
Ecole Doctorale ABIES

UFR Sciences Exactes et Naturelles

Université de Reims Champagne-Ardenne

THÈSE EN CO-TUTELLE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIEGE

Discipline : Microbiologie

Et

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE

Discipline : **SCIENCES AGRONOMIQUES, BIOTECHNOLOGIES AGRO-ALIMENTAIRES**

Spécialité : **Microbiologie**

Présentée et soutenue publiquement par **ROMAIN BOUCHAT**

XYLANFACTORY - Optimisation de la culture d'une bactérie thermophile en bioréacteurs pour la production d'hémicellulases et la valorisation des xylanes des biomasses lignocellulosiques

Thèse dirigée par Mme. Caroline Rémond, **UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE**

Et par M. Frank Delvigne, Université de Liège – Gembloux Agro-Bio Tech

COMPOSITION DU JURY

Rapporteurs : M. Vincent Phalip, Professeur, Université de Lille

M. Fadhel Ben Chaabane, Chargé de recherche, Institut français du pétrole et des énergies

Examineur : Mme. Sandrine Alfenore, Maître de conférences, INSA Toulouse

M. Philippe Jacques, Professeur, Université de Liège

Directeurs : Mme. Caroline Rémond, Professeur, Université de Reims Champagne Ardenne

M. Frank Delvigne, Professeur, Université de Liège

Co-encadrante : Mme. Harivony Rakotoarivonina, Maître de conférences, Université de Reims Champagne Ardenne



Résumé

Le fractionnement pour la valorisation des hémicelluloses de la biomasse lignocellulosique est une étape clé du bioraffinage du végétal. L'utilisation d'enzymes lignocellulolytiques est une des voies utilisées pour l'hydrolyse des biomasses car elle est éco-responsable. Il est nécessaire de disposer d'enzymes efficaces et d'optimiser leur production. Cette thèse a pour objectif d'améliorer la production d'hémicellulases par une bactérie thermophile, *Thermobacillus xylanilyticus*. Cette bactérie hémicellulolytique sécrète une enzyme de la famille GH11 avec une forte activité xylanase mais cette activité a tendance à baisser au cours des cultures. La thèse s'est focalisée sur l'étude des facteurs populationnels impactant la chute de l'activité lors de cultures successives. Une dérive phénotypique menant à la présence d'une sous-population tricheuse a été identifiée comme responsable de la perte d'activité. Des stratégies de contrôle de la diversification phénotypique ont alors été établies. Elles ont été basées sur l'introduction de changements environnementaux (sources de carbone) ou en changeant l'état physiologique des cellules (âge des inocula) lors de cultures successives pour améliorer la production d'enzymes. A partir de ces approches, l'activité xylanase a pu être augmentée jusqu'à 15-fois en alternant la source de carbone. Les activités complémentaires β -xylosidase et acétyl estérase ont été augmentées en changeant l'âge de l'inocula (cellules en phase stationnaire). Dans la dernière partie de la thèse, la stratégie des changements environnementaux a été faite avec des cultures en ségréostat ce qui a permis de contrôler la diversification phénotypique de la souche en bioréacteurs.

Mots-clefs : biomasse lignocellulosique, xylanase, *Thermobacillus xylanilyticus*, diversité phénotypique, sous-population, bioréacteur, ségréostat

XYLANFACTORY - Optimization of the culture of a thermophilic bacterium in bioreactors for the production of hemicellulases and the valorization of xylans from lignocellulosic biomass

Abstract

Fractionation for valorization of hemicelluloses from lignocellulosic biomass is a key step in the biorefinery of plants. The use of lignocellulolytic enzymes is one of the ways used for the hydrolysis of biomasses because it is more eco-responsible. It is then necessary to have efficient enzymes and to optimize their production. This thesis aims to improve the production of hemicellulases by a thermophilic bacterium, *Thermobacillus xylanilyticus*. This hemicellulolytic bacterium secretes an enzyme of the GH11 family with a strong xylanase activity but this activity tends to decrease during the cultivations. The thesis focused on the study of population factors impacting the fall of the activity during successive cultivations. A phenotypic diversification leading to the presence of a cheating subpopulation was identified as responsible for the loss of activity. Strategies to control phenotypic diversification were then established. They were based on the introduction of environmental changes (carbon sources) or by changing the physiological state of the cells (age of inocula) during successive cultivations to improve enzyme production. From these approaches, xylanase activity could be increased up to 15-fold by alternating the carbon source. The complementary activities β -xylosidase and acetyl esterase were increased by changing the age of the inocula (cells in stationary phase). In the last part of the thesis, the strategy of environmental changes was done with segregated cultures which allowed to control the phenotypic diversification of the strain in bioreactors.

Keywords : lignocellulosic biomass, xylanase, *Thermobacillus xylanilyticus*, phenotypic diversification, subpopulation, bioreactor, segregostat

Laboratoire d'accueil

Cette thèse a été réalisée dans le cadre du projet de thèse en co-tutelle XylanFactory entre la chaire Agroressources FERmentation Enzymes (AFERE) de l'Université de Reims Champagne-Ardenne (URCA, France) et le laboratoire Microbial Processes and Interactions (MIPI) d'AgroBioTech Gembloux (Belgique). Ce projet est une collaboration entre un laboratoire belge et un laboratoire français mais également entre 2 universités, l'Université de Liège et l'URCA. Les analyses (cytométriques et microscopiques) ont impliqué une collaboration avec deux plateaux techniques, MOBICYTE et URCACyt, et l'utilisation de la plateforme PICT de l'URCA.



Remerciements

Après plusieurs années de thèse passées au sein des 2 équipes des laboratoires de l'UMR FARE à Reims en France et du MiPI à Gembloux en Belgique, plusieurs remerciements s'imposent.

Je tiens à remercier premièrement l'ensemble de mes encadrants, Caroline Rémond, Harivony Rakotoarivonina et Frank Delvigne sans qui ce projet n'aurait pas pu être possible ainsi que pour leurs conseils avisés au niveau scientifique mais également social.

Merci aux rapporteurs, Vincent Phalip et Fadhel Ben Chaabane ainsi qu'aux membres du jury Sandrine Alfenore et Philippe Jacques, d'avoir accepté de juger ce travail.

Au niveau des laboratoires, je souhaiterais remercier l'ensemble du personnel de l'UMR FARE principalement au niveau de l'équipe enzymes (Caroline, Corinne, Harivony, Ludovic, Sofiene, Juliette, Emeline, Coraline et Flora) et du MiPI (Frank, Hosni, Samuel, Andrew, Adrien, Sébastien, Cathy, Marguerite, Barbara et j'en passe car la liste est longue) pour leurs différentes aides scientifiques, les aides au niveau organisationnel et/ou les bons moments passés ensemble. Un grand merci également à Frédéric Vélard, Sandra Audonnet et Damien Rioult pour leurs aides lors des analyses microscopiques avancées, de triage cellulaire et de cytométrie.

Je tiens également à remercier un ensemble de personnes qui ont pu m'aider à me changer les idées et à tenir moralement. Un grand merci donc à Andrew, Samuel, Harivony, Sofiene, Issa, Mathieu, Laulau, Claire, Anne, Raphaël, Justine, Flora, David, Sancho, Lauris, Thibaut et Thomas. J'ai sans doute oublié beaucoup de personnes mais je remercie tous ceux et celles qui ont pu m'aider à ce niveau et qui pourraient se reconnaître dans ces lignes

A titre plus personnel, je tiens à remercier mes sœurs, leurs compagnons et mon père pour m'avoir soutenu pendant toute cette année. Je remercie également mes colocataires lors du début de ma thèse, Thib, Nico et Quentin qui m'ont aidé à bien décompresser après des journées bien remplies. Je remercie également ma belle-famille (Nathalie et Fabrice) d'avoir accepté de m'héberger pendant ma période de rédaction après mon départ de Reims. Enfin, bien sûr, si je ne devais remercier qu'une seule personne à titre personnel, ce serait ma compagne, Elodie Smeets, qui n'a fait que rendre mes journées plus lumineuses et heureuses depuis que je la connais. C'est également elle qui était ma première source d'écoute, de conseils et de réconforts au cours de ces dernières années et sans qui j'aurais difficilement tenu avec tous les imprévus s'étant déroulés au cours de cette thèse.

SOMMAIRE

Introduction.....	12
1. La biomasse lignocellulosique et l'organisation de la paroi cellulaire végétale	17
1.1. Organisation de la paroi	17
1.2. Composition de la paroi cellulaire végétale	18
2. Récalcitrance de la paroi à la conversion biologique	28
3. Hydrolyse enzymatique des celluloses et hémicelluloses.....	30
3.1. Les cellulases	32
3.2. Les hémicellulases impliquées dans l'hydrolyse des xylanes	32
4. Valorisation des xylanes en bioraffinerie	36
5. Production d'enzymes lignocellulolytiques.....	39
5.1. Généralités sur les microorganismes producteurs.....	39
5.2. Niches écologiques occupées par des microorganismes lignocellulolytiques	41
5.3. Microorganismes extrêmophiles.....	43
5.4. Productions d'enzymes lignocellulolytiques	47
5.5. Microorganismes hémicellulolytiques	49
6. <i>Thermobacillus xylanilyticus</i>	51
6.1. Origine et généralités sur la bactérie	51
6.2. Potentiel enzymatique de la bactérie pour le fractionnement des biomasses lignocellulosiques	51
7. Evolution de souches bactériennes.....	54
7.1. Dégénérescence de souches bactériennes	54
7.2. Notion de <i>fitness</i>	55
7.3. Evolution de souches pour la production de molécules d'intérêts.....	57
8. Etude de l'hétérogénéité phénotypique par cytométrie en flux	60
8.1. Hétérogénéité phénotypique	62
8.2. Etude de l'hétérogénéité et cytométrie en flux	64
8.3. Alternative à la cytométrie en flux, cultures en microfluidiques	71
8.4. Culture en ségrégostat	73
Partie II : Objectifs et stratégies	76
1. Objectifs de la thèse et questions scientifiques.....	77
1.1. Objectifs de la thèse	77
1.2. Questions scientifiques	78

2.	Stratégies adoptées.....	79
3.	Plan général des expériences.....	80
Partie III : Matériels et méthodes.....		82
1.	Cultures de la bactérie <i>Thermobacillus xylanilyticus</i>	83
1.1.	Milieu de culture	83
1.2.	Culture de <i>Thermobacillus xylanilyticus</i>	84
2.	Dosages enzymatiques.....	86
2.1.	Préparation des différentes fractions enzymatiques.....	86
2.2.	Dosage d'activité xylanase	86
2.3.	Dosage des activités intracellulaires (acétyl estérase et β -xylosidase).....	87
2.4.	Dosage des protéines	88
3.	Mesures de l'expression du gène <i>tx-xyn11</i>	89
3.1.	Extraction de l'ARN.....	89
3.2.	Synthèse des ADN complémentaires	90
3.3.	PCR quantitative	90
4.	Analyse de populations	93
4.1.	Mesures cytométriques lors des cultures successives.....	93
4.2.	Triage cellulaire	94
4.3.	Culture après triage cellulaire	95
4.4.	Analyses par microscopie électronique à balayage	95
5.	Optimisation de la production enzymatique	96
5.1.	Cultures successives avec alternance de sources de carbone	96
5.2.	Cultures successives en présence de xylane et de lignocelluloses avec transferts en phase stationnaire	97
6.	Cultures en bioréacteurs.....	98
6.1.	Définition des paramètres de culture de <i>T. xylanilyticus</i> en bioréacteurs.....	98
6.2.	Cultures en ségrégostat.....	101
7.	Analyses statistiques	103
Partie IV : Résultats		104
A.	Chapitre I : Impact des populations sur l'activité enzymatique de <i>Thermobacillus xylanilyticus</i> et caractérisation des populations – Article 1 accepté chez Microbial Cell Factories	105
1.	Résumé étendu	106
2.	Article 1: Xylanase production by <i>Thermobacillus xylanilyticus</i> is impaired by population diversification but can be mitigated based on the management of cheating behavior	108

2.1.	Abstract	108
2.2.	Background.....	109
2.3.	Results	111
2.4.	Discussion	124
2.5.	Conclusions.....	126
2.6.	Methods	127
B.	Chapitre II : Stratégie de contrôle de la diversité phénotypique sur différentes biomasses lignocellulosiques - Article 2 accepté chez Bioprocess and Biosystems Engineering	134
1.	Résumé étendu	135
2.	Article 2: Control of phenotypic diversification based on serial cultivations on different carbon sources leads to improved bacterial xylanase	137
2.1.	Abstract	137
2.2.	Background.....	138
2.3.	Materials and methods	140
2.4.	Results	144
2.5.	Discussion	153
2.6.	Conclusion	156
C.	Chapitre III : Optimisation de la production enzymatique par stabilisation des populations en bioréacteurs	158
1.	Contexte	159
2.	Résultats.....	160
2.1.	Effet des paramètres environnementaux sur la croissance de <i>T. xylanilyticus</i> en bioréacteurs	160
2.2.	Cultures ségréostat pour diminuer l'hétérogénéité de populations en bioréacteurs ..	173
3.	Discussion	178
	Partie V : Discussion	182
1.	Réponses aux objectifs de la thèse	183
2.	Choix de l'étude des populations et études de l'impact des sous-populations.....	186
3.	Contrôle de la diversification phénotypique.....	190
4.	Optimisation de la culture en bioréacteurs, montée en échelle et culture ségréostat	193
5.	Perspectives.....	198
5.1.	Amélioration de l'étude en ségréostat et études de la formation de biofilms de <i>T. xylanilyticus</i>	198
5.2.	Utilisation des stratégies de diversification phénotypique pour la production de cocktails enzymatiques pour la déconstruction des biomasses lignocellulosiques.....	199

5.3. Identification des mécanismes moléculaires impliqués dans la diversification phénotypique	199
5.4. Cultures en microfluidiques	200
Partie VI : Conclusions	206
Bibliographie	211
Annexes	241
Table des annexes	242
Table des figures.....	246
Liste des Tables.....	253

Liste des abréviations

2G : de Deuxième Génération

ADNc : ADN complémentaires

AGX : Arabinoglucuronoxylanes

ARNm : ARN messenger

ARNr : ARN ribosomique

CBH : Cellobiohydrolase

CCD : Nombre cumulatif de division cellulaire

CE : Carbohydate esterases

DO_{600nm} (OD_{600nm}) : Densité optique mesurée à 600 nm

EG : Endo-β-1,4-glucanase

FC : Flow Cytometry

FRET : Förster energy transfer

FSC : Forward Scatter

GAX : Glucuronoarabinoxylanes

GFP : Green Fluorescent Protein

GH : Glycoside Hydrolase

HMDS : Hexamethyldisilazane

IS : Insertion Sequence

IU : International Unit

LOC : Lab On a Chip

OD : Optical Density

PBS : Phosphate Buffer Solution

PCR : Polymerase Chain Reaction

PDMS : Polydiméthylsiloxane

PI : Prodipidum Iodide

pO₂ : Pourcentage d'air saturé en oxygène

RPM : Rotation Par Minute

RRI : Respiration Response Imaging

RSG : RedoxSensor Green

SEM : Scanning Electron Microscopy

SNP : Single Nucleotide Polymorphism

SSC : Side Scatter

UI : Unité Internationale

Unité G : Gaïacyle

Unité H : *p*-hydroxyphényle

Unité S : Syringyle

VVM : Vessel Volume/Minute

WGS : Whole genome sequencing

INTRODUCTION

La biomasse végétale lignocellulosique est utilisée depuis longtemps par l'homme pour se chauffer (bois de chauffage), pour construire des meubles ou encore produire du papier. Plus récemment, le concept de bioraffinage s'est développé pour élargir les valorisations possibles du végétal en vue de limiter le recours aux énergies fossiles polluantes. Celles-ci sont, en effet, génératrices de gaz à effet de serre, limitées et leur coût est volatile et prévu à la hausse selon les scénarios (Kamm and Kamm, 2004; Fernando *et al.*, 2006; Narbel and Hansen, 2014; Abas, Kalair and Khan, 2015; Ubando, Felix and Chen, 2020). Ces prévisions semblent se confirmer à l'heure actuelle. Le bioraffinage du végétal vise à produire de l'énergie, de la chaleur, des biocarburants, des biomolécules et des biomatériaux (Kumar, Singh and Singh, 2008; Ubando, Felix and Chen, 2020). Les biocarburants représentent une source d'énergie renouvelable et plus durable que les énergies fossiles. Elles participent également à la limitation du réchauffement climatique. La première génération de biocarburants est d'ores et déjà produite à l'échelle industrielle et est incorporée dans les carburants délivrés à la pompe pour les consommateurs. Cette première génération a cependant suscité des débats éthiques car les biomasses utilisées sont normalement dédiées à l'industrie agro-alimentaire ce qui a généré une compétition d'usage directe (Naik *et al.*, 2010). La compétition a pu être également indirecte de par l'utilisation de surfaces agricoles pour ces cultures (Naik *et al.*, 2010). Les voies de production de biocarburants de seconde et troisième générations (2G et 3G respectivement) se sont développées suite à ces débats. Ce type de débats existent cependant toujours dans certains pays pour les biocarburants de seconde génération principalement en termes d'utilisation et d'espace : doit-on utiliser les espaces cultivables pour la culture de biomasses dédiées à la production de biocarburant ou pour la culture de nourriture dans les pays en développement (Das and Gundimeda, 2022; Rodionova *et al.*, 2022) ?

En effet, les biocarburants de deuxième génération (2G) sont basés sur l'utilisation de biomasses lignocellulosiques (Naik *et al.*, 2010). Les biomasses lignocellulosiques sont de différentes origines et natures : résidus de récolte (pailles, bagasses, rafles, ...), bois de feuillus, bois résineux, déchets lignocellulosiques (déchets de sylviculture), biomasses herbacées ou des déchets municipaux (tontes, tailles) (Sánchez and Cardona, 2008). Elles sont composées de cellulose (polysaccharide principalement composé de répétitions d'unités de glucose), hémicelluloses (polysaccharides avec des répétitions d'unités de glucose, mannose, galactose, fructose, xylose, arabinose et d'acide glucuronique principalement) et lignine (polymère phénolique). Du fait de leurs rendements élevés, leurs cultures possibles dans des lieux ne concurrençant pas des zones cultivables ainsi que leurs faibles besoins en nutriments et eau, des

cultures dédiées (comme le Miscanthus, le Switchgrass, les taillis à courte rotation ou très courte rotation,...) ont été développées pour produire de l'énergie (combustion) et des biocarburants (Gressel, 2008; Dodd and Cann, 2009; Jørgensen, 2011; Raud *et al.*, 2019). Toutefois, à ce jour, la valorisation des biomasses lignocellulosiques (production de biocarburants 2G ou de molécules d'intérêts) reste insuffisante du fait d'un coût élevé de production lié à des verrous technologiques. Le principal verrou est lié à la récalcitrance de la biomasse lignocellulosique vis-à-vis d'une conversion biologique. Pour surmonter cette récalcitrance, un prétraitement physico-chimique de la biomasse est indispensable. Pour la conversion biologique, il est nécessaire de disposer de différentes enzymes pour hydrolyser les polysaccharides de la biomasse lignocellulosique : la cellulose et les hémicelluloses. En effet, dans le système de bioraffinerie 2G, la tendance est tournée vers l'utilisation complète de l'ensemble de la biomasse et de tous les polymères la composant.

Un large panel d'enzymes est nécessaire pour obtenir une hydrolyse complète et efficace générant la production d'hexoses (oses à 6 atomes de carbone) comme le glucose mais également de pentoses (oses à 5 atomes de carbone) comme le xylose et l'arabinose. Ces sucres peuvent être fermentés en éthanol 2G par des microorganismes fermentaires ou convertis par voie fermentaire ou par voie chimique en un large panel de biomolécules d'intérêts (molécules plateformes ou molécules à hautes valeurs ajoutées) (Aditiya *et al.*, 2016). Ces enzymes sont des enzymes hydrolytiques (ou hydrolases) principalement des glycosides hydrolases (GHs) et estérases. D'autres enzymes (oxydoréductase) peuvent être impliquées également pour l'oxydation de la lignine.

Disposer d'enzymes hydrolytiques variées et stables pour des procédés industriels est donc une étape indispensable pour le développement d'une conversion biologique de la biomasse lignocellulosique. Dans le contexte du bioraffinage, les cellulases sont les enzymes les plus utilisées car elles permettent d'obtenir les unités de glucose constituant la cellulose. Cependant, l'utilisation de xylanases et d'autres hémicellulases (β -xylosidases, arabinosidases, ...) est également nécessaire pour une utilisation totale de la biomasse lignocellulosique. Celles-ci vont servir à la production de xylose à partir de lignocelluloses contenant des hémicelluloses (des xylanes particulièrement). Par ailleurs, les xylanases sont d'ores et déjà mises en œuvre pour d'autres applications telles que l'alimentation animale, la panification, le blanchiment de la pâte à papier ou encore la production de xylo-oligosaccharides prébiotiques (Juturu and Wu, 2012). La recherche de microorganismes producteurs de ces enzymes (bactéries, champignons,

levures, ...) est un point essentiel des études d'optimisation du fractionnement des biomasses lignocellulosiques. Ces microorganismes se trouvent dans diverses niches écologiques riches en lignocelluloses (sols agricoles, de forêt, rumen de ruminants, ...) incluant également des conditions extrêmes (fonds marins, sources chaudes dans des cratères volcaniques, ...) (Thapa *et al.*, 2020). Ces microorganismes, qualifiés d'extrêmophiles sont parmi les plus intéressants pour la dégradation des biomasses lignocellulosique par leurs productions enzymatiques particulières (en termes de stabilité, d'activité et de mode d'action) qui peuvent être utilisées dans des bioprocédés avec des conditions drastiques (de températures, pH ou salinité par exemple) (Van den Burg, 2003; Bhalla *et al.*, 2013; Thapa *et al.*, 2020). Il est par exemple admis que les bactéries thermophiles produisant des enzymes thermostables (stable à de hautes températures) constituent un des groupes les plus efficaces dans la dégradation des biomasses lignocellulosiques (Bhalla *et al.*, 2013). Ces microorganismes sont cependant également les plus compliqués à cultiver (Van den Burg, 2003; Bhalla *et al.*, 2013; Thapa *et al.*, 2020). De plus, tout comme pour de nombreux processus industriels impliquant des cellules microbiennes (bioprocédés), de l'hétérogénéité phénotypique peut venir impacter la croissance des microorganismes et la production des produits d'intérêt (des enzymes lignocellulolytiques dans ce contexte) (Delvigne and Goffin, 2014; Binder *et al.*, 2017). L'identification des microorganismes, leurs cultures et l'étude de leurs productions enzymatiques sont donc des points essentiels afin d'améliorer la conversion des différentes ressources lignocellulosiques existantes en produits d'intérêt.

C'est dans ce contexte que s'inscrivent ces travaux de thèse qui concernent l'étude de la production d'enzymes hémicellulolytiques particulièrement d'une xylanase (principale enzyme sécrétée) par la bactérie hémicellulolytique thermophile *Thermobacillus xylanilyticus*.

PARTIE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1. La biomasse lignocellulosique et l'organisation de la paroi cellulaire végétale

1.1. Organisation de la paroi

La paroi cellulaire végétale est un composant structurel essentiel des cellules végétales qui leur offre une protection contre un ensemble de stress externes et internes. Cette paroi est principalement composée de polymères (glucidiques et aromatiques majoritairement) et est organisée en couches concentriques qui apparaissent séquentiellement au cours du développement de la plante (Cosgrove, 2005; Doblin, Pettolino and Bacic, 2010; Gibson, 2012). Les différentes couches sont les suivantes (de l'extérieur à l'intérieur, Figure 1A) : la lamelle moyenne, la paroi primaire et la paroi secondaire.

La lamelle moyenne est la première couche formée dans le développement de la plante (Cosgrove, 2005). Son rôle principal est l'adhésion des cellules afin de maintenir l'intégrité structurelle des tissus végétaux. Elle sert également à la séparation cellulaire déclenchée par le développement de la cellule et l'environnement (Zamil and Geitmann, 2017). Cette couche est principalement formée de pectines formant des gels hydratés.

