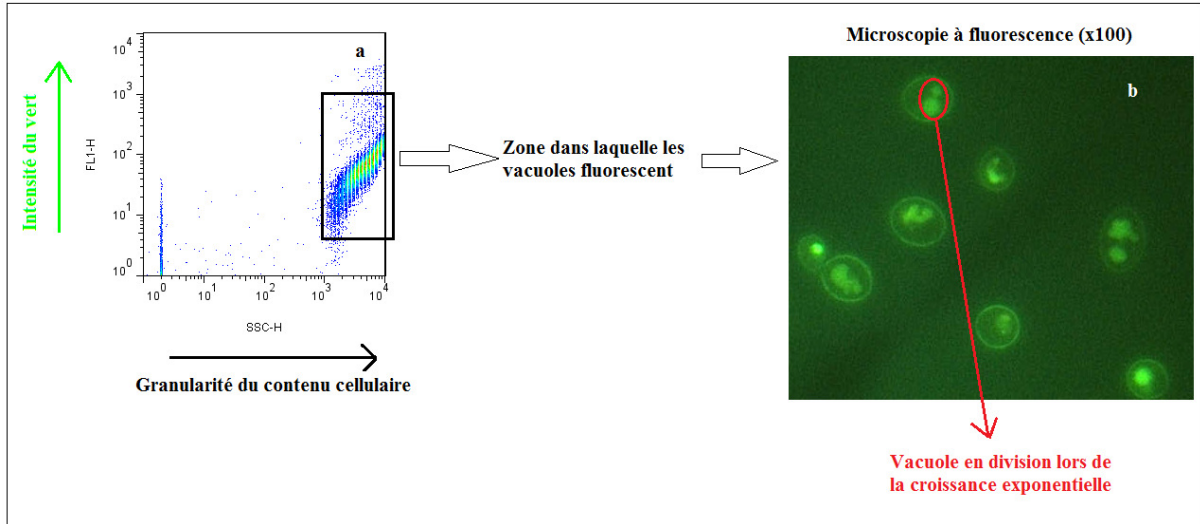
Dans des conditions aérobies, la concentration cytoplasmique des peroxysomes augmente pour une levure en croissance sur un milieu riche en acide oléique. Cette prolifération induit une diminution de la taille des vacuoles (SMERALDI *et al.*, 1994). Par contre, une dégradation des peroxysomes s'ensuit lorsque cette levure est inoculée dans un milieu riche en glucose. Cette digestion est réalisée par le complexe protéolytique vacuolaire afin d'éviter la redondance des enzymes peroxysomales dans le cytoplasme (SARAYA *et al.*, 2010). Par conséquent, le volume vacuolaire augmente pour occuper la quasi totalité du volume de la cellule.

D'une manière générale, la cytométrie en flux a permis de mettre en évidence l'induction des peroxysomes. Dans un premier temps, notre axe de recherche fut de trouver un colorant spécifique capable de se fixer sur les peroxysomes. Ainsi, l'induction peut être observée par une simple augmentation de la fluorescence au cours du conditionnement. Dès lors, le Nile Red a été testé car il est connu pour se fixer sur les corps d'inclusions tels que les granules de poly-3-hydroxybutyrate (PHB) et les corps gras d'inclusion (KACMAR *et al.*, 2005). Il fut supposé qu'il puisse colorer les peroxysomes cependant les cytogrammes issus de la cytométrie en flux sont difficilement interprétables et ne montrent pas de différences significatives entre l'essai et le témoin exempt d'oléate.

En approfondissant les recherches dans la littérature, un moyen simple et direct d'observer la présence de peroxysomes est d'utiliser une souche de levure possédant la séquence d'une protéine GFP fusionnée au promoteur d'un gène codant pour une protéine de la membrane peroxysomale (BINNS *et al.*, 2006). Pour des raisons pratiques, cette solution n'a pas été envisagée et la recherche s'est focalisée sur une manière indirecte d'observer l'induction des peroxysomes. En définitive, le choix s'est porté sur l'utilisation du fluoro-isothiocyanate, un colorant spécifique de la vacuole. Effectivement, SMERALDI *et al.* (1994) démontrent que la prolifération des peroxysomes dans une levure incubée sur un milieu riche en méthanol peut être observée par une diminution de la fluorescence émise par la vacuole. Les auteurs considèrent que la fluorescence émise par la vacuole est proportionnelle à sa taille.

Remarque: le méthanol stimule la prolifération des peroxysomes car ceux-ci produisent une catalase décomposant le peroxyde d'hydrogène dégagé lors de l'oxydation du méthanol.

Au cours du conditionnement, des prélèvements du milieu de culture récoltés à des moments précis de la croissance cellulaire ont été colorés au FITC (Section IV.6.3.1). L'analyse au cytomètre de flux de 30000 cellules par échantillon génère un cytogramme bidimensionnel (Figure 22a). L'axe des ordonnées fournit l'intensité de la fluorescence verte (canal FL1) et l'axe des abscisses la granularité (SSC). La zone encadrée dans la figure 22a représente la fluorescence émise par les vacuoles. Nous considérons une relation de proportionnalité entre la taille et la fluorescence émise par les vacuoles. La figure 22b présente une photographie réalisée à l'aide d'un microscope à fluorescence des cellules colorées au FITC. Des colorations régulières tout au long de la culture permettent d'observer l'impact de l'acide oléique sur la fluorescence/taille de la vacuole.



**Figure 22. Coloration des vacuoles cellulaires au fluoro-isothiocyanate (FITC). a) Cytogramme (SSC,FL3) d'un échantillon en phase de croissance exponentielle. b) Photographie de cellules en croissance exponentielle à l'aide de la microscopie à fluorescence (x100).**

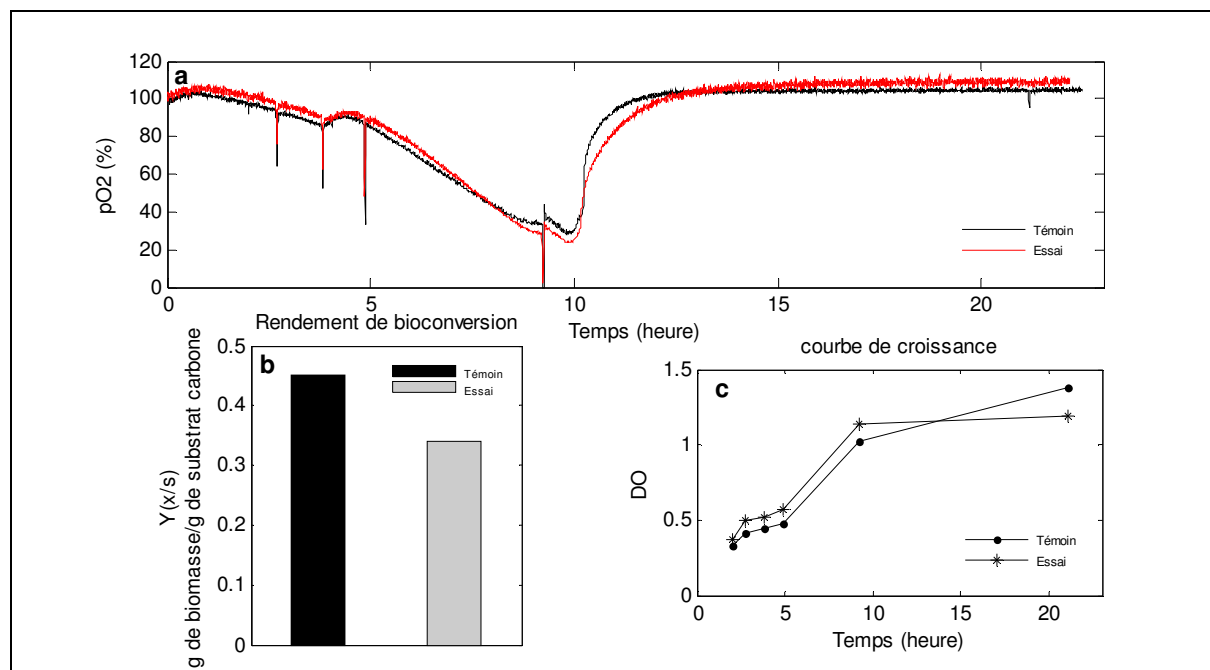
#### V.1.4 RESULTATS

La mise au point du protocole de conditionnement a été effectuée par étapes successives. C'est pourquoi les résultats présentés ci-dessous sont regroupés par essai de conditionnement en respectant l'ordre chronologique dans lequel ils ont été faits. Les résultats discutés sont tout d'abord commentés et observés puis finalement interprétés.

##### V.1.4.1 CONDITIONNEMENT *BATCH* DES LEVURES AU GLUCOSE ET A L'ACIDE OLEIQUE

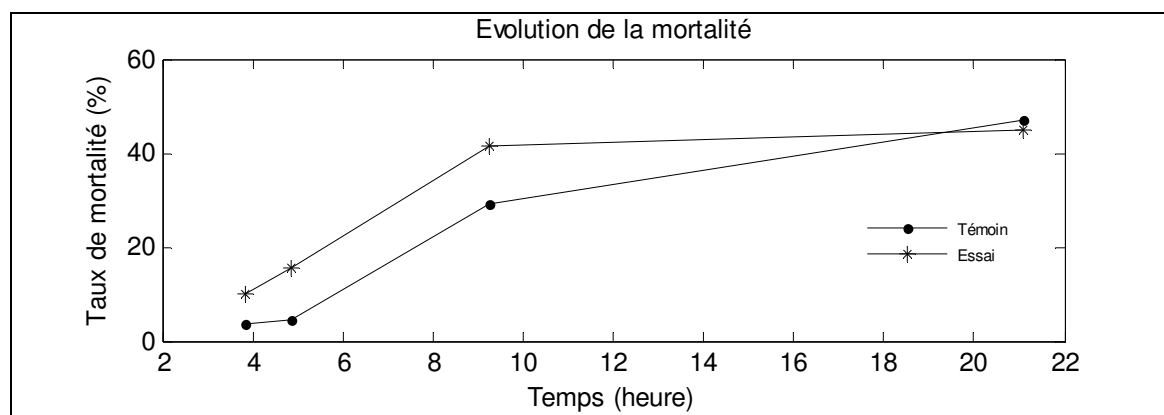
Dans un premier temps, le premier conditionnement testé est une culture en phase *batch* dans laquelle le milieu de culture contient du glucose (5 g/litre) et de l'acide oléique (2,5 g/litre). Le témoin est composé uniquement de glucose (5 g/litre). Les fioles incubées (30°C à 140 rpm) possèdent une concentration en biomasse initiale de 0,70 g/litre.

Peu de temps après l'inoculation de la préculture, la pO<sub>2</sub> diminue progressivement dans les deux fioles jusqu'à un minimum atteint après 10 heures. Il s'ensuit alors une remontée et une stabilisation de la pO<sub>2</sub> après 15 heures de culture (Figure 23a). Les courbes de pO<sub>2</sub> et les courbes de croissance sont quasi identiques pour le témoin et l'essai. Leurs rendements de bioconversion valent respectivement 0,45 et 0,34 (Figure 23b). Le rendement de bioconversion ( $Y_{x/s}$ ) est égal à la quantité de biomasse sèche (g) produite à partir d'un gramme de substrat présent dans le milieu de culture.



**Figure 23. Résultats du conditionnement *batch*. a) Profil de la pression en oxygène dissout. b) Rendements de bioconversion. c) Evolution de la densité optique au cours du conditionnement.**

La courbe de pO<sub>2</sub> indique que les levures consomment l'oxygène dissout pour respirer le substrat jusqu'à épuisement de celui-ci. La remontée de la pO<sub>2</sub> confirme qu'il n'y a plus de substrat à respirer. Les deux courbes de croissance font clairement apparaître les trois phases caractéristiques d'une culture *batch*: tout d'abord une phase de latence les premières heures, suivie de la croissance exponentielle jusqu'à la dixième heure puis de la phase stationnaire. La valeur des rendements de bioconversion ( $Y_{x/s}$ ) inférieure à l'unité corrobore également la déviation du flux de carbone vers une autre voie que la production de biomasse, notamment la production d'éthanol. Cependant, l'infériorité du  $Y_{x/s}$  pour le *batch* glucose/oléate implique qu'une partie de la source de carbone n'a pas été consommée. L'acide oléique n'est pas assimilé au cours de ce conditionnement car la répression catabolique effectuée par le glucose sur l'acide oléique est trop élevée. C'est-à-dire que tant que le glucose n'est pas totalement épuisé, celui-ci inhibe la transcription des gènes codant pour le métabolisme de l'acide oléique. Si l'enregistrement après stabilisation de la pO<sub>2</sub> à 100% avait continué, les levures auraient peut-être eu le temps nécessaire de produire les enzymes utiles au métabolisme de l'acide oléique. L'absorption de l'acide oléique aurait provoqué une rechute de la pO<sub>2</sub>. Néanmoins, la durée du procédé est relativement longue, ce qui est peu intéressant pour un conditionnement à l'échelle industrielle.



**Figure 24. Evolution de la mortalité cellulaire au cours du conditionnement *batch*.**

De plus, la mortalité cellulaire est élevée en fin de culture, atteignant près de 50 % (Figure 24). Ce taux de mortalité important est dû à l'acidification du milieu de culture ayant cours lors de la phase *batch*. Il est à noter que le système d'incubation utilisé n'effectue pas de régulation du pH.

Par conséquent, le conditionnement *batch* glucose/acide oléique n'a pas satisfaisant et il est nécessaire de trouver un système dans lequel la répression catabolique induite par l'effet glucose est minimale.

#### **V.1.4.2 CONDITIONNEMENT *FED-BATCH* DES LEVURES AU GLUCOSE ET A L'ACIDE OLEIQUE**

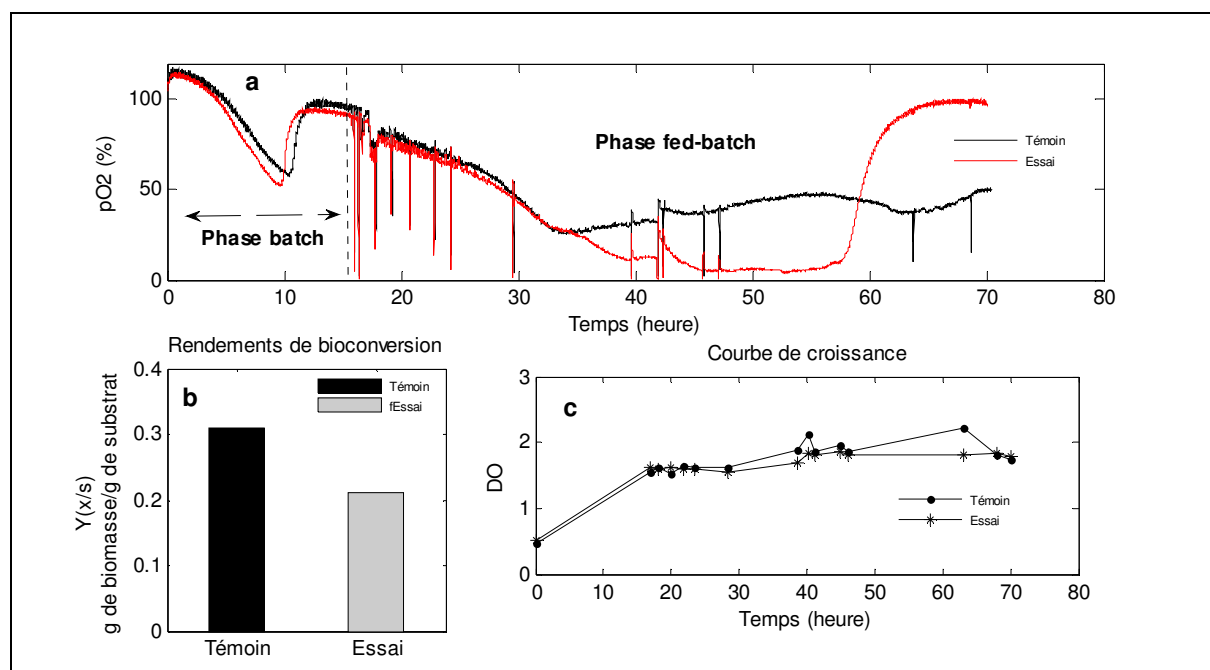
Tenant compte des résultats du conditionnement *batch*, le raisonnement suivi envisage un système de conditionnement qui limite l'effet glucose pour permettre à la levure d'utiliser l'acide oléique. Le principe est d'apporter le glucose et l'acide oléique de manière répétée en très faibles quantités. L'hypothèse émise suppose que les séquences d'ajout sont suffisamment espacées dans le temps pour permettre à la levure de consommer rapidement le glucose en premier lieu et d'assimiler l'oléate en second lieu.

Pour mettre en œuvre ce raisonnement, une culture *fed-batch* pour laquelle la solution d'ajout est composée de glucose (20 g/litre) et d'acide oléique (10 g/litre) a été mise au point. La solution d'ajout du témoin est quant à elle composée de glucose (20 g/litre). L'ajout est opéré via une pompe péristaltique régulée par une équation d'ajout préalablement établie pour la culture *fed-batch* de *S. cerevisiae (boulardii)*. Cette séquence d'ajout est écrite dans un programme MATLAB qui par l'intermédiaire d'une interface régule l'activation de la pompe péristaltique. L'apport en substrat mixte est précédé d'une phase *batch* au cours de laquelle les levures consomment le glucose (30 g/litre) afin d'atteindre leur phase de croissance exponentielle indispensable au démarrage de la phase *fed-batch* (biomasse sèche au début du *fed-batch*  $\approx$  2 g/litre). Pour éviter la mortalité élevée rencontrée dans l'essai précédent, le milieu de culture et la solution d'ajout utilisées furent tamponnées à pH 5,5 à l'aide d'hydrogène-phosphate di-potassique et de dihydrogène-phosphate de potassium (Section IV.3.2.2). Des mesures hors lignes de pH ont été effectuées à 3 moments différents:

- lors de l'inoculation du milieu de culture
- à la fin de la phase *batch*
- au milieu de la phase *fed-batch*

La température (30°C) et la vitesse de la plate-forme d'agitation (140 rpm) sont maintenues identiques par rapport au conditionnement précédent.

La courbe de pO<sub>2</sub> (Figure 25a) dans les deux fioles suit un profil similaire pour les 17 premières heures de culture. Le démarrage du *fed-batch* commence simultanément pour les fioles vers la 17<sup>ème</sup> heure. On observe alors une lente descente de la pO<sub>2</sub> de 70 à 25 % en une vingtaine d'heures. A la 35<sup>ème</sup> heure, la pO<sub>2</sub> de la fiole témoin stabilise aux environs des 35-40 % tandis que la pO<sub>2</sub> de la fiole d'essai continue à diminuer pour se maintenir vers 5 % pendant une vingtaine d'heures avant de remonter brusquement à 100 %. La conditionnement a été arrêté après 70 heures de culture alors que l'apport du substrat n'était pas encore terminé. Le pH diminue de 5,5 à 3,6 durant la phase *batch* malgré le tampon et continue à chuter jusqu'à 2,4 après 40 heures de culture. La détermination du  $Y_{x/s}$  est calculée sur base de la quantité totale de substrat dans la fiole d'ajout. Les  $Y_{x/s}$  valent respectivement 0,31 et 0,21 pour le témoin et l'essai (Figure 25b). Malgré une faible augmentation de la densité optique après la phase *batch* (due à la dilution du milieu de culture par la solution d'ajout), les courbes de croissance sont quasi identiques (Figure 25c).