La paroi primaire, se développant lors de la croissance des tissus végétaux, est relativement mince, souple et hautement hydratée. Elle nécessite d'être résistante à la traction (pour les pressions hydrostatiques) et extensible (pour l'extension de la cellule lors de l'absorption d'eau) (Cosgrove and Jarvis, 2012). Elle est la première couche à présenter la structure particulière, semblable à des fibres de verre, des parois cellulaires végétales. Cette structure est faite de microfibrilles de cellulose cristallines incorporées dans une matrice de polysaccharides complexes, divisés en deux classes, hémicelluloses et pectines (Cosgrove, 2005; Doblin, Pettolino and Bacic, 2010).

La paroi secondaire n'est pas présente pour toutes les cellules végétales. Elle se forme après l'arrêt de l'expansion cellulaire chez certaines cellules spécialisées (Zhong, Cui and Ye, 2019). Elle est principalement présente dans les trachéides chez les plantes vasculaires sans graines et les gymnospermes, les vaisseaux chez les angiospermes, les fibres dans le xylème primaire et secondaire dans le bois où elle permet de donner une force et une résistance mécanique aux cellules lors du développement des tissus végétaux ou pour aider au transport de l'eau dans la plante (Zhong and Ye, 2015; Kumar, Campbell and Turner, 2016). La résistance

mécanique doit être à la fois au niveau traction que compression (Cosgrove and Jarvis, 2012). Elle comporte différentes couches en fonction de l'orientation des microfibrilles de cellulose : S1 présentant une organisation de microfibrilles croisées, S2 présentant une organisation de microfibrilles parallèles et S3 présentant une organisation de microfibrilles orientées en hélice plate (Timell, 1967). Ces trois couches diffèrent également en tailles et en composition chimique.

Au niveau des composants des couches, la membrane cellulaire végétale est donc constituée majoritairement de polysaccharides (dont des polysaccharides pectiques au niveau de la lamelle moyenne) et de lignines (Zamil and Geitmann, 2017).

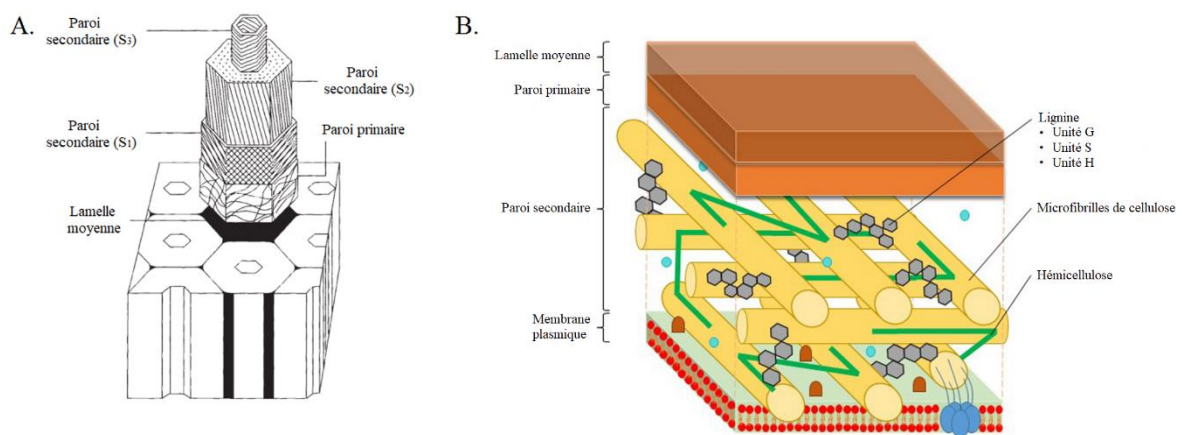


Figure 1 : Organisation de la paroi cellulaire végétale. A : Arrangement spatial schématisé des différentes couches de la paroi végétale cellulaire ; B : Composition et arrangement des différents polymères dans les parois végétales (tiré de Loix et al., 2017).

1.2. Composition de la paroi cellulaire végétale

Les trois polymères principaux composant les différentes couches de la paroi secondaire sont donc la cellulose, les hémicelluloses et les lignines (Figure 1B). Les proportions de ces trois polymères sont variables selon l'origine de la plante, son stade de développement et le type cellulaire (Doblin, Pettolino and Bacic, 2010). Les monocotylédones, les dicotylédones et les gymnospermes ont en effet des teneurs différentes en cellulose, hémicelluloses et lignines (Tables 1 et 2) (Galkin and Samec, 2016). En plus de ces 3 polymères viennent s'ajouter des protéines (tels que des extensines, des protéines riches en glycine, des protéines riches en proline, des lectines, ...) qui vont avoir un rôle structural mais qui vont également contribuer

à l'assemblage et au modelage de la paroi au cours de la croissance ainsi qu'aux réponses aux différents stress (Showalter, 1993; Doblin, Pettolino and Bacic, 2010). Ces protéines peuvent également être des enzymes telles que des hydrolases, des protéases, des glycosidases, des peroxydases, des estérases, des expansines, des kinases, des glycoprotéines (comprenant les extensines) et des arabinogalactanes (Showalter, 1993; Doblin, Pettolino and Bacic, 2010). On peut également y retrouver des ions (cations métalliques divalent ou trivalents) qui sont généralement accumulés au niveau de la membrane des cellules végétales lors de leur absorption par la cellule à partir de l'environnement (Krzesłowska, 2011). Parmi ceux-ci, un ion particulièrement important est l'ion calcium Ca^{2+} . Celui-ci est en effet essentiel à la croissance et au développement des plantes principalement en augmentant la cohésion des parois cellulaires végétales où il se retrouve (Demarty, Morvan and Thellier, 1984; Hepler, 2005).

Table 1 : Teneurs en cellulose, hémicelluloses et lignines des monocotylédones, dicotylédones et gymnospermes exprimées en pourcentage de matière sèche (d'après Galkin & Samec, 2016).

<i>Biomasses végétales</i>	<i>Cellulose</i>	<i>Hémicelluloses</i>	<i>Lignines</i>
<i>Monocotylédones (blé, maïs, ...)</i>	29 – 35 %	26 – 32 %	16 – 21 %
<i>Dicotylédones (bois de feuillus comme le bouleau)</i>	43 – 47 %	25 – 35 %	16 – 24 %
<i>Gymnospermes (conifères ou résineux)</i>	~ 40 %	25 – 29 %	25 – 31 %

Table 2 : Teneurs en cellulose, hémicelluloses et lignines de diverses biomasses exprimées en pourcentage de matière sèche (Kumar and Reetu, 2015).

<i>Biomasses lignocellulosiques</i>	<i>Cellulose</i>	<i>Hémicelluloses</i>	<i>Lignines</i>	<i>Cendres</i>
<i>Algues vertes</i>	20-40	20-50	-	-
<i>Coton, lin, ...</i>	80-95	5-20	-	-
<i>Herbes</i>	25-40	25-50	10-30	-
<i>Bois dur</i>	43-47	25-35	16-24	0.4-0.8
<i>Ecorces de feuillus</i>	22-40	20-38	30-55	0.6-1
<i>Bois tendre</i>	40-44	25-29	25-31	0.4-0.6
<i>Ecorces de résineux</i>	18-38	15-33	30-60	0.6-1

<i>Tiges de maïs</i>	39-47	26-31	3-5	12-16
<i>Tiges de sorgho</i>	27	25	11	-
<i>Canne de maïs</i>	38-40	28	7-21	3.6-7.0
<i>Fibres de coco</i>	36-43	0,15-0.25	41-45	2,7-10.2
<i>Paille de riz</i>	28-36	23-28	12-14	14-20
<i>Paille de blé</i>	33-38	26-32	17-19	6-8
<i>Paille d'orge</i>	31-45	27-38	14-19	2-7
<i>Paille de sorgho</i>	32	24	13	12
<i>Bagasse de sorgho doux</i>	34-45	18-28	14-22	-
<i>Bagasse de canne à sucre</i>	32-48	19-24	23-32	1,5-5
<i>Journaux</i>	40-55	25-40	18-30	-
<i>Pâte chimique</i>	60-80	20-30	2-10	-

1.2.1. La cellulose

La cellulose est le polysaccharide le plus abondant sur Terre. Elle consiste en une répétition d'unités de D-glucopyranose liées par liaisons glycosidiques β -(1,4). Les chaînes linéaires non ramifiées formées par ces répétitions de glucoses sont liées entre elles par des liaisons hydrogènes formant des feuillets. Ces liaisons hydrogènes sont également intramoléculaires venant stabiliser chaque feuillet (Hatfield, 1993). Cela est rendu possible par la conformation β des unités de glucose (Brandt *et al.*, 2013). Les différents feuillets sont liés entre eux par des interactions de Van der Waals afin de former les microfibrilles (Nishiyama *et al.*, 2003).

1.2.2. Les hémicelluloses

Les hémicelluloses sont les seconds polysaccharides les plus abondants dans les parois cellulaires végétales. Ils sont composés principalement de pentoses et d'hexoses. Les hexoses présents sont le glucose, le mannose, le galactose, le fructose et l'acide glucuronique tandis que les pentoses retrouvés sont le xylose et l'arabinose (Brandt *et al.*, 2013). Elles sont classées en fonction des oses qui composent le squelette principal du polymère. Celui-ci peut également présenter diverses substitutions et des ramifications par de courtes chaînes. Les différents oses sont liés par différents types de liaisons glycosidiques (β -(1,4), β -(1,3), α -(1,2), α -(1,3) ou α -(1,6) par exemple) en fonction des hémicelluloses (Scheller and Ulvskov, 2010). Les principaux

types d'hémicelluloses sont les xyloglucanes, les mannanes et glucomannanes, les glucanes à liaisons mixtes et les xylanes (Figure 2) (Scheller and Ulvskov, 2010).

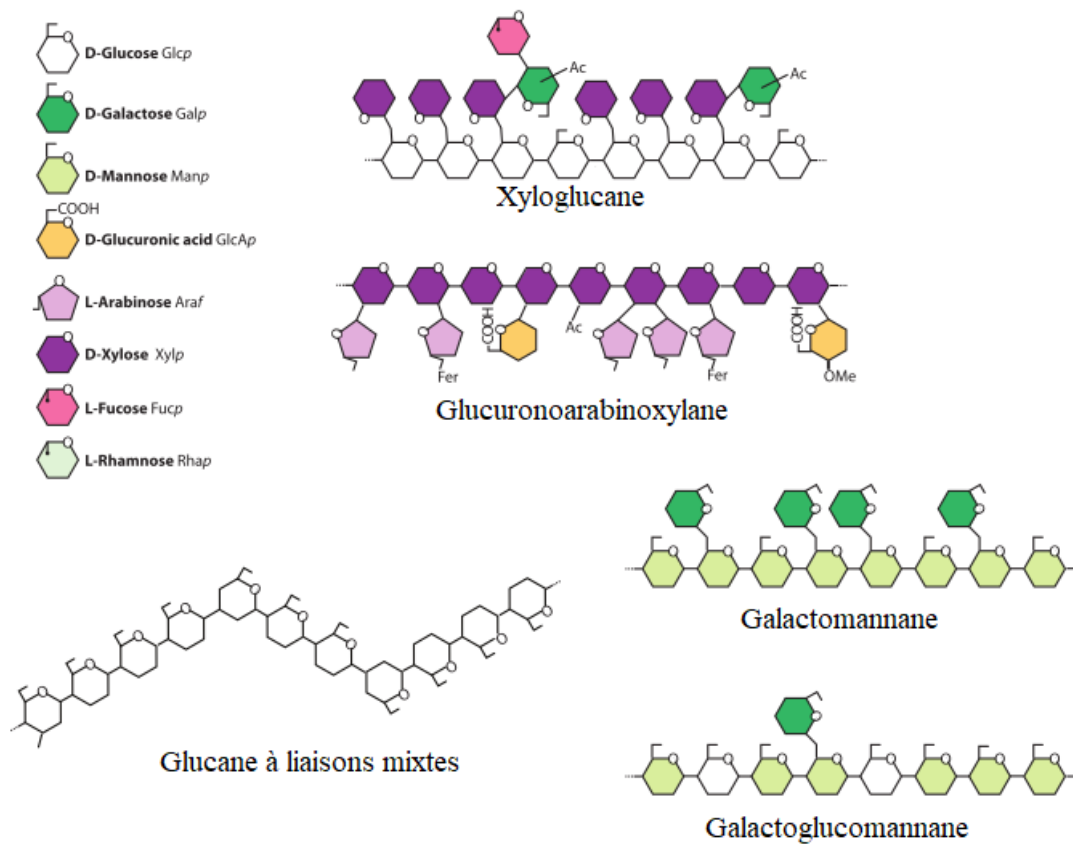


Figure 2 : Structure de certaines hémicelluloses avec les différents oses constitutifs (tirée de Scheller & Ulvskov, 2010).

Les xyloglucanes sont constitués d'un squelette de glucoses liés en β (1,4). Des résidus xylooses ou de courtes chaînes composées de xylooses, galactoses et fucoses substituent certains résidus de xylose. Les mannanes et glucomannanes sont composés soit uniquement de résidus de mannose (mannanes) ou de résidus de mannose et glucose (glucomannanes). Des substituants de type galactose peuvent également être présents sur le squelette principal créant des galactomannanes ou des galactoglucomannanes. Les glucanes à liaisons mixtes contiennent à la fois des liaisons glycosidiques β (1,4) et des liaisons β (1,3) entre les résidus. Ces hémicelluloses ne sont pas ramifiées (Scheller and Ulvskov, 2010).

Les xylanes représentent les hémicelluloses les plus présentes dans la nature (Kulkarni, Shendye and Rao, 1999; Collins, Gerday and Feller, 2005; Motta, Andrade and Santana, 2013).

Ils ont comme squelette principal, des résidus D-xylopyranose liés en β -(1,4). Ils peuvent également présenter des substitutions d'acide D-glucuronique (glucuronoxylane) ou des substitutions (simple ou double) de type L-arabinofuranose (arabinoxylane). Les résidus d'acide glucuronique peuvent également être estérifiés par un groupement *O*-méthyle en position 4 (Scheller and Ulvskov, 2010). Cinq familles principales peuvent être alors considérées : les homoxylanes, les arabinoxylanes, les glucuronoxylanes, les glucuronoarabinoxylanes (GAX) et les arabinoglucuronoxylanes (AGX) (Dodd and Cann, 2009). Les homoxylanes, composés uniquement d'unités de xylose, sont très peu répandus dans la nature et n'ont donc été isolés que de sources limitées telles que l'alfa, les tiges de tabac ou les coques de graines de guar (Sunna and Antranikian, 1997; Motta, Andrade and Santana, 2013). Les AGX et les GAX possèdent les 2 types de substituants : arabinose et acide glucuronique mais en proportions différentes et se retrouvent dans des biomasses différentes (Ebringerová, 2005; Peng *et al.*, 2011). D'autres substituants tels que du rhamnose, du galactose, de l'acide galacturonique, des groupements acétyles, des groupements méthyles, des acides féruliques et/ou *p*-coumariques, peuvent également substituer le squelette principal de résidus de xylose venant ainsi complexifier la structure des xylanes (Figures 2 et 3, Rennie & Scheller, 2014; Scheller & Ulvskov, 2010). Les groupements féruloyl (acide férulique) et *p*-coumaroyl (acide *p*-coumarique) sont liés aux substituants de type arabinose chez certains arabinoxylanes et arabinoglucuronoxylanes (Dodd and Cann, 2009). Les résidus de type L-rhamnose, acide galacturonique et galactose se retrouvent au niveau des glucuronoxylanes (Peng *et al.*, 2011; Rennie and Scheller, 2014). Les groupements acétyles estérifient directement les résidus de type xylose tandis que les groupements méthyles estérifient l'acide glucuronique (York and O'Neill, 2008; Doblin, Pettolino and Bacic, 2010; Scheller and Ulvskov, 2010).

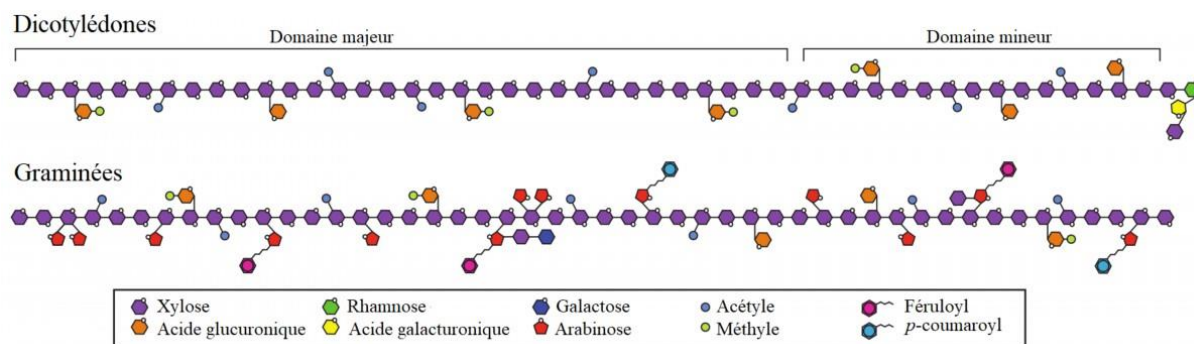


Figure 3 : Structure et composition généralisées des xylanes chez les dicotylédones et les graminées (tirée de Rennie & Scheller, 2014).

De nombreuses variations existent au niveau de la structure des xylanes qui va directement dépendre de l'espèce (Figure 3) et même des tissus dans lesquels ils se situent (Scheller and Ulvskov, 2010; Rennie and Scheller, 2014).

1.2.3. Les pectines

Les pectines sont les troisièmes polysaccharides les plus importants des parois cellulaires végétales. Elles jouent un rôle de ciment intercellulaire et servent également à réguler l'extension cellulaire (Palin and Geitmann, 2012). Elles sont majoritairement présentes dans la lamelle moyenne et la paroi primaire. Ces polymères sont tous composés d'acides glucuroniques (représentant donc 70 % des composants des pectines) liés aux positions 1 et 4 par des liaisons glycosidiques (Mohnen, 2008). Des distinctions sont cependant présentes, les principaux types de pectines sont les homogalacturonanes, les rhamnogalacturonanes I, les xylogalacturonanes, les apiogalacturonanes et les rhamnogalacturonanes II (Harholt, Suttangkakul and Scheller, 2010; Atmodjo, Hao and Mohnen, 2013).

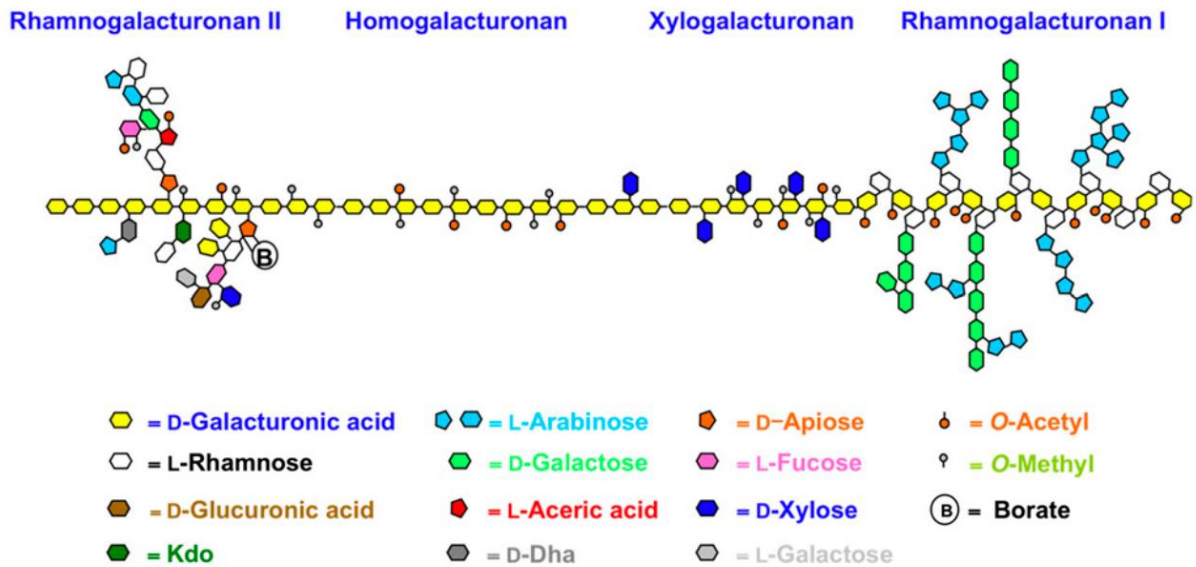


Figure 4 : Structure des pectines (tirée de Harholt et al., 2010).

1.2.4. Les lignines

Les lignines sont les polymères phénoliques les plus abondants sur Terre. Ils sont constitués principalement de trois types de 4-hydroxyphénylpropanoïdes (ou monolignols) qui se distinguent selon le degré de méthylation de leur cycle aromatique : l'alcool *p*-coumarylique, l'alcool coniférylique et l'alcool sinapylique (Ralph, Brunow and Boerjan, 2007). Ces unités sont appelées respectivement unités *p*-hydroxyphényle (unité H), gaïacyle (unité G), et syringyle (unité S) lorsqu'elles sont polymérisées afin de former les lignines (Vanholme *et al.*, 2010). La polymérisation a lieu après le transport des monolignols vers la membrane plasmique et se fait par une radicalisation oxydative des phénols (ou déhydrogénisation) *via* l'action de laccases et de peroxidases formant donc des radicaux phénoxyles qui vont ensuite se coupler de façon aléatoire (Tobimatsu and Schuetz, 2019). Ces couplages aléatoires sont à l'origine d'une grande diversité de liaisons entre les différentes unités (G, H et S) de la lignine. Ces liaisons sont de type éther (β -aryl éther [β -O-4] ou biphenyl éther [4-O-5]), carbone-carbone (Spirodiènone [β -1] ou des liaisons mixtes (Phénylcoumarane [β -5 (α -O-4)], résinol [β - β (γ -O- α)] ou dibenzodioxocine [5-5/ β -O-4 (α -O-4)]) (Ralph *et al.*, 2004; Vanholme *et al.*, 2012). La polymérisation a lieu au niveau du coin des cellules, de la lamelle moyenne et de la paroi primaire lors de la formation de la paroi secondaire et se propage ensuite dans les autres couches de la paroi végétale (Vanholme *et al.*, 2010). La proportion de chaque unité dans les lignines varie directement en fonction de l'origine botanique (taxa, Table

3), du type de cellules, de la couche pariétale et peut être influencée par des signaux environnementaux. Par exemple, les angiospermes dicotylédones vont contenir principalement des unités G et S. Seules des traces d'unités H y seront trouvées (sauf exception). Les lignines de monocotylédones (herbes par exemple) vont contenir plus d'unités H que les dicotylédones et des niveaux comparables d'unités G et S (Ralph, Brunow and Boerjan, 2007).

Table 3 : Présence des principales unités de lignine dans différents types de plantes exprimée en pourcentage (Li *et al.*, 2015).

<i>Type de matériels végétales</i>	<i>Unité S</i>	<i>Unité G</i>	<i>Unité H</i>
<i>Herbe</i>	25-50 %	25-50 %	10-25 %
<i>Bois de conifères</i>	0-1 %	90-95 %	0.5-3.4 %
<i>Bois de feuillu</i>	50-75 %	25-50 %	Traces

1.2.5. Les liaisons entre les différents polymères pariétaux

Les différents polymères qui forment les parois végétales interagissent entre eux par des liaisons covalentes, ioniques ou hydrogènes principalement (Hatfield, 1993). Ces liaisons permettent la formation d'un réseau complexe constitué d'une matrice amorphe, composée de pectines, hémicelluloses et de lignines, englobant les microfibrilles de celluloses (Figure 1) stabilisées par des liaisons hydrogènes et des interactions de Van der Waals (Somerville *et al.*, 2004). Ces liaisons peuvent également être intramoléculaires comme les liaisons hydrogènes intramoléculaires présentes pour la cellulose (Figure 5) et pour les 2 principaux types d'hémicelluloses (les xylanes et les glucomannanes) créant les systèmes cellulose-xylane et cellulose-glucomannane (Zhang, Yang and Blasiak, 2011). Les liaisons covalentes retrouvées sont soit des liaisons glycosidiques, soit des liaisons ester ou soit des liaisons éther (Hatfield, 1993).