**Figure 25. Résultats du conditionnement *fed-batch*. a) Profil de la pression en oxygène dissout. b) Rendements de bioconversion. c) Evolution de la densité optique au cours du conditionnement.**

Des observations au microscope ont malheureusement détecté la présence d'une légère contamination bactérienne dans la fiole d'essai. Cela explique la diminution plus prononcée de la pO<sub>2</sub> observée à partir de la 35<sup>ème</sup> heure.

Malgré une contamination obtenue dans la fiole d'essai, nous tirons malgré tout des enseignements sur le conditionnement testé. Premièrement, la durée de l'expérimentation est trop longue pour envisager un tel conditionnement à l'échelle industrielle. Deuxièmement, la remontée brusque de la pO<sub>2</sub> à la 60<sup>ème</sup> heure, alors que l'apport de substrat continue, présage que les cellules ne sont plus métaboliquement actives. Cela est confirmé par les résultats obtenus par cytométrie en flux.

La mortalité cellulaire est déjà de 60 % à la fin de la phase *batch* et continue d'accroître jusque 80 % lors du *fed-batch* pour le témoin et l'essai (Figure 26). Il est fort probable que la baisse de pH observée est la cause essentielle de cette hausse de mortalité.

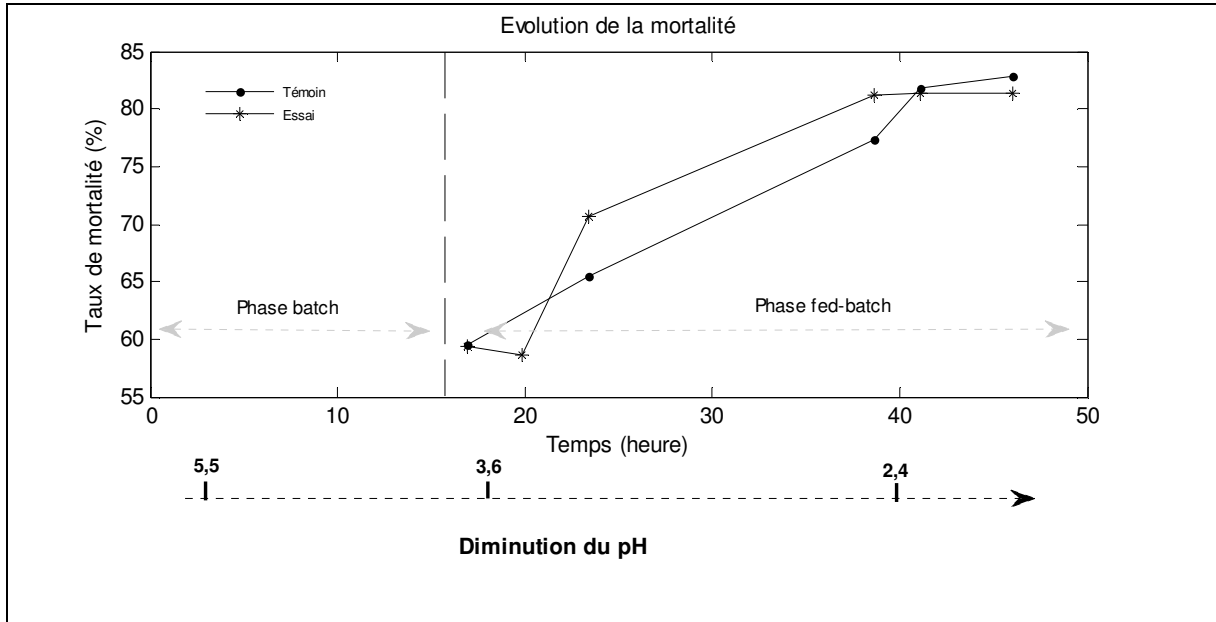


Figure 26. Evolution de la mortalité cellulaire au cours du conditionnement *fed-batch*.

Troisièmement, la ressemblance des courbes de croissance et l'infériorité du  $Y_{x/s}$  de l'essai supposent à nouveau que la levure n'a pas su modifier son métabolisme suffisamment pour assimiler l'oléate et créer l'induction des peroxysomes. Cela est peut-être dû au fait que l'équation d'ajout imposée à la pompe par le code Matlab ne correspondait pas parfaitement aux paramètres de notre conditionnement. En somme, le conditionnement testé n'a pas fonctionné pour des raisons pratiques. Effectivement, les points faibles du système de conditionnement sont l'absence de la régulation du pH et le système de prélèvement qui n'assure pas une prise à 100 % stérile des échantillons. Malgré cet essai infructueux, l'idée de départ reste la même: réduire la répression catabolique et forcer les levures à utiliser l'acide oléique dans des conditions limitantes en glucose.

### V.1.4.3 CONDITIONNEMENT *BATCH* DES LEVURES AU TREHALOSE ET A L'ACIDE OLEIQUE

Afin d'éviter les défauts pratiques rencontrés lors du conditionnement *fed-batch*, l'approche du procédé a été simplifiée pour viser à :

- améliorer l'apport progressif de glucose
- réduire l'acidification du milieu de culture
- diminuer les probabilités de contaminations

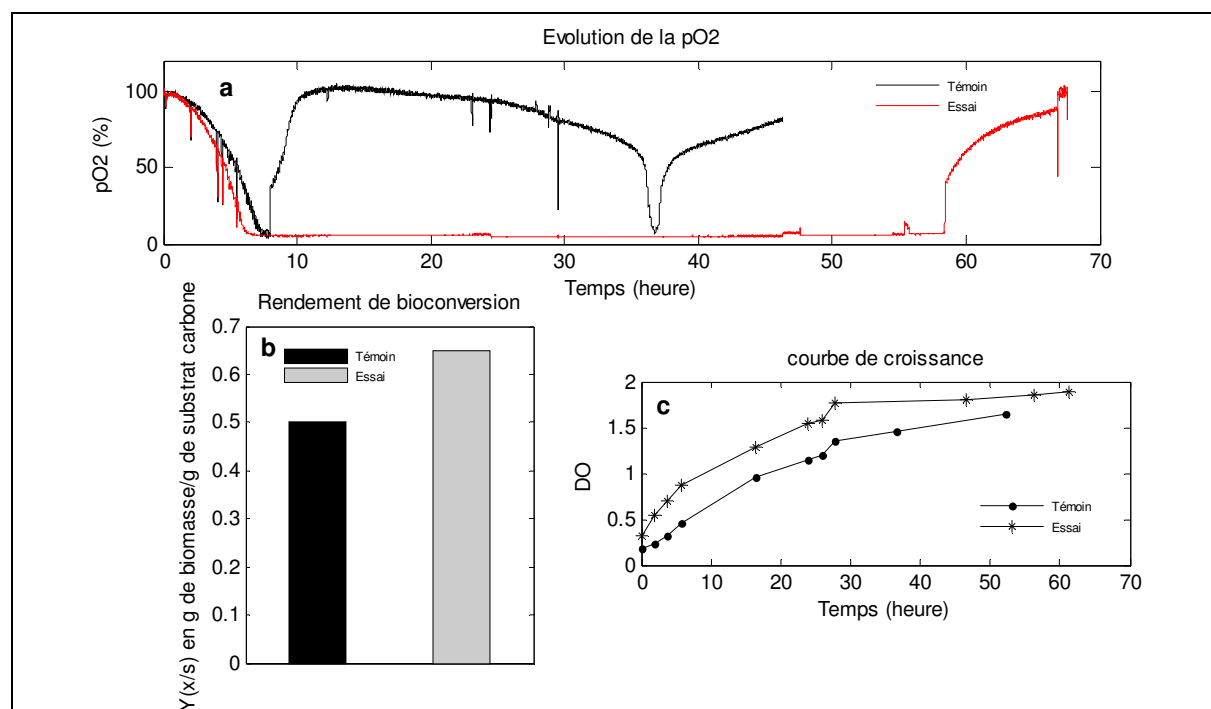
Pour ce faire, un retour à un système *batch* a été effectué en employant un substrat autre que le glucose. La subtilité étant de pouvoir reproduire naturellement des conditions limitantes dans un système *batch* fermé. Afin de mimer cette situation, l'approche s'est basée sur les travaux de MOURET *et al.* (2006). Ceux-ci démontrent qu'en présence de tréhalose, la production en fiole *batch* d'une souche de levure surexprimant le gène de la tréhalase permet d'imiter un chémostat oxydatif en limitation glucose. En d'autres termes, la cinétique d'hydrolyse très lente du tréhalose simule des conditions de limitation en glucose dans la fiole. Pour rappel, le tréhalose est un disaccharide naturel composé de deux molécules de glucose connectée par une liaison  $\alpha$  (1,1). Il est produit et accumulé dans la levure lors d'un stress en tant que réserve d'hydrates de carbone (LEJEUNE *et al.*, 2010). Dans des conditions favorables, il est hydrolysé très lentement par la tréhalase en deux molécules de glucose assimilables par la levure. La tréhalase est une hydrolase située dans l'espace périplasmique. Par conséquent, ce relargage très progressif de glucose dans le milieu de culture mime parfaitement les conditions imposées par un chémostat en limitation glucose.

La mise en application du système de conditionnement envisagé est identique au conditionnement *batch* réalisé initialement excepté l'origine des sources de carbone. L'essai est composé de tréhalose (10 g/litre) et d'acide oléique (5 g/litre) dans un milieu tamponné à pH 5,5. Le témoin contient quant à lui uniquement du tréhalose (10 g/litre) dans un milieu tamponné à pH 5,5. Trois séries de ce conditionnement ont été effectuées en expérimentant des paramètres différents (Annexes VIII.3).

D'une manière générale, les trois conditionnements testés furent exempts de contaminations et le tampon utilisé a permis de restreindre la baisse de pH au sein du milieu de culture. Les profils en oxygène dissout du témoin sont pour la première fois significativement différents de l'essai. Hormis la durée, le témoin et l'essai présentent des profils caractéristiques semblables pour les trois répétitions. Seuls les résultats de l'essai 1 sont présentés dans ce travail, les deux autres figurent dans les annexes.

Dans la fiole témoin et l'essai, les dix premières heures sont caractérisées par une chute rapide de la pO<sub>2</sub> (Figure 27). A partir de ce moment, le profil de la fiole diffère de l'essai en exposant des pO<sub>2</sub> supérieures tout au long du conditionnement. La courbe de pO<sub>2</sub> de l'essai se stabilise à des faibles valeurs (5-6%) tandis que le témoin voit sa pO<sub>2</sub> remonter brusquement jusqu'à environ 80 à 90%. A partir de ces valeurs élevées, la pO<sub>2</sub> du témoin redescend à nouveau très lentement jusqu'à un minimum puis repart vers des valeurs élevées de pO<sub>2</sub> pour se stabiliser à 100 %. Dans la fiole d'essai, la pO<sub>2</sub> se maintient à environ 5-6 % durant la totalité du conditionnement avant d'effectuer sa remontée à 100%. Le  $Y_{x/s}$  de l'essai (0,65) est supérieur au témoin (0,51) (Figure 27b). L'observation des courbes de croissance distingue une différence de densité optique entre l'essai et le témoin.

Pourtant, les courbes semblent garder une même pente durant toute la culture sauf lors des 10 premières heures (Figure 27c).



**Figure 27. Résultats du conditionnement *batch* tréhalose/acide oléique. a) Profil de la pression en oxygène dissout. b) Rendements de bioconversion. c) Evolution de la densité optique au cours du conditionnement.**

La dissemblance entre le profil de la pO<sub>2</sub> du témoin et de l'essai indique que l'acide oléique induit une ou plusieurs modifications physiologiques. Afin de comprendre les phénomènes intervenant durant ce conditionnement, nous appliquerons la notion théorique d'équivalents carbone: la quantité d'énergie contenue par atome de carbone varie selon la nature de la source de carbone. Le bilan énergétique de la respiration du glucose fournit 38 ATP alors que celui d'un acide gras tel que l'acide palmitique atteint 129 ATP. Si l'on compare l'énergie comprise par atome de carbone, le glucose contient 6,3 ATP/atome de carbone alors que l'acide palmitique inclut 8,06 ATP/atome de carbone. Par ailleurs, 6 moles de dioxygène sont nécessaires pour oxyder 1 mole de glucose alors qu'il en faut 23 pour 1 mole d'acide palmitique. Cela revient à utiliser **1** mole d'O<sub>2</sub> par mole d'atome de carbone du glucose pour **1,44** mole d'O<sub>2</sub> par mole d'atome de carbone d'acide palmitique. En conséquence, si nous posons l'hypothèse que la levure assimile l'acide oléique au cours du conditionnement, sa demande en oxygène devrait être supérieure à celle du témoin, qui lui ne consomme que du glucose. En somme, la pO<sub>2</sub> de la fiole d'essai devrait être inférieure à celle du témoin puisque la consommation d'oxygène y est plus importante. Cela correspond bien aux observations effectuées ci-dessus. La nuance entre le  $Y_{x/s}$  de l'essai et du témoin atteste également le fait qu'une partie de l'acide oléique est assimilée dans la biomasse. Nous restons bien entendu prudent quant à l'utilisation du terme assimilation car la totalité de l'acide oléique n'est pas entièrement incorporée dans la cellule et une fraction peut être respirée par la voie de la  $\beta$ -oxydation.

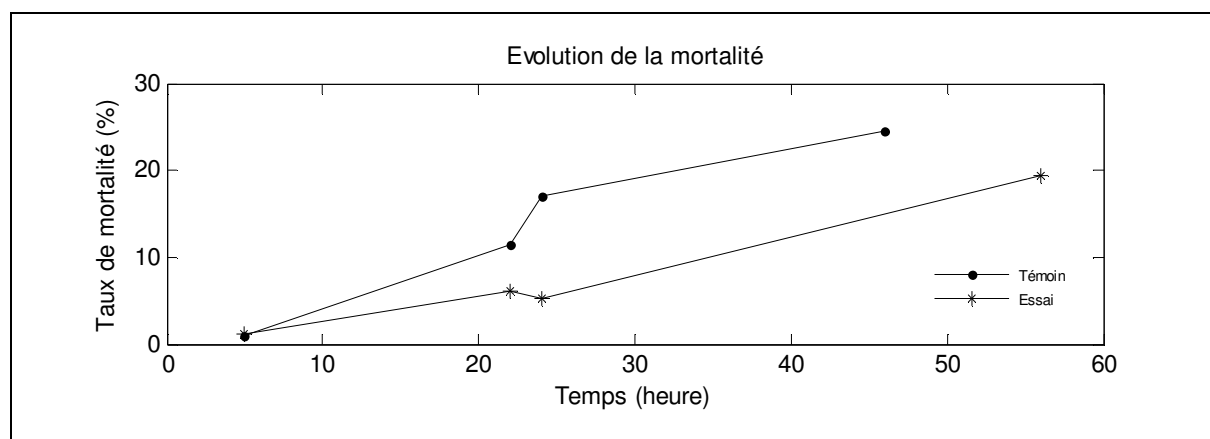


Du point de vue cinétique, le taux de croissance est semblable pour l'essai et le témoin. La source de carbone étant le substrat limitant, l'enzyme la plus lente conditionne le taux de croissance de la levure. Dans notre cas, l'activité enzymatique très faible de la tréhalase impose le taux de croissance du témoin et de l'essai. Cela expliquerait le parallélisme des courbes de croissance du témoin et de l'essai.

Le profil de la pO<sub>2</sub> dans fiole témoin indiquerait que le glucose résiduel de préculture est tout d'abord consommé, ce qui conduit à une chute de la pO<sub>2</sub>. Ensuite, la remontée de la pO<sub>2</sub> suppose que pendant cette période, les tréhalases sont produites dans le périplasme et commencent à hydrolyser lentement le tréhalose du milieu extracellulaire. Le glucose libéré par l'hydrolyse est oxydé quasi instantanément par les levures. La quantité de glucose libérée est consommée de plus en plus rapidement au fur et à mesure que les levures se multiplient. Cette observation est attestée par le taux de consommation de l'oxygène qui augmente de la 12<sup>ème</sup> à la 37<sup>ème</sup> heure.

Dans la fiole d'essai, la chute initiale de pO<sub>2</sub> correspondrait également à la consommation du glucose résiduel provenant de la préculture. Toutefois, à l'inverse du témoin, les levures continuent à consommer l'oxygène malgré la limitation en glucose liée à la lente cinétique d'hydrolyse du tréhalose. Il est fort probable que les périodes de carence en glucose soient comblées par l'assimilation de l'acide oléique du milieu de culture. Dans ce cas, le conditionnement *batch* tréhalose/acide oléique constituerait, de manière hypothétique, notre premier succès dans la recherche d'un protocole de conditionnement des levures à l'acide oléique.

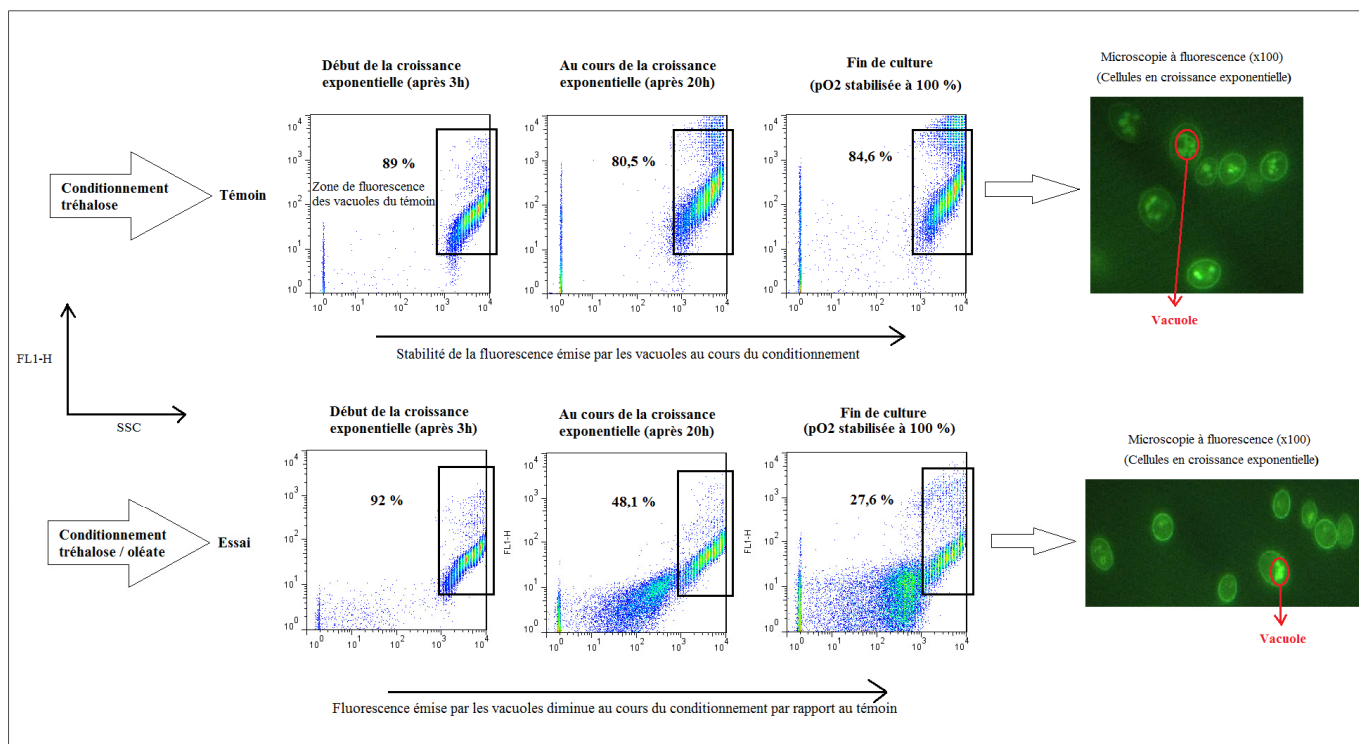
Quant à la viabilité cellulaire (Figure 28), le nombre de cellules mortes augmente progressivement au cours du conditionnement pour atteindre environ 20-25 % en fin de culture. Néanmoins, la mortalité est plus élevée dans le témoin. Les conditions de limitation en glucose y sont plus importantes car il n'y a pas de seconde source de carbone pour satisfaire le manque. Dès lors, la perméabilité membranaire s'accroît et augmente la vulnérabilité des cellules face à un stress.