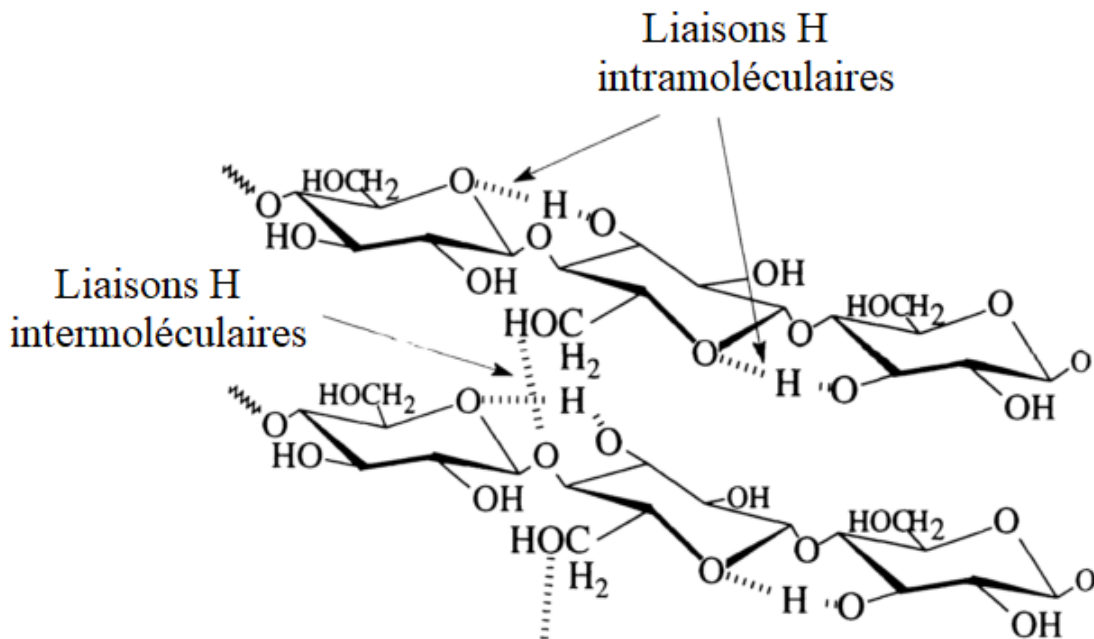


Figure 5 : Chaînes de cellulose adjacentes présentant des liaisons H intra et intermoléculaires (tiré de Hatfield, 1993).

Les premières interactions intermoléculaires d'importance sont celles entre les microfibrilles de cellulose et les hémicelluloses. De par leur proximité structurale, la cellulose et les hémicelluloses peuvent présenter des nombreuses possibilités d'interactions intermoléculaires non-covalentes, les principales étant également les liaisons hydrogènes (Zhang, Yang and Blasiak, 2011). La substitution des xylanes avec de l'arabinose et de l'acide glucuronique permet d'ailleurs de stabiliser les interactions cellulose-xylane. Par exemple, dans le cas de la présence de plusieurs chaînes de xylanes, la réticulation entre les substituants d'acides glucuroniques stabilise fortement les chaînes de xylanes (Pereira *et al.*, 2017).

Les autres interactions d'importance sont entre les lignines et les polysaccharides. Ces liaisons se font lors de la synthèse des lignines durant la formation de la paroi secondaire (Ralph, Brunow and Boerjan, 2007). Il s'agit d'interactions covalentes (principalement des liaisons α -éther, α -ester et phénylglycosidiques) (Lawoko, Henriksson and Gellerstedt, 2006; Zhang, Yang and Blasiak, 2011). Concernant les interactions covalentes, certaines peuvent également se créer suite à des groupements spécifiques présents sur les xylanes. Par exemple, les esters d'acide férulique présents dans les xylanes de graminées peuvent subir une dimérisation oxydative ou photochimique et former des liaisons covalentes avec les chaînes de

xylanes adjacentes ou avec la lignine (Hartley *et al.*, 1990; Ralph, Grabber and Hatfield, 1995; Rennie and Scheller, 2014).

Au niveau des autres types d'interactions, il est possible également de retrouver des interactions ioniques ou des interactions entre les polymères saccharidiques et les protéines. Les interactions ioniques peuvent se former entre deux composants de charge opposée dans la paroi. Les résidus d'acide galacturonique chargés négativement des pectines et les ions Ca^{2+} en sont des exemples (Wehr, Menzies and Blamey, 2004). Ces interactions sont influencées par le pH, la présence d'ions, l'eau et la modification des composants de la paroi. Généralement, ces interactions ioniques impliquent donc des ions Ca^{2+} entre les résidus d'acides galacturoniques des chaînes adjacentes de rhamnogalacturonanes (Hatfield, 1993). Il existe aussi d'autres types de liaisons ioniques qui peuvent relier des pectines acides avec les extensines basiques pouvant être trouvées dans la paroi (Hatfield, 1993; Showalter, 1993).

Toutes ces liaisons décrites ici participent à la récalcitrance des biomasses lignocellulosiques.

2. Récalcitrance de la paroi à la conversion biologique

La récalcitrance de la biomasse lignocellulosique peut être définie comme les différentes caractéristiques de la biomasse qui vont augmenter de façon importante les besoins en énergie dans les processus de sa conversion, le coût et la complexité des opérations en bioraffinerie, et/ou qui vont réduire la récupération du carbone de la biomasse dans les produits souhaités (McCann and Carpita, 2015).

Les paramètres influençant la digestibilité enzymatique et participant à la récalcitrance de transformation des biomasses lignocellulosiques peuvent être classés en deux catégories : les facteurs chimiques et les facteurs structurels (Zoghلامي and Paës, 2019). Les facteurs chimiques comprennent tous les facteurs relatifs à la composition des biomasses, le degré de polymérisation des composants et leur teneur en lignines, hémicelluloses et groupements acétyles. Bien que les facteurs structuraux comprennent le degré de cristallinité de la cellulose et la surface spécifique de la cellulose, la taille des pores et leur volume sont également des paramètres importants à considérer (Zoghلامي and Paës, 2019). C'est principalement du fait des interactions entre les lignines et les hémicelluloses avec les microfibrilles de cellulose que la récalcitrance entrave l'hydrolyse enzymatique. Cela a donc amené un intérêt croissant pour améliorer la compréhension des interactions entre les hémicelluloses et les autres constituants des parois cellulaires végétales au niveau moléculaire (Pereira *et al.*, 2017).

En effet, les hémicelluloses stabilisent le réseau formé par les différents polymères constituant les parois cellulaires végétales. Elles sont également un des paramètres affectant la digestibilité enzymatique par leur degré de substitution principalement. Les groupements acétyles présents chez les hémicelluloses (glucuronoxylanes et les glucomannanes des bois durs et tendres) affectent les propriétés et les interactions des hémicelluloses avec les autres polymères, altérant ainsi leur solubilité (Pawar *et al.*, 2013). Par exemple, la présence des groupements acétyles peut bloquer l'hydrolyse enzymatique de la cellulose (Pan, Gilkes and Saddler, 2006). Le degré d'acétylation représente le rapport moléculaire entre la teneur totale en groupements acétyles et la teneur totale en monomères pouvant les porter (Pawar *et al.*, 2013). Un degré d'acétylation important va donc limiter l'accessibilité à la cellulose en interférant avec la reconnaissance enzymatique (Zoghلامي and Paës, 2019). Dans tous les cas, le contenu en hémicelluloses influence toujours négativement l'hydrolyse des biomasses lignocellulosiques notamment de par leur degré important de substitutions. Leur élimination est donc indispensable pour

optimiser l'hydrolyse enzymatique de la cellulose et celle-ci se fait par le biais d'un prétraitement physico-chimique.

Les prétraitements de la biomasse lignocellulosique sont variés et peuvent mettre en jeu des acides, de l'eau (sous forme liquide ou gazeuse), des solvants organiques ou des composés alcalins. Le prétraitement permet (dans le cas de l'utilisation de solvants ou de composés alcalins) d'éliminer les lignines participant également à la récalcitrance des biomasses lignocellulosiques (Gírio *et al.*, 2010). C'est après l'étape de prétraitement que l'étape d'hydrolyse de la cellulose et des hémicelluloses résiduelles a lieu pour produire des monosaccharides ou des oligosaccharides.

3. Hydrolyse enzymatique des celluloses et hémicelluloses

L'hydrolyse enzymatique de la cellulose et des hémicelluloses a été largement étudiée, dans le cadre du bioraffinage des lignocelluloses pour la production de bioéthanol 2G (Bhat, 2000; Dodd and Cann, 2009; Deutschmann and Dekker, 2012; Binod *et al.*, 2019). Malgré les nombreuses études menées, l'étape d'hydrolyse enzymatique des parois lignocellulosiques demeure un défi technologique et économique lié à la récalcitrance de la biomasse lignocellulosique et au coût encore trop important des enzymes utilisées notamment dans le cadre de la production de molécules à faible valeur ajoutée telles que l'éthanol. L'amélioration d'enzymes existantes par ingénierie et l'optimisation de la production d'enzymes par fermentation microbienne sont parmi les approches les plus utilisées. Par ailleurs la recherche d'enzymes plus performantes et de nouvelles enzymes suscite toujours un fort engouement. La découverte récente de nouvelles enzymes telles que les monooxygénases lytiques de polysaccharides (ou LPMOs) a ouvert de nouvelles perspectives pour la valorisation des biomasses lignocellulosiques (Johansen, 2016; Chylenski *et al.*, 2019). Ces enzymes sont plus précisément des enzymes oxydantes qui utilisent des électrons pour former des espèces réactives de l'oxygène à partir d'O₂ ou d'H₂O₂. Les espèces réactives vont ensuite pouvoir cliver les liaisons glycosidiques β-1,4 (Chylenski *et al.*, 2019). Les LPMOs peuvent être mises en œuvre pour l'obtention de nanofibrilles de cellulose utilisables dans de nombreuses applications de par leurs propriétés de résistances mécaniques, stabilisation des émulsions, barrières aux gaz, ... (Moreau *et al.*, 2019).

L'hydrolyse enzymatique demeure avantageuse par de multiples aspects en comparaison aux autres méthodes d'hydrolyses telles que l'hydrolyse acide ou thermique par exemple. En effet, les réactions enzymatiques sont menées dans des conditions réactionnelles douces (température modérée, pas de solvant ni de produits chimiques requis, pression atmosphérique) et respectueuses de l'environnement limitant la consommation d'énergie et la génération de sous-produits indésirables (Fang *et al.*, 2009; Singh *et al.*, 2019). Ceci permet de limiter le renouvellement des équipements et donc impacte positivement le CAPEX (ou dépenses d'investissement) (Aditiya *et al.*, 2016). Différents types d'enzymes existent et sont caractérisées par différents paramètres de type Michaelis-Menten (Km par exemple) qui vont décrire l'affinité d'une enzyme pour un substrat ou un cofacteur, aussi appelée spécificité, la vitesse de réaction et la sensibilité de l'enzyme à l'inhibition par des molécules régulatrices (Jarboe *et al.*, 2012). En plus de ces paramètres, d'autres sont importants à considérer pour

caractériser une enzyme tels que l'efficacité catalytique, les besoins en cofacteurs, la régulation allostérique (et donc la configuration stérique), l'absorption du substrat et l'exportation du produit de réaction (Jarboe *et al.*, 2012).

Les principaux types d'enzymes utilisés pour le fractionnement des biomasses lignocellulosiques sont les cellulases, les hémicellulases et des enzymes ligninolytiques (les peroxydases et les laccases) (Binod *et al.*, 2019). De nouvelles études sont cependant constamment réalisées afin de découvrir de nouvelles enzymes lignocellulolytiques avec des propriétés améliorées telles que des activités catalytiques plus élevées ou une meilleure stabilité à des environnements extrêmes (de température, pH, salinité, ...) (Binod *et al.*, 2019). Comme par exemple, la découverte d'une endoxylanase, hydrolysant par transglycosylation, produite par *Aspergillus flavus* s'est avérée très intéressante (Chen *et al.*, 2019). En effet, cette enzyme, AfXynA, est très stable, particulièrement sur une large gamme de pH de 3,5 à 10,5, ce qui est très utile pour l'industrie de la pâte et du papier requérant des pH alcalins (Chen *et al.*, 2019).

Les enzymes clés composant les cellulases et hémicellulases sont les glycoside hydrolases (GH) et les estérases (CE pour *carbohydrate esterases*) (Bornscheuer, Buchholz and Seibel, 2014). Les GHs et les CEs sont maintenant classées selon leurs séquences d'acides aminés primaires en plusieurs familles dans la base de données CAZy (www.cazy.org, consulté en mai 2022), qui a été rendue accessible en ligne depuis Septembre 1998 (Henrissat, 1991; Cantarel *et al.*, 2009). Cette base de données est continuellement mise à jour (Garron and Henrissat, 2019; Drula *et al.*, 2022).

Les GHs clivent les liaisons glycosidiques par inversion ou rétention de configuration stéréochimique au niveau du carbone anomérique (Dodd and Cann, 2009). Les glycosidhydrolases intervenant pour une hydrolyse totale des polysaccharides en monosaccharides sont de deux types selon leur mode d'action sur les polymères : les endo-enzymes (qui clivent les liaisons glycosidiques au sein de la chaîne polysaccharidique principale et libèrent les oligosaccharides) et les exo-enzymes (qui clivent les oligosaccharides ou les ramifications des chaînes principales et libèrent des monomères et des dimères tels que le cellobiose) (Jalak *et al.*, 2012).

3.1. Les cellulases

Les cellulases sont de trois types : endo- β -1,4-glucanases, exo- β -1,4-glucanases et β -glucosidases (Horn *et al.*, 2012; Binod *et al.*, 2019). Elles clivent toutes des liaisons glucosidiques β -(1,4) mais dans différentes parties de la chaîne cellulosique. Les endo- β -1,4-glucanases (EGs) clivent de manière aléatoire au sein de la chaîne glucosidique et sont principalement actives au niveau des régions cellulosiques amorphes (Horn *et al.*, 2012; Donohoe and Resch, 2015). Les exo- β -1,4-glucanases, appelées également cellobiohydrolases (CBHs), sont des enzymes processives qui hydrolysent l'extrémité réductrice ou non de la chaîne cellulosique (Horn *et al.*, 2012). L'action commune des EGs et des CBHs génère principalement du cellobiose qui est ensuite hydrolysé par les β -glucosidases en unités de glucose (Horn *et al.*, 2012; Donohoe and Resch, 2015; Kumar and Reetu, 2015). Un fonctionnement complémentaire (voir synergique) de plusieurs enzymes au niveau de leur mode d'action et de leur spécificité est donc nécessaire pour une hydrolyse efficace de la cellulose en glucose (Jalak *et al.*, 2012).

3.2. Les hémicellulases impliquées dans l'hydrolyse des xylanes

Les enzymes nécessaires à l'hydrolyse des hémicelluloses peuvent être classées en deux catégories, des enzymes de dépolymérisation qui clivent le squelette principal et des enzymes qui éliminent les substituants pouvant bloquer les enzymes de dépolymérisation au niveau stérique (enzymes accessoires ou débranchantes) (Van Dyk and Pletschke, 2012). Des activités différentes (activités xylanase, xylosidase, estérase, ...) sont nécessaires à l'hydrolyse des xylanes. Les connaissances accrues sur la structure des xylanes de différents substrats végétaux ont d'ailleurs orienté la recherche vers la découverte d'enzymes aux activités et spécificités différentes (Capetti *et al.*, 2021). Les principales enzymes xylanolytiques nécessaires pour le fractionnement des xylanes sont également des GHs et des estérases (Dodd and Cann, 2009; Malgas *et al.*, 2019). La classification CAZymes des GH en différentes familles se basant sur la structure primaire des acides aminés est la plus utilisée actuellement en plus de la comparaison des domaines catalytiques et leurs mécanismes d'action (cinétique, propriété catalytique, spécificité du substrat et description du produit) (Henrissat and Coutinho, 2001; Garron and Henrissat, 2019).

Les principales enzymes intervenant lors de l'hydrolyse des xylanes sont des endo-1,4- β -D-xylanases (EC 3.2.1.8), β -D-xylosidases (EC 3.2.1.37), α -L-arabinofuranosidases (EC 3.2.1.55), α -D-glucuronidases (EC 3.2.1.139), acétyle xylane estérases (EC 3.1.1.72) et des féruloyle et *p*-coumaroyle estérases (EC 3.1.1.73 et EC 3.1.1.B10) (Figure 6) (Aditiya *et al.*, 2016; Bhardwaj, Kumar and Verma, 2019).

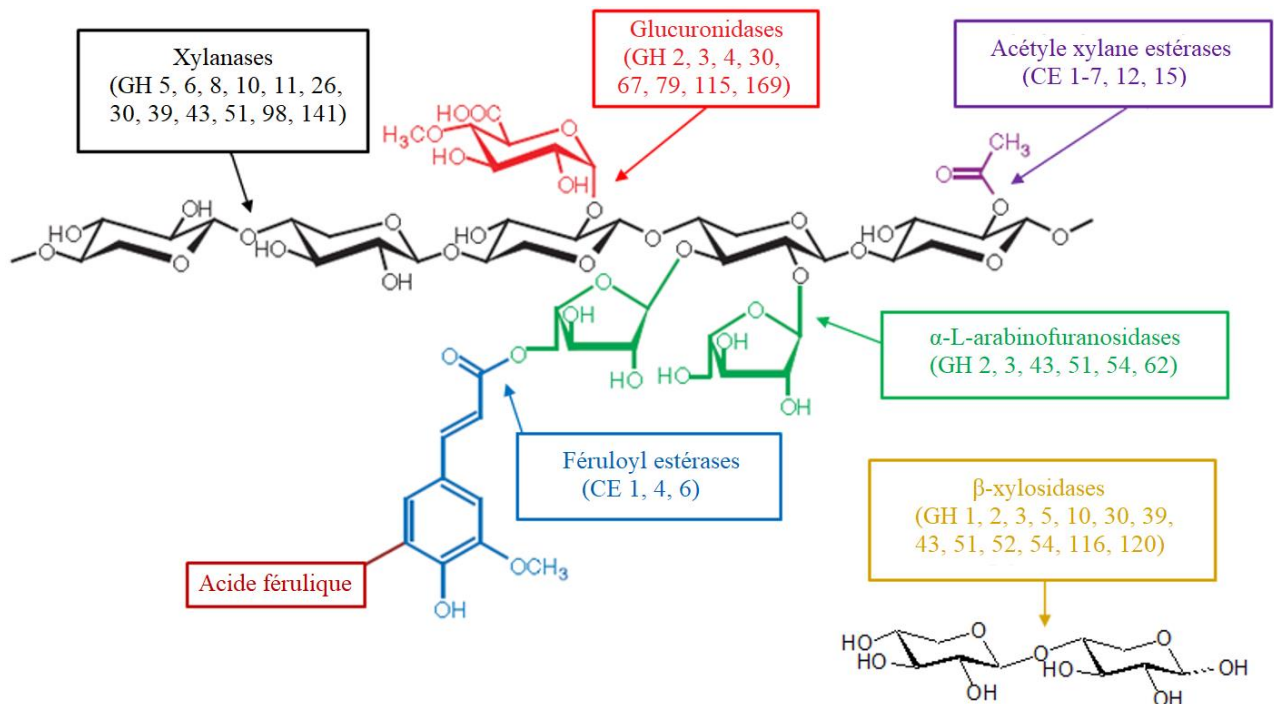


Figure 6 : Différentes enzymes nécessaires à l'hydrolyse des xylanes (et familles de GHs auxquelles elles appartiennent) ainsi que leurs actions au niveau de différents sites des xylanes (adapté de Dodd and Cann, 2009 avec les familles d'enzymes mises à jour avec le site <http://www.cazy.org/> consulté en mai 2022).

Les endo-1,4- β -xylanases clivent les liaisons β -1,4 entre les différentes unités de xylose pour former des xylo-oligosaccharides tels que le xylobiose. Elles appartiennent principalement aux familles 5, 6, 8, 10, 11, 26, 30, 39, 43, 51, 98 et 141 (<http://www.cazy.org/> consulté en mai 2022, Collins, Gerday and Feller, 2005; Nguyen *et al.*, 2018). Les β -D-xylosidases libèrent du xylose à partir des xylo-oligosaccharides générés par les xylanases (Dodd and Cann, 2009). Celles-ci appartiennent principalement à certaines familles de GHs, les familles 1, 2, 3, 5, 10, 30, 39, 43, 51, 52, 54, 116 et 120 (<http://www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html> consulté en mai 2022). L'hydrolyse des xylanes par les endo-xylanases peut se faire par 2 modes d'actions

distincts : rétention ou inversion du centre anomérique du sucre réducteur (monomère composant le polysaccharide) détaillés dans la figure 7 (Subramaniyan and Prema, 2002; Bhardwaj, Kumar and Verma, 2019).

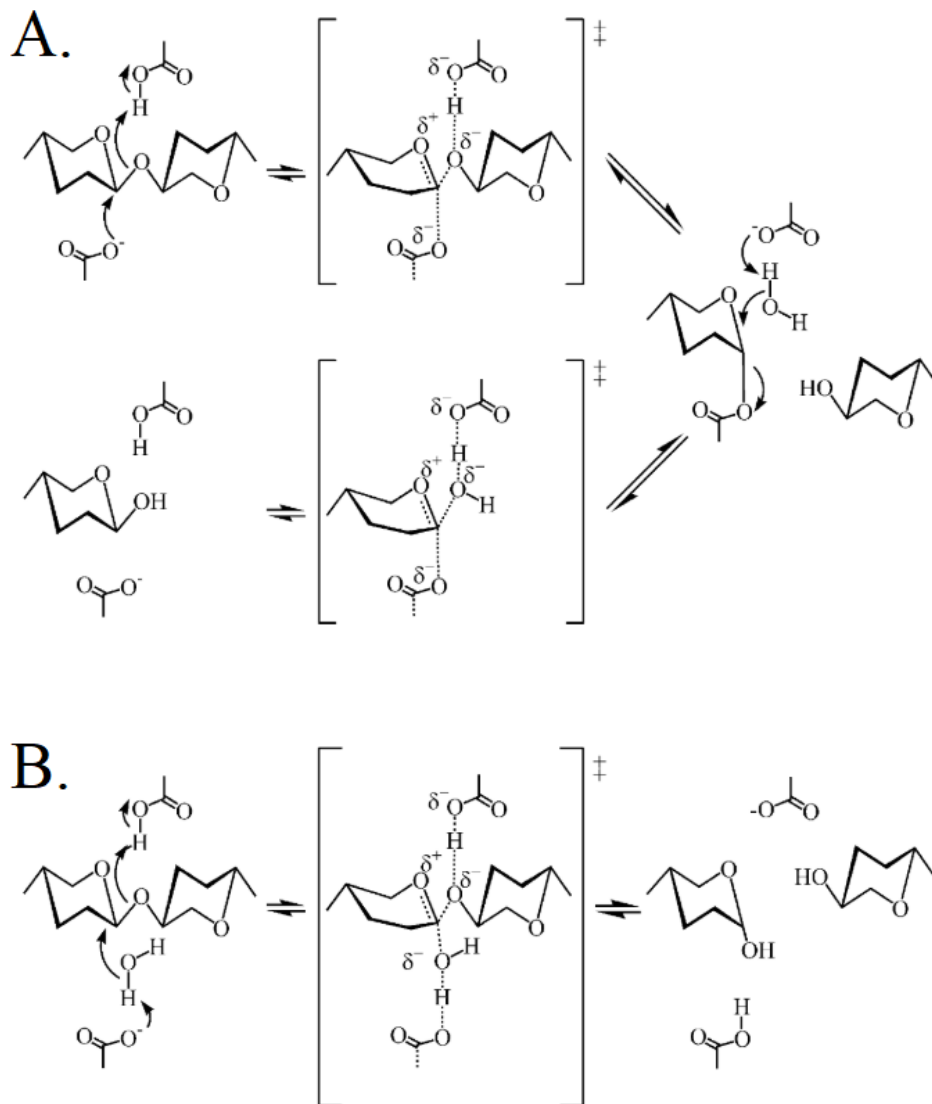


Figure 7 : Mécanismes d'hydrolyse des xylanes par rétention (A) et inversion (B) (tiré de Collins et al., 2005).