**Figure 28. Evolution de la mortalité cellulaire au cours du conditionnement *batch* tréhalose/acide oléique.**

L'analyse des cytogrammes (FL1,SSC) résultants de la coloration de la vacuole à l'aide du fluoro-isothiocyanate (Figure 29) est censée vérifier les hypothèses avancées concernant le phénomène d'assimilation/d'induction des peroxysomes par l'acide oléique. A la figure 29, l'encadrement dans les cytogrammes correspond à la zone de fluorescence émise par les vacuoles du témoin et sert de base pour l'analyse des cytogrammes de l'essai.

L'axe des ordonnées FL1 représente l'intensité de la fluorescence émise par la vacuole. Nous considérons une relation de proportionnalité entre la taille de la vacuole et l'intensité de la fluorescence. Le pourcentage indique la quantité d'événements présents à l'intérieur de la zone par rapport à la quantité d'événements totaux.



**Figure 29. Evolution de la fluorescence émise par la vacuole au cours du conditionnement *batch* tréhalose/acide oléique.**

Pour la fiole témoin, ce chiffre varie peu tandis que cette valeur diminue pour l'essai au fur et à mesure du conditionnement. Effectivement, l'intensité de la fluorescence décroît sur la période de culture. De ce fait, la taille des vacuoles de l'essai s'amenuise au cours du conditionnement. D'après les travaux de SMERALDI *et al.* (1994), cela signifie que l'induction des peroxysomes a bel et bien eu lieu dans la cellule. Les photographies réalisées au microscope à fluorescence corroborent cette déduction. Les vacuoles sont en pleine division pour le témoin alors que les vacuoles de l'essai sont difficilement discernables.

### V.1.5 CONCLUSION

Un conditionnement *batch* des levures dans un milieu composé de tréhalose et d'acide oléique a permis l'induction des peroxysomes. La lente cinétique d'hydrolyse du tréhalose permet de créer des conditions de limitation en glucose (MOURET *et al.*, 2005). Dès lors, l'assimilation de l'acide oléique est possible (EVEERS *et al.*, 1991) et provoque la prolifération des peroxysomes au sein du cytoplasme. L'incorporation de l'acide oléique a été mise en évidence par l'analyse du profil de la pression en oxygène dissout. La coloration au fluoro-isothiocyanate du contenu vacuolaire à plusieurs moments de la culture s'est révélée satisfaisante pour mettre en évidence la prolifération des peroxysomes grâce à la cytométrie en flux.

## V.2 IMPACT DE L'ACIDE OLÉIQUE SUR LES CULTURES *FED-BATCH* DE *S. CEREVISIAE* (*BOULARDII*) EN REACTEUR *SCALE-DOWN*

### V.2.1 OBJECTIF

A l'échelle industrielle, la production aérobie de levure *Saccharomyces cerevisiae* est générée par culture *fed-batch*. Le principe est d'apporter progressivement du substrat (glucose) dans le milieu de culture pour inciter la respiration et éviter la fermentation. Le bioréacteur employé est une cuve hermétique composée d'un axe central rotatif sur lequel est/sont fixé(s) un/plusieurs mobile(s) d'agitation. Néanmoins, l'apport séquencé de glucose dans un réacteur industriel crée des gradients de concentration momentanés car la puissance développée par les mobiles d'agitation n'est pas suffisante pour assurer l'homogénéisation instantanée du pulse de glucose. En effet, l'augmentation de la taille du réacteur implique une augmentation du temps mis par le réacteur pour homogénéiser un pulse de substrat. Ce temps de mélange est donc dépendant de la taille du réacteur, de la puissance développée par l'agitation et de la puissance volumique (DELVIGNE, 2006). Lors de leurs déplacements dans le bioréacteur, les levures rencontrent ces zones d'hétérogénéités. Les concentrations élevées en glucose les contraignent à fermenter le surplus de substrat. Ce phénomène, appelé effet Crabtree, induit une production d'éthanol au détriment de la synthèse de biomasse. Cela représente un inconvénient majeur pour l'industriel dont le but est de maximiser le rendement de bioconversion ( $Y_{x/s}$ ) du procédé.

A ce jour, aucune recherche n'a permis de mettre au point un procédé capable de limiter les conséquences indésirables de l'effet Crabtree hormis l'utilisation de souches génétiquement modifiées. Dans ce contexte, il est intéressant d'imaginer un système de production *fed-batch* dans lequel les levures utilisées sont naturellement résistantes à l'effet Crabtree court-terme (Section II.3.4.3). La phase *fed-batch* est précédée d'un conditionnement à l'acide oléique dans le but d'induire la prolifération des peroxysomes dans la levure. D'après les résultats de FERIA-GERVASIO *et al.* (2008), ces organites cellulaires offrent une nouvelle voie de transport du carbone vers la mitochondrie, site ultime de la respiration cellulaire. Lors de la phase *fed-batch*, l'hypothèse avance que les levures se déplaçant dans des gradients de concentration élevés en glucose peuvent dévier le flux de carbone excédentaire vers la mitochondrie grâce à la présence des peroxysomes.

La seconde partie de ce travail étudie la modulation de l'effet *scale-down* par ajout d'acide oléique. La technologie *scale-down* fournit des outils à l'échelle du laboratoire qui permettent de simuler des gradients de concentration dans le but de prévoir le comportement des levures lors de leur passage à l'échelle industrielle. Le réacteur *scale-down* utilisé au cours des manipulations est décrit dans la section IV.4.2. L'effet *scale-down* peut-être résumé par une diminution de la cinétique globale du procédé.

Trois phénomènes se distinguent du réacteur idéal de référence (LEJEUNE *et al.*, 2010):

- augmentation de la durée de culture
- augmentation de la production d'éthanol
- diminution du rendement de biomasse microbienne

L'objectif des expérimentations vise à étudier l'impact de l'acide oléique sur l'effet *scale-down* rencontré dans les cultures *fed-batch* sur glucose seul.

## V.2.2 **METHODOLOGIE ET DESCRIPTION DES REACTEURS UTILISES**

La démarche suivie consiste à observer l'impact de l'acide oléique sur l'effet *scale-down*. Pour ce faire, des productions de *S. cerevisiae (boulardii)* ont été réalisées dans un réacteur de référence dit "idéal" et dans un réacteur *scale-down*.

Le réacteur de référence est un réacteur pilote de laboratoire d'un volume de deux litres équipé d'un ordinateur interne assurant la régulation optimale des paramètres de culture. Vu le faible volume du réacteur de référence et la performance du système d'agitation, l'opération de mélange est considérée comme parfaite. C'est-à-dire que le milieu de culture est instantanément homogénéisé après un pulse de substrat. Dès lors, les conditions hydrodynamiques du milieu sont idéales pour le développement du microorganisme.

Le réacteur *scale-down* utilisé reproduit en laboratoire les conditions hydrodynamiques rencontrées à l'échelle industrielle. En d'autres termes, il crée artificiellement des zones d'hétérogénéités du substrat à l'échelle du laboratoire. Il est composé d'une partie parfaitement mélangée, identique au réacteur de référence, et d'une section non-mélangée connectée au réacteur. La section non-mélangée est une boucle de recirculation dont l'une des extrémités est plongée dans le milieu de culture et l'autre est connectée au sommet de la cuve. La circulation du fluide à l'intérieur de la boucle, caractérisée par un écoulement piston, se fait au moyen d'une pompe péristaltique fonctionnant à un débit constant de 10,9 litre/heure. Lors de la mise en route du *fed-batch*, l'ajout de substrat s'effectue au début de la boucle de recirculation.

La production de levure à partir d'un substrat mixte glucose/acide oléique est appelée "essai". La phase d'ajout *fed-batch* est précédée par une étape de conditionnement des levures à l'acide oléique (Section IV.4.4). Les levures produites à partir de glucose uniquement sont nommées "témoin" (Section IV.4.3). Elles sont réalisées en parallèle avec les cultures d'essai de manière à caractériser l'impact du substrat mixte sur l'effet *scale-down*.

La régulation de l'ajout de substrat dans le réacteur se fait indirectement par la mesure de la pression en oxygène dissout dans la partie parfaitement mélangée du réacteur (Section IV.4.5). Ce type de régulation assure un apport séquencé de petites quantités de substrat, ce qui minimise l'effet Crabtree dans le réacteur.

Différents paramètres sont évalués dans le but de pouvoir comparer les réacteurs. Des prélèvements stériles sont effectués à intervalles réguliers. Ils sont soumis à des mesures de densité optique et de matière sèche afin de déterminer la courbe de croissance des levures et les rendements de bioconversion de chaque culture. L'analyse phénotypique des levures est également réalisée grâce à la cytométrie en flux. Elle met en évidence les variations physiologiques au sein des populations de cellules lorsque les conditions hydrodynamiques sont modifiées. Divers paramètres sont estimés tels que le taux de mortalité, le taux de cellules métaboliquement actives et la morphologie vacuolaire (Section V.1.3). Finalement, la teneur en éthanol produite au cours de la phase *fed-batch* est déterminée par HPLC.

Le tableau ci-dessous récapitule les cultures entreprises et les analyses réalisées.

**Tableau 9. Récapitulatif des cultures réalisées.**

		Type de réacteur	Type de régulation	Nature(s) du substrat carboné	Analyses
Témoin	Réacteur 1	référence	indirecte (pO <sub>2</sub> )	glucose	DO, MS, coloration PI, FUN, éthanol
	Réacteur 2	<i>scale-down</i>	indirecte (pO <sub>2</sub> )	glucose	DO, MS, coloration PI, FUN, éthanol
Essai	Réacteur 3	référence	indirecte (pO <sub>2</sub> )	glucose et acide oléique	DO, MS, coloration PI, FUN, FITC, éthanol
	Réacteur 4	<i>scale-down</i>	indirecte (pO <sub>2</sub> )	glucose et acide oléique	DO, MS, coloration PI, FUN, FITC, éthanol

### V.2.3 RESULTATS

La discussion des résultats de cette deuxième partie présente deux approches. La première consiste à traiter indépendamment les données provenant des cultures sans acide oléique (témoin) et des cultures avec acide oléique (essai) de manière à interpréter l'effet *scale-down*. La seconde approche vise à comparer et analyser les différences obtenues entre les cultures en présence et en absence d'acide oléique dans le but de comprendre l'impact de l'acide oléique sur la modulation de l'effet *scale-down*.

#### V.2.3.1 OBSERVATION DE L'EFFET *SCALE-DOWN* AU NIVEAU D'UNE CULTURE *FED-BATCH*

Les modifications hydrodynamiques apportées par le réacteur *scale-down* engendrent des variations physiologiques à l'échelle de la levure. Les résultats ci-après présentent les principaux paramètres affectés par ce changement des conditions de mélange:

- les profils de pression en oxygène dissout dans la section parfaitement mélangée du réacteur
- les temps d'activation de la pompe d'ajout
- la croissance cellulaire des levures au cours de la culture
- la concentration en éthanol du milieu de culture

### V.2.3.1.1 *PRODUCTION FED-BATCH DE S. CEREVISIAE (BOULARDII) AVEC APPORT DE GLUCOSE*

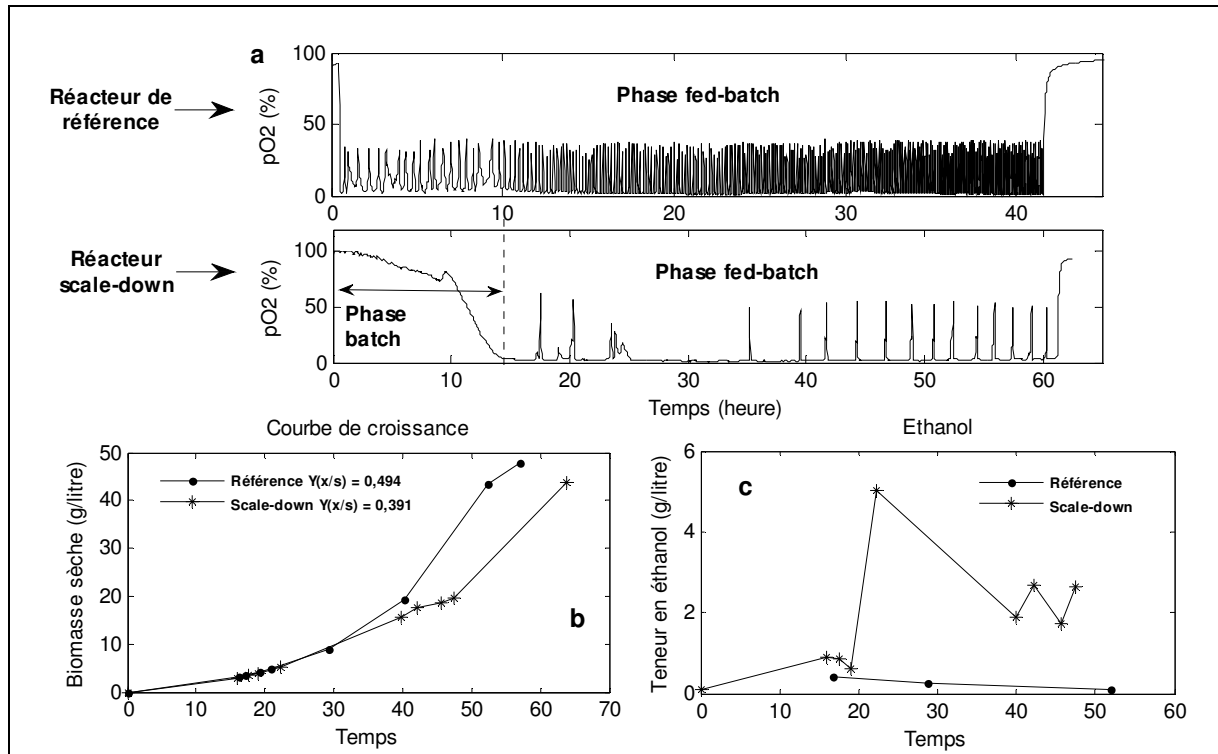
La pression en oxygène dissout a été enregistrée lors de la conduite des différents réacteurs. La figure 30 donne l'enregistrement de la pO<sub>2</sub> pour le réacteur de référence et le réacteur *scale-down*. La fréquence d'oscillation de la pO<sub>2</sub> durant la phase *fed-batch* peut-être assimilée à la fréquence d'activation de la pompe d'ajout. Dans le réacteur de référence, la pompe s'active très souvent sur de courtes durées alors que dans le réacteur *scale-down*, la pompe s'enclenche rarement mais sur de longues périodes (Tableau 10). L'apparition de ce phénomène est due à l'injection du glucose au début de la boucle de recirculation, ce qui occasionne un retard de l'ajout de glucose dans le réacteur. Ce délai augmente la durée pendant laquelle les levures sont en manque de glucose.

**Tableau 10** Durée moyenne des temps d'ajouts et nombre d'ajouts dans les réacteurs *scale-down* et de référence pour les cultures sans acide oléique.

	Durée moyenne des ajouts (s)	Nombre d'ajouts
Réacteur de référence	48'	274
Réacteur <i>scale-down</i>	198'	16

L'évolution de la teneur en biomasse dans le milieu de culture, présentée à la figure 30, indique que le taux de croissance des levures est plus élevé dans le réacteur de référence que dans le réacteur *scale-down*. En effet, la culture dans le réacteur *scale-down* est plus longue que dans le réacteur de référence. Le rendement de bioconversion du réacteur de référence (49,4%) s'accorde bien avec la littérature. LEJEUNE *et al.* (2010) atteignent une valeur de 48% pour *S. cerevisiae (boulardii)* dans des conditions de culture semblables. Néanmoins, le  $Y_{x/s}$  diminue significativement pour le réacteur *scale-down* (39,1%). La teneur en éthanol est toujours supérieure dans le réacteur *scale-down*. Cette différence s'accroît lors du démarrage de la phase *fed-batch* pour atteindre 2,6 g/litre en fin de culture dans le réacteur *scale-down* contre 0,1 g/litre pour le réacteur de référence.

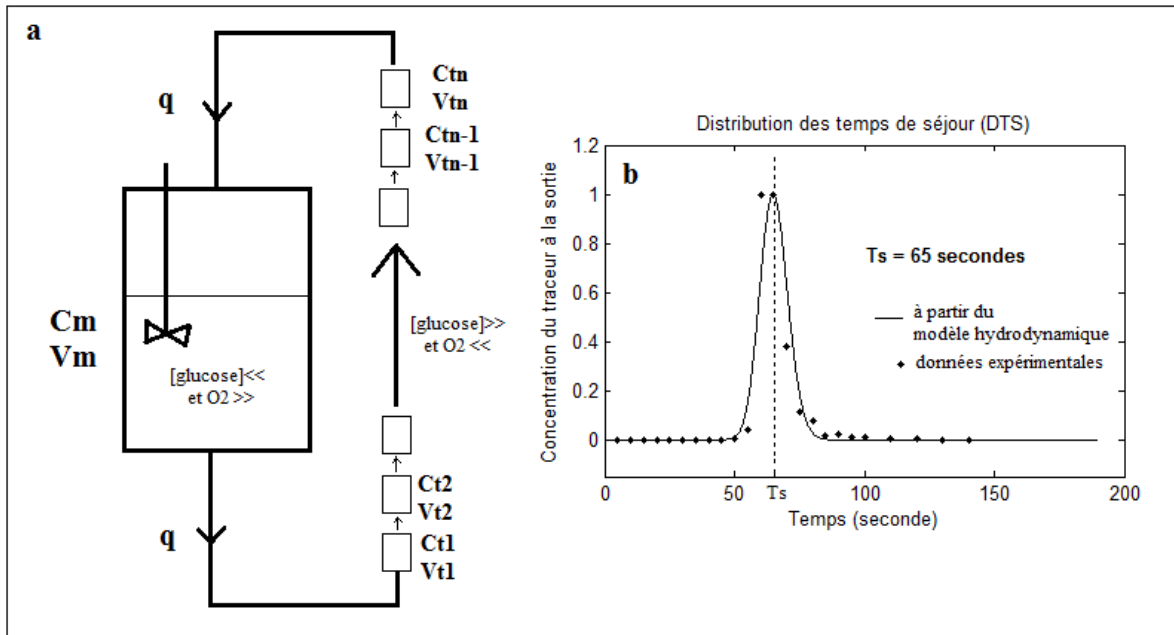
Les conditions de culture du réacteur de référence sont considérées idéales pour le développement optimal des levures. Le réacteur *scale-down* permet d'exposer les microorganismes à des fluctuations de conditions extracellulaires représentatives de celles rencontrées à l'échelle industrielle. Il est important de caractériser les amplitudes et les fréquences de ces fluctuations car il est mentionné dans la littérature que celles-ci sont critiques pour l'extrapolation des bioprocédés. Pour ce faire, il est nécessaire de créer un modèle hydrodynamique qui permet de simuler les fluctuations imposées par la boucle de recirculation. La partie agitée du réacteur est considérée comme un compartiment parfaitement mélangé (CPM) tandis que la boucle de recirculation est caractérisée par un écoulement piston et doit être modélisée comme 150 CPM en série (Figure 31a). Le modèle est caractérisé par le volume et la concentration en glucose dans chaque CPM ainsi que les flux (débit de recirculation) entre chaque CPM. A partir de ces données, il est possible d'écrire une matrice des flux entre chaque CPM afin de créer un système d'équations différentielles permettant de calculer la distribution des temps de séjour (DTS) dans la boucle de recirculation.