En plus de ces enzymes dont le produit final d'hydrolyse est le xylose, d'autres enzymes (présentées ci-dessus) sont également nécessaires pour éliminer les substituants, il s'agit des enzymes débranchantes. Les α -glucuronidases et α -L-arabinofuranosidases permettent de cliver

respectivement les substituants d'acide glucuronique et d'arabinose. Les acétyl xylane estérases éliminent les groupements acétyles (Figure 6). D'autres estérases peuvent également être nécessaires telles que les féruloyle et coumaroyl estérases pour hydrolyser les liaisons esters entre les résidus d'arabinose et les acides férulique ou *p*-coumarique respectivement (Dodd and Cann, 2009). Les acétyl xylane estérases appartiennent aux familles 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 12 ou 15 des hydrates de carbone estérases (CE) tandis que les féruloyle et *p*-coumaroyl estérases appartiennent aux familles 1, 4 et 6 des hydrates de carbone estérases (CE) (Dodd and Cann, 2009).

La classification CAZymes permet de prendre également en compte les domaines catalytiques et les mécanismes d'action des différentes enzymes (Collins, Gerday and Feller, 2005; Drula *et al.*, 2022). Les familles de xylanases les plus fréquentes et les plus étudiées au niveau des propriétés catalytiques sont les familles GH 10 et 11 (Bhardwaj, Kumar and Verma, 2019). La famille 10 comprend principalement des endo-1,4- β -xylanases (EC 3.2.1.8) et des endo-1,3- β -xylanases (EC 3.2.1.32) (Biely *et al.*, 1997; Collins, Gerday and Feller, 2005; Bhardwaj, Kumar and Verma, 2019). Les enzymes de cette famille sont particulièrement actives au niveau des courts xylo-oligosaccharides, ce qui indique la présence de petits sites de liaison au substrat (Biely *et al.*, 1997; Motta, Andrade and Santana, 2013). La structure des enzymes de cette famille est en forme de « *salad bowl* » et présente 4 à 5 sites de liaison au substrat (Biely *et al.*, 1997). La famille 11 est exclusivement composée d'enzymes impliquées dans l'hydrolyse des xylanes. Ces enzymes sont efficaces sur les longues chaînes de xylanes (de par la présence des sites de liaison au substrat plus larges) (Collins, Gerday and Feller, 2005). La présence de substituants ou de liaisons β -1,3 sont des obstacles à leurs activités hydrolytiques. Elles vont donc avoir tendance à cliver les xylanes en des xylo-oligosides de tailles plus importantes que les enzymes de la famille 10 (Biely *et al.*, 1997). Celles-ci ont tendance à produire des xylo-oligosides plus courts d'un résidu xylose (Biely, Singh and Puchart, 2016). Les produits de l'hydrolyse des xylanases GH 11 peuvent être alors encore hydrolysés par les enzymes de la famille 10 et par des xylosidases. Ces 2 familles de xylanases peuvent donc fonctionner de manière complémentaire (Biely, Singh and Puchart, 2016).

4. Valorisation des xylanes en bioraffinerie

Les xylanases peuvent être utilisées pour différentes applications en biotechnologies telles que le blanchiment de la pâte de bois et du papier, l'amélioration de la digestibilité des aliments pour animaux, la clarification de jus de fruits et la transformation de biomasses lignocellulosiques en monosaccharides (Subramaniyan and Prema, 2002; Juturu and Wu, 2012).

Dans l'industrie du papier et de la pâte de bois, les xylanases peuvent être utilisées comme blanchisseur biologique. Habituellement, les agents blanchissants sont des produits chimiques tels que des chlorines. L'utilisation de ces produits chimiques conduit à la formation de composés phénoliques chlorés ou des biphényles polychlorés qui sont toxiques, très résistants à la biodégradation et constituent donc une source de pollution de l'environnement nécessitant des méthodes plus éco-responsables (Subramaniyan and Prema, 2002; Ramanjaneyulu and Devi, 2017). En plus d'être moins polluants, les xylanases ont pris de l'importance dans ce domaine car, suite à l'hydrolyse des xylanes (liés à la cellulose et à la lignine), la séparation des composants est optimisée, ce qui augmente le gonflement de la paroi des fibres et améliore l'extraction de la lignine de la pulpe. Ainsi, une combinaison de xylanases et d'enzymes dégradant la lignine aide à augmenter la brillance de la pulpe.

Les applications au niveau de la transformation du textile se situent au niveau des trois étapes du processus de transformation, le désencollage, le dégraissage et le blanchiment (Subramaniyan and Prema, 2002; Battan *et al.*, 2012). Ces trois étapes permettent d'empêcher les fils (de coton par exemple) de se rompre au cours du tissage en retirant les substances adhésives mais également de se débarrasser de différents éléments (graisses, cires, protéines, pectines, colorants naturels, minéraux, polysaccharides non celluloses, ...) ne présentant aucun intérêt et venant complexifier les phases de blanchissement et de teinture (Battan *et al.*, 2012). Pour ce type d'applications, des xylanases thermostables sont particulièrement d'intérêt. Par exemple, la production de xylanase de *Bacillus pumilus* s'est avérée intéressante car son activité est thermostable et a déjà montré de bons résultats pour le désencollage et le dégraissage. La perte de masse des tissus secs (ici de coton) est ce qui est mesurée pour constater l'efficacité des xylanases sur le dégraissage et désencollage (Battan *et al.*, 2012). Dans le cas de l'activité xylanase de *B. pumilus*, elle a permis une perte de masse de 1,5 % de tissu en coton après une heure dans un système agité et l'utilisation d'EDTA a permis d'obtenir des pertes de masse encore plus importantes (Battan *et al.*, 2012).

Au niveau de l'industrie alimentaire, les différentes applications des xylanases sont principalement des applications de boulangerie mais également dans la clarification des jus de fruits et des applications pour les aliments dédiés aux animaux (Raveendran *et al.*, 2018; Bhardwaj, Kumar and Verma, 2019). Dans le cadre des applications de boulangerie, les xylanases sont utilisées avec d'autres enzymes telles que les cellulases afin d'hydrolyser les polysaccharides non amidonnés en vue d'améliorer les propriétés rhéologiques de la pâte à pain (Raveendran *et al.*, 2018). Plusieurs microorganismes tels que *B. subtilis* ou *Aspergillus niger* ont déjà pu présenter des activités endoxylanases différentes (GH11 et GH10) pour ce type d'applications (Butt *et al.*, 2008). Au niveau des applications de clarification des jus de fruits, les xylanases permettent de réduire la turbidité et la viscosité des jus qui sont principalement dues aux polysaccharides tels que les pectines, l'amidon et les hémicelluloses. La xylanase produite par *Bacillus stearothermophilus* a permis la clarification de jus de citron et celle de *Bacillus pumilus* VLK-1 a été mise en œuvre pour clarifier du jus d'orange ou de raisin (Dhiman *et al.*, 2011; Kumar *et al.*, 2014).

Les applications au niveau de l'alimentation animale concernent l'amélioration de la digestibilité des nutriments et le fractionnement des polysaccharides non-amidonnés peu digestibles et considérés comme antinutritionnels au niveau des différentes parties du système gastro-intestinal (Zhang *et al.*, 2014). Des exemples actuels comprennent l'utilisation de mélanges d'enzymes riches en activité xylanase pour l'amélioration de la lactation des vaches laitières (Romero *et al.*, 2016), l'utilisation de xylanases pour fractionner les arabinoxylanes des régimes alimentaires à base de blé dans le système gastro-intestinal de poulets (Zhang *et al.*, 2014) ou encore l'utilisation d'une xylanase GH11 produite par fermentation de *Komagataella phaff* sur 5 types d'alimentation différents à base de maïs et de soja pour améliorer la santé et le système gastro-intestinal de poulets (Nusairat and Wang, 2021). Un intérêt des xylanases en alimentation animale est leur capacité à produire des xylo-oligosaccharides prébiotiques qui peuvent favoriser le développement des microorganismes probiotiques de la flore intestinale (Bhardwaj, Kumar and Verma, 2019; Ríos-Ríos *et al.*, 2021; Van Hoeck *et al.*, 2021).

Finalement, les xylanases sont également utilisables dans les procédés de bioraffinage des biomasses lignocellulosiques comme déjà abordé (Bhardwaj, Kumar and Verma, 2019). Ces enzymes participent principalement à l'étape d'hydrolyse des parois lignocellulosiques

mais peuvent également améliorer l'hydrolyse de la cellulose en la rendant plus accessible aux cellulases (Hu, Arantes and Saddler, 2011; Bhardwaj, Kumar and Verma, 2019).

L'hydrolyse des xylanes conduit à la formation de xylo-oligosaccharides ou pentoses monomériques. Les xylo-oligosaccharides sont d'intérêt pour des applications prébiotiques (Ríos-Ríos *et al.*, 2021). Le xylose peut être fermenté en éthanol ou autres molécules d'intérêt telles que l'acide lactique, l'acide succinique, ... Le xylose peut également être fermenté ou réduit de façon classique en xylitol, polyol largement utilisé en tant qu'agent sucrant, non cariogène et rafraîchissant dans les chewing-gums, bains de bouche et dans l'industrie pharmaceutique (Chen *et al.*, 2010; Qaseem, Shaheen and Wu, 2021) (Figure 8). Des produits de dégradation du xylose (par exemple, lefurfural) peuvent être obtenus dans certaines conditions d'hydrolyse acide à haute température. Le furfural et ses dérivés sont des molécules de fort intérêt pour l'industrie de la chimie (Eseyin and Steele, 2015).

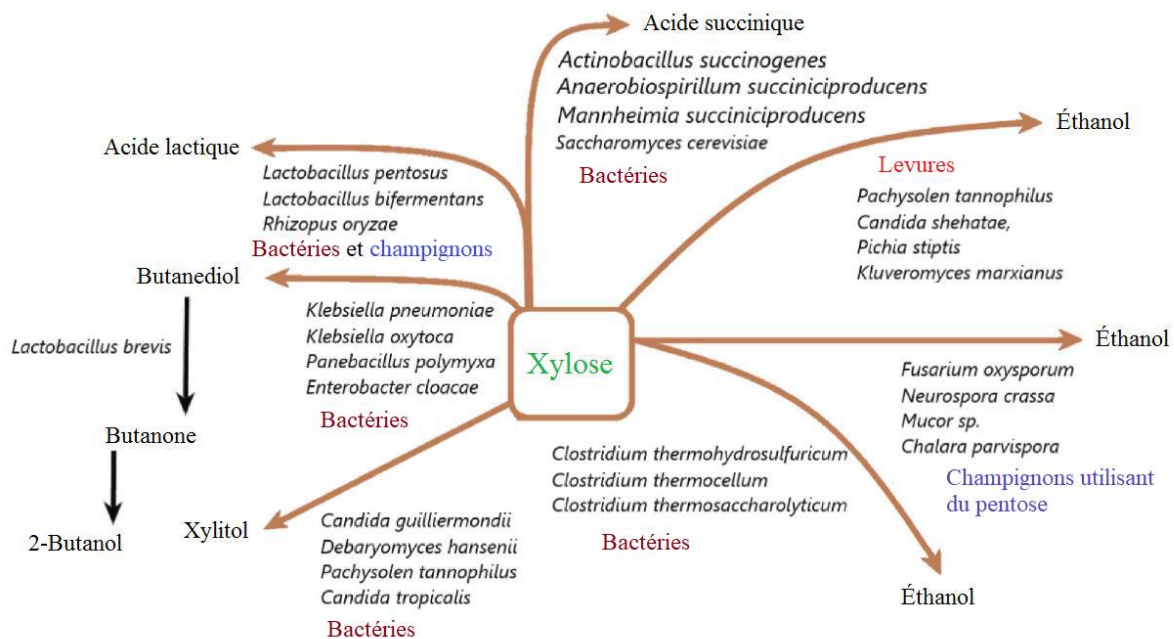


Figure 8 : Valorisation du xylose en différents produits à valeur ajoutée et microorganismes (bactéries, levures et champignons) nécessaires à la conversion vers ces produits (tiré de Qaseem, Shaheen, & Wu, 2021).

5. Production d'enzymes lignocellulolytiques

5.1. Généralités sur les microorganismes producteurs

De nombreux microorganismes sont capables de dégrader la biomasse lignocellulosique dans divers écosystèmes. Ces microorganismes peuvent être des bactéries, champignons, archées ou des protistes et peuvent présenter des activités enzymatiques lignocellulolytiques de type cellulases, hémicellulases et lignolytiques (Kang *et al.*, 2004; Jørgensen *et al.*, 2005; Häkkinen *et al.*, 2014; López-Mondéjar, Zühlke, Becher, *et al.*, 2016; López-Mondéjar, Zühlke, Větrovský, *et al.*, 2016; Beladhadi *et al.*, 2022). L'ensemble de ces enzymes agit de façon complémentaire et pour certaines synergiques afin de permettre une dégradation complète et efficace des biomasses lignocellulosiques (Bhattacharya, 2015; Cortes-Tolalpa, Salles and van Elsas, 2017). Dans la nature, des communautés microbiennes agissent de concert pour dégrader efficacement les biomasses lignocellulosiques comme expliqué précédemment (Ventorino *et al.*, 2015; Cortes-Tolalpa, Salles and van Elsas, 2017).

Les champignons, particulièrement les espèces appartenant aux genres *Aspergillus*, *Penicillium*, *Schizophyllum*, *Trichoderma*, *Phanerochaete*, et *Sclerotium*, sont les microorganismes les plus efficaces pour la dégradation des biomasses lignocellulosiques (Pérez *et al.*, 2002; Chukwuma *et al.*, 2020). Ils utilisent la voie catabolique du pentose et nécessitent donc par exemple du xylose pour leur croissance. C'est également le cas pour certaines bactéries (appartenant aux genres *Clostridium* par exemple). Elles utilisent précisément trois possibles voies : la voie de l'isomérase, la voie de l'oxydoréductase et la voie de l'oxydation. (Domingues *et al.*, 2021). C'est à cette fin que ces individus doivent avoir un arsenal enzymatique comprenant des enzymes actives sur les polysaccharides tels que des glycosides hydrolases auxquelles appartiennent les xylanases (endoxylanases, β -xylosidases, ...) (Klaubauf *et al.*, 2014). Des études génomiques du genre *Aspergillus* concernant le potentiel de dégradation de biomasses lignocellulosiques ont pu démontrer une différence entre 3 *Aspergilli* au niveau du contenu génomique, de la spécificité des enzymes et de la régulation des gènes impliqués dans la dégradation des polysaccharides malgré une croissance similaire sur ces polysaccharides (Coutinho *et al.*, 2009; Klaubauf *et al.*, 2014). La production des enzymes lignocellulolytiques de ces champignons est hautement régulée au niveau transcriptomique et la transcription est induite par la détection d'oligosaccharides dérivés de l'hydrolyse de la cellulose (comme la cellobiose par exemple) et des hémicelluloses (Brown, Ries and Goldman, 2014; Liu and Qu, 2019). Le contrôle de la transcription des gènes impliqués dans la production

d'enzymes hémicellulolytiques se fait alors principalement par l'action de différents régulateurs de la transcription tels que des activateurs comme XlnR qui est l'un des principaux activateurs de la transcription chez les champignons pour le fractionnement des celluloses et hémicelluloses (Klaubauf *et al.*, 2014; Liu and Qu, 2019).

La grande différence entre les bactéries et les champignons hémicellulolytiques est que les champignons sont connus pour sécréter de plus haut niveau d'enzymes dans le milieu que les bactéries qui vont également présenter des activités lignocellulolytiques intracellulaires (Motta, Andrade and Santana, 2013). De plus, la biodiversité est bien plus avancée chez les champignons. En effet, ils présentent par exemple 3 types de champignons en termes de fractionnement des lignocelluloses. Ceux-ci sont les champignons de la pourriture blanche adaptés au prétraitement de la lignine par la production d'enzymes oxydatives, les champignons de la pourriture brune et les champignons de la pourriture molle adaptés pour le fractionnement de la cellulose et de l'hémicellulose en industrie (Wan and Li, 2012; Saini and Sharma, 2021). C'est d'ailleurs les champignons filamenteux qui sont actuellement les plus utilisés industriellement pour produire des enzymes lignocellulolytiques pour leurs niveaux de production élevés et leurs compositions enzymatiques complètes (Liu and Qu, 2019). Les évolutions au niveau des manipulations génétiques ouvrent également la voie à l'ingénierie de ces organismes (Liu and Qu, 2019). Ces champignons sont aussi capables de s'adapter rapidement à des changements environnementaux ayant lieu lors du processus de déconstruction des biomasses végétales (Znameroski and Glass, 2013).

Cependant, les enzymes lignocellulolytiques produites par les bactéries s'avèrent également très intéressantes par plusieurs aspects. En effet, les bactéries sont plus facilement cultivables et se développent donc plus rapidement que les champignons, les bactéries peuvent s'adapter également à différents types de stress environnementaux et les enzymes peuvent se regrouper en complexes multi-enzymes (comme les cellulosomes) qui peuvent présenter alors une fonctionnalité et une spécificité pour le substrat très importantes (Woo *et al.*, 2014; Chukwuma *et al.*, 2020). Ces aspects et la croissance plus rapide peuvent donc rendre les productions enzymatiques bactériennes plus rentables pour la dégradation des biomasses lignocellulosiques. Ils vont directement dépendre de la niche écologique d'où proviennent les bactéries.

5.2. Niches écologiques occupées par des microorganismes lignocellulolytiques

Les microorganismes d'intérêts peuvent être trouvés dans différentes niches écologiques riches en lignocelluloses incluant les tubes digestifs de nombreux animaux (le rumen des ruminants, les intestins d'insectes/termites,...) divers sols (sous-bois, forêts, terrains agricoles, ...), les composts et les environnements marins ou salins (considérés comme des environnements extrêmes) (Thapa *et al.*, 2020). Plusieurs de ces niches sont des zones de fermentation anaérobie naturelle (telles que les fonds marins ou les tubes digestifs d'animaux).

Les collections d'isolats bactériens provenant du sol de forêts tropicales se sont déjà avérées comme hautement lignocellulolytiques (Woo *et al.*, 2014). Le sol est effectivement une source riche d'organismes dégradant la cellulose car celle-ci y est abondante sous forme de plantes mortes (Sethi *et al.*, 2013). La diversité des organismes dépend directement de la structure et de la composition du sol ainsi que des biomasses lignocellulosiques qui s'y trouvent (Thapa *et al.*, 2020). Par exemple, des études de la diversité ont prouvé qu'on peut retrouver des champignons présentant des activités cellulases ou des bactéries Gram négatives ligninolytiques dans le sol de forêts de conifères (Wilhelm *et al.*, 2019). Les bactéries présentant des activités cellulases au niveau du sol appartiennent plutôt aux espèces *Bacillus*, *Pseudomonas* et *Serratia* (Srivastava *et al.*, 2018; Thapa *et al.*, 2020). Des activités hémicellulolytiques y sont également présentes, des études récentes ont pu prouver par exemple la présence de 104 individus bactériens et 52 individus fongiques présentant des activités hémicellulolytiques dans des sols de forêts de conifères provenant de deux écozones très différentes en Amérique du Nord (Leung *et al.*, 2016). Au sein de ces écosystèmes, les différents organismes fonctionnent généralement ensemble afin de se compléter en termes de métabolismes et dégrader alors la cellulose et les hémicelluloses. La complémentarité peut se faire au niveau de la croissance et de l'activité enzymatique et ces deux processus sont liés dans les communautés microbiennes (Van Dyk and Pletschke, 2012). Les microorganismes lorsqu'ils coexistent sur un même substrat vont souvent diviser le travail (partage de niche) par cette coopération métabolique comme dans l'exemple de la production de cellulases et de xylanases extracellulaires, au sein d'une communauté microbienne, qui existe chez beaucoup d'individus impliqués dans le fractionnement des biomasses lignocellulosiques au niveau du sol afin d'obtenir des conditions favorables au développement d'autres espèces (Hays *et al.*, 2015; López-Mondéjar, Zühlke, Becher, *et al.*, 2016). Des études ont en effet déjà démontré

que, dans les communautés lignocellulolytiques où plusieurs espèces coexistent, des fonctionnalisations spécifiques au sein des membres de la communauté existe (Rafieenia, Atkinson and Ledesma-Amaro, 2022). Certains organismes vont se spécialiser dans le fractionnement des celluloses où d'autres vont plutôt se focaliser sur les lignines ou les hémicelluloses. D'autres exemples impliquent le fractionnement des biomasses et la production d'acide butyrique comme dans le cas de la communauté microbienne formée par *T. reesei*, *Lactobacillus pentosus* et *Clostridium tyrobutyricum* (Roell *et al.*, 2019; Rafieenia, Atkinson and Ledesma-Amaro, 2022).

Dans le rumen, la synthèse métabolique de gaz naturels (CH_4 et CO_2) se fait par la fermentation anaérobie qui nécessite quatre étapes différentes : hydrolyse, acidogénèse, acétogénèse et méthanogénèse. Les microorganismes (comprenant des bactéries du genre *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Fibrobacter*, *Butyrivibrio* ou *Prevotella*, des champignons du genre *Neocallimastix*, *Orpinomyces*, *Stachybotrys* ou *Trichosporon* et des levures du genre *Candida*) produisant des enzymes hydrolytiques telles que des cellulases et hémicellulases qui catalysent l'hydrolyse des polysaccharides en monomères (Angelidaki *et al.*, 2011; Zheng *et al.*, 2014; Liang *et al.*, 2021). Ces microorganismes forment donc une relation symbiotique avec leur hôte qui leur fournit la biomasse nécessaire à leur développement alors que les microorganismes aident à la digestion de l'hôte.

En plus des ruminants se nourrissant de biomasses lignocellulosiques, de nombreux invertébrés (coléoptères, foreurs de bois, termites, ...) se nourrissent également de matières végétales ligneuses tel que le bois. Une relation symbiotique entre les microorganismes et les invertébrés se développent donc comme dans le rumen des ruminants. Le rôle de ces microorganismes est la décomposition d'aliments complexes en nutriments essentiels, la détoxification de certains composés, la contribution à la fixation de l'azote atmosphérique et le recyclage des déchets, d'induire les mécanismes de défense contre les pathogènes et la dégradation des composants de la paroi cellulaire végétale (Thapa *et al.*, 2020). Les termites sont actuellement considérés comme une source intéressante de microorganismes produisant des cellulases et hémicellulases (Auer *et al.*, 2017; Thapa *et al.*, 2020).

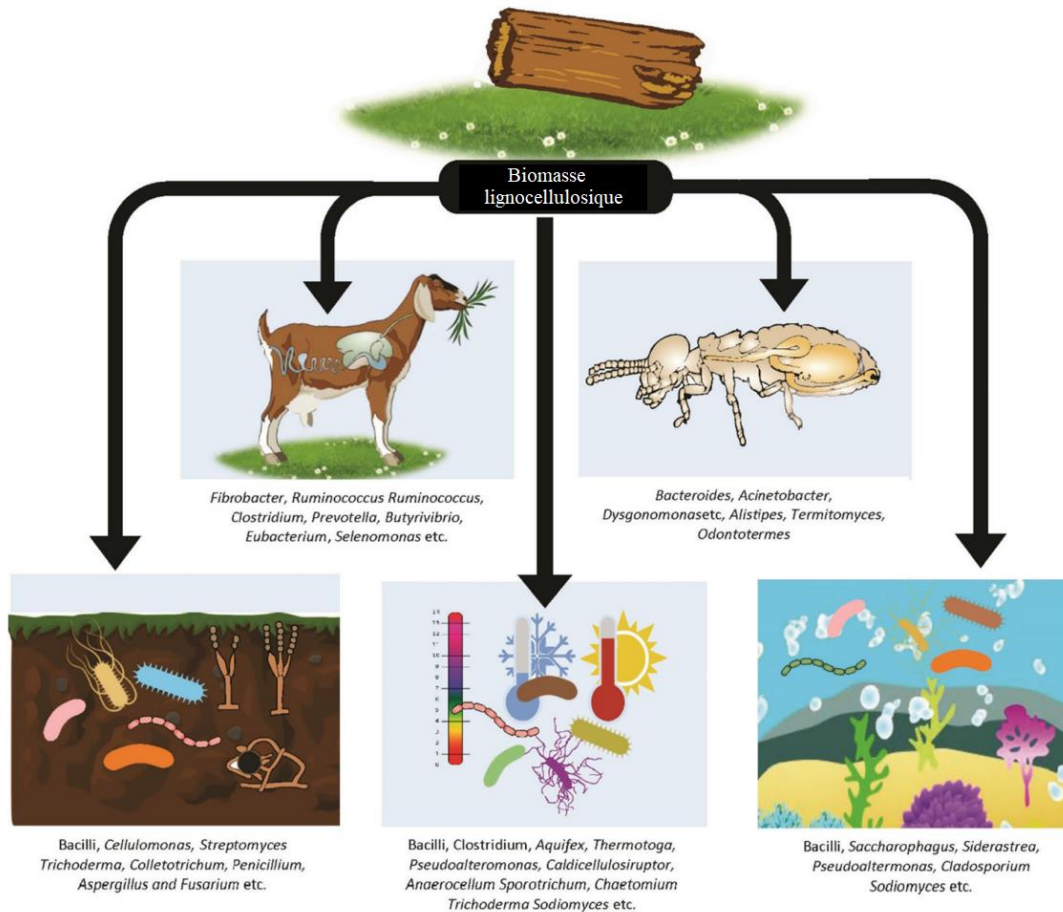


Figure 9 : Niches écologiques des bactéries lignocellulolytiques et espèces trouvées dans ces différentes niches (Adapté de Thapa et al., 2020).