**Figure 30. Evolution de différents paramètres au cours des cultures témoins en réacteur *scale-down* et en réacteur de référence. a) Profil de la pression en oxygène dissout. b) Courbe de croissance. c) Evolution de la teneur en éthanol dans le milieu de culture (g/litre).**

La DTS calculée à partir du modèle est identique à la DTS obtenue expérimentalement (Figure 31b). D'autre part, la DTS (65 secondes) obtenue est en accord avec l'hypothèse d'un écoulement piston car la DTS théorique détermine un temps de séjour de 77 secondes (Section IV.4.1).

La DTS des cellules dans la boucle de recirculation permet de déterminer la durée pendant laquelle les cellules sont soumises à des fluctuations importantes du milieu extracellulaire. L'injection du glucose au début de la boucle de recirculation génère un gradient de glucose. Dès lors, la boucle est caractérisée par des teneurs élevées en glucose et une faible pression en oxygène dissout (conditions non-idéales) tandis que la partie agitée est caractérisée par des faibles teneurs en glucose et une pression en oxygène dissout élevée grâce à l'aération continue (conditions idéales). Durant leurs déplacements dans le réacteur, les levures traversent alternativement des conditions idéales et non-idéales. Lors de leurs passages dans la boucle, elles sont exposées plus d'une minute à des teneurs élevées en glucose et faibles en oxygène. Connaissant les causes de l'effet Crabtree, il est fort probable que les levures fermentent une partie du glucose en éthanol. Cette hypothèse est vérifiée par les teneurs en éthanol nettement supérieures dans le réacteur *scale-down*. Par conséquent, les levures connaissent un état de stress dans la boucle. Le retour à un état physiologique normal dans les conditions idéales s'accompagne d'une période de ré-adaptation qui tend à diminuer la cinétique globale du procédé par rapport au réacteur de référence.



**Figure 31. Caractérisation du réacteur *scale-down* a) Modèle hydrodynamique d'un réacteur *scale-down* , le réacteur est compartimenté en zones parfaitement mélangées ( $n=150$  et  $q=10,9$  litre/h) (DELVIGNE *et al.*, 2010) b) DTS des cellules dans la boucle de recirculation.**

Les fluctuations hydrodynamiques imposées dans le réacteur *scale-down* induisent une physiologie oscillatoire des levures qui se répercute dans l'augmentation de la durée de culture et l'infériorité du  $Y_{x/s}$  par rapport au réacteur de référence. De plus, les hauts gradients de glucose rencontrés au sein de la boucle incitent les levures à produire de l'éthanol, ce qui contribue également à la chute des rendements en biomasse. Les observations corroborent les travaux de LEJEUNE *et al.* (2010).

V.2.3.1.2 PRODUCTION FED-BATCH DE *S. CEREVISIAE* (*BOULARDII*) AVEC APPORT DE GLUCOSE ET ACIDE OLEIQUE

A la différence de la culture sans acide oléique, la phase *batch* est remplacée par une phase de conditionnement tréhalose/acide oléique (Section V.1). Pour rappel, la lente cinétique d'hydrolyse du tréhalose crée des conditions limitantes en glucose qui permettent à la levure d'utiliser la seconde source de carbone: l'acide oléique. L'induction des peroxyosomes détectable par cytométrie en flux est le critère choisi pour vérifier le bon fonctionnement du conditionnement.

Comme ce fut le cas dans les cultures sans acide oléique, le taux d'oxygène dissout ( $pO_2$ ) des cultures envisagées a été enregistré en continu (Figure 32). Les phases de conditionnement en bioréacteur manifestent des profils en  $pO_2$  complètement différents de ceux obtenus en fiole. Cette nuance est due aux conditions d'agitation et d'aération nettement plus performantes en bioréacteur. De fait, la durée des conditionnements est bien plus rapide: 50 heures en fiole pour 27 heures en bioréacteur.

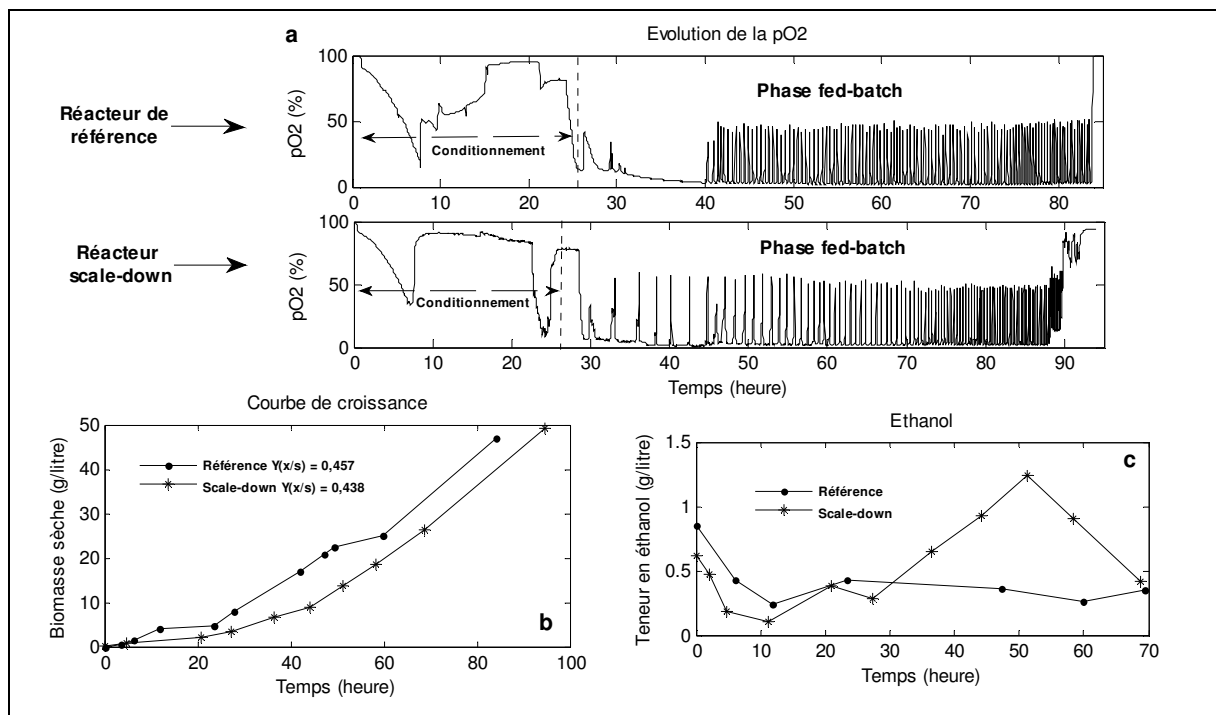


De même que précédemment, les oscillations de pO<sub>2</sub> ayant cours lors de la phase *fed-batch* peuvent-être interprétées comme les séquences d'activation et de désactivation de la pompe d'ajout. Les ajouts effectués dans le réacteur de référence sont plus fréquents et plus courts que dans le réacteur *scale-down* (Tableau 11).

**Tableau 11. Durée moyenne des ajouts et nombre d'ajouts dans les réacteurs d'essai *scale-down* et de référence pour les culture avec acide oléique.**

	Durée moyenne des ajouts (s)	Nombre d'ajouts
Réacteur de référence	132'	116
Réacteur <i>scale-down</i>	154'	103

Quoique très faible, cette différence est due à la présence de la boucle de recirculation qui occasionne un retard de l'ajout de substrat dans la partie parfaitement mélangée du réacteur. Néanmoins, cet écart est moins marqué que dans les cultures sans acide oléique. L'évolution de la biomasse sèche (figure 32) indique que le taux de croissance atteint par les levures à la fin du conditionnement est supérieur dans le réacteur de référence. Cela se transmet par une augmentation du temps de culture et une diminution du  $Y_{x/s}$  dans le réacteur *scale-down*. Cependant, l'écart entre les deux rendements de bioconversion est très faible par rapport à celui observé dans les cultures sans acide oléique. Nous observons une évolution semblable de la concentration en éthanol qui s'élève à 0,42 et 0,35 g/litre en fin de culture pour les bioréacteurs *scale-down* et de référence respectivement.



**Figure 32. Evolution de différents paramètres au cours des cultures d'essai en réacteur *scale-down* et en réacteur de référence. a) Profil de la pression en oxygène dissout. b) Courbe de croissance. c) Evolution de la teneur en éthanol dans le milieu de culture (g/litre).**

L'analyse des résultats obtenus visent à interpréter:

- le comportement de la levure face à l'apport d'un substrat mixte dans des conditions idéales (réacteur de référence)
- le comportement de la levure face à l'apport d'un substrat mixte dans des conditions non-idéales (réacteur *scale-down*)

Les interprétations avancées sont hypothétiques. Elles sont basées sur les observations décrites dans le paragraphe ci-dessus et les connaissances acquises dans la littérature.

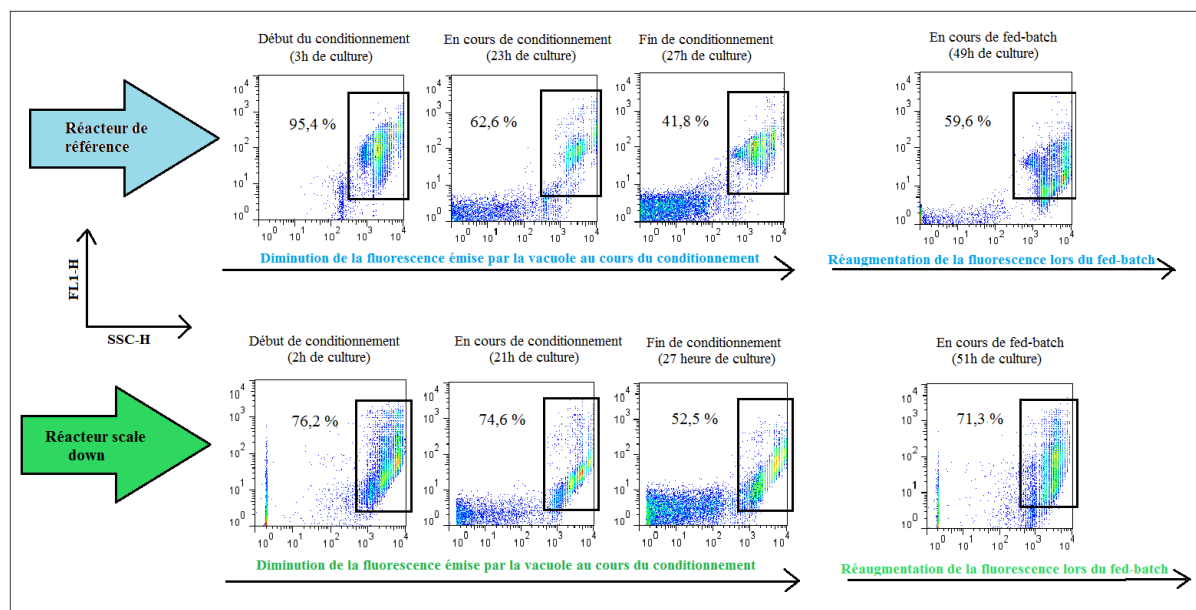
**Dans le réacteur de référence (conditions idéales):**

Tout d'abord, les levures sont soumises à un conditionnement (mode *batch* et conditions aérobies) durant lequel des conditions limitantes en glucose sont obtenues par l'utilisation du tréhalose (MOURET *et al.*, 2005). La répression catabolique effectuée par le glucose est atténuée par sa faible concentration (PHAM *et al.*, 1998) et permet aux levures d'utiliser la seconde source de carbone présente dans le milieu de culture: l'acide oléique. Dans ces conditions, FERIA-GERVASIO *et al.* (2008) impute à l'acide oléique un "effet génétique" et un "effet substrat" sur la physiologie des levures.

- L'effet génétique de l'acide oléique mènerait à la transcription de certains gènes dont le promoteur possède une ORE (*Oleic Response Element*). Parmi ces gènes, certains sont impliqués dans la prolifération des peroxysomes (ERDMANN *et al.*, 1989 et 1995; SALEEM *et al.*, 2008) et d'autres codent pour des enzymes/protéines spécifiques engagées dans le transport du carbone du cytoplasme vers la mitochondrie, site ultime de la respiration cellulaire (KAL *et al.* 1999; HILTUNEN *et al.* 2003; GURVITZ et ROTTENSTEINER, 2006; SALEEM *et al.*, 2008). D'une part, l'induction des peroxysomes créerait de nouvelles voies de transport pour acheminer l'acétyl-coA du peroxysome vers la mitochondrie. D'autre part, la présence d'acide oléique augmenterait l'activité de certaines protéines impliquées dans le transport de l'acétyl-coA du cytoplasme vers la mitochondrie.
- L'effet substrat désignerait l'acide oléique comme une source de carbone supplémentaire pour les levures en croissance exponentielle. L'acide oléique est en effet dégradé en acétyl-coA au cours de la  $\beta$ -oxydation dans les peroxysomes (TROTTER, 2001).

D'après FERIA-GERVASIO *et al.* (2008), ces deux effets simultanés engendreraient un retard de la balance respiro-fermentaire lors d'un pulse de glucose. En d'autres termes, les levures atténueraient l'effet Crabtree court-terme en redirigeant le flux de carbone excédentaire vers la mitochondrie grâce aux nouvelles voies de transport du carbone et évitent donc les voies de fermentation.

Dans la figure 33, les résultats de la cytométrie en flux des levures colorées au FITC confirment que le cytoplasme devient le siège d'une prolifération des peroxysomes au détriment de la taille de la vacuole durant le conditionnement.



**Figure 33. Cytogrammes illustrant l'évolution de la fluorescence des vacuoles au cours du conditionnement en réacteur de référence et en réacteur *scale-down*.**

Le conditionnement terminé, la phase *fed-batch* démarre et la pompe s'enclenche quand la  $pO_2$  dépasse la valeur seuil de 30% dans le réacteur. Les levures en croissance exponentielle consomment d'abord préférentiellement le glucose. Au fur et à mesure que les cellules ressentent une diminution de l'effet glucose, elles peuvent assimiler et dégrader une partie de l'acide oléique dans les peroxysomes hérités du conditionnement. Dans leurs travaux, FERIA-GERVASIO *et al.* (2008) observent une consommation de l'acide oléique représentant 3 à 15% de la source de carbone dans un chémostat en limitation glucose auquel on apporte de l'acide oléique à de très faibles taux de dilution ( $0,0041$  et  $0,0073 h^{-1}$ ). Une fois que la totalité de glucose injecté lors du pulse précédent est consommée, la  $pO_2$  remonte suite à l'aération continue malgré le faible taux de consommation d'oxygène utilisé pour l'assimilation de l'acide oléique. Dès que la valeur seuil des 30% est atteinte, la pompe s'enclenche et apporte à nouveau du glucose et de l'acide oléique.

Il est supposé qu'au cours de la croissance exponentielle, l'effet récurrent de la répression catabolique engendre une dégradation progressive des peroxysomes dans le cytoplasme. SMERALDI *et al.* (1994) observent que le passage d'une culture de levure en croissance sur méthanol (un substrat activant également la prolifération des peroxysomes) à une culture sur milieu glucose s'accompagne d'une dégradation des peroxysomes opérée par la vacuole. Le cytogramme (Figure 34) obtenu pour un échantillon coloré au FITC en cours de *fed-batch* corrobore l'hypothèse émise. En effet, la fluorescence émise par la vacuole augmente à nouveau pendant le *fed-batch*. Ce qui signifie que la vacuole reprend du volume au détriment des peroxysomes.

En résumé, les levures en croissance exponentielle consomment préférentiellement le glucose à l'acide oléique. Cependant, celui-ci est assimilé en faibles quantités au cours des différents ajouts dans les peroxysomes hérités du conditionnement lorsque l'effet glucose s'atténue. Il semble également qu'une partie de l'acide oléique incorporé au sein de la levure sert à entretenir l'induction de certains gènes. Notamment les gènes responsables de l'acheminement de l'acétyl-coA peroxysomal vers la mitochondrie tels que le système CAT (acétyl-carnitine), la voie de la citrate synthase (CS) et la voie de l' $\alpha$ -isopropylmalate synthétase (Section II.3.5.2). Ces nouvelles voies d'apport du carbone dans la mitochondrie permettent à la levure de modifier sa bascule respiro-fermentaire lorsque celle-ci rencontre des concentrations élevées en glucose. En effet, la levure pourrait rediriger le pyruvate excédentaire vers ces nouvelles voies de transport en plus de celles déjà existantes. Ainsi, elle évite les voies de la fermentation. Cela explique le très faible taux d'éthanol et le bon rendement de bioconversion obtenu (45,7%).

**Dans le réacteur *scale-down* (alternance de conditions idéales et non-idéales):**

De manière identique au réacteur de référence, l'induction des peroxysomes constatée par la cytométrie en flux témoigne de la bonne conduite du conditionnement (Figure 33). Une fois terminé, la phase *fed-batch* démarre et la pompe s'enclenche en fonction de la pression en oxygène dissout mesurée dans la partie agitée du réacteur *scale-down*. Les levures rencontrent alternativement des conditions idéales dans la partie agitée et des conditions non-idéales dans la boucle de recirculation. Pour rappel, les hautes concentrations en glucose et la faible pression en oxygène dissout dans la boucle de recirculation provoquent une production éthanol et une chute du rendement en biomasse dans le réacteur *scale-down* sans acide oléique. Pourtant, la teneur en éthanol est quasi nulle tout au long de la culture *fed-batch* dans le réacteur *scale-down* avec acide oléique. L'écart de  $Y_{x/s}$  avec le réacteur de référence est très faible ( $\pm 5\%$ ) comparée à celle obtenue dans les cultures sans acide oléique ( $\pm 20\%$ ). Ce résultat est très important car il vérifierait l'hypothèse avancée précédemment. La présence d'acide oléique atténuerait l'effet Crabtree en modifiant la balance respiro-fermentaire. De ce fait, le carbone excédentaire serait redirigé non pas vers la fermentation mais vers la production de biomasse.

### **V.2.3.2 COMPARAISON DES CULTURES *FED-BATCH* AVEC ET SANS ACIDE OLEIQUE**

La confrontation des résultats entre les cultures en présence et en absence d'acide oléique permet de rendre compte de l'impact de l'acide oléique sur la modulation de l'effet *scale-down* établi pour des cultures *fed-batch* sur glucose seul.

Les critères de comparaison choisis pour mettre en évidence l'impact de l'acide oléique sont:

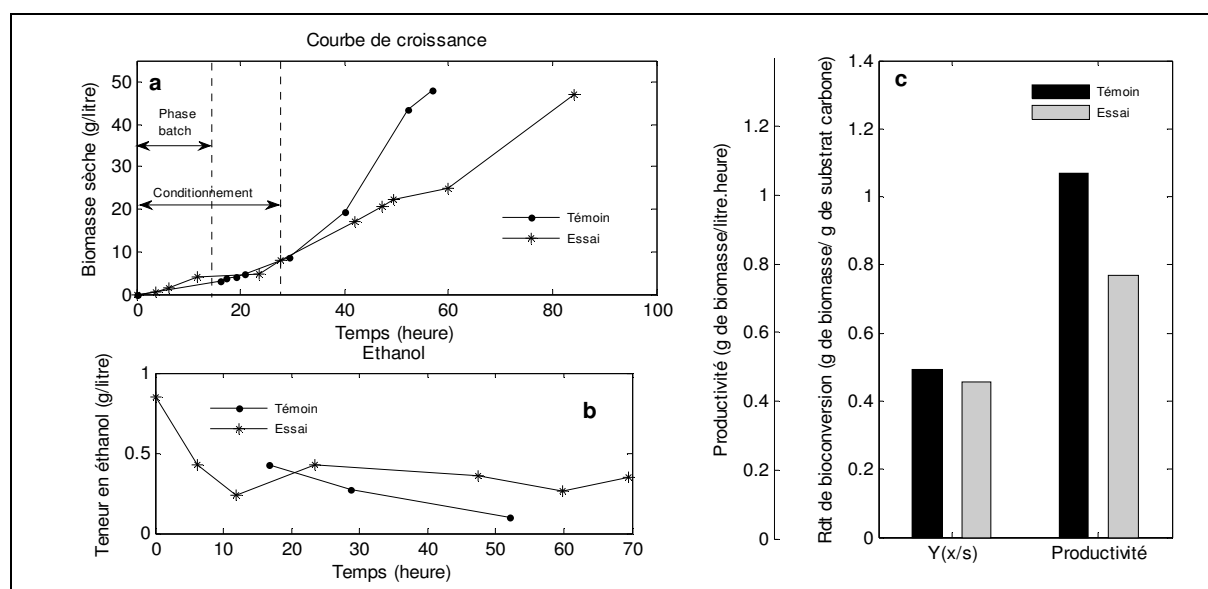
- la teneur en éthanol au cours de la culture, le  $Y_{x/s}$  et la productivité cellulaire
- la dynamique *fed-batch*

Remarque: pour des questions de facilité, la culture sans acide oléique est appelée "témoin" tandis que la culture avec acide oléique est appelée "essai".

### V.2.3.2.1 COMPARAISON DES CULTURES EN REACTEUR DE REFERENCE

#### Production d'éthanol

La teneur en éthanol dans le réacteur de référence reste très faible tout au long de la culture (< à 0,5 g/litre) pour le témoin et l'essai (Figure 34). Il n'existe pas de différences significatives entre les deux réacteurs si ce n'est que le témoin produit un peu moins d'éthanol. Un phénomène de diauxie apparait quand les levures du témoin commencent à ressentir un manque important de glucose (ENFORS *et al.*, 1991), c'est-à-dire qu'elles ont la capacité d'oxyder l'éthanol produit. Il est supposé que les levures de l'essai ne ressentent jamais un manque réel en carbone suite à la présence de l'acide oléique. Il faut noter que l'acide oléique n'est pas entièrement consommé car il en reste une quantité résiduelle en fin de culture. D'ailleurs, la rémanence de l'acide oléique dans le milieu de culture entraîne une diminution du  $Y_{x/s}$  de l'essai (45,7%) par rapport celui du témoin (49,4%). D'une manière générale, les deux réacteurs de référence offrent des résultats semblables mis à part la cinétique globale de culture plus lente en présence d'acide oléique.



**Figure 34. Comparaison des teneurs en biomasse (a) et en éthanol (b) dans le réacteur de référence pour le témoin et l'essai. c) Valeur des rendements de bioconversion et de la productivité cellulaire au cours du *fed-batch*.**

#### Dynamique *fed-batch*

Dans le réacteur de référence, le taux de croissance est supérieur pour les levures se développant sur glucose seul (Figure 34) cependant il faut noter que la culture d'essai est précédée d'une plus longue étape de conditionnement. Tenant compte des interprétations faites dans la section précédente, au fur et mesure de l'atténuation de l'effet glucose, les cellules de l'essai assimilent l'acide oléique. Cependant, il semble que le métabolisme respiratoire de la levure soit plus lent et plus complexe sur le substrat mixte.

Premièrement, le glucose et l'acide oléique induisent chacun des modifications physiologiques différentes dans la levure et perturbent le métabolisme. Deuxièmement, les ajouts de substrat sont plus important dans l'essai, ce qui engendre une durée de consommation plus longue du substrat carboné que dans le témoin (Figure 35).

Troisièmement, bien que la quantité d'oxygène requise par atome de carbone d'acide oléique soit plus élevée que par atome de carbone de glucose (Section V.1.4.3), il se pourrait que la vitesse de consommation d'oxygène soit plus faible lors de l'oxydation de l'acide oléique.

En d'autres termes, la levure consommerait le glucose plus rapidement que l'acide oléique. Ce phénomène se répercuterait dans l'augmentation de la durée de culture. Néanmoins, peu d'articles de la littérature font référence à ce sujet. Cette interprétation constitue une hypothèse qu'il faudrait vérifier.

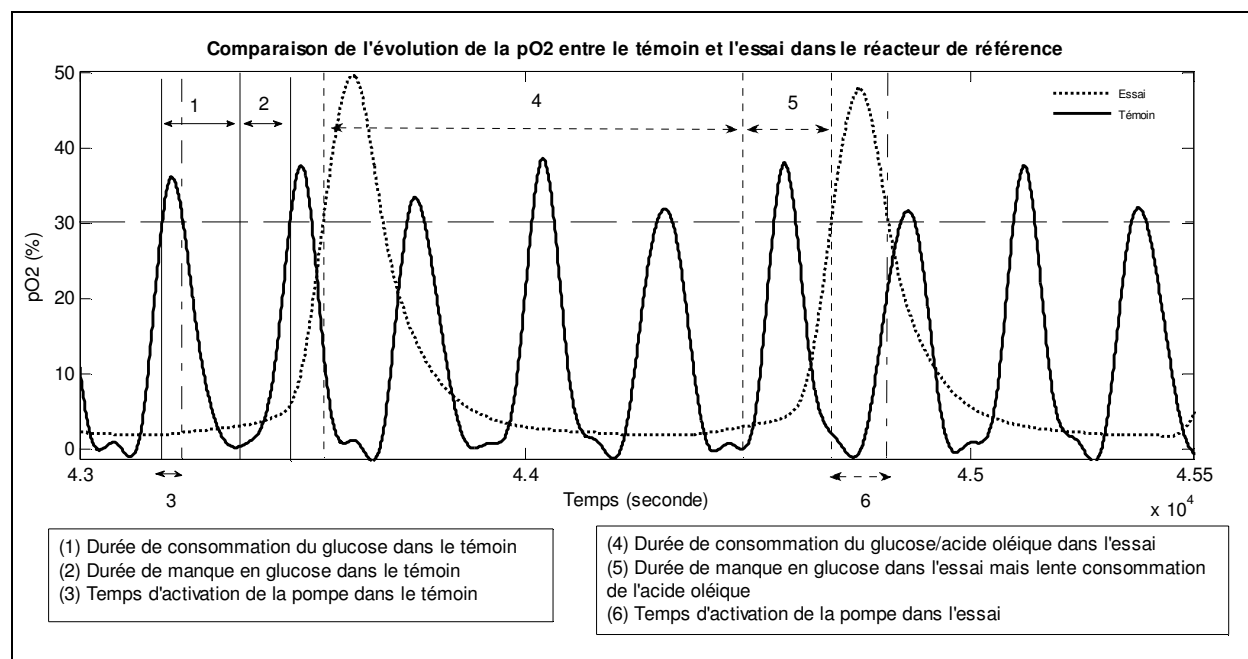


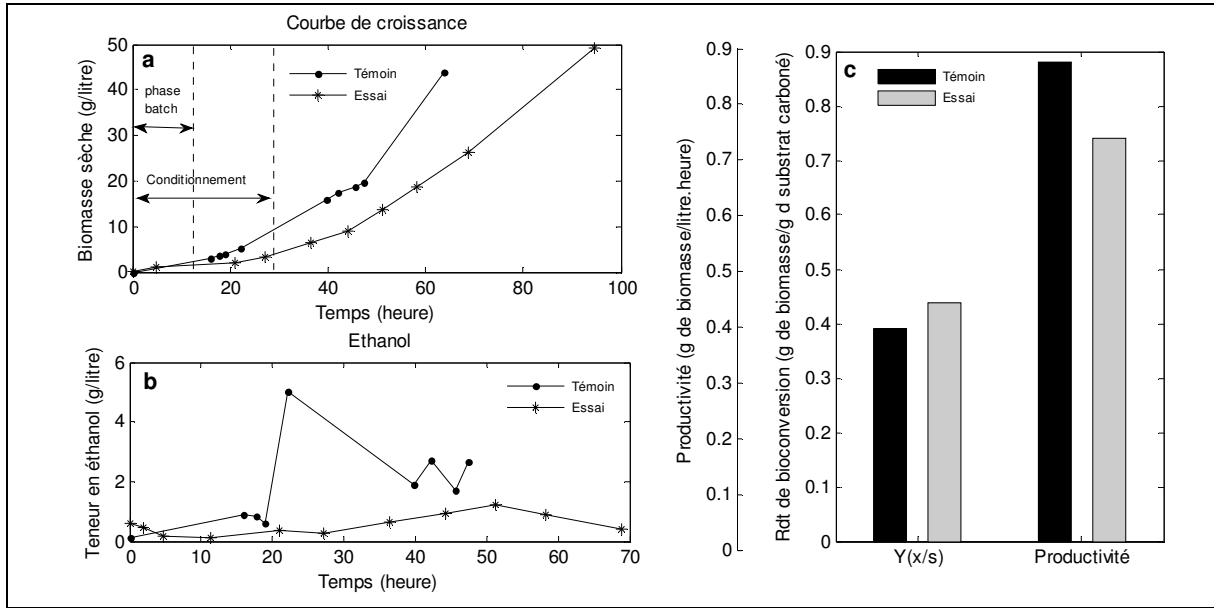
Figure 35. Comparaison de l'évolution de la pO<sub>2</sub> entre le témoin et l'essai dans le réacteur de référence.

#### V.2.3.2.2 COMPARAISON DES CULTURES EN RÉACTEURS SCALE-DOWN

##### Production d'éthanol

Malgré les fluctuations des conditions extracellulaires propices à l'effet Crabtree dans la boucle de recirculation, les levures de l'essai produisent peu d'éthanol (0,4 g/litre en fin de culture). Ce phénomène atteste que l'acide oléique influence la transition de la bascule respiro-fermentaire étant donné que dans les mêmes conditions sans acide oléique, la teneur en éthanol est accrue et atteint jusqu'à 2,5 g/litre en fin de culture (Figure 36). La diminution de la production d'éthanol se fait au profit de la synthèse de biomasse. Effectivement, la concentration en biomasse en fin de culture atteint près de 50 g/litre pour l'essai alors qu'elle n'est que de 42 g/litre pour le témoin. Par ailleurs, en comparaison avec le réacteur de référence, le rendement de bioconversion chute de 5% lors du passage en réacteur *scale-down* pour l'essai alors qu'il diminue de 20% pour le témoin.

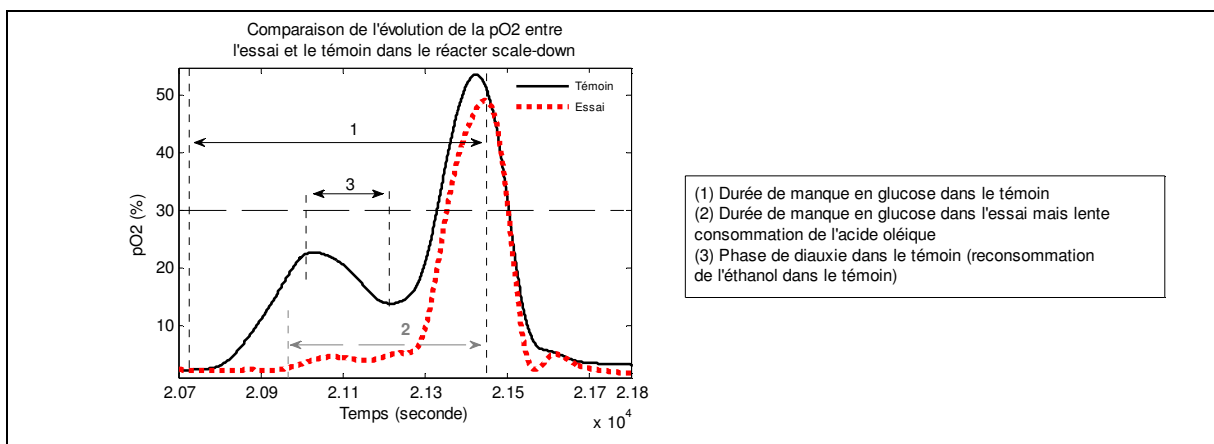
Toutefois, le taux de croissance des cellules et la productivité du témoin (0,88 g de biomasse/litre.heure) sont supérieurs à ceux de l'essai (0,74 g de biomasse/litre.heure) (Figure 36). Une analyse fine de la dynamique *fed-batch* est essentielle pour comprendre ce phénomène.



**Figure 36. Comparaison des teneurs en biomasse (a) et en éthanol (b) dans le réacteur *scale-down* pour le témoin et l'essai. c) Valeur des rendements de bioconversion et de la productivité cellulaire au cours du *fed-batch*.**

**Dynamique *fed-batch***

Bien que la durée de la culture *fed-batch* soit augmentée en présence d'acide oléique, la dynamique des oscillations de pO<sub>2</sub> est plus rapide dans l'essai que dans le témoin. En effet, la durée moyenne d'activation de la pompe est plus longue pour le témoin (198 secondes) que pour l'essai (154 secondes). Ce qui signifie que le manque en carbone occasionné par la boucle de recirculation est moins ressenti par les levures de l'essai (Figure 37). Effectivement, la durée de carence en glucose est supérieure dans le témoin (Figure 37). Egalement, l'analyse fine de la courbe pO<sub>2</sub> du témoin constate une faible rechute de la pO<sub>2</sub> pendant la phase de manque en glucose. Cela correspond sans doute à un phénomène de diauxie, absent dans l'essai puisque les teneurs en éthanol atteintes sont quasi nulles.



**Figure 37. Analyse fine et comparaison d'une oscillation de pO<sub>2</sub> entre le témoin et l'essai dans un réacteur *scale-down*.**

Les levures de l'essai ne sont jamais soumises à un manque de carbone car il reste toujours une quantité résiduelle d'acide oléique dans le milieu de culture. Si la vitesse de consommation d'oxygène pour respirer l'acide oléique est plus faible que le taux d'oxygène dissout apporté par l'aération continue, la  $pO_2$  remonte dans le réacteur au delà de 30%. Dès lors, l'effet de retard occasionné par la boucle ne serait pas ressenti par les levures. Dans ce cas, les levures n'éprouvent jamais de stress nutritionnel, ce qui améliorerait la dynamique *fed-batch*.

Jusqu'à maintenant, l'hypothèse avancée présente que la meilleure dynamique *fed-batch* observée dans le réacteur *scale-down* avec acide oléique est due à une composante biologique. Néanmoins, la composante physico-chimique du système est modifiée par l'ajout d'un acide gras dans le milieu de culture. MOROA *et al.*, (1999) ont observé que l'ajout d'huile de soja à faible concentration dans un milieu aéré augmente le transfert de masse et l'aire interfaciale des bulles d'air. La présence d'acide oléique améliorerait le transfert d'oxygène de la phase gazeuse vers la phase liquide. Cette augmentation du  $k_L a$  assurerait une meilleure disponibilité de l'oxygène dissout pour les levures et contribuerait à une meilleure cinétique d'oxydation du substrat.

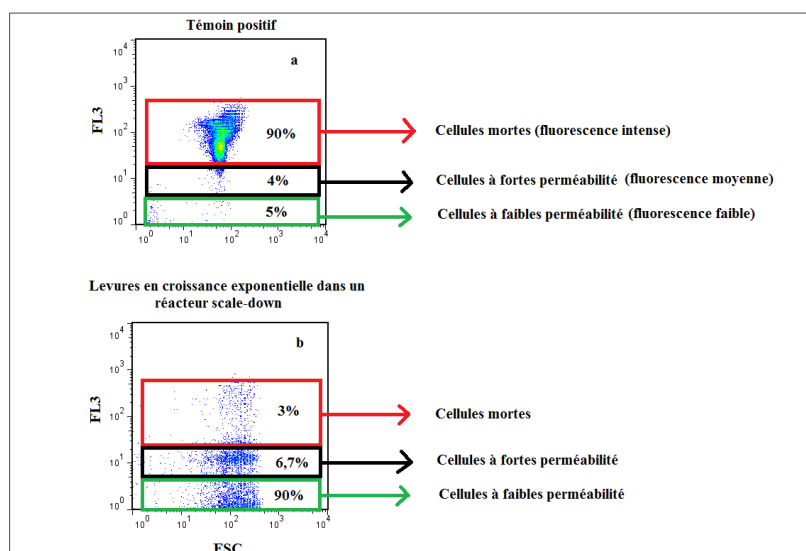
### V.2.3.3 ANALYSE DE LA VIABILITE CELLULAIRE DES LEVURES PRODUITES EN CULTURES *FED-BATCH* EN PRESENCE ET EN ABSENCE D'ACIDE OLEIQUE

Ce chapitre est consacré à l'analyse de la viabilité cellulaire des levures au cours de chaque culture. Outre la mortalité cellulaire, une approche intéressante consiste également à évaluer la qualité des levures. Le principe est d'estimer le degré d'altération des membranes cellulaires. Pour ce faire, la perméabilité de la membrane cellulaire peut-être jaugée grâce aux cytogrammes issus de la coloration des levures à l'iodure de propidium. Ce colorant s'introduit dans les cellules dont la membrane cellulaire est endommagée et colore le cytoplasme. Une cellule morte fluoresce intensément dans le rouge comme c'est le cas dans un témoin positif (Figure 38). Dans les cytogrammes, il existe également une zone intermédiaire dans laquelle les cellules fluorescent à des intensités moyennes (Figure 38). Cette zone coïnciderait avec des cellules vivantes dont la membrane est très perméable.

Les cytogrammes repris dans les annexes VIII.4 et VIII.5 présentent l'évolution des ces deux paramètres (taux de mortalité et cellules à fortes perméabilités) pour les quatre productions *fed-batch* accomplies au cours de ces manipulations.

D'une manière générale, le taux de mortalité reste relativement faible en fin de phase *fed-batch* pour chaque culture (1-4 %). L'activité métabolique résiduelle des levures, déterminée par la coloration au FUN-1, atteint 80-85 % en moyenne. Cette bonne viabilité cellulaire pour les deux types de réacteurs envisagés atteste que les mauvaises conditions de mélange infligées par la boucle de recirculation induisent uniquement des bouleversements au niveau du métabolisme cellulaire. Néanmoins, le réacteur *scale-down* a un impact non-négligeable sur l'altération de la membrane car la perméabilité membranaire semble s'accroître. Le taux de cellules à fortes perméabilités atteint alors 3 à 7% en fin de culture contre 0 à 2% dans le réacteur de référence. Quoique légère, cette dissimilitude pourrait trouver son origine dans l'effet *scale-down*.