5.3. Microorganismes extrêmophiles

Les microorganismes marins survivent dans des conditions élevées de pressions, de températures, de salinités et géochimiques. Ces microorganismes peuvent se retrouver sur les algues, les sédiments marins ou les éponges par exemple mais peuvent également se retrouver directement dans l'eau marine (même jusque dans les eaux de l'Antarctique). Ces environnements ont permis de développer des productions enzymatiques particulières en terme de stabilité (dans des conditions drastiques) et de modes d'action principalement (Thapa *et al.*, 2020). Ces productions peuvent donc être intéressantes pour de nombreuses applications industrielles (Thapa *et al.*, 2020). En effet, dues aux conditions particulières de croissance, les xylanases produites peuvent par exemple présenter des activités à des températures, des pH ou des concentrations salines différentes des enzymes isolées d'environnements terrestres (Qeshmi

et al., 2020). Les principales sources de xylanes dans ce type d'environnement sont des sédiments, des forêts de mangrove situées à la limite entre environnements terrestres et marins, des invertébrés marins (tels que *Halocynthia aurantium* et *Deroceras reticulatum*) ou des algues marines (Qeshmi *et al.*, 2020). Les principaux microorganismes d'intérêts pour le fractionnement des xylanes dans ces environnements sont des algues, bactéries, champignons, protozoaires, gastéropodes et arthropodes. Les microorganismes hémicellulolytiques les plus isolés de ces environnements marins sont les bactéries et les champignons tout comme leurs contreparties terrestres. Les bactéries marines hémicellulolytiques sont ici préférées aux champignons suite au temps de génération plus important de ceux-ci. Des bactéries récemment reportées comprennent par exemple *Bacillus tequilensis*, *B. subtilis cho40*, *B. subtilis SR60* et *Achromobacter xylosoxidans* (Qeshmi *et al.*, 2020).

Certains autres microorganismes vivent dans d'autres environnements extrêmes en termes de température, de salinité de pH, de pression. Ces microorganismes sont appelés extrémophiles et ils produisent généralement des enzymes actives et stables dans ces conditions drastiques (Van den Burg, 2003; Arora and Panosyan, 2019). Ils sont classés en différentes catégories en fonction des conditions extrêmes auxquelles ils sont soumis (Table 4).

Table 4 : Classification de certains extrémophiles et productions enzymatiques associées (adapté de Van den Burg, 2003).

Paramètre environnemental	Caractéristiques	Types	Enzymes
Température	$T^{\circ} > 80^{\circ}\text{C}$	Hyperthermophiles	Protéases
	$80^{\circ}\text{C} > T^{\circ} > 60^{\circ}\text{C}$	Thermophiles	GHs, chitinases, xylanases, lipases et estérases
	$T^{\circ} < 15^{\circ}\text{C}$	Psychrophiles	Polymérase, déshydrogénases, protéases, amylases, cellulases et lipases
Salinité	2 – 5 M NaCl	Halophiles	Protéases et déshydrogénases
pH	pH > 9	Alcalinophiles	Protéases et cellulases
	pH < 4	Acidophiles	Amylases, cellulases, glucoamylases, oxydases et protéases
Pression	Pression jusqu'à 130 MPa	Piézophiles (ou barophiles)	Encore à définir

Comme extrêmophiles il existe donc des organismes thermophiles, psychrophiles, acidophiles, alcalinophiles et halophiles qui sont ciblés par la recherche de biocatalyseurs fonctionnels dans des conditions extrêmes pour des transformations enzymatiques dans des applications alimentaires, chimiques, pharmaceutiques ou d'autres applications industrielles (Van den Burg, 2003; Thapa *et al.*, 2020). En plus de ces classifications, il existe également des organismes pouvant survivre dans d'autres conditions extrêmes telles que des conditions de dessiccation (xérophiles), des conditions de radioactivité importantes ou des concentrations importantes de gaz, de métaux (organismes métallo-tolérants) ou de polluants (Arora and Panosyan, 2019). Lorsque ces microorganismes sont capables de se développer dans plusieurs habitats extrêmes (ou réunissant plusieurs conditions extrêmes), ils sont qualifiés de polyextrêmophiles (Arora and Panosyan, 2019).

Les organismes thermophiles présentent des intérêts pour le fractionnement des biomasses à plusieurs égards. Ils montrent effectivement une diversité moléculaire importante et peuvent produire des enzymes thermostables, des enzymes ayant des températures de fusion (T_m) élevées ou des temps de demi-vie importants à haute température (Turner, Mamo and Karlsson, 2007). Dans les processus bioindustriels, les enzymes thermostables présentent de nombreux avantages : elles ouvrent des possibilités de stockage prolongé (à température ambiante), elles possèdent une tolérance accrue aux solvants organiques, elles présentent de faibles pertes d'activité au cours du temps, leur utilisation réduit les risques de contamination (à haute température) augmentant donc la productivité, les hautes températures utilisées augmentent la solubilité des réactifs (et des produits) résultant sur une vitesse de réaction plus importante et cette vitesse plus importante diminue la quantité d'enzymes nécessaires (Turner, Mamo and Karlsson, 2007; Bhalla *et al.*, 2013).

Il est désormais admis que les bactéries thermophiles produisant des enzymes thermostables (principalement cellulases et xylanases) constituent un des groupes les plus efficaces dans la dégradation des biomasses lignocellulosiques (Bhalla *et al.*, 2013). Différentes études ont démontré que l'identification des organismes thermophiles hémicellulolytiques produisant des GHs (appartenant dans tous les cas relevés aux familles 10 et 11) est prometteuse car elle permet aussi d'élargir le panel de xylanases identifiées, la compréhension des mécanismes d'hydrolyse des xylanases et les applications des xylanases (Collins, Gerday and Feller, 2005). Plusieurs bactéries thermophiles ont déjà été identifiées telles que des bactéries appartenant aux genres *Clostridium* (*C. Straminisolvens*, *C. thermocellum*, ...), *Aquifex*

(*Aquifex aeolicus*), *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. licheniformis*, ...), *Geobacillus* (*G. thermolovorans*, *G. sp.70PC53*, ...), *Caldicellulosiruptor* (*C. bescii*, *C. lactoaceticus* et *C. owensensis*) *Caldibacillus* (*Caldobacillus cellulovorans*), *Acidothermus* (*Acidothermus cellulolyticus*), *Thermotoga* (*Thermotoga neapolitana*) et bien d'autres (Beguin, Cornet and Aubert, 1985; Kim *et al.*, 2000; Kato *et al.*, 2004; Bhalla *et al.*, 2013; Ladeira *et al.*, 2015). Beaucoup d'études de bactéries thermophiles productrices de xylanases se focalisent sur le genre *Geobacillus* (Shulami *et al.*, 2007; De Maayer *et al.*, 2014; Daas *et al.*, 2018; Chadha *et al.*, 2019). Ce genre est en effet capable de produire des xylanases hautement thermostables (par exemple les souches DUSELR 13 et WSUCEF1) (Chadha *et al.*, 2019). Les xylanases de ces souches ont pu être démontrées comme plus actives et thermostables que des enzymes commerciales (Chadha *et al.*, 2019). Cette thermostabilité résulte d'interactions intermoléculaires et intramoléculaire (liaisons hydrogènes, ponts salins, forces hydrophobiques et liaisons disulfures) plus importantes au niveau des régions N-terminales (Cheng *et al.*, 2014; Basit *et al.*, 2018). Ces liaisons vont rendre la protéine plus compacte et alors plus résistante à la dénaturation (thermique ou par des modifications de pH) (Cheng *et al.*, 2014; Basit *et al.*, 2018).

Des champignons thermophiles et mésophiles ont déjà également été découverts avec des activités cellulases thermostables. Ils appartiennent principalement aux genres *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Trichoderma*, et *Sclerotium* et comprennent également les champignons *Sporotrichum thermophile*, *Thermoascus thermophile*, *Chaetomium thermophile* et *Coniochaeta ligniaria* (Bhalla *et al.*, 2013). *Trichoderma reesei* s'avère être particulièrement important pour la production de cellulases mais également de xylanases à l'échelle industrielle (Marty *et al.*, 2021). Ce champignon présente 34 gènes codant pour des cellulases et xylanases, les plus importantes étant des cellobiohydrolases (CBHI et CBHII) et des endo- β -1,4-xylanases (XYNI et XYNII) (Kubicek, 2013; Marty *et al.*, 2021). D'autres champignons thermophiles ont également été identifiés avec des activités xylanases importantes tels que *Thermomyces lanuginosus* (dont la température de croissance optimale est de 50°C) qui s'avèrent être l'un des producteurs les plus importants de xylanases thermostables (et exempts de cellulases) (Chadha *et al.*, 2019).

5.4. Productions d'enzymes lignocellulolytiques

Le coût élevé actuel des enzymes lignocellulolytiques constitue un obstacle majeur à l'utilisation de la biomasse lignocellulosique en biocarburants et en produits chimiques. Les productions actuelles d'enzymes lignocellulolytiques reposent sur l'utilisation de champignons principalement (Liu *et al.*, 2013). Ces individus comprennent par exemple *T. reesei*, *S. cerevisiae*, *Thermomyces lanuginosus* ou *Aspergillus niger* (Gusakov, 2011; Kumar and Shukla, 2018; Martzy *et al.*, 2021).

Comme précisé précédemment, l'activation de la production des capacités lignocellulolytiques des microorganismes se fait par différents systèmes de régulation et est souvent également liée à la régulation de la production de cellulases comme c'est le cas chez *T. reesei* (avec le régulateur XlnR) qui est vraiment un modèle d'étude de la production cellulolytique et hémicellulolytique chez les champignons filamenteux (Amore, Giacobbe and Faraco, 2013; Klaubauf *et al.*, 2014). Ces microorganismes vont produire et sécréter les enzymes. La sécrétion est principalement due à la taille importante des xylanes empêchant leur pénétration dans les cellules (Collins, Gerday and Feller, 2005). La transcription et la sécrétion des enzymes lignocellulolytiques sont également fortement régulées par la détection des oses libérés lors de la dégradation des polysaccharides. L'ensemble est coordonné alors par l'action de facteurs de transcription spécifiques à la voie de production (Brown, Ries and Goldman, 2014). Ceux-ci sont déjà fortement étudiés dans le cas des champignons hémicellulolytiques (Brown, Ries and Goldman, 2014; Liu and Qu, 2019). Dans le cas des bactéries, certaines études existent également concernant les mécanismes de production d'enzymes lignocellulolytiques. Par exemple, des bactéries telles que *Bacillus subtilis* (souche 168) et *Clostridium acetobutylicum* (souche ATCC 824) sont bien détaillées au niveau de leur production de xylanases (Chakdar *et al.*, 2016). Pour *B. subtilis*, il a été découvert qu'il y a 4 gènes majeurs pour la production de xylanases (*xynA*, *xynB*, *xynC* et *xynD*) tous localisés au niveau de l'ADN chromosomique. Des niveaux importants de xylose et xylane semblent induire la synthèse de β -xylosidases au niveau de ces gènes (principalement *xynB*) (Gärtner, Geissendörfer and Hillen, 1988; Chakdar *et al.*, 2016). Un gène, *xynP*, encode également pour un transporteur de sucres et un régulateur de transcription appelé XylR ici (Chakdar *et al.*, 2016). *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 présente également des gènes codant pour la production de xylanase (dont *xynB* et *xynD*). Elle possède également un gène, *xynT*, codant pour le transport de sucres

et le régulateur principal, XylR, qui va contrôler la transcription de *xynD* et *xynT* (Chakdar *et al.*, 2016).

Dans les deux systèmes (fongiques et bactériens), la régulation de la production d'enzymes hémicellulolytiques repose donc sur des facteurs de transcription, XlnR et XylR étant des bons exemples, et sur l'induction produite par la présence de certains oses tels que la xylose.

La production industrielle d'enzymes lignocellulolytiques peut se faire par fermentation à l'état solide (SSF) ou par fermentation submergée (SmF). Actuellement, les enzymes industrielles sont principalement produites en fermentation submergée parce qu'il est plus facile de contrôler le processus et qu'il y a plus de bioréacteurs industriels pour ce type de fermentation (Leite *et al.*, 2021). La fermentation à l'état solide est définie comme la culture de microorganismes sur des supports solides humides (supports inertes ou substrats insolubles) qui peuvent être utilisés comme sources de carbone et d'énergie (Hölker, Höfer and Lenz, 2004). Bien que la SSF soit généralement un processus plus long, la production d'enzymes y est plus élevée mais elle présente également d'autres avantages par rapport à la fermentation submergée comme le fait d'être plus proche des environnements naturels, la demande en énergie moins importante, une production réduite de déchet, ... ce qui peut la rendre plus rentable (Leite *et al.*, 2021). C'est à cet effet qu'un nombre croissant d'études se focalisent sur ce mode de fermentation avec différent microorganismes (principalement fongiques et filamenteux) (Pandya and Gupte, 2012; Sandra and Laura, 2015; Alokika and Singh, 2020; Leite *et al.*, 2021).

Les utilisations industrielles des microorganismes sont donc intéressantes pour la déconstruction des biomasses lignocellulosiques comme précisé lors des points précédents. Cependant, la production industrielle d'enzymes lignocellulolytiques est sujette à des phénomènes de répression catabolique du carbone dus à la préférence de consommation du glucose (Brown, Ries and Goldman, 2014). En effet, l'action de protéines répressives chez les champignons (protéines CreA, CRE1 et Cre1) et *S. cerevisiae* (protéine Mig1p) empêche l'utilisation de sources alternatives de carbone en inhibant la transcription d'enzymes lignocellulolytique secrétée ou produite intracellulairement (Brown, Ries and Goldman, 2014). Ces protéines vont être induites lors de la détection de sources de carbones plus favorables (tels que le glucose) par les individus (Brown, Ries and Goldman, 2014).

5.5. Microorganismes hémicellulolytiques

Les microorganismes producteurs strictement d'enzymes hémicellulolytiques (principalement xylanase) viennent de niches écologiques diverses et sont donc très variés. Ils comprennent principalement des champignons filamenteux des genres *Trichoderma* (seulement certaines souches comme *T. reesei* SAF3), *Aspergillus*, *Fusarium* et *Pichia* et des bactéries des genres *Bacillus*, *Geobacillus*, *Cellulomonas*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Paenibacillus*, *Arthrobacter*, *Microbacterium*, *Streptomyces*, *Actinomadura*, *Nonomuraea*, *Pseudoxanthomonas* et *Rhodothermus* (Kar *et al.*, 2006; Motta, Andrade and Santana, 2013; Chakdar *et al.*, 2016). Plusieurs bactéries ont déjà été isolées et appartiennent aux genres *Bacillus*, *Geobacillus*, *Thermobacillus*, *Thermotoga*, *Acidothermus*, *Cellulomonas*, *Paenibacillus*, *Thermoanaerobacterium*, *Actinomadura*, *Alicyclobacillus*, *Anoxybacillus*, *Nesterenkonia*, et *Enterobacter* (Touzel *et al.*, 2000; Watanabe *et al.*, 2007; Bhalla *et al.*, 2013). Les xylanases bactériennes thermostables sont d'ailleurs préférées aux xylanases fongiques du fait de leurs températures optimales plus élevées et une thermostabilité générale plus importante (suite aux différents liaisons tels que les ponts disulfure) rendant l'identification de bactéries thermostables strictement hémicellulolytiques intéressantes (Yeoman *et al.*, 2010; Bhalla *et al.*, 2013). L'identification de ces individus strictement hémicellulolytiques est très importante pour des utilisations industrielles. En effet, par exemple dans le cas du désencrage de certains papiers, des productions de xylanases sont nécessaires mais pas de cellulases car elles vont conduire à l'hydrolyse des fibres de cellulose, ce qui va diminuer la résistance de la pâte de papier (Subramaniyan and Prema, 2000; Maity *et al.*, 2012; Desai and Iyer, 2016).

Parmi les individus les plus intéressants pour la production d'enzymes hémicellulolytiques, on retrouve particulièrement les bactéries provenant du genre *Geobacillus*, et *Thermobacillus* qui présentent des caractéristiques de thermophilie tels que *Geobacillus thermoleovorans*, *Geobacillus stearothermophilus*, *Thermobacillus composti* ou *Thermobacillus xylanilyticus* qui est la bactérie étudiée dans le cadre de cette thèse (Touzel *et al.*, 2000; Sharma, Adhikari and Satyanarayana, 2007; Shulami *et al.*, 2007; Watanabe *et al.*, 2007). Ces bactéries sont particulièrement retrouvées au niveau du sol et des composts (ou des niches plus particulières telles que des mines d'or) et présentent les mêmes caractéristiques que les bactéries lignocellulolytiques (présence de régulateurs importants de transcription comme XylR) (Shulami *et al.*, 2007; Bergdale, Hughes and Bang, 2014; Daas *et al.*, 2016). De plus, leur grande variabilité génétique a pu démontrer leur capacité variable de fractionnement des

hémicelluloses (par la production de différentes hémicellulase), ce qui les rend également intéressante dans le cadre d'optimisation de souche par ingénierie génétique (De Maayer *et al.*, 2014).

6. *Thermobacillus xylanilyticus*

6.1. Origine et généralités sur la bactérie

Thermobacillus xylanilyticus a été isolée d'un sol agricole sous un tas de fumier dans le nord de la France et est déposée à la Collection Nationale de Cultures Microbiennes (CNCM I-1017). Les cellules ont la forme de bacilles mesurant 0,4-0,5 sur 2,0-2,8 μm et peuvent présenter des endospores ellipsoïdales se formant dans les sporanges au centre des cellules (Figure 10). Cette bactérie est strictement aérobie, Gram-positif et thermophile. La croissance de la bactérie est optimale à 55°C et à pH compris entre 6,5 et 8,5. Du CO₂ et du bicarbonate sont également requis afin de réduire le temps de latence avant croissance de la bactérie (Touzel *et al.*, 2000).

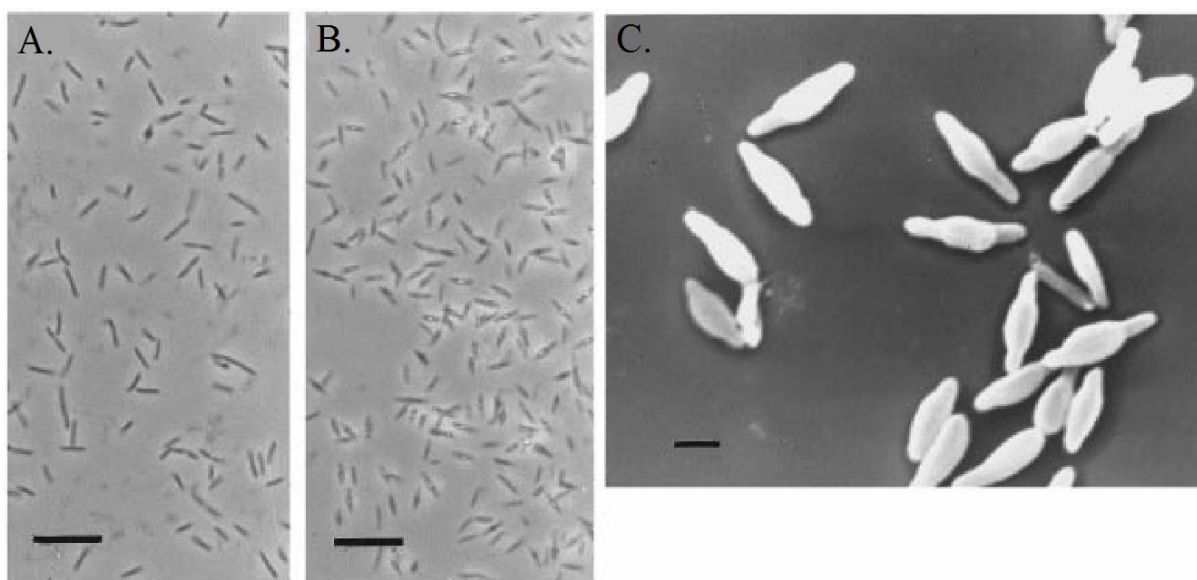


Figure 10 : Morphologie de *Thermobacillus xylanilyticus* observée par microscopie optique et électronique à balayage (Barre = 10 μm pour les images de microscopie optique et 1 μm pour les images de microscopie électronique à balayage). A : Cellules à l'état végétatif ; B : Cellules en cours de sporulation ; C : Cellules en phase de croissance exponentielle tardive affichant des sporanges gonflés. (Tiré de Touzel *et al.*, 2000).

6.2. Potentiel enzymatique de la bactérie pour le fractionnement des biomasses lignocellulosiques

L'arsenal enzymatique de cette bactérie est composé de plusieurs enzymes dont certaines caractérisées telles que deux xylanases (appartenant aux familles GH10 et GH11), une

arabinofuranosidase GH51 et une féruloyl estérase CE1 (Samain, Debeire and Touzel, 1997; Debeche *et al.*, 2000; Rakotoarivonina *et al.*, 2011). *T. xylanilyticus* n'a pas d'activité cellulase connue (Samain, Debeire and Touzel, 1997; Rakotoarivonina *et al.*, 2012, 2022) et est considérée comme étant hémicellulolytique. Cette bactérie est capable d'adapter directement sa production enzymatique à la biomasse lignocellulosique utilisée pour sa croissance (Rakotoarivonina *et al.*, 2012). L'enzyme principale produite par cette bactérie est la xylanase Tx-xyn11 de la famille GH11 sécrétée dans le milieu de culture lors de la croissance de la bactérie. *T. xylanilyticus* produit également d'autres enzymes mais intracellulairement : une xylanase GH10, une arabinosidase GH51 et une estérase CE1 (Rakotoarivonina *et al.*, 2012; Samain *et al.*, 1992). Plusieurs études ont montré l'intérêt des hémicellulases de *T. xylanilyticus* pour hydrolyser diverses biomasses lignocellulosiques. Par exemple, l'action hydrolytique des xylanases Tx-xyn10 et Tx-xyn11 en présence de son de blé et de xylanes solubles et insolubles, présentant divers taux de substitution par l'arabinose, adéjà été étudiée (Beaugrand *et al.*, 2004). Dans le cas du son de blé, le rendement d'hydrolyse est deux fois plus élevé par l'action de Tx-xyn11 (50 % des xylanes hydrolysés après 24 heures de réaction) comparativement à Tx-xyn10 (25 % d'hydrolyse des xylanes du son de blé). À l'inverse des résultats obtenus avec le son de blé, Tx-xyn10 est 2 fois plus efficace que Tx-xyn11 sur des xylanes solubles présentant des taux Ara/Xyl élevés. La xylanase Tx-xyn11 permet d'hydrolyser respectivement 20 % et 56 % des xylanes de paille de blé non prétraitée et prétraitée à l'ammoniaque (Rémond *et al.*, 2010). Plus récemment, la xylanase Tx-xyn11 a été mise en œuvre pour produire des xylo-oligosaccharides prébiotiques à partir de son de blé (Ríos-Ríos *et al.*, 2021).

Il est également possible de produire des cocktails enzymatiques hémicellulolytiques après croissance de la bactérie en présence de son ou de paille de blé. Les cocktails sont alors obtenus en mélangeant le milieu extracellulaire et les protéines intracellulaires produites lors de la croissance en présence des différents substrats lignocellulosiques. Les cocktails produits sont efficaces pour hydrolyser le son et de la paille de blé en libérant des pentoses et des composés phénoliques (Rakotoarivonina *et al.*, 2016). Ces cocktails ont également été utilisés pour produire de l'acide férulique à partir de son de blé (Dupoirion *et al.*, 2017, 2018).

Une caractéristique importante des enzymes produites par cette bactérie est leur capacité à fonctionner dans des conditions drastiques de T° et de pH (Samain *et al.*, 1992; Debeche *et al.*, 2000; Rakotoarivonina *et al.*, 2011). Par exemple, la xylanase principale sécrétée par la souche, Tx-xyn11 possède une thermostabilité lui permettant de conserver 60 à 70 % d'activité résiduelle après 24 heures d'incubation à 60°C et sa demi-vie est de 40 et 25 minutes à 75 et

80°C respectivement (Samain *et al.*, 1992; Harris *et al.*, 1997; Samain, Debeire and Touzel, 1997; Connerton *et al.*, 1999).

L'induction de la production d'enzymes hémicellulolytiques chez *T. xylanilyticus* se fait par l'utilisation de substrats complexes tels que du xylane de hêtre, de la paille de blé ou du son de blé (Rakotoarivonina *et al.*, 2012). La production ne se fait pas en présence de glucose. La concentration en oses est probablement un élément clé comme pour *Paenibacillus curdlanolyticus* (Waeonukul *et al.*, 2008). La production pourrait alors fortement dépendre de phénomènes de répression catabolique du carbone (Solopova *et al.*, 2014). Cependant, les mécanismes métaboliques exacts de production enzymatique de la bactérie ne sont pas encore identifiés. Un récent séquençage génomique a permis de donner un aperçu du génome de cette bactérie et pourrait permettre d'identifier à l'avenir les mécanismes exactes de production enzymatique chez *T. xylanilyticus* (Rakotoarivonina *et al.*, 2022).

Le séquençage du génome de *T. xylanilyticus* a permis également de mettre en évidence la présence de 94 gènes codant pour des GHs, 16 gènes pour des CEs, 45 gènes pour des glycosyl transférases et 2 gènes pour des lyases de polysaccharides (Rakotoarivonina *et al.*, 2022). Ainsi plusieurs estérases et β -xylosidases et d'autres xylanases identifiées dans le génome ont été obtenues par clonage et expression hétérologue et en cours de caractérisations en présence de divers substrats. Ceci ouvre donc des perspectives pour la production et la caractérisation de nouvelles enzymes pour le fractionnement et la valorisation de biomasses lignocellulosiques à partir de cette bactérie.

7. Evolution de souches bactériennes

Comme précisé précédemment, le coût élevé actuel des enzymes lignocellulolytiques constitue un obstacle majeur à l'utilisation de la biomasse lignocellulosique (Liu *et al.*, 2013). Pour obtenir une hydrolyse efficace des matériaux lignocellulosiques en comparaison à l'hydrolyse de l'amidon avec des enzymes industrielles, il a été estimé qu'il faudrait 40 à 100 fois plus d'enzymes lignocellulolytiques par rapport aux amylases utilisées pour l'hydrolyse de l'amidon suite au faible rendement d'hydrolyse (Liu *et al.*, 2013). L'amélioration des systèmes enzymatiques lignocellulolytiques dépend fortement de la conception de l'ensemble de la voie technologique (Liu *et al.*, 2013). Cependant, le métabolisme des différents microorganismes impliqués est également à considérer. En effet, des phénomènes de dégénérescence de souches peuvent amener à des pertes de productivité comme c'est le cas lors de l'utilisation de *T. reesei* à l'échelle industrielle (Marty *et al.*, 2021). Cela s'inscrit dans les recherches actuelles de l'impact des phénomènes d'hétérogénéité microbienne sur la robustesse des bioprocédés (Delvigne and Goffin, 2014).

7.1. Dégénérescence de souches bactériennes

Lors de cultures longues (par exemple des cultures successives), les souches bactériennes subissent des modifications qui affectent à la fois leurs caractéristiques morphologiques et physiologiques et génèrent des mutants avec des capacités de production (de métabolites extracellulaires par exemple) altérées. L'activité principale ou d'intérêt de la bactérie diminue au cours du temps. Ce phénomène est appelé la dégénérescence de souches (Peng and Liang, 2020). Ce terme dégénérescence a d'ailleurs été défini (par Reusser en 1963) comme le fait de perdre la capacité de produire des composés chimiques souhaitables. Ce phénomène est donc influencé par la capacité de la population à conserver les caractéristiques morphologiques ou biosynthétiques souhaitables de génération en génération (Reusser, 1963).

Il s'agit d'un phénomène déjà observé chez de nombreux microorganismes d'intérêts industriels comme certaines bactéries du genre *Clostridium* qui sont productrices de solvants (solvantogènes), du genre *Streptomyces* produisant des antibiotiques ou pour la synthèse de γ PGA (acide polyglutamique) chez *Bacillus subtilis* (Jones, Van Der Westhuizen and Long, 1982; Gravius *et al.*, 1993; Peng and Liang, 2020). Les baisses d'activités pourraient être sources de pertes économiques (par exemple en limitant les produits de fermentation) (Peng

and Liang, 2020). Cela existe également par exemple pour des champignons d'intérêt tels que *T. reesei* pour la dégradation des biomasses lignocellulosiques (par suite leur production de cellulases) (Martzy *et al.*, 2021). Elles doivent donc être maîtrisées pour améliorer les procédés de cultures.

L'origine principale des phénomènes de dégénérescence des souches est l'apparition de mutants par instabilité génétique bactérienne ou par différents stress comme le manque de nutriments, les stress acides, alcalins, thermiques et osmotiques, ou la présence de produits toxiques (Gravius *et al.*, 1993; Kashket and Zhi-Yi Cao, 1995; Peng and Liang, 2020). Cela mène à l'apparition d'une hétérogénéité de population au sein de la culture.

Les mécanismes cellulaires impliqués dans la dégénérescence de souche sont donc la variabilité du contenu génétique (Schroeder *et al.* 2018), la régulation de l'expression génique par rétroaction (Smits *et al.* 2006) et les mécanismes d'épigénétisme (Smits, Kuipers and Veening, 2006; Casadesús and Low, 2013; Schroeder *et al.*, 2018).

7.2. Notion de *fitness*

La notion de *fitness* est essentielle dans les études de dégénérescence des souches bactériennes mais également pour l'optimisation de souches bactériennes (Dragosits and Mattanovich, 2013). Elle correspond à la sélection des traits (ou caractéristiques) métaboliques (suite à un meilleur phénotype) (Dettman *et al.*, 2012). Elle représente donc l'adaptation d'un microorganisme à certaines conditions qui permettent le développement de populations adaptées qui vont être sélectionnées au cours de générations. L'évolution des différents traits au cours d'une culture est alors exprimée avec la valeur de *fitness* qui peut être suivie par des méthodes standards de laboratoire (ex : mesure de la croissance, mesure de l'activité métabolique, ...) (Dettman *et al.*, 2012). Une augmentation du *fitness* est donc souvent égale à une évolution positive du phénotype (par exemple la résistance à certains stress). Elle est détectée par une fréquence plus importante des individus présentant le phénotype sélectionné dans la population en comparaison avec la souche originelle (Dettman *et al.*, 2012). Par exemple, lors d'adaptation d'*E. coli* à l'utilisation du lactose, les clones mutés au niveau de l'opéron *lac* auront tendance à être plus sélectionnés que les clones non mutés. Ils ont donc un *fitness* plus important sur des environnements différents au niveau de la concentration en lactose (Quan *et al.*, 2012).

Les indicateurs utilisés pour indiquer des changements de *fitness* sont principalement le taux de croissance maximale, μ_{\max} , le taux de survie (à des composés toxiques dans le milieu par exemple) ou le rendement absolu en biomasse (Dragosits and Mattanovich, 2013). L'évolution du *fitness* est exprimée généralement en fonction du nombre de générations (Dragosits and Mattanovich, 2013). Cependant, le nombre cumulatif de division cellulaire (ou CCD) peut aussi être utilisé et plus intéressant car le taux de mutations est moins sous-estimé comme démontré dans une étude comparative lors d'une évolution d'*E. coli* pendant 40 jours (Lee *et al.*, 2011). En effet, le nombre de générations ne reflète pas le nombre réel de cellules dans une culture à un temps donné, à l'opposé du CCD qui est bien plus proche du nombre de cellules en présence à un temps donné (Lee *et al.*, 2011).

Les mutations sont importantes à considérer car elles sont à la base des changements génétiques et de la sélection des phénotypes (Dragosits and Mattanovich, 2013). Les différents types de mutations rencontrés sont par exemple les polymorphismes mononucléotidiques (*single-nucleotide polymorphisms* ou SNPs), les petites insertions et délétions (ou indels), des mouvements d'éléments transposables (*insertion sequence* ou IS) ou de plus larges insertions et délétions (Conrad, Lewis and Palsson, 2011; Dragosits and Mattanovich, 2013) (Figure 11B). Ces changements peuvent être détectés par séquençage du génome entier (*whole genome sequencing* ou WGS) de la population évoluée en comparaison avec la souche d'origine (Schoumans *et al.*, 2010; Conrad, Lewis and Palsson, 2011). Toutes ces mutations contribuent à augmenter ou diminuer l'expression de certains gènes (en agissant directement sur la région promotrice d'un gène par exemple), à modifier ou à diminuer leurs fonctions (en modifiant la séquence génétique) ou encore à modifier les processus de régulation (en modifiant un régulateur transcriptionnel) comme dans le cas de l'opéron *lac* précédemment cité où différents types de mutations ont pu être relevés et avaient tendance à améliorer le *fitness* d'*E. coli* lors de croissances avec du lactose (Quan *et al.*, 2012; Dragosits and Mattanovich, 2013).

L'évolution du *fitness* est plus importante au cours des premières générations (Figure 11A) (Hua *et al.*, 2007; Barrick *et al.*, 2009). Barrick *et al.* (2009) ont montré que lors de cultures d'*E. coli* pendant 40000 générations (environ 20 ans), des SNPs ont eu lieu tout au long des cultures. Certaines de ces mutations, qui ont été victimes d'interférences clonales et ont créé des lignées minoritaires, peuvent être dues à la présence de niches environnementales différentes au sein de la culture (Barrick *et al.*, 2009). Avec cette étude, ils ont pu démontrer qu'il y a une

certaine évolution des mutations qui conduit à une baisse croissante des bénéfices des mutations supplémentaires (Figure 11A) (Barrick *et al.*, 2009).

Le pourcentage d'évolution du *fitness* est également influencé par la pression de sélection appliquée au cours des cultures (par exemple, une acidité croissante). Certaines études de cultures de *E.coli* et *S. cerevisiae* montrent une augmentation de 50 à 100 % après 100 à 500 générations (pour des croissances dans des conditions limitées en glycérol ou glucose) alors que d'autres études de *Geobacter sulfurreducens* montrent une augmentation jusqu'à 1000 % (ici représenté par le taux de réduction du fer) après 24 mois de cultures (Tremblay *et al.*, 2011; Dragosits and Mattanovich, 2013).

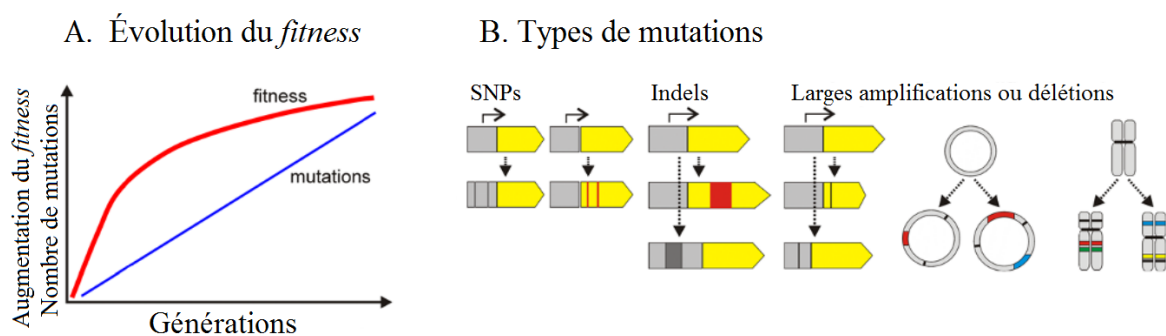


Figure 11: Lien entre le nombre de mutations et la notion de *fitness*. A : Évolution du *fitness* et du nombre de mutations en fonction du nombre de générations ; B : Différents types de mutations rencontrées en optimisation de souches par cultures successives (tiré de Dragosits & Mattanovich, 2013).

7.3. Evolution de souches pour la production de molécules d'intérêts

Pour augmenter l'efficacité de l'hydrolyse enzymatique, l'activité catalytique individuelle mais également synergétique ont besoin d'être augmentées ainsi que la thermostabilité des enzymes pour éviter l'inactivation thermique (Viikari *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2013). D'autres paramètres sont également intéressants à améliorer en fonction des utilisations des enzymes. Ces paramètres incluent la stabilité face à des changements de pH, face à des inhibiteurs ou l'adsorption des enzymes sur la lignine. Une solution possible est le

développement de systèmes enzymatiques personnalisés (Liu *et al.*, 2013). Afin d'obtenir des systèmes enzymatiques personnalisés, deux alternatives sont possibles, la recherche de nouvelles enzymes plus adaptées dans les niches écologiques décrites précédemment ou par ingénierie des protéines (Liu *et al.*, 2013). Par exemple, dans le cas de *Thermobacillus xylanilyticus*, une xylanase GH11 mutante, Tx-xyl-SS3, a pu être obtenue avec une thermostabilité améliorée (avec un temps de demi vie 10 fois supérieur à l'enzyme sauvage à 70°C) par l'ajout de ponts disulfures (Paës and O'Donohue, 2006).

Les stratégies d'ingénierie métabolique peuvent se concentrer sur différents points, les voies de signalisation et les éléments de régulation de la transcription (tels que ceux décrits précédemment XlnR et XylR), les voies de sécrétion, orienter directement les flux métaboliques ou altérer la morphologie des cellules pour les champignons (ramification des hyphes) (Liu *et al.*, 2013). Ces modifications peuvent se faire seulement après des analyses transcriptomiques, protéomiques et métabolomiques permettant une meilleure compréhension des processus biologiques menant à la production des enzymes lignocellulolytiques (Liu *et al.*, 2013).

Une autre alternative s'avère être l'évolution de souches microbiennes. Les méthodes d'évolution de souches se concentrent par exemple sur l'utilisation de l'évolution adaptative en laboratoire (*adaptive laboratory evolution* ou ALE) permettant d'éviter l'utilisation d'outils de modification génomique (Dragosits and Mattanovich, 2013). Au cours de ce genre d'expérience, des souches microbiennes sont successivement cultivées (en culture continue ou par cultures successives) afin d'améliorer leur *fitness* au cours des générations (Portnoy, Bezdán and Zengler, 2011; Dragosits and Mattanovich, 2013). Des bactéries hémicellulolytiques ont déjà été améliorées en utilisant ces méthodes tels que *Thermus thermophilus* pour l'utilisation conjointe de xylose et glucose sans phénomène de répression catabolique ou la souche WSCUF1 de *Geobacillus* (déjà présenté précédemment) afin d'améliorer son activité laccase (d'un facteur 20-fois) (Cordova *et al.*, 2016; Govil *et al.*, 2020). Ce genre de méthodes d'évolution permet l'accumulation de mutations bénéfiques pour la nouvelle souche en résultant (Figure 11) (Dragosits and Mattanovich, 2013)

En plus de ces modifications, l'optimisation de la production des enzymes d'intérêt peut également se faire par des moyens plus classiques tels que la modification des conditions de culture et de production. Cela a déjà pu être réalisé avec *Bacillus licheniformis* BCLLNf-01 qui a vu sa production de carboxyméthylcellulases améliorées par la modification du milieu de

culture (au niveau de la concentration de la source de carbone) et du pourcentage d'inoculum utilisé (da Silva, Melo and Luna Finkler, 2021).

8. Etude de l'hétérogénéité phénotypique par cytométrie en flux

Comme vu lors des phénomènes d'évolution de souches microbiennes, l'hétérogénéité phénotypique est un facteur important à considérer en biotechnologie car elle implique la coexistence de cellules avec différents phénotypes (et donc comportements et états physiologiques). Dans les applications industrielles, il faut donc pouvoir caractériser et prédire le phénotype des cellules individuelles car il impacte directement le rendement et donc la performance du bioprocédé (Lencastre Fernandes *et al.*, 2011). Cette caractérisation était préalablement faite de manière indirecte, en mesurant certains paramètres comme le pH, la densité cellulaire, le taux de consommation de substrat et la formation de produit (Lencastre Fernandes *et al.*, 2011). Cependant, suite à l'amélioration des techniques utilisées dans le milieu de la biologie moléculaire et des méthodes expérimentales pour l'analyse des cellules individuelles, cette caractérisation a pu être abordée de manière beaucoup plus détaillée via des mesures de l'expression de gènes individuels, soit au niveau global soit en mesurant l'expression de gènes pertinents. De plus, le nombre d'études basées sur des méthodes capables de quantifier les propriétés de cellules individuelles a augmenté de façon exponentielle au cours des dernières années (Lencastre Fernandes *et al.*, 2011; Sampaio and Dunlop, 2020).

Les méthodes génétiques globales permettant d'étudier l'hétérogénéité phénotypique au niveau la variabilité génétique sont, pour les plus importantes, l'analyse du polymorphisme de la longueur des fragments amplifiés, l'électrophorèse en champ pulsé, les micropuces à ADN et la PCR des éléments d'ADN répétitifs (Lencastre Fernandes *et al.*, 2011). Ces analyses sont cependant spécifiques à l'expression des gènes et sont coûteuses en termes de temps et de moyens. C'est pour compenser ces deux inconvénients que d'autres méthodes ont été développées pour étudier l'hétérogénéité phénotypique au cours des cultures microbiennes. Celles-ci comprennent l'utilisation de systèmes rapporteurs, la coloration par marqueurs fluorescents, la microscopie, la cytométrie en flux (la méthode la plus utilisée), la spectroscopie Raman ainsi que l'analyse et la culture en microfluidiques (Lencastre Fernandes *et al.*, 2011; Heins and Weuster-Botz, 2018).

Les méthodes microscopiques fournissent des outils puissants pour étudier l'hétérogénéité microbienne avec une résolution à l'échelle d'une seule cellule. La microscopie à fluorescence et la microscopie optique, couplées à l'analyse d'images, sont en effet très utiles pour l'étude des cellules individuelles dans les populations en fermentation et contribuent à l'évolution des connaissances sur les phénomènes d'hétérogénéité (Lencastre Fernandes *et al.*, 2011).

Cependant elles ont été progressivement remplacées par l'utilisation de la cytométrie en flux, qui permet de travailler à plus haut débit que la microscopie, pour l'analyse de souches rapporteuses ou lors de l'utilisation de marqueurs fluorescents (Lencastre Fernandes *et al.*, 2011). Ces souches rapporteuses comprennent des gènes rapporteurs qui codent généralement pour une enzyme dont l'activité peut être testée facilement, soit directement, soit après lyse des cellules (Lencastre Fernandes *et al.*, 2011). Les marqueurs fluorescents tels que l'iodure de propidium (PI) permettent d'évaluer d'autres paramètres physiologiques ou d'être une alternative à la conception parfois longue de souches rapporteuses (Lencastre Fernandes *et al.*, 2011). Il s'agit souvent de colorants permettant d'évaluer la viabilité des cellules et donc de comparer la viabilité de différentes souches ou populations ou d'évaluer les changements de viabilité au cours d'une culture (Heins and Weuster-Botz, 2018). La cytométrie en flux et les marqueurs fluorescents utilisés dans le cadre de cette étude seront présentés dans les sections ci-dessous.

La spectroscopie Raman est également utilisée pour l'étude de l'hétérogénéité en ligne. Cette technique est basée sur la diffusion de la lumière à longueur d'onde décalée résultant de collisions inélastiques de photons avec les molécules, lors de l'excitation de l'échantillon par une lumière monochromatique (Ulber, Frerichs and Beutel, 2003; Lencastre Fernandes *et al.*, 2011). Il s'agit donc d'une méthode non destructive permettant l'obtention d'informations au niveau moléculaire sans utilisation de marqueurs fluorescents ou modification de souches (Lencastre Fernandes *et al.*, 2011). Avec des analyses à l'échelle de la cellule unique, il a été prouvé que des cellules bactériennes morphologiquement semblables peuvent présenter des spectres Raman différents suite à des contenus intracellulaires différents (Schuster, Urlaub and Gapes, 2000; Lencastre Fernandes *et al.*, 2011).

Les dernières méthodes se développant particulièrement au cours de ces dernières années sont l'utilisation de bioréacteurs à échelle réduite tels que les dispositifs microfluidiques, également appelés réacteurs monocellulaires (Heins and Weuster-Botz, 2018). Ceux-ci seront également décrits dans les sections suivantes car ils représentent une des alternatives les plus importantes (et également complémentaires) à la cytométrie en flux largement utilisée actuellement.

Avant cela, une définition de l'hétérogénéité phénotypique est nécessaire.

8.1. Hétérogénéité phénotypique

L'hétérogénéité phénotypique est une des bases des phénomènes de dégénérescence de souche bactérienne. Elle représente la présence de phénotypes différents au sein d'une culture. Les sources de ces différences sont diverses et variées. Elles reprennent par exemple le contenu génétique des cellules (populations différentes d'un point de vue génétique), l'historique des cellules, les états du cycle cellulaire, l'âge des cellules ou les conditions micro-environnementales des cellules (Delvigne *et al.*, 2014; Heins and Weuster-Botz, 2018). Des populations isogéniques de cellules microbiennes peuvent donc présenter de l'hétérogénéité phénotypique malgré des mêmes conditions macroscopiques de culture (Delvigne and Goffin, 2014; Heins and Weuster-Botz, 2018). Cette hétérogénéité phénotypique trouve son origine dans deux composantes qui sont une source intrinsèque de bruit résultant de la stochasticité des réactions biochimiques entre les composants moléculaires (au niveau de l'anabolisme et du catabolisme des macromolécules) et une source extrinsèque de bruit résultant de la variabilité du nombre de copies de ces composants moléculaires (Figure 12) (Swain, Elowitz and Siggia, 2002; Delvigne and Goffin, 2014). La stochasticité des réactions biochimiques se situe plus particulièrement au niveau de l'expression des gènes mais cela peut également se retrouver au niveau des réactions métaboliques (Delvigne *et al.*, 2014). Ces deux mécanismes de stochasticité peuvent se produire simultanément dans les cellules microbiennes et peuvent avoir des répercussions l'une sur l'autre. Par exemple, la stochasticité de l'expression des gènes a des répercussions sur l'expression d'enzymes métaboliques, ce qui a un impact sur la stochasticité des réactions métaboliques (Delvigne *et al.*, 2014). La composante intrinsèque amène de l'hétérogénéité dans des populations isogéniques malgré des conditions homogènes de culture. À l'inverse, la composante extrinsèque de l'hétérogénéité peut directement être influencée par les conditions micro-environnementales de chaque cellule microbienne (Baert *et al.*, 2016).