**Figure 38. Cytogramme de coloration à l'iodure de propidium. a) Témoin positif. b) Echantillon de levures en croissance exponentielle dans un réacteur *scale-down*.**

D'une part, quand une cellule traverse un gradient de concentration élevé en glucose, elle fermente l'excès de pyruvate formé au cours de la glycolyse en éthanol. La levure n'accumule pas l'éthanol produit au sein de son cytoplasme. Elle l'excrète dans le milieu de culture et la perméabilité de la membrane cellulaire augmente naturellement. D'autre part, l'augmentation de la perméabilité membranaire peut-être due également au manque de glucose éprouvé plus intensément dans le réacteur *scale-down*. Toutefois, la présence d'acide oléique a démontré une réduction de la fermentation du glucose dans les hauts gradients en glucose de la boucle de recirculation. Par conséquent, l'accroissement de la perméabilité membranaire perpétrée chez les levures de l'essai dans le réacteur *scale-down* ne serait pas dû à l'éthanol formé. Une étude récente de CONNERTH *et al.*, (2010) a identifié que la synthèse d'ester de stérol dans les corps d'inclusion lipidiques était inhibée dans le cas de levures se développant sur un milieu riche en acide oléique. Or, la présence d'ester de stérol est indispensable pour assurer l'homéostasie membranaire. De fait, la levure est sujette à la liposensibilité. Dès lors, la levure verrait sa physiologie perturbée lors de l'injection de glucose et d'acide oléique au début de la boucle de recirculation. En effet, les teneurs élevées en acide oléique rencontrées dans la boucle pourraient être à l'origine de l'accroissement de la perméabilité membranaire.

## V.2.4 CONCLUSION

L'effet *scale-down* a été mis en évidence lors de la production *fed-batch* de *S. cerevisiae* (*boulardii*) à partir de glucose seul en réacteur *scale-down*. La combinaison d'un conditionnement des levures à l'acide oléique et la présence de l'acide oléique lors de la production *fed-batch* de *S. cerevisiae* (*boulardii*) a modifié les conséquences indésirables de l'effet *scale-down*. Effectivement, une faible production d'éthanol est observée dans le réacteur *scale-down* au bénéfice de la synthèse de biomasse en présence d'acide oléique. Toutefois, la productivité reste plus élevée dans une culture sur glucose seul avec 0,88 g/l.h contre 0,74 g/l.h en présence d'acide oléique. La viabilité cellulaire est peu affectée par les mauvaises conditions hydrodynamiques. Cependant, il semble que la perméabilité de la membrane cellulaire s'accroît dans les réacteurs *scale-down*.

## V.3 SIMULATION DES CONCENTRATIONS EN GLUCOSE RENCONTREES PAR LES LEVURES DANS LE REACTEUR SCALE-DOWN AVEC ACIDE OLEIQUE

### V.3.1 OBJECTIFS

Dans leurs recherches, FERIA-GERVASIO *et al.*, (2008) ont mesuré que dans un chémostat glucose/acide oléique, un délai de temps moyen de 15 minutes s'écoule entre le pulse de glucose et l'apparition d'éthanol dans le milieu de culture par rapport à un chémostat glucose. L'objectif de ce dernier chapitre est de simuler les conditions hydrodynamiques rencontrées dans le bioréacteur *scale-down* avec acide oléique dans le but d'observer les concentrations en glucose éprouvées par les levures lors de leurs déplacement. L'idéal serait de pouvoir estimer le temps moyen d'exposition des levures à des concentrations élevées en glucose. Un temps moyen inférieur ou proche à 15 minutes confirmerait le retard de la bascule respiro-fermentaire observé dans la culture en réacteur *scale-down* avec acide oléique.

### V.3.2 DÉMARCHE SUIVIE

Dans un premier temps, l'évolution de la concentration en glucose au cours du temps a été simulée dans le réacteur *scale-down*. Pour ce faire, la partie agitée du réacteur est considérée comme un compartiment parfaitement mélangé (CPM) tandis que la boucle de recirculation caractérisée par un écoulement piston est considérée comme une série de 150 CPM. L'évolution de la concentration en glucose dans chaque CPM dépend de:

- la fréquence d'ajout, du débit de la pompe d'ajout et de la concentration de la solution d'ajout
- la distribution des temps de séjour des cellules au sein de la boucle de recirculation
- la cinétique de consommation du substrat par la biomasse
- du volume du CPM

Ces données sont intégrées dans un système d'équations différentielles (modèle déterministe) dont la résolution numérique fournit la concentration en glucose dans chaque CPM au cours du temps (Section IV.5.3).

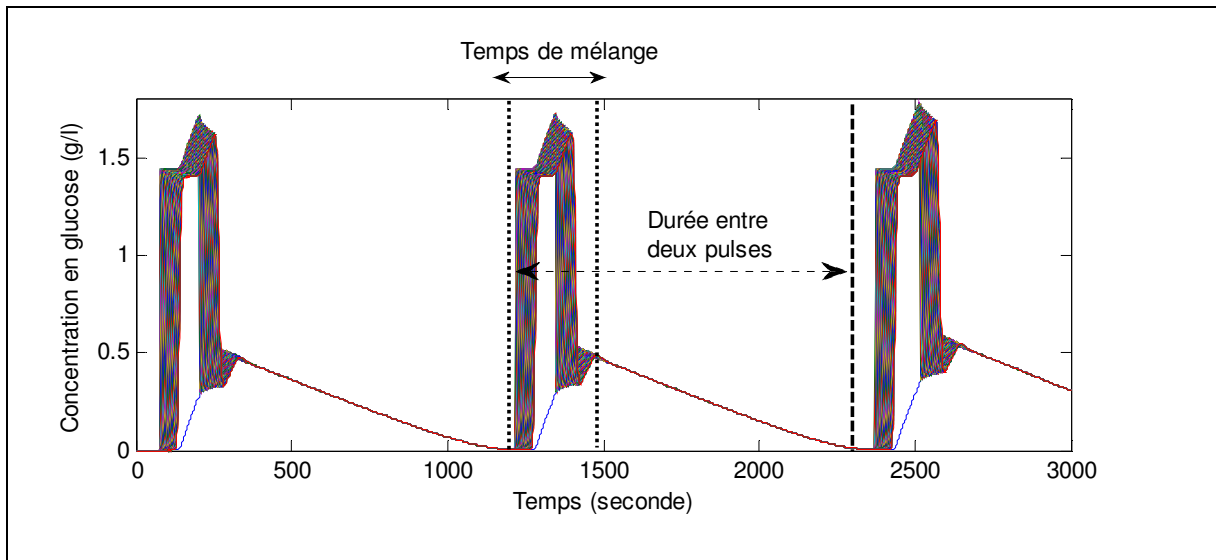
Dans un deuxième temps, le déplacement des levures dans le réacteur a été simulé au cours du temps. La simulation du déplacement aléatoire des microorganismes dans le réacteur se base sur un modèle stochastique dans lequel la transition entre les différents états est gouvernée par des probabilités. Le moment de transition entre chaque état est obtenu grâce à la génération de nombres aléatoires. Chaque simulation donne le parcours temporel d'une cellule à travers les différents CPM.

Finalement, la superposition des données provenant de la simulation du déplacement d'une cellule et de l'évolution de la concentration en glucose fournit le profil en glucose rencontré par une cellule au cours de son déplacement dans les CPM du réacteur *scale-down*. L'inconvénient de la méthode n'est de générer le déplacement que d'une seule cellule à la fois. Il faudrait concaténer des centaines de simulations pour estimer le temps moyen d'exposition des cellules à une concentration supérieure à une valeur seuil. Néanmoins, pour des raisons pratiques, l'analyse portera sur l'observation de quelques simulations.

### V.3.3 RÉSULTATS

Le modèle choisi pour caractériser le réacteur *scale-down* a été validé par le calcul de la DTS du modèle (voir section V.2.3.1.1).

La figure 39 donne l'évolution de la concentration en glucose pour chacun des CPM du réacteur *scale-down* avec acide oléique. La simulation choisie a été effectuée lorsque la dynamique d'ajout est régulière en fin de la phase *fed-batch*. La durée de la simulation est d'environ 50 minutes.

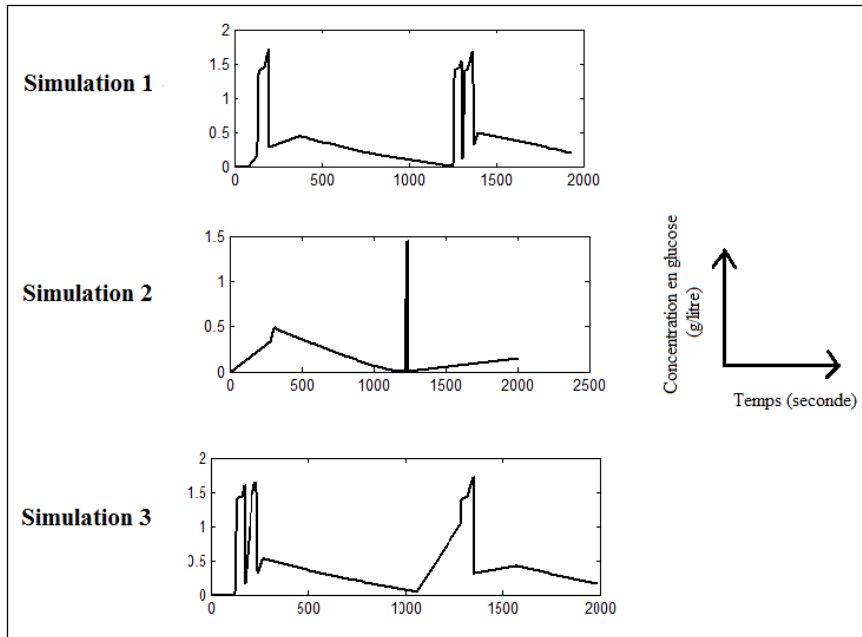


**Figure 39. Evolution de la concentration en glucose dans chaque CPM du réacteur *scale-down* avec acide oléique.**

Le temps de séjour d'une levure dans la boucle de recirculation (65 secondes) est plus faible que le temps de mélange (285 secondes). Dès lors, le gradient de concentration est maintenu durant le parcours des cellules dans la boucle de recirculation. Par ailleurs, la durée entre deux pulses de substrat (1200 secondes) est plus élevée que le temps de mélange, ce qui implique une accumulation de glucose dans la partie agitée.

La figure 40 fournit les concentrations rencontrées lors du déplacement de trois cellules dans le réacteur *scale-down* avec acide oléique. La dissimilitude entre les trois profils de concentration traversés rend compte du caractère aléatoire du modèle. Les profils obtenus illustrent bien les fluctuations extracellulaires rencontrées par les levures au cours de leurs déplacements. Les pics de concentration d'1,5 g/litre correspondent au passage de la cellule dans la boucle de recirculation au moment de l'ajout.

Les cellules sont confrontées à une concentration moyenne en glucose supérieure à la valeur seuil de la bascule respiro-fermentaire ( $\pm 0,2$  g/litre). Dans ce cas, les teneurs élevées en glucose devraient contraindre les levures à fermenter les excès de glucose en éthanol. Pourtant, le dosage de l'éthanol détermine une concentration de 0,4 g/litre en fin de culture, semblable à celle du réacteur de référence. Par conséquent, la présence de l'acide oléique contribue à l'atténuation de l'effet Crabtree dans la boucle de recirculation. En perspective, il serait intéressant de calculer le temps moyen d'exposition des cellules à une concentration supérieure à 0,2 g/litre afin de le comparer au retard de la bascule respiro-fermentaire déterminé par FERIA-GERVASIO *et al.*, (2008).



**Figure 40. Simulation des concentrations en glucose rencontrées par une cellule au cours de son déplacement dans le réacteur.**

## VI CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les finalités de ce travail s'inscrivent dans la continuité des recherches menées par l'INSA TOULOUSE sur l'analyse systémique de la transition respiro-fermentaire chez *Saccharomyces cerevisiae*. Les résultats obtenus par FERIA-GERVASIO *et al.*, (2008) concernent une approche plus fondamentale de la bascule respiro-fermentaire. L'idée de ce mémoire s'est davantage concentrée sur les potentialités de l'acide oléique dans la modulation des effets néfastes rencontrés lors de l'extrapolation des cultures de *Saccharomyces cerevisiae*. Le recours à la technologie *scale-down* a permis de reproduire les conditions hydrodynamiques industrielles. L'hypothèse générale fut d'attribuer deux rôles à l'acide oléique: celui d'inducteur et celui de substrat. D'une part, l'acide oléique est un activateur de plusieurs réactions physiologiques telles que la prolifération des peroxysomes et la transcription de gènes impliqués dans le transport du carbone vers la mitochondrie. D'autre part, l'acide oléique est une source de substrat quand il est décomposé en acétyl-coA lors de la  $\beta$ -oxydation ayant cours dans les peroxysomes. Ces deux effets ont pu être observés expérimentalement au cours de ce travail. Le rôle inducteur alloué à l'acide oléique lui confère la capacité de retarder la transition respiro-fermentaire lors des excès de glucose générés par les gradients de concentration au sein des réacteurs industriels. L'hypothèse générale a été vérifiée à l'échelle du laboratoire lors des productions de levure en réacteur *scale-down*.

Tout d'abord, la mise au point d'un protocole de conditionnement des levures à l'acide oléique a permis d'induire la prolifération des peroxysomes au sein du cytoplasme. Pour ce faire, il a fallu créer un système minimisant la répression catabolique, responsable de l'utilisation préférentielle du glucose à toute autre source de carbone (EVEERS *et al.*, 1991). Les travaux de MOURET *et al.*, (2005) ont permis de concevoir un conditionnement *batch* tréhalose/acide oléique. L'hydrolyse enzymatique du tréhalose en deux molécules de glucose est très lente et crée des conditions identiques à un chémostat en limitation glucose. L'effet substrat de l'acide oléique a été vérifié par les profils en oxygène dissout et le rendement de bioconversion. L'effet inducteur a été observé par la coloration au fluoro-isothiocyanate du contenu vacuolaire à plusieurs moments du conditionnement. Cette méthode s'est révélée satisfaisante pour mettre en évidence la prolifération des peroxysomes grâce à la cytométrie en flux (SMERALDI *et al.*, 1994).

Ensuite, l'effet *scale-down* a été observé dans les productions *fed-batch* de levure à partir de glucose seul. L'alternance de conditions de mélanges idéales et non-idéales induit un état physiologique oscillatoire chez la levure qui se traduit par l'effet *scale-down*. En d'autres termes, l'expérience a constaté la diminution du rendement de bioconversion ( $\pm 10\%$ ) et de la productivité cellulaire ( $\pm 20\%$ ) ainsi qu'une augmentation de la production d'éthanol par rapport au réacteur de référence. Ces résultats sont en accord avec la littérature (LEJEUNE *et al.*, 2010). Par contre, l'effet *scale-down* observé dans les productions *fed-batch* de levure à partir d'un substrat mixte glucose/acide oléique diffère des cultures sur glucose seul. En fin de culture, la teneur en éthanol atteinte est faible et similaire au réacteur de référence avec acide oléique. De fait, le rendement de bioconversion et la productivité cellulaire diminuent très peu, d'environ 5% et 3% respectivement. Finalement, les hétérogénéités créées dans la section non-mélangée du réacteur ne semblent pas affecter la viabilité cellulaire des levures au cours de la culture. Toutefois, l'augmentation de la perméabilité membranaire dans le réacteur *scale-down* avec glucose serait due à la sécrétion de l'éthanol. Tandis que

l'augmentation de la perméabilité membranaire dans le réacteur *scale-down* avec acide oléique pourrait être due à l'acide oléique dont la présence influence la biogénèse des membranes cellulaires (CONNERTH *et al.*, 2010).

La comparaison de l'effet *scale-down* obtenu dans les cultures en présence et en absence d'acide oléique valide l'hypothèse générale. Effectivement, les modifications hydrodynamiques générées par le réacteur *scale-down* ne perturbent pas le métabolisme oxydatif et n'accroissent pas la production d'éthanol en présence d'acide oléique. Grâce à son double rôle d'inducteur et de substrat, l'acide oléique est d'une part consommé par la voie de la  $\beta$ -oxydation dans les peroxysomes hérités du conditionnement. D'autre part, sa présence exerce une pression de sélection activant de nouvelles voies de transport du carbone vers la mitochondrie. Dès lors, les flux excédentaires de glucose sont redirigés vers la voie respiratoire, c'est-à-dire vers la production de biomasse. En conclusion, la levure est naturellement plus résistante à l'effet Crabtree en présence d'acide oléique, ce qui lui confère une meilleure adaptation aux stress imposés par le procédé de culture *fed-batch*.

Par ailleurs, l'analyse de la dynamique *fed-batch* a démontré que le métabolisme oxydatif de la levure est ralenti en présence de glucose et d'acide oléique. Néanmoins, la dynamique d'ajout est améliorée dans le réacteur *scale-down* avec acide oléique, notamment car la rémanence de l'acide oléique n'induit jamais des conditions de stress nutritionnels. De plus, l'acide oléique modifie la physico-chimie du milieu de culture. Sa présence pourrait améliorer le transfert de masse d'oxygène de la phase gazeuse vers la phase liquide ( $k_L a$ ) en augmentant l'aire interfaciale des bulles d'air (MOROA *et al.*, 1999; THONART, 2009). Cette meilleure disponibilité de l'oxygène dissout pour les levures contribuerait à améliorer l'oxydation du substrat.

Finalement, les simulations des gradients de glucose expérimentés par les levures au cours de leurs déplacements dans le réacteur *scale-down* avec acide oléique ont démontré que les levures font face à des fluctuations des conditions extracellulaires dans la boucle de recirculation. Malgré les teneurs élevées en glucose (2 g/litre) propices à l'effet Crabtree, les levures produisent très peu d'éthanol par rapport au réacteur *scale-down* sans acide oléique. Il aurait été intéressant de calculer le temps d'exposition moyen des levures à des hautes concentrations en glucose de manière à le comparer avec le retard de la bascule respiro-fermentaire (15 minutes) déterminé par FERIA-GERVASIO *et al.*, (2008).

Sur base des résultats obtenus, cette étude offre plusieurs perspectives de recherche dans le domaine du génie biotechnologique ainsi que des potentialités d'applications à l'échelle industrielle. Effectivement, il serait intéressant d'étudier l'effet combiné de l'acide oléique sur le transfert d'oxygène (effet physico-chimique) et sur le retard de la bascule respiro-fermentaire (effet biologique) dans les bioréacteurs industriels en utilisant la technologie *scale-down*. Il serait également judicieux d'étudier l'influence de l'acide oléique sur la qualité des levures obtenues lors des étapes de séchage par lyophilisation ou atomisation. D'un point de vue appliqué, le tréhalose utilisé dans le conditionnement mis au point pourrait être remplacé par un apport régulé de glucose à l'échelle industrielle. Finalement, la valorisation de substrats riches en acide oléique pourrait être envisagée pour la production *fed-batch* de levure à l'échelle industrielle.