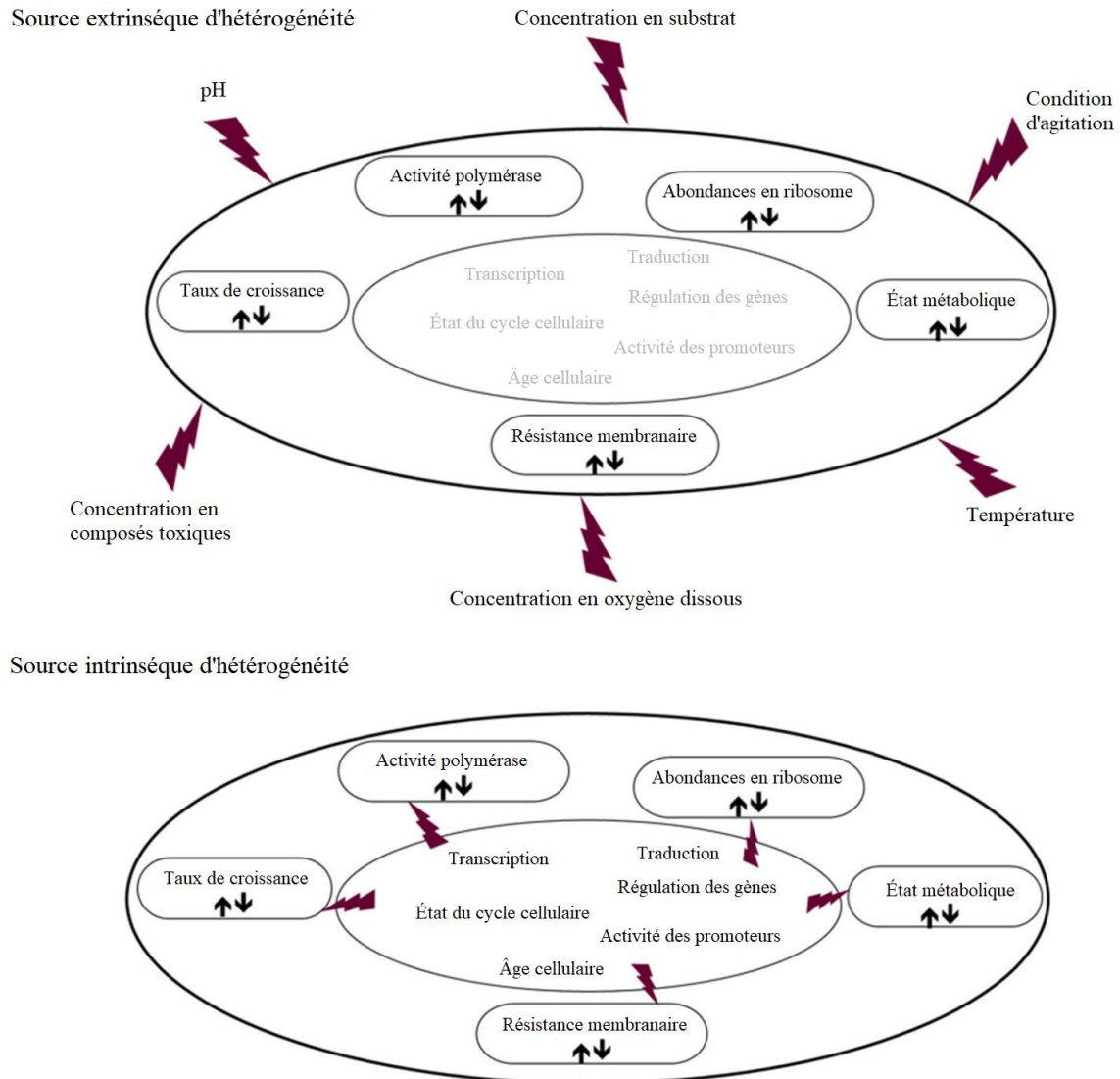


Figure 12 : Illustration des sources d’hétérogénéité extrinsèque et intrinsèque et des facteurs les influençant(tiré de Heins & Weuster-Botz, 2018).

Les cultures à large échelle (cultures en bioréacteurs) sont sujettes à des gradients (de température, pH, oxygène ou substrat) plus importants qui créent donc une plus grande hétérogénéité dans les conditions environnementales des cellules (Figure 13). Celle-ci est souvent définie comme la source d’hétérogénéité principale des cellules dans les bioprocédés industriels (Delafosse *et al.*, 2015; Delvigne *et al.*, 2018). Les impacts réels sont encore méconnus bien qu’il a déjà été plusieurs fois prouvé que cette hétérogénéité phénotypique peut être une source majeure de problèmes dans les bioprocédés (Delvigne and Goffin, 2014; Delvigne *et al.*, 2014).

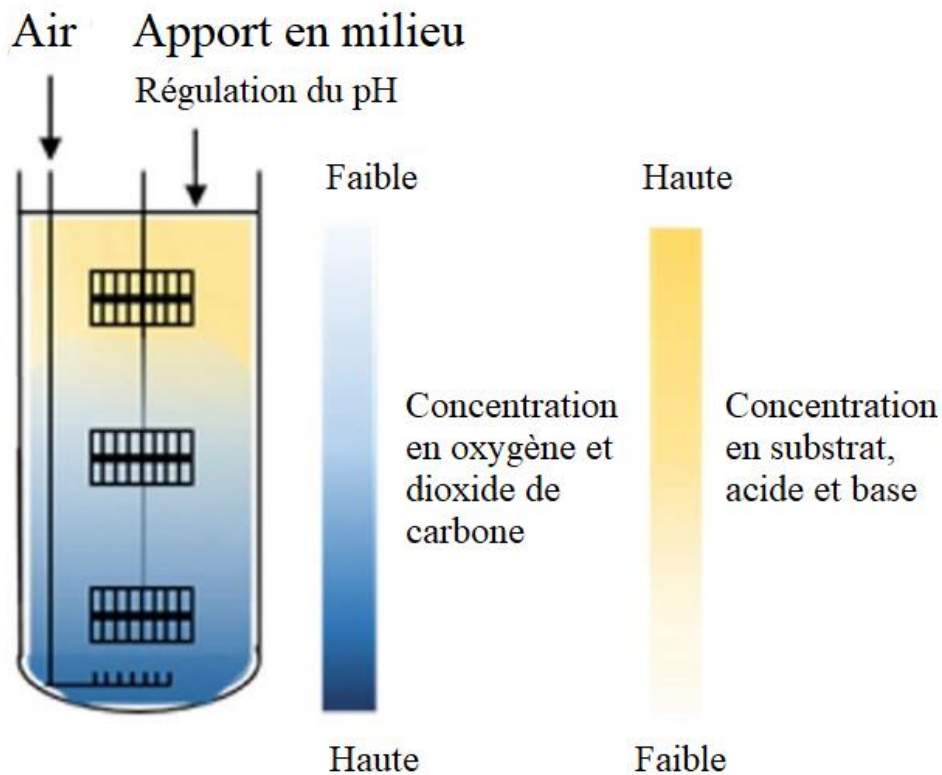


Figure 13 : Gradients présents dans les bioréacteurs agités (tiré de Delvigne et al., 2018).

En effet, différentes applications industrielles ont pu être impactées par l'apparition d'une population spécifique de cellules non-productrices ou peu-productrices (Delvigne *et al.*, 2014). Ces applications comprennent par exemple la production de solvants par des cellules appartenant au genre *Clostridium*, la production d'acide lactobionique ou la production de protéines recombinantes (Delvigne *et al.*, 2014).

8.2. Etude de l'hétérogénéité et cytométrie en flux

La cytométrie en flux a vu son intérêt augmenter depuis les années 2010 jusqu'à devenir aujourd'hui la méthode de choix pour la caractérisation et la classification des populations microbiennes (Heins and Weuster-Botz, 2018). La cytométrie en flux (*Flow cytometry*) est un outil qui permet de compter, trier et examiner des objets dans une suspension liquide (tels que des microorganismes). Cette technique s'appuie sur les propriétés de diffusion, d'excitation et d'émission de la lumière pour mesurer différents paramètres de ces objets tels que des paramètres

cellulaires (Lencastre Fernandes *et al.*, 2011). Un cytomètre en flux est composé de 3 parties : le système fluide, le système optique et le système électronique (Figure 14). Le système fluide transporte les cellules d'une solution à travers l'instrument pour obtenir les données. Il inclut deux composants : un fluide entraîneur (ou *sheath fluid*) et des conduits sous pression. Le liquide entraîneur est un diluant (généralement du PBS), qui est injecté dans la chambre d'écoulement (*flow chamber*) par les conduits sous pression. Une conduite d'air sous pression injecte également les cellules en suspension du tube d'échantillon jusqu'à la chambre d'écoulement. Le flux de cellules devient un noyau central (*central core*) dans un flux coaxial (*coaxial flow*) fait par le flux de liquide entraîneur (Adan *et al.*, 2017). La différence de pression entre les deux flux permet d'aligner les cellules qui vont passer à travers un laser. Le débit de cellules (ou taux d'injection) peut directement être défini par l'expérimentateur du cytomètre (Adan *et al.*, 2017).

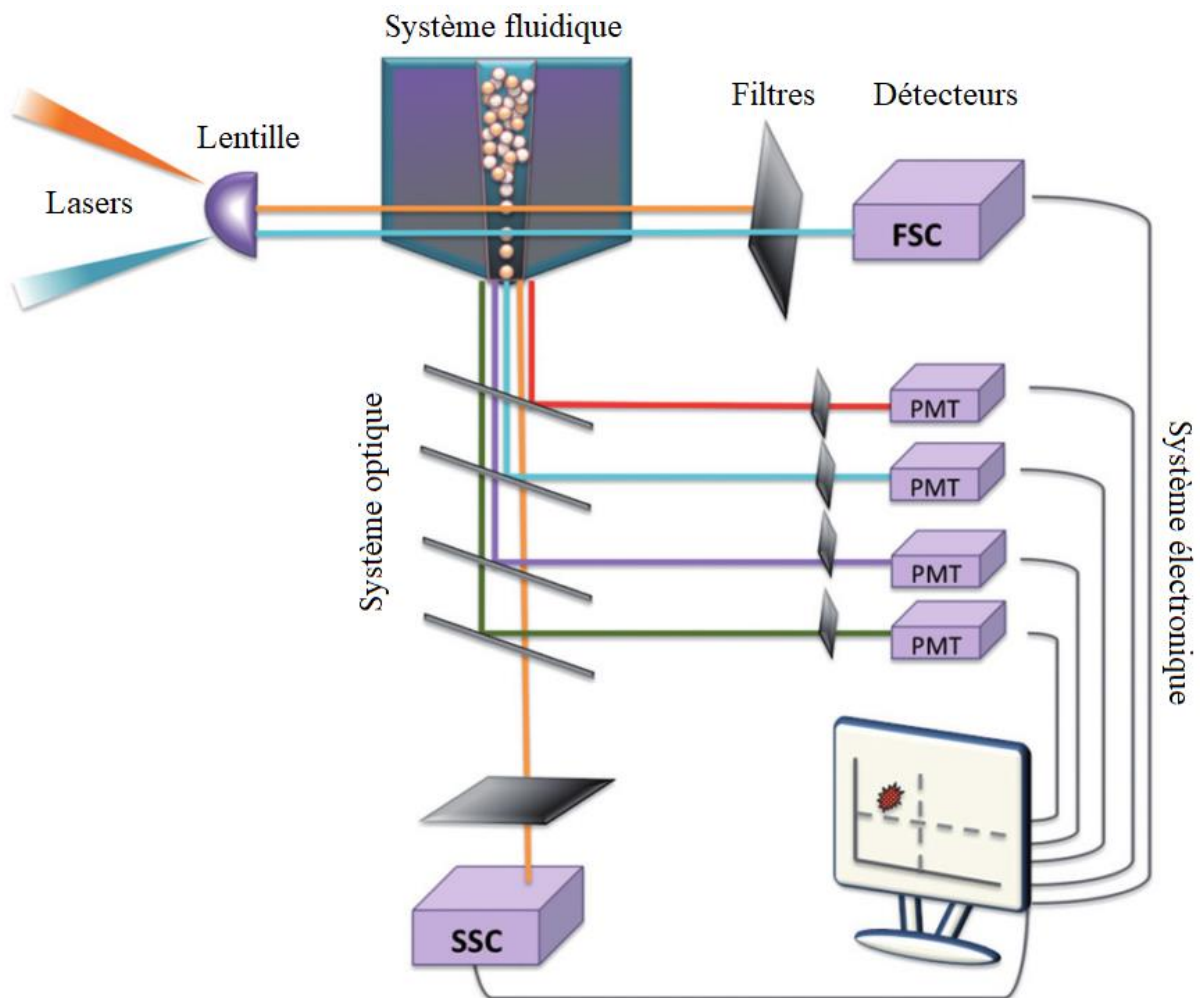


Figure 14 : Composants principaux d'un cytomètre en flux (tiré de Adan et al., 2017).

Le système optique comprend le laser (orienté perpendiculairement au flux de cellules) et également un système de lentilles qui permet de définir et focaliser le faisceau laser. Celui-ci vient toucher les cellules et est alors dévié aux bords de celles-ci, c'est le phénomène de diffusion de la lumière (*light scattering*). Deux types de signaux en résultent, les signaux mesurés aux petits angles (*Forward scatter* ou *FSC*) et les signaux mesurés à 90° (*Side scatter* ou *SSC*). Les signaux mesurés aux petits angles sont issus de la diffraction de la lumière le long du même axe que le faisceau laser alors que les signaux mesurés à 90° sont issus de la lumière reflétée et réfléchi à 90° du faisceau laser (Figure 15). Les signaux mesurés aux petits angles sont directement proportionnels à la surface de la cellule (ou taille cellulaire) tandis que les signaux mesurés à 90° sont proportionnels à la granularité cellulaire (ou la complexité de l'intérieur de la cellule) (Reggeti and Bienzle, 2011; Adan *et al.*, 2017).

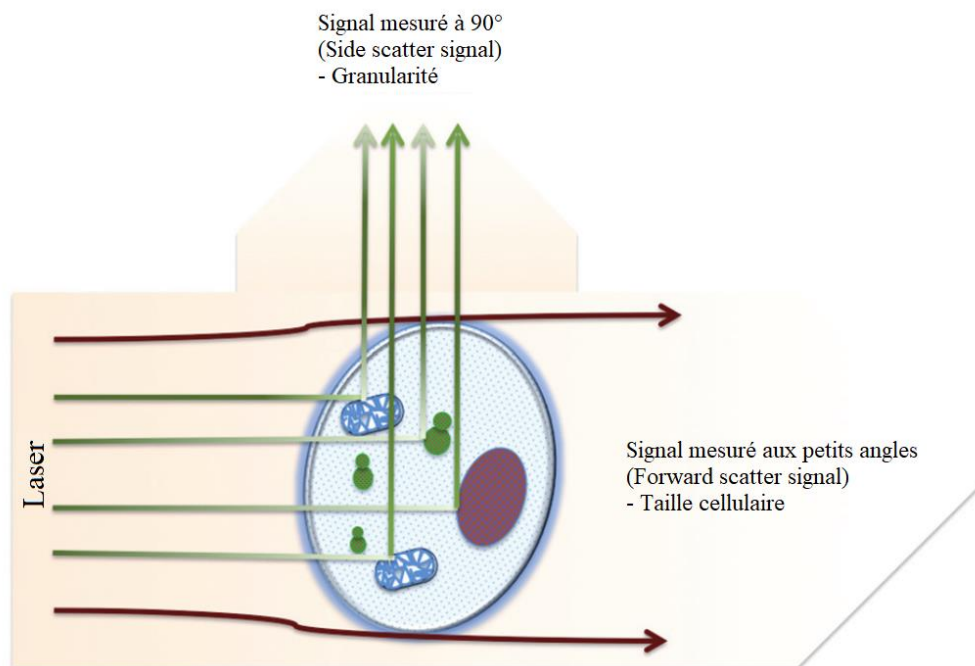


Figure 15 : Principe des signaux mesurés aux petits angles (*FSC signal*) et des signaux mesurés à 90° (*SSC signal*) après passage d'une cellule à travers le laser d'un cytomètre en flux permettant de mesurer respectivement la taille cellulaire et la granularité (tiré de Adan *et al.*, 2017).

Il existe différentes configurations de laser en cytométrie de flux en fonction du marqueur fluorescent utilisé (ou fluorochrome). Un des faisceaux lasers les plus utilisés est le laser bleu d'argon (à 488 nm) qui permet d'exciter plusieurs fluorochromes synthétiques ou naturels (comprenant ceux des algues et phytoplanctons). Les autres faisceaux ajoutés peuvent être des lasers ultraviolets (300 à 400 nm), des lasers infrarouges (à 630-640 nm par exemple) (Adan *et al.*, 2017). Un système de filtres fait également partie du système optique et permet de diriger spécifiquement les longueurs d'ondes des lumières émises par les cellules après excitation par les lasers vers les détecteurs spécifiques (faisant partie du système électronique). La spécificité des détecteurs pour une fluorescence particulière est donc faite par l'utilisation d'un filtre approprié qui peut être un filtre passe-long (*long pass*), passe-court (*short pass*) ou passe-bande (*band pass*) (Reggeti and Bienzle, 2011; Adan *et al.*, 2017). Les premiers permettent de laisser passer des longueurs d'onde de lumière égales ou supérieures à une longueur d'onde donnée tandis que les seconds permettent de laisser passer les longueurs d'onde de lumière égales ou inférieures à une longueur d'onde donnée. Les filtres passe-bande ne permettent qu'à une gamme étroite de longueurs d'onde, proche d'une longueur d'onde donnée de passer (Reggeti and Bienzle, 2011; Adan *et al.*, 2017).

Les détecteurs faisant partie du système électronique permettent de transférer les signaux lumineux en tensions électroniques, il s'agit donc de photodétecteurs. Deux types de photodétecteurs existent en cytométrie, les photodiodes (PD) et les tubes photomultiplicateurs (PMT) qui sont utilisés en fonction de leur sensibilité (Reggeti and Bienzle, 2011; Adan *et al.*, 2017). Ces deux types de photodétecteurs convertissent les signaux lumineux en un nombre d'électrons pour créer un courant électronique qui va être amplifié et converti en un pulse de tension. Des convertisseurs analogiques font également partie de ce système électronique et permettent de transformer les signaux électriques en données qui peuvent être affichées et manipulées sous forme de tracés ou d'histogrammes (Adan *et al.*, 2017).

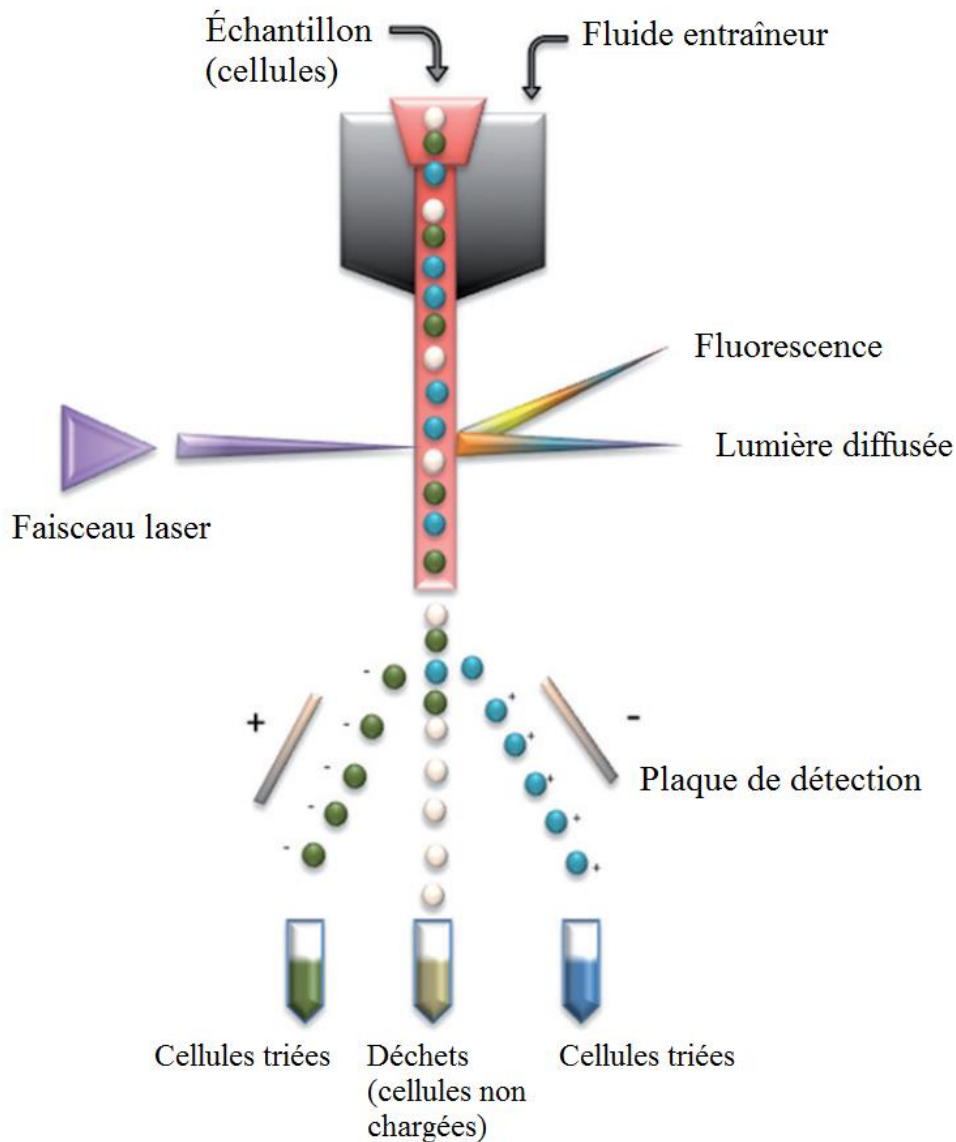


Figure 16 : Schématisation du principe du triage cellulaire par cytométrie en flux (tiré de Adan et al., 2017).

La cytométrie en flux peut également être utilisée pour faire du triage cellulaire. Ce triage est basé sur la déviation électrostatique de gouttelettes chargées. Ces gouttelettes contiennent des cellules d'intérêt et sont formées par le passage des cellules à travers une buse sous vibration (Adan *et al.*, 2017). Les gouttelettes contenant les cellules d'intérêt (détectées après leur passage à travers le faisceau lumineux) vont être chargées par une électrode de charge. Les gouttelettes chargées sont alors déviées vers des plaques de platine chargées à l'opposées. Les gouttelettes non chargées sont à l'inverse collectées dans un conteneur à déchets (Adan *et al.*, 2017). Les cytomètres de type FACS (pour *fluorescence activated cell sorting*)

permettent d'effectuer ce genre de triage sur base des signaux de fluorescence des cellules en récupérant celles-ci dans deux (ou plus) récipients (Adan *et al.*, 2017). Comme précisé, beaucoup des études d'hétérogénéité phénotypique actuelles utilisent les principes des marqueurs fluorescents (fluorochromes) et des souches rapporteuses avec la cytométrie en flux afin de détecter, caractériser et trier les populations selon les signaux fluorescents obtenus (Heins and Weuster-Botz, 2018).

Les souches rapporteuses (ou biosenseurs) contiennent en effet des gènes rapporteurs qui codent généralement pour une enzyme dont l'activité peut être mesurée par fluorescence directement ou après la lyse cellulaire (Lencastre Fernandes *et al.*, 2011). Ces souches consistent en deux parties : un module d'entrée et un module de transduction. Le module d'entrée est activé par un événement intracellulaire d'intérêt et le module de transduction va traduire cet événement en un signal détectable, spécifique et dont l'intensité est proportionnelle à l'occurrence de l'évènement d'intérêt (Heins and Weuster-Botz, 2018). Il existe différents types de souches rapporteuses en fonction des systèmes rapporteurs utilisés : les biocapteurs basés sur les promoteurs, sur les facteurs de transcription, sur les FRET (pour *Förster energy transfer*) et sur les riboswitchs (Heins and Weuster-Botz, 2018). Le choix de ces rapporteurs est important car ils reposent sur l'expression spécifique de l'hétérogénéité de l'espèce et ne sont donc pas interchangeables. Tous ces systèmes utilisent des protéines fluorescentes, souvent des GFP (pour *green fluorescent protein*) pour traduire l'évènement en signal détectable. Ce signal fluorescent peut alors être détectée par microscopie mais plus particulièrement par cytométrie en flux pour un meilleur traitement des données.