## VII REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. BAUER, J. *et al.*, (1999). By-product formation during exposure of respiring *Saccharomyces cerevisiae* cultures to excess glucose is not caused by a limited capacity of pyruvate carboxylase. *FEMS Microbiology Letters*, 179, 107-113.
2. BERRY D.R., (1988). Products of primary metabolite pathways. *In physiology of industrial Fungi* (Ed. D.R. Berry), 130-160. Blackwell scientific publications, Oxford.
3. BINNS D. *et al.*, (2006). An intimate collaboration between peroxisomes and lipid bodies. *The Journal of Cell Biology*, 173, 719–731.
4. BLOM J., DE MATTOS MJT et GRIVELL LA., (2000). Redirection of the respiro-fermentative flux distribution in *Saccharomyces cerevisiae* by overexpression of the transcription factor Hap4p. *Applied and environmental microbiology*, 66(5), 1970-1973.
5. BOOTH I.R., (2002). Stress and the single cell: Intrapopulation diversity is a mechanism to ensure survival upon exposure to stress. *International journal of food microbiology*, 78, 19-30.
6. CASALONE E., BARBERIO C., CAVALIERI D. et POLSINELLI M. (2000). Identification by functional analysis of the gene encoding isopropylmalate II (LEU9) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 16, 539-545.
7. CIMPRICH P., SLAVIK J. ET KOTYK A., (1995). Distribution of individual cytoplasmic pH values in a population of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Letters*, 130(2-3), 245-251.
8. CONNERTH M. *et al.*, (2010). Oleate inhibits steryl ester synthesis and causes liposensitivity in yeast. *Journal of biological chemistry*, 285(35), 26832-26841.
9. DELVIGNE *et al.*, (2010). Applicability of GFP microbial whole cell biosensors to bioreactor operations: mathematical modeling and related experimental tools. *Biosensors – Emerging Materials and Applications*, 27, 601-631.
10. DELVIGNE F., (2006). Etudes de l'impact des conditions hydrodynamiques du bioréacteur sur la conduite et l'extrapolation des bioprocédés, in Unité de Bioindustries. Gembloux Agro Biotech, 236.
11. DELVIGNE F., (2009-2010). Manuel de travaux pratique d'industries d'extraction et de fermentation: 1ère partie.
12. EGGLESTON M.D. et MARSHALL P.A., (2007). *Saccharomyces cerevisiae* samples stained with FUN-1 dye can be stored at  $-20\pm C$  for later observation. *Journal of Microscopy*, 225, 100–103.
13. ERDMANN, R. et BLOBEL G., (1995) Giant peroxisomes in oleic acid-induced *Saccharomyces cerevisiae* lacking the peroxisomal membrane-protein PMP27P. *Journal of the Cell Biology*, 128, 509–523.
14. ERDMANN, R., VEENHUIS, M., MERTENS, D., et KUNAU, W. H. (1989). Isolation of peroxisome-deficient mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, 86, 5419–5423.

15. EVERS *et al.*, (1991). Physiological-studies on the utilization of oleic acid by *Saccharomyces cerevisiae* in relation to microbody development. *FEMS microbiology letters*, 90(1), 73-78.
16. FERIA-GERVASIO D. *et al.*, (2008). Oleic acid delays and modulates the transition from respiratory to fermentative metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* after exposure to glucose excess. *Applied microbial and cell physiology*, 78, 319-331.
17. FICKERS, P. *et al.*, (2005). Hydrophobic substrate utilisation by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential applications. *FEMS Yeast Research*, 5, 527-543.
18. FIECHTER A. et SEGHEZZI W., (1992). Regulation of glucose-metabolism in growing yeast-cells. *Journal of Biotechnology*, 27, 27-45.
19. FLIKWEERT M. T. *et al.*, (1999). Steady-state and transient-state analysis of growth and metabolite production in a *Saccharomyces cerevisiae* strain with reduced pyruvate-decarboxylase activity. *Biotechnology and Bioengineering*, 66, 42-50.
20. FLIKWEERT M. T. *et al.*, (1996). Pyruvate decarboxylase: an indispensable enzyme for growth of *Saccharomyces cerevisiae* on glucose, *Yeast*. 12, 247-257.
21. FLIKWEERT M. T., VAN DIJKEN J. P. et PRONK J. T. (1997). Metabolic responses of pyruvate decarboxylase-negative *Saccharomyces cerevisiae* to glucose excess. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(9), 3399-3404.
22. GANCEDO JM, (1998). Yeast carbon catabolite repression. *Microbiology and molecular biology reviews*, 62(2), 334-361.
23. GARCIA-OCHOA F., GOMEZ E., SANTOS V.E. et MERCHUK J.C., (2010). Oxygen uptake rate in microbial processes: An overview. *Biochemical Engineering Journal*, 49, 289-307.
24. GOMES DE MESQUITA D., TEN HOOPEN R. et WOLDRINGH C. L. (1991). Vacuolar segregation to the bud of *Saccharomyces cerevisiae*: an analysis of morphology and timing in the cell cycle. *Journal of general microbiology*, 137, 2447-2454.
25. GURVITZ A. et ROTTENSTEINER H. (2006). The biochemistry of oleate induction: transcriptional upregulation and peroxisome proliferation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1763,1392–1402.
26. HETTEMA E. H. *et al.*, (1996). The ABC transporters Pat1 and Part2 are required for import of long-chain fatty acids into peroxisomes of *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO Journal*, 15, 3813-3822.
27. HILDYARD J. C. W. et HALESTRAP A. P. (2003). Identification of the mitochondrial pyruvate carrier in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemichal Journal*, 374, 607-611.
28. HILTUNEN JK *et al.*, (2003). The biochemistry of peroxysomal  $\beta$ -oxydation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Review*, 27, 35-64.
29. HU Z., NEHLIN J.O., RONNE H. et MICHELS C.A. (1995). MIG1-dependent and MIG1 independent glucose regulation of MAL gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics*, 28, 258-266.
30. JUNKER B., (2004). Scale-up methodologies for *Escherichia coli* and yeast fermentation processes. *Journal of bioscience and bioengineering*, 97(6), 347-364.



31. KACMAR J., CARLSON R., BALOGH S. J. ET SRIENC F., (2005). Staining and quantification of poly-hydroxy-butyrate in *Saccharomyces cerevisiae* and *Cupriavidus necator* cell populations using automated flow cytometry. *Cytometry Part A*, 69A, 27-35.
32. KAL AJ et al., (1999). Dynamics of genes expression revealed by comparison of serial analysis of gene expression transcript profiles from yeast grown on two different carbon sources. *Molecular biology of the cell*, 10, 1859-1872.
33. KUNAU W. H, DOMMES V. et SCHULZ H. (1995). Beta-oxidation of fatty acids in mitochondria, peroxisomes, and bacteria: a century of continued progress. *Progress in lipid Research*, 34, 267-342.
34. KUNAU WH., DOMMES V. et SCHULZ H., (1995). Beta-oxidation of fatty acids in mitochondria, peroxisomes, and bacteria: A century of continued progress. *Progress in lipid research*, 34(4), 267-342.
35. LEJEUNE A., DELVIGNE F. et THONART P., (2010). Influence of bioractor hydraulic characteristics on a *Saccharomyces cerevisiae fed-batch* culture : hydrodynamic modelling and *scale-down* investigations. *Journal of Industrial Microbiology and biotechnology*, 37, 225-236.
36. LEJEUNE A., DELVIGNE F. et THONART P., (2010). Trehalose as a stress marker of the physiological impact of mixing on yeast production: *scale-down* reactors and mini-bioreactors investigations. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 14(S2), 531-536.
37. LOCKSHON D. et al., (2007). The sensitivity of yeast mutants to oleic acid implicates the peroxisome and other processes in membrane function. *Genetics*, 175, 77–91.
38. MILLARD et al., (1997). Development of the FUN-1 Family of Fluorescent Probes for Vacuole Labeling and Viability Testing of Yeasts. *Applied and environmental Microbiology*, 63(7), 2897-2905.
39. MOROA A. et al., (1999). Effect of antifoam addition on gas-liquid transfer mass in stirred fermenters. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 20, 165-172.
40. MOURET J.R., JACOBSEN J.N. ET GUILLOUET S.E. (2005). Kinetic analysis of a trehalase-overexpressing strain grown on trehalose: a new tool for respiro-fermentative transition studies in *Saccharomyces cerevisiae*. *Letters in applied Microbiology*, 42, 363-368.
41. NEUBAUER P. et JUNNE S., (2010). *Scale-down* simulators for metabolic analysis of large-scale bioprocesses. *Current Opinion in Biotechnology*, 21, 114–121.
42. PALMIERI, L. et al., (1997). Identification of yeast ACR1 gene product as a succinate-fumarate transporter essential for growth on ethanol or acetate. *FEBS Letters*, 417, 114-118.
43. PHAM O.T.B., LARSSON G. et ENFORS S-O., (1998). Growth and Energy Metabolism in Aerobic *Fed-batch* Cultures of *Saccharomyces cerevisiae*: Simulation and Model Verification. *Biotechnology and Bioengineering*, 60, 476-482.
44. POSTMA E., VERDUYN C., SCHEFFERS W. A. et VAN DIJKEN J. P. (1989). Enzymic analysis of the crabtree effect in glucose-limited chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(2), 468-477.

45. PRESCOTT L.M., HARLEY J.P. et KEEIN D.A., (1995). *Microbiologie*. 2ed. Bruxelles: De Boeck Université, 1014.
46. PRONK J.T., DE STEENSMA H. Y. et VAN DIJKEN J. P. (1996). Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 12(16), 1607-1633.
47. ROSENBERGER S., CONNERTH M., ZELNIG G. ET DAUM G., (2009). Phosphatidylethanolamine synthesized by three different pathways is supplied to peroxisomes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular and cell biology of lipids*, 1791(5), 379-387.
48. SALEEM R.A. *et al.*, (2008). Genome-wide analysis of signaling networks regulating fatty acid-induced gene expression and organelle biogenesis. *Journal of Cell Biology*, 181, 281–292.
49. SMERALDI C., BERARDI E. et PORRO D., (1994). Monitoring of peroxisome induction and degradation by flow cytometric analysis of *Hansenula polymorpha* cells grown in methanol and glucose media: cell volume, refractive index and FITC retention. *Microbiology*, 140, 3161-3166.
50. SONNLEITNER B. et KÄPPELI O. (1986). Growth of *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by its limited respiratory capacity: formulation and verification of hypothesis. *Biotechnology and Bioengineering*, 28, 927-937.
51. STUCKA R., DEQUIN S., SALMON J. M. et GANCEDO C. (1991). DNA sequences in chromosomes II and VII code for pyruvate carboxylase isoenzymes in *Saccharomyces cerevisiae*: analysis of pyruvate carboxylase-deficient strains. *Molecular and General Genetics*, 229, 307-315.
52. THONART P., (2009-2010). Génie industriel alimentaire et ingénierie agro-alimentaire: 1ère partie.
53. THONART P., (2009-2010). Industries d'extraction et de fermentation : 1ère partie
54. TREITEL MA, KUCHIN S., CARLSON M., (1998). Snf1 protein kinase regulates phosphorylation of the mig1 repressor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology*, 18(11), 6273-6280.
55. TROTTER P. J. (2001). The genetics of fatty acid metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annual Review of Nutrition*, 21, 97-119.
56. VAN ROERMUND C. W. *et al.*, (1995). The membrane of peroxisomes in *Saccharomyces cerevisiae* is impermeable to NAD(H) and acetyl-CoA under in vivo conditions. *The EMBO Journal*, 14, 3480-3486.
57. VAN ROERMUND C.W.T., WATERHAM H.R., IJLSTA L. et WANDERS R.J.A. (2003). Fatty acid metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 60, 1838–1851.
58. VERDUYN, C., POSTMA E., SCHEFFERS W. A. et VAN DIJKEN J. P. (1992). Effect of benzoic acid on metabolic fluxes in yeasts: a continuous-culture study on the regulation of respiration and alcoholic fermentation. *Yeast*, 8, 501-517.

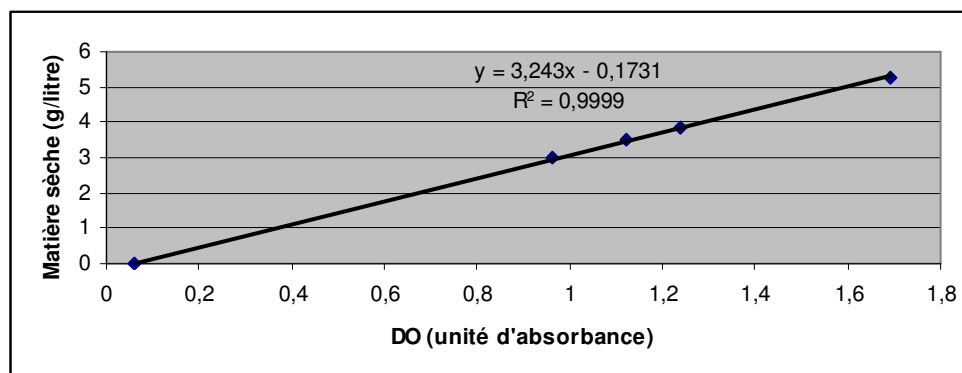
59. WALKER G.M., (1998). *Yeast-Physiology and biotechnology*. Edition: John Wiley & Sons, 350.
60. WRIESSNEGGER T. *et al.*, (2007). Lipid composition of peroxysomes from the yeast *Pichia pastoris* grown on different carbon sources. *Biochemica et Biophysica Acta*, 1771, 455-461.
61. XU Y. *et al.*, (2000). The yeast mitochondrial citrate transport protein. Probing the secondary structure of transmembrane domain IV and identification of residues that likely comprise a portion of the citrate translocation pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 275, 12009-12016.

## VIII ANNEXES

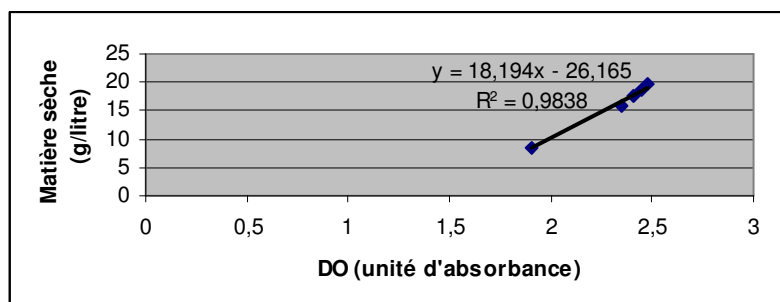
### VIII.1 DROITES DE CORRELATION ENTRE LA DENSITE OPTIQUE ET LA MATIERE SECHE

#### VIII.1.1 MILIEU DE CULTURE SANS ACIDE OLEIQUE

Droite de corrélation pour les DO inférieures à 1,7 ( $R^2=0,9999$ )

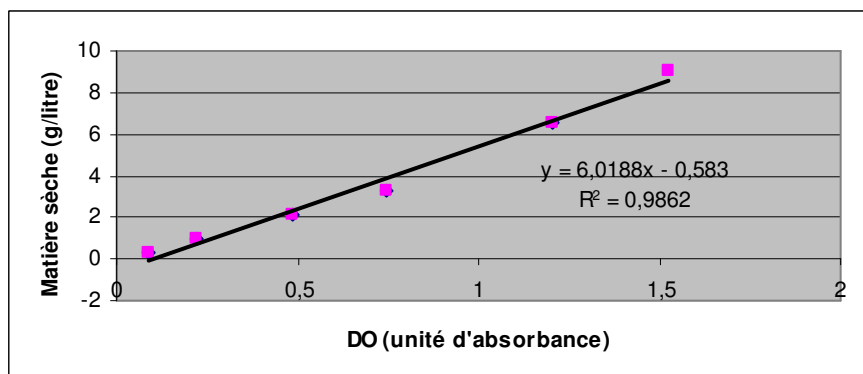


Droite de corrélation pour les DO supérieures à 1,8 ( $R^2=0,9838$ )

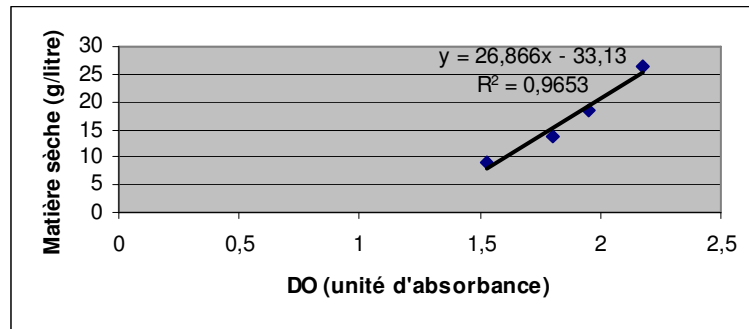


#### VIII.1.2 MILIEU DE CULTURE AVEC ACIDE OLEIQUE

Droite de corrélation pour les DO inférieures à 1,5 ( $R^2=0,9862$ )

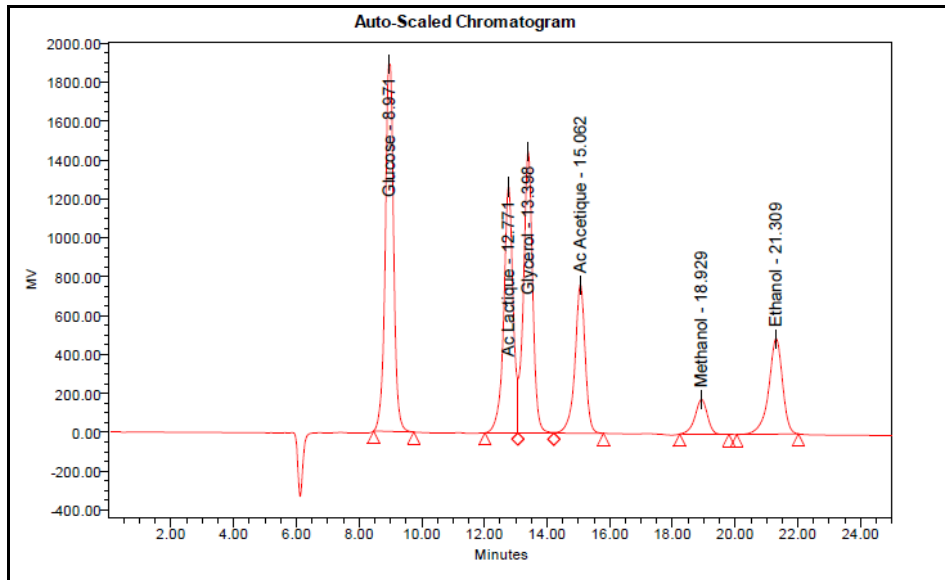


Droite de corrélation pour les DO supérieures à 1,5 ( $R^2=0,9653$ )

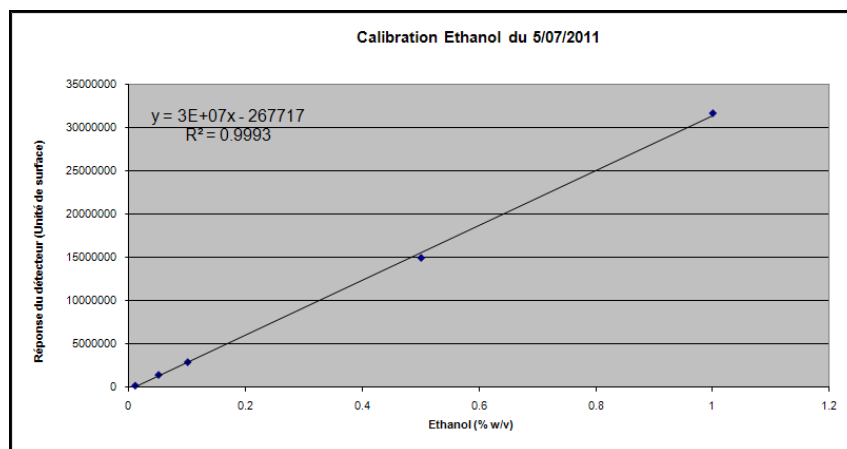


## VIII.2 DOSAGE DE L'ETHANOL

La figure ci-dessous illustre le chromatogramme résultant de l'injection de la gamme de standards à 0,5 % (w/v).



Le graphique ci-dessous illustre la droite de calibration de l'éthanol utilisée pour doser les échantillons du milieu de culture.



Le tableau ci-dessous reprend les données de la droite de calibration.

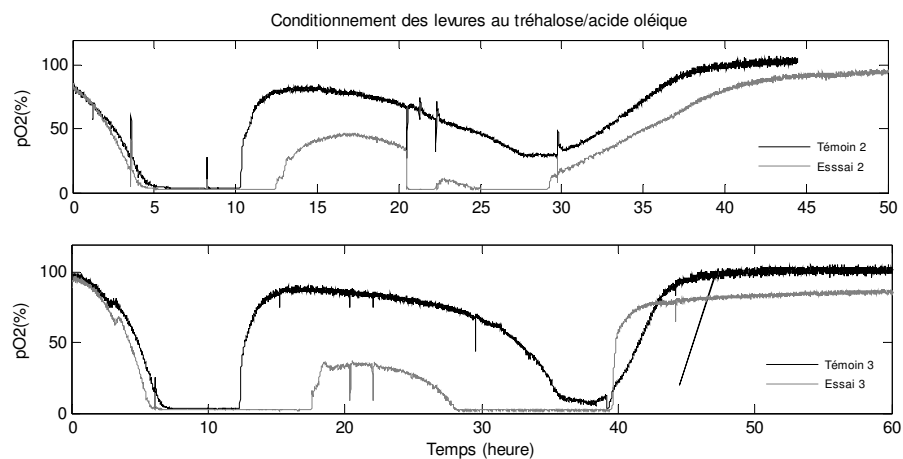
Calibration	Ethanol en % (W/V)	Réponse (U de surface)
STD3	0.01	204662
STD4	0.05	1444225
STD5	0.1	2914987
STD6	0.5	14962178
STD7	1	31656279

### VIII.3 CONDITIONNEMENT *BATCH* DES LEVURES DANS UN MILIEU TREHALOSE/L'ACIDE OLEIQUE

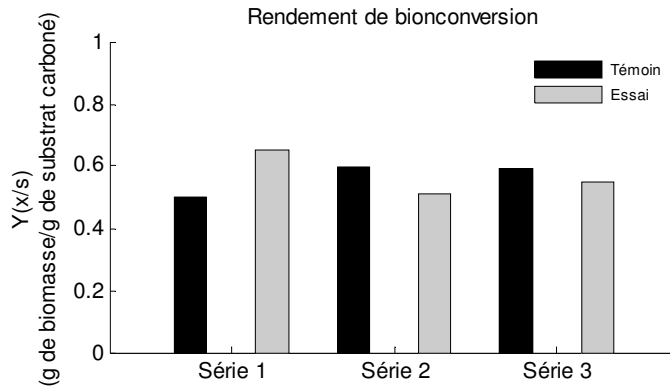
Le tableau ci-dessous décrit les différents paramètres testés lors de chaque série de conditionnement.

	Type de fiole	Vitesse d'agitation (rpm)	Température (°C)
<b>Série 1</b>	défecteurs verticaux	100	30
<b>Série 2</b>	défecteurs ronds	140	30
<b>Série 3</b>	défecteurs ronds	100	30

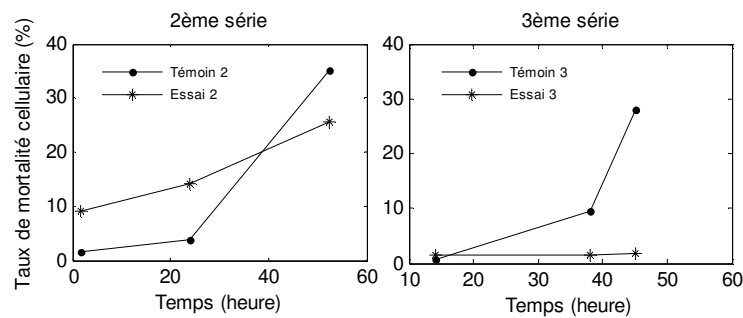
Les deux graphiques ci-dessous illustrent l'évolution de la pression en oxygène dissout pour la série 2 et 3 du conditionnement des levures au tréhalose/acide oléique.



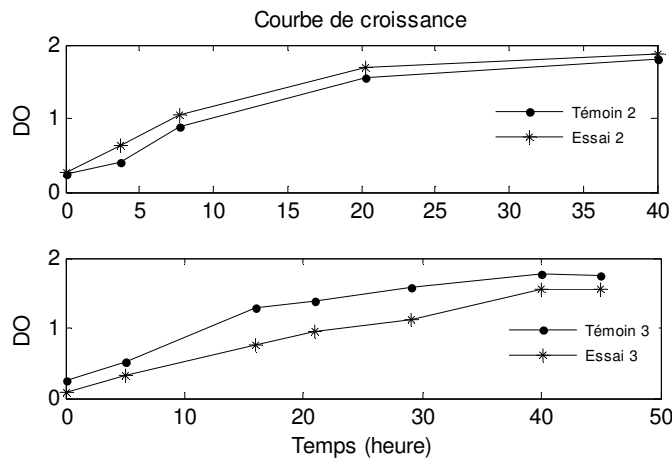
L'histogramme ci-dessous illustre les rendements de bioconversion obtenus lors des 3 séries de conditionnements *batch* tréhalose/acide oléique testés.



Les deux graphiques ci-dessous illustrent le taux de mortalité des levures lors de la 2ème et 3ème série de conditionnement au tréhalose/acide oléique.



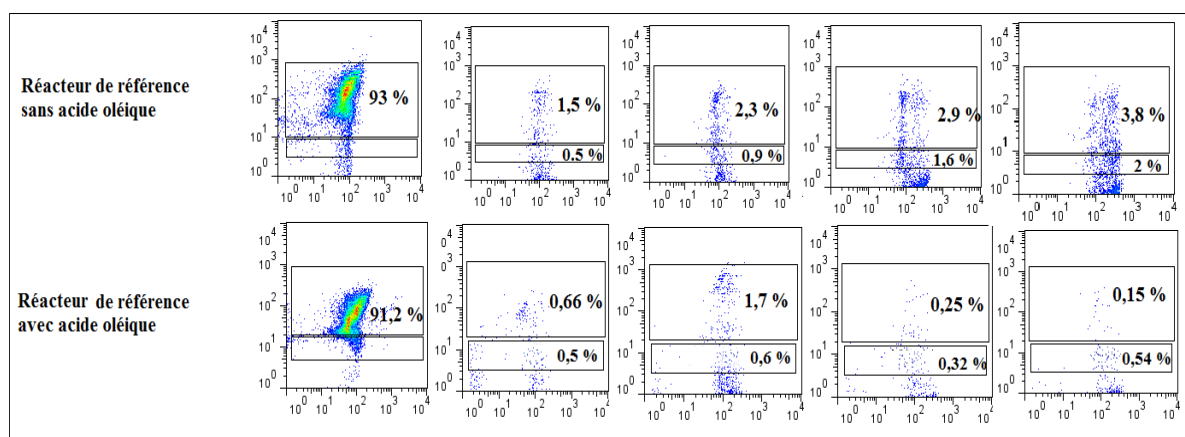
Les deux graphiques ci-dessous illustrent la courbe de croissance des levures au cours de la 2ème et 3ème série de conditionnement.



## VIII.4 MORTALITE CELLULAIRE DES LEVURES EN COURS DE CULTURE *FED-BATCH*

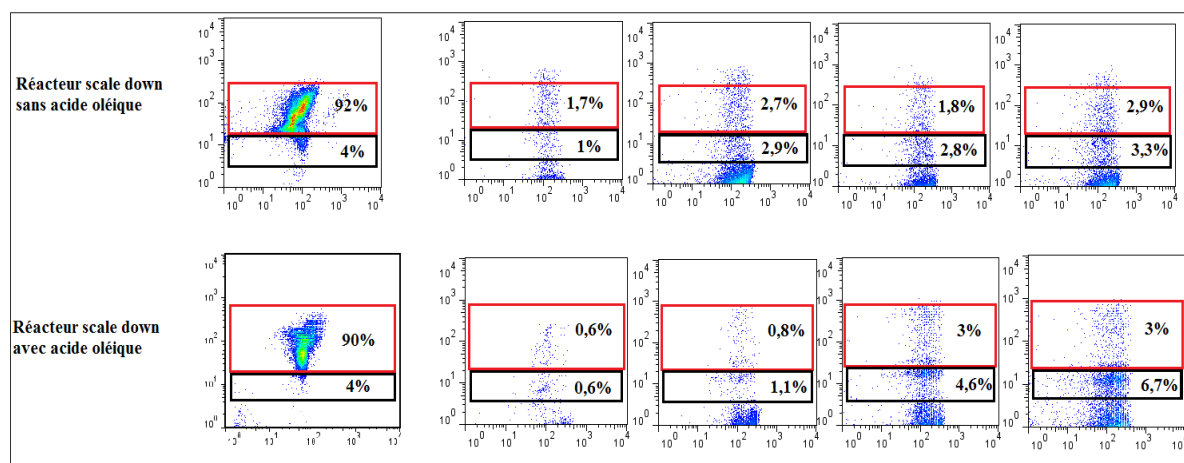
### VIII.4.1 REACTEUR DE REFERENCE

Les cytogrammes représentés ci-dessous sont issus de la coloration des échantillons à l'iodeure de propidium au long de la culture *fed-batch*. Le témoin positif (1er cytogramme en partant de la gauche) permet de définir la zone de mortalité. Le cadre supérieur inclue les cellules mortes et le cadre inférieur les cellules à forte perméabilité.



### VIII.4.2 REACTEUR SCALE-DOWN

Les cytogrammes représentés ci-dessous sont issus de la coloration des échantillons à l'iodeure de propidium au long de la culture *fed-batch*. Le témoin positif (1er cytogramme en partant de la gauche) permet de définir la zone de mortalité. Le cadre supérieur inclue les cellules mortes et le cadre inférieur les cellules à forte perméabilité.

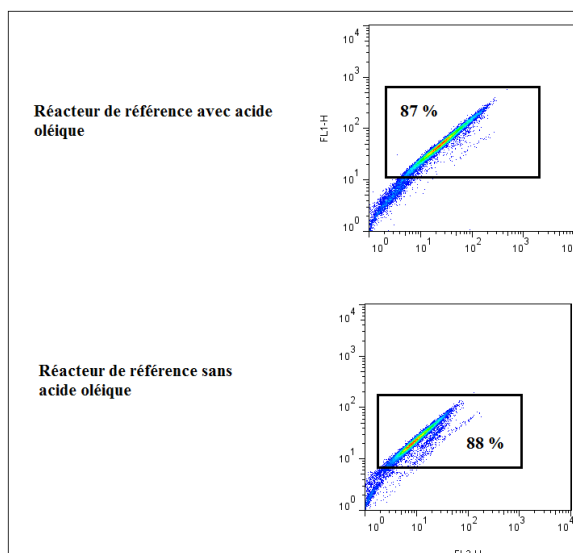




## VIII.5 ACTIVITE METABOLIQUE DES LEVURES EN FIN DE CULTURE FED-BACH

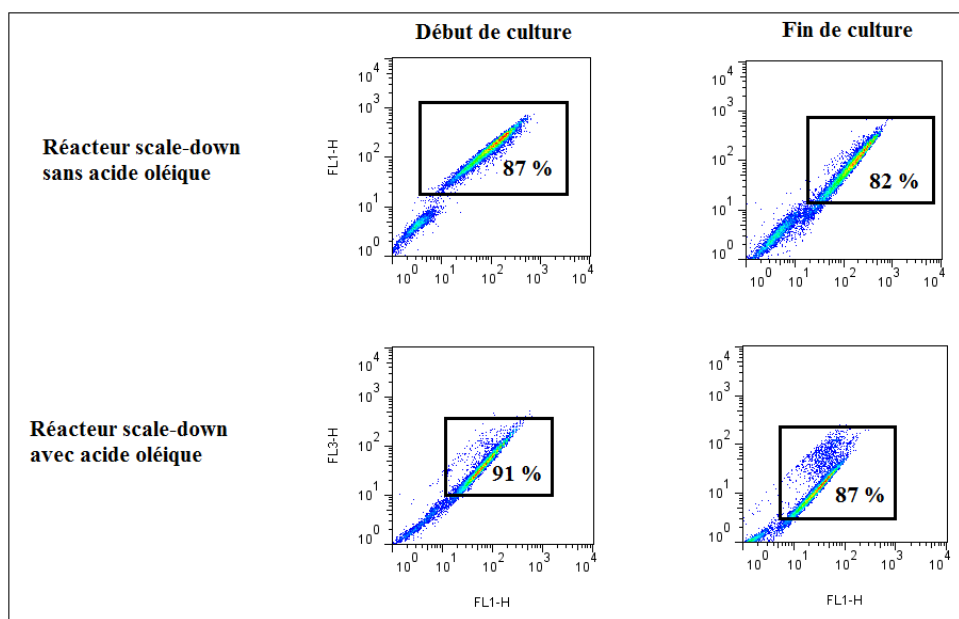
### VIII.5.1 REACTEUR DE REFERENCE

Les cytogrammes ci-dessous sont issus de la coloration des levures au FUN-1 en fin de culture dans les réacteurs de référence. La zone encadrée regroupe les cellules métaboliquement actives.



### VIII.5.2 REACTEUR SCALE-DOWN

Les cytogrammes ci-dessous sont issus de la coloration des levures au FUN-1 en début et fin de culture dans les réacteurs *scale-down*. La zone encadrée regroupe les cellules métaboliquement actives.



## VIII.6 SIMULATION STOCHASTIQUE DU DEPLACEMENT DES CELLULES DANS LE REACTEUR SCALE-DOWN

(DELVIGNE *et al.*, 2010).

### 1. Rappels théoriques

La matrice de flux du modèle compartimenté déterministe sera assimilée à la matrice "générateur" du modèle stochastique à temps continu. Le générateur contient toutes les informations pour effectuer la simulation.

$$M = Q = \begin{bmatrix} -q_{ii} & q_{ij} & 0 & 0 & 0 & 0 \\ q_{ij} & \cdot & \cdot & 0 & 0 & 0 \\ 0 & \cdot & \cdot & \cdot & 0 & 0 \\ 0 & 0 & \cdot & \cdot & \cdot & 0 \\ 0 & 0 & 0 & \cdot & \cdot & \cdot \\ 0 & 0 & 0 & 0 & \cdot & \cdot \end{bmatrix}$$

Physiquement, le générateur contient les taux d'échange (exprimés en  $s^{-1}$ ) entre compartiments obtenus via le bilan de matière. Cette matrice peut être décomposée en différents éléments qui seront utilisés dans l'algorithme de simulation stochastique. La diagonale principale de cette matrice correspond à un vecteur  $\lambda$  qui contient les taux de fuite de chacun des compartiments.

$$\lambda = \begin{bmatrix} q_{ii} \\ \cdot \\ \cdot \\ \cdot \end{bmatrix}$$

Avec

$$q_{ii} = - \sum q_{ij}$$

Cette propriété implique que la somme de chaque ligne de la matrice Q est égale à 0. Physiquement, cette propriété peut être utilisée pour vérifier le bilan de masse du système. Les valeurs du vecteur  $\lambda$  peuvent être utilisées pour calculer la distribution des temps de séjour au niveau d'un compartiment donné. Ce vecteur est donc également appelé vecteur des temps de séjour. Par exemple, pour le compartiment i :

$$P(x_i) = q_{ii} \cdot e^{-q_{ii} \cdot x_i}$$

Au niveau de la simulation stochastique, les taux de fuite  $\lambda_i$  sont utilisés pour définir le temps d'occurrence d'un événement (dans notre cas, le déplacement d'une particule d'un état à l'autre). Les temps pour lesquels intervient une transition sont déterminés à partir d'une distribution exponentielle dont la forme est la suivante:

$$T_i = -\frac{\ln(r)}{\lambda_i}$$

Où  $r$  est un nombre aléatoire issu d'une distribution uniforme sur l'intervalle (0 1). Une fois le temps de transition déterminé, il faut définir la direction prise par la particule ou, en d'autres termes, le numéro de l'état adjacent dans lequel elle va se déplacer. De nouveau, cette donnée peut être extraite du générateur  $Q$  en calculant la chaîne de Markov discrète  $P$  associée.

$$P = \frac{Q}{\lambda} + \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & . & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & . & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & . & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 \end{bmatrix}$$

Les valeurs contenues dans cette matrice associée  $P$  correspondent à des probabilités de transition vers les états en contact (la somme des éléments d'une ligne est égale à 1). Au niveau de l'algorithme, la transition est effectuée en générant un nombre aléatoire et en comparant la valeur obtenue avec les probabilités contenues dans la ligne de la matrice  $P$  correspondant à l'état de départ. Les éléments nécessaires pour réaliser une simulation stochastique sont :

- Le vecteur des temps de séjour  $\lambda$
- La matrice de Markov associée  $P$
- La distribution initiale du système (conditions initiales du système au sens stochastique)
- Le vecteur d'espace d'états (qui donne la numérotation des états de 1 à  $i$ )

## 2. Extraction des données à partir de la matrice de flux ou générateur

Considérons un générateur qui contient les taux de transition exprimés en  $s^{-1}$ . Le vecteur des temps de séjour  $\lambda$  peut être obtenu en isolant la diagonale de la matrice  $Q$  :

```
lambda = abs(diag(Q));
```

La chaîne de Markov associée  $P$  peut également être calculée à partir de la matrice  $Q$  :

```
s = size(Q)
for i = 1:s
Pdiag(:,i) = Q(:,i)./lambda(i);
end
index = find(Pdiag==-1);
Pdiag(index)=0;
P = Pdiag;
```

Ces deux éléments seront utilisés pour les simulations stochastiques du déplacement des microorganismes dans le réacteur. Deux autres éléments sont également requis:

- Le vecteur d'état initial  $\mu$  :

```
mu = zeros(1, s);
mu(1) = 1; %Dans le cas d'une injection locale de traceur
```

- Le vecteur de position d'état S:  $S = 1:s$  %s étant la taille de la matrice Q

### 3. Simulation stochastique du déplacement de particules neutres dans le réacteur

La simulation en temps continu d'une particule neutre ou d'un microorganisme peut être effectuée en utilisant la boucle itérative suivante:

```
while T(i) < Tmax,

T(i+1) = T(i) - log(rand)/lambda(x(i));
% génération d'un nombre aléatoire à partir d'une distribution exponentielle
    x(i+1) = rando(P(x(i), :));
% génération d'une transition à partir de la matrice de transition par la fonction rando
i=i+1;
end
```

La fonction rando permet d'estimer une transition à partir d'une distribution de probabilité. Cette distribution de probabilité est donnée par la ligne de la chaîne de Markov associée P correspondant à l'état actuel dans lequel se trouve la particule.