L'utilisation des marqueurs fluorescents pour des colorations spécifiques en fonction des caractéristiques cellulaires des populations peuvent venir compléter l'utilisation des souches rapporteuses afin d'évaluer d'autres paramètres physiologiques ou de servir d'alternatives pour éviter le temps important nécessaire à la création de souches rapporteuses (Heins and Weuster-Botz, 2018). Différents marqueurs sont déjà utilisés actuellement pour des évaluations de la viabilité des souches via, par exemple, la perméabilité de la membrane par coloration avec l'iodure de propidium (PI) (Davey and Hexley, 2011; Heins and Weuster-Botz, 2018; Sassi *et al.*, 2019). Lors du choix du marqueur à utiliser, il est important de comprendre comment le marqueur fonctionne et quel aspect de la physiologie microbienne il permet d'évaluer afin de tirer des conclusions correctes (Buysschaert *et al.*, 2016). Les différents types de colorants sont les colorants d'acides nucléiques (ADN particulièrement) et les colorants

fonctionnels qui vont directement permettre de cibler des activités enzymatiques, le stress oxydatif ou la composition en lipides par exemple. Le fonctionnement de tous ces marqueurs ainsi que leur temps d'incubation nécessaires pour atteindre le pic de fluorescence du marqueur sont important à considérer lors du choix du marqueur fluorescent d'intérêt (Buysschaert *et al.*, 2016). Dans cette étude, deux différents marqueurs fluorescents vont être détaillés : l'iodure de propidium et le *RedoxSensor Green* (ou RSG). Le premier (PI) est donc utilisé principalement pour détecter la viabilité des cellules au travers de la perméabilité de leur membrane en colorant les acides nucléiques. A l'inverse de nombreux autres marqueurs fluorescents (tels que le DAPI, le SYBR green I et le SYTO 9), l'iodure de propidium n'est pas capable de traverser les membranes cellulaires (Buysschaert *et al.*, 2016). Cependant, des études ont pu prouver que l'iodure de propidium est également utile à l'étude des stress cellulaires car les membranes cellulaires subissent des remodelages et qu'elles soient endommagées suite à des stress cellulaires (Davey and Hexley, 2011; Sassi *et al.*, 2019). En cytométrie, ce marqueur est excitable à 488 nm et les signaux fluorescents résultants sont détectés par un filtre passe-bande à 630 nm après un temps d'incubation de 5 minutes dans le noir (Davey and Hexley, 2011). Le second marqueur fluorescent est le RSG. Il s'agit d'un colorant fonctionnel qui va permettre de mettre en évidence les activités métaboliques (Baert *et al.*, 2016). Le RSG est en effet réduit par les réductases intracellulaires impliquées dans le métabolisme aérobie. Cette réduction libère un composé fluorescent vert qui est excitable à 488 nm. La fluorescence émise est alors détectable par cytométrie à une longueur d'onde comprise entre 500 et 530 nm après un temps d'incubation de 10 minutes (Konopka *et al.*, 2011). Ce marqueur a déjà pu être utilisé pour mettre en évidence l'activité métabolique de différentes souches d'*Escherichia coli* dans différentes conditions de cultures (Baert *et al.*, 2016) et pour faire de l'imagerie de la réponse respiratoire (*respiration response imaging* ou RRI) (Konopka *et al.*, 2011).

Le désavantage principal des analyses de cellules par cytométrie de flux est le côté statique des analyses. En effet, ces analyses reposent sur des échantillonnages réguliers qui ne permettent donc pas d'avoir le suivi complet des dynamiques de populations et la diversité phénotypique observée à l'échelle de la cellule unique (Ladner *et al.*, 2017). Des alternatives existent alors via des méthodes d'analyses dynamiques des cellules uniques (*single cell*).

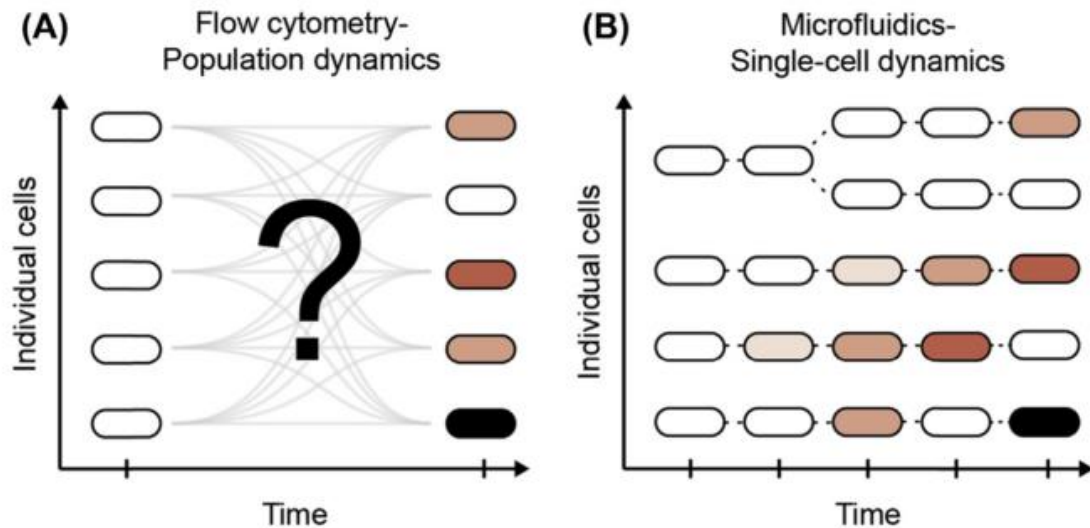


Figure 17 : Différence entre l'analyse statique (A) et l'analyse dynamique (B) de cellules uniques (tiré de Ladner et al., 2017). L'analyse statique est conventionnellement faite à haut débit par cytométrie en flux alors que l'analyse dynamique est plutôt réalisée par cultures de cellules uniques en microfluidiques et par microscopie *time-lapse*.

8.3. Alternative à la cytométrie en flux, cultures en microfluidiques

Comme présenté précédemment, certaines alternatives à la cytométrie en flux existent alors pour l'étude de l'hétérogénéité phénotypique et sont plutôt basées sur le suivi de croissance des cellules uniques à l'opposé de la cytométrie en flux qui va analyser l'ensemble de la population sur base des données recueillies pour chaque cellule (Dusny and Schmid, 2015). Celles-ci comprennent l'imagerie microscopique d'une cellule (pour des études de physiologie cellulaire, mesure de l'expression des gènes ou des protéines), la technique de l'électrophysiologie moléculaire (ou *patch clamp*) qui enregistre l'ouverture et la fermeture des canaux ioniques d'une cellule, le pincement optique/magnétique, l'utilisation de substrats à motifs ou l'approche du laboratoire en puce (*lab on a chip* ou LOC) comprenant les cultures de cellule unique en microfluidiques et en temps réels (Liem *et al.*, 1995; Yin and Marshall, 2012; Delvigne and Goffin, 2014). Cette approche ouvre également la possibilité de réaliser des analyses « omiques » (analyse protéomique, transcriptomique, génomique, ...) (Delvigne and Goffin, 2014). Il a été expliqué ci-dessus pourquoi un contrôle de l'environnement des cellules est nécessaire afin de pouvoir faire les liens entre ces conditions environnementales et les phénotypes résultants (ce qui n'est pas atteignable en bioréacteurs agités). Ce contrôle est

possible en cultures et analyse de cellule unique en microfluidiques (Dusny and Schmid, 2015). Les microfluidiques représentent la technologie des systèmes qui traitent de petites quantités de fluide en utilisant des canaux dont les dimensions sont de l'ordre de dizaines ou de centaines de micromètres (Whitesides, 2006). Les microfluidiques permettent alors d'éliminer l'hétérogénéité environnementale causée par la turbulence en la substituant par un écoulement laminaire calculable et contrôlable à l'échelle du micron (Dusny and Schmid, 2015). Les cultures en microfluidiques consistent donc à cultiver des cellules individuelles à l'intérieur de microstructures (Figure 18) et de suivre ces cultures par microscopie automatisée avec des prises d'images à différents intervalles de temps.

Cette méthode de culture permet l'obtention d'informations sur la physiologie, le comportement et la lignée des cellules individuelles (Grünberger *et al.*, 2015). De plus, par l'utilisation de marqueurs fluorescents, d'autres paramètres (de vitalité par exemple) peuvent être suivis en continu.

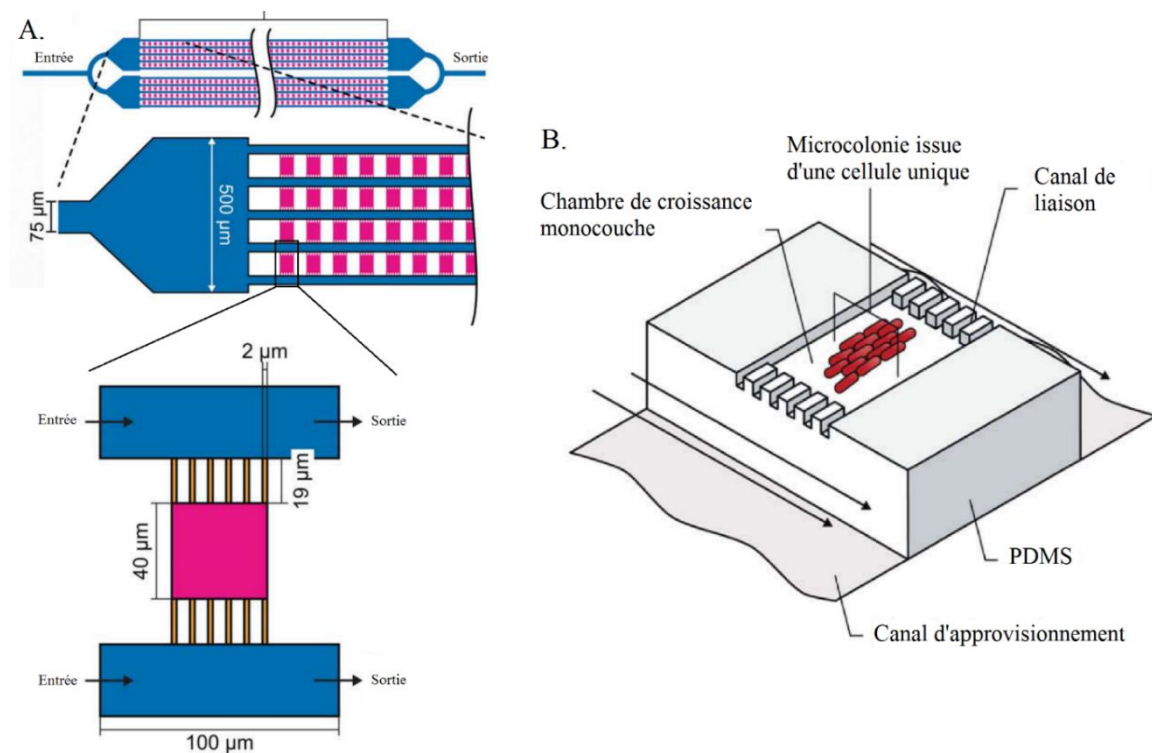


Figure 18 : Représentation des microstructures permettant la culture de cellules uniques. A : Représentation schématique du système vu du dessus ; B : Représentation schématique d'une chambre de croissance monocouche en 3D. Ici l'ensemble du système de canaux et de chambres de cultures sont directement faits en polydiméthylsiloxane (PDMS). La hauteur des chambres

de culture est de 1 μm contre 10 μm pour les canaux d’approvisionnement (tiré de Grünberger et al., 2015).

8.4. Culture en ségrégostat

Les méthodes d’analyse de l’hétérogénéité phénotype présentées dans les points précédents sont faites à des petites échelles (microfluidiques). Or, les moyens plus conventionnels de l’étude de la physiologie microbienne sont les cultures en *chemostat* (culture continue en bioréacteurs) qui permet la culture à long terme d'une population microbienne dans des conditions limitantes définies (Sassi *et al.*, 2019). Il est intéressant de se poser la question de comment étudier l’hétérogénéité des populations à cette échelle mais également de contrôler et gérer le degré de diversification phénotypique des populations microbiennes. Celle-ci peut être étudiée et contrôlée à l’échelle d’un bioréacteur via une stratégie de contrôle reposant sur des perturbations environnementales à des fréquences et des amplitudes variables pour stabiliser et diriger les processus de diversification microbienne via un dispositif appelé ségrégostat (Sassi *et al.*, 2019). Le ségrégostat est un dispositif de culture continue directement liée à un cytomètre en flux qui enregistre les données de populations (et donc l’hétérogénéité phénotypique) en ligne (Figure 19). Ces données de populations permettent de faire varier les conditions environnementales avec des pulses de substrats (tels qu’une source de carbone comme le glucose).

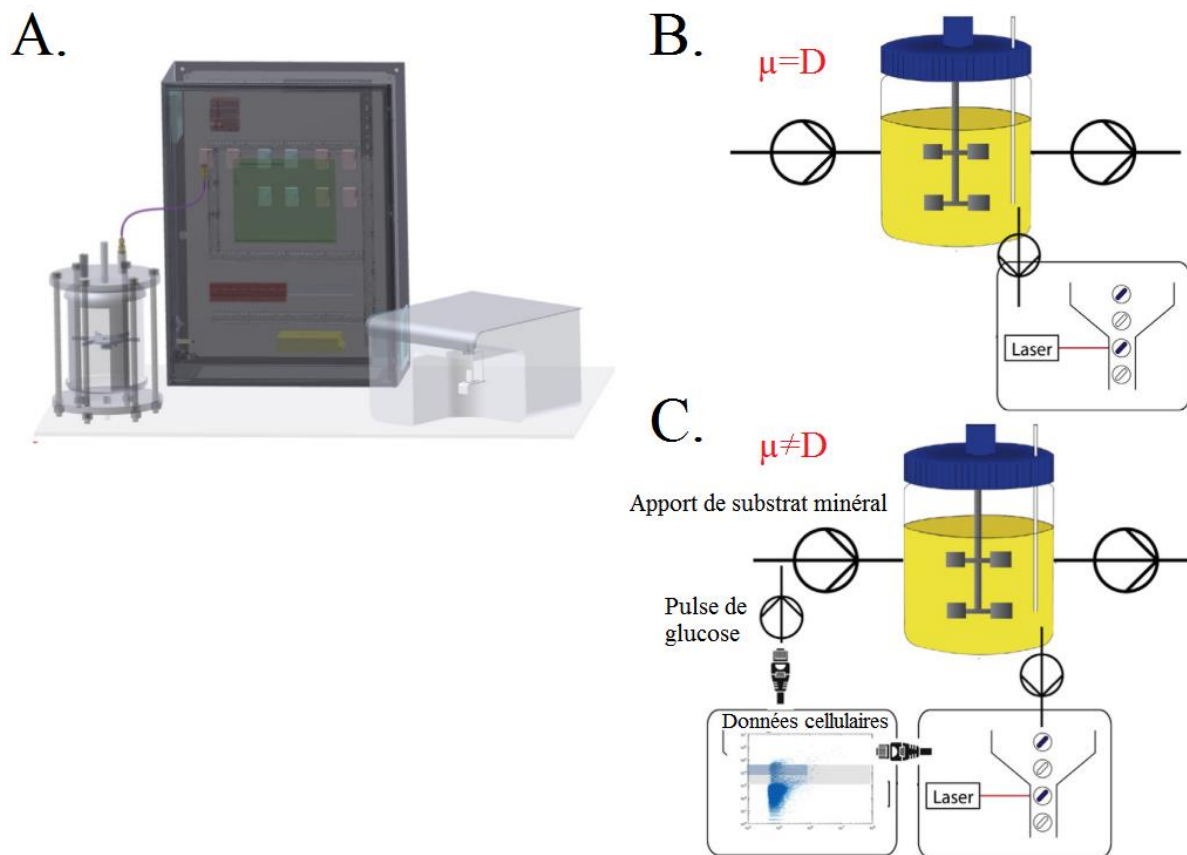


Figure 19 : Principe de la culture avec le dispositif ségrégestat. A : Schéma avec les différents composants pour la plateforme de cytométrie en ligne ; B : Utilisation de la plateforme de cytométrie en ligne lors d'une culture continue (*chemostat*) ; C : Utilisation de la plateforme de cytométrie en ligne lors d'une culture en ségrégestat avec pulse de glucose en fonction des données de population enregistrées. Dans ce cas de figure, le taux de croissance (μ) n'est plus égal au taux de dilution (D) à l'inverse de la culture de type *chemostat* (tiré de Sassi et al., 2019).

Le profil des changements environnementaux peut alors être utilisé afin de déterminer la période de temps nécessaire à des changements phénotypiques importants tels que la perméabilisation des membranes cellulaires d'*Escherichia coli* et *Pseudomonas putida* suite à des stress environnementaux causés par le manque de nutriments (Sassi *et al.*, 2019). L'étude de ces deux individus bactériens réalisées à Gembloux Agro-Bio Tech avec le dispositif ségrégestat (et le marqueur fluorescent adapté, l'iodure de propidium) a également mis en évidence que l'utilisation des pulses de glucose (et donc d'une altération des conditions environnementales) permet de contrôler l'hétérogénéité phénotypique en exposant l'ensemble

des cellules à des cycles d'excès et de limitation en nutriments (Sassi *et al.*, 2019). Ces travaux ont été plus tard confirmés par l'étude de l'induction de l'opéron arabinose d'*E. coli* et par l'utilisation de pulses d'arabinose avec le dispositif ségrégostat (Nguyen *et al.*, 2021). Au cours de cette étude, une stratégie d'alternance de sources de carbone a premièrement été utilisée en culture continue « classique » (*chemostat*) en fournissant du glucose et de l'arabinose à différents ratios. Avec l'utilisation d'un marqueur GFP lié au promoteur P_{araBAD}, l'étude de l'hétérogénéité a montré la présence de deux sous-populations pour chaque ratio, les cellules exprimant la GFP et celles ne l'exprimant pas. C'est en utilisant ces données de populations qu'une stratégie de contrôle a été mise au point et basée sur la dynamique d'alternance de phénotypes des cellules avec le système ségrégostat. Au lieu de contraindre l'activation des cellules vers un phénotype précis, le système ségrégostat a permis aux cellules de basculer librement autour d'une valeur seuil de fluorescence (et donc d'expression) (Nguyen *et al.*, 2021). Une étape clé est donc de définir cette valeur seuil, cela a pu être réalisé par l'analyse de population lors de la culture continue préalablement faite. La valeur seuil a alors été définie comme 50 % de cellules exprimant la GFP. En dessous de cette valeur, une perturbation environnementale était faite par un pulse d'arabinose et, via cette méthode, l'ensemble de la population a oscillé entre l'expression de la GFP et l'absence d'expression (Nguyen *et al.*, 2021).

PARTIE II : OBJECTIFS ET STRATEGIES

1. Objectifs de la thèse et questions scientifiques

1.1. Objectifs de la thèse

Cette thèse s'inscrit dans le contexte de la valorisation totale de la biomasse lignocellulosique, plus particulièrement la valorisation des hémicelluloses et la production d'un arsenal enzymatique capable de fractionner les xylanes (xylanases, xylosidases, arabinofuranosidases, estérases, ...). Toutes ces enzymes sont des hémicellulases qui sont utilisables dans différents bioprocédés industriels couvrant plusieurs secteurs (alimentaire, pharmaceutique, papier, ...). Leur production et leur utilisation à moindre coût sont des points de développements pour les bioprocédés industriels. *Thermobacillus xylanilyticus* s'intègre bien dans ce contexte de par sa production d'enzymes hémicellulolytiques dépendant de la biomasse utilisée pour sa culture et du caractère thermostable de ces enzymes (Rakotoarivonina *et al.*, 2011, 2012; Rakotoarivonina *et al.*, 2014; Rakotoarivonina *et al.*, 2016). Il a été publié récemment que cette bactérie présente plusieurs gènes d'intérêt pour la dégradation des lignocelluloses dont 94 gènes codant des GHs, 16 gènes pour des CEs, 45 gènes pour des glycosyl transférases et 2 gènes pour des lyases de polysaccharides (Rakotoarivonina *et al.*, 2022). Son activité enzymatique principale identifiée est liée à la production d'une xylanase de la famille GH11 (Tx-xyn11) produite extracellulairement alors que ses autres enzymes sont produites intracellulairement (xylosidase, acétyl estérase et arabinofuranosidase par exemple). Sa croissance rapide (par rapport aux champignons lignocellulolytique), sa propriété d'adaptation de sa production enzymatique en fonction de la biomasse utilisée rend son utilisation prometteuse pour la production de cocktails enzymatiques thermostables comprenant plusieurs enzymes nécessaires au fractionnement des biomasses lignocellulosiques (Rakotoarivonina *et al.*, 2016). Cependant **la bactérie présente une importante hétérogénéité au niveau de sa production enzymatique**, particulièrement celle de la xylanase Tx-xyn11 sécrétée, lorsqu'elle est cultivée en présence de lignocellulose comme source de carbone. **Une perte d'activité au cours du temps** a pu être observée par rapport aux niveaux initiaux d'activité xylanase mesurés lorsque la souche a été découverte (Samain *et al.*, 1992; Samain, Debeire and Touzel, 1997). De plus, des phénomènes de sporulation complexifient la culture de cette bactérie et sa production d'enzymes.

Notre hypothèse est que la présence **de phénomènes de diversité phénotypique** (comme présenté dans l'étude bibliographique) serait responsable de la présence d'une

diversité de populations et d'une dérive (hétérogénéité jusqu'à perte) **de la production enzymatique** par la bactérie. L'objectif principal de cette thèse est donc l'identification des facteurs (liés aux populations) qui pourraient influencer la croissance et la production d'hémicellulases de *T. xylanilyticus* lors de cultures avec des biomasses lignocellulosiques.

L'autre objectif de la thèse est de pouvoir améliorer la production d'enzymes par la bactérie en développant une stratégie de contrôle de la diversification phénotypique si les phénomènes de diversification sont bien une des causes de la dérive et de l'hétérogénéité de production d'enzymes hémicellulolytiques chez cette bactérie.

1.2. Questions scientifiques

L'évaluation des facteurs influençant la production d'enzymes hémicellulolytiques chez *T. xylanilyticus* amène donc aux questions scientifiques suivantes :

- La diversification phénotypique est-elle la cause de l'hétérogénéité observée pour la production d'hémicellulases par la souche ?
- Quelles sont les facteurs influençant la diversification phénotypique ?
- Quelles sont les dynamiques entre les différentes populations présentes lors d'une culture de *T. xylanilyticus* ?
- Est-il possible de changer les dynamiques entre les différentes populations de *T. xylanilyticus* avec des stratégies de contrôle de la diversification phénotypique ?
- La source de carbone influence-t-elle la diversification phénotypique ?
- Les stratégies de contrôle de la diversification phénotypique de *T. xylanilyticus* sont-elles exploitables en bioréacteurs ?

2. Stratégies adoptées

La stratégie principale adoptée pour étudier l'impact de la diversité phénotypique et des populations sur la production enzymatique de *T. xylanilyticus* est une approche par cultures successives avec étude des populations par cytométrie en flux pour comprendre les changements de production d'activité enzymatique de la bactérie sur le long terme et identifier les facteurs responsables de ces changements (génétique et population). Les cultures successives ont été adoptées afin d'augmenter le temps de culture et le nombre de générations. La cytométrie en flux permet de relier les changements populationnels avec les dynamiques de production d'enzymes (activité xylanase extracellulaire).

Par ailleurs, afin d'étudier et de caractériser les populations présentes chez *T. xylanilyticus* lors de cultures successives de façon indépendante, la stratégie du triage cellulaire a été adoptée. Ces caractérisations ont été faites par l'évaluation de la croissance, de l'activité xylanase produite et de la morphologie cellulaire des différentes populations.

Enfin, pour essayer de maîtriser la diversification phénotypique chez *T. xylanilyticus* et améliorer la production d'enzyme, des modifications des dynamiques de population par l'altération des conditions environnementales ou des conditions biotiques (états physiologiques de l'inoculum plus précisément) ont été tentées. Cette stratégie a été réalisée par l'introduction de fluctuations dans les conditions de culture (utilisation de source de carbone complexe lignocelluloses, ou complémentation du xylane avec source de carbone facilement assimilable) et dans les conditions physiologiques initiales des cellules en début de culture (âge des inocula). Cette stratégie a été associée à différentes échelles de cultures (successive en bouteilles scellées et en bioréacteurs avec les cultures en ségrégostat). Avant d'utiliser les cultures en ségrégostat réalisés en bioréacteurs, des optimisations de la culture en bioréacteurs ont été nécessaires.

3. Plan général des expériences

Premièrement, pour comprendre les pertes d'activité xylanase observées au cours du temps, des cultures successives avec du xylane ont été réalisées afin d'étudier si ces pertes d'activité sont liées à l'augmentation du nombre de générations et de sous-cultures. Pour ce faire, au cours des générations, l'activité xylanase extracellulaire a été mesurée par dosage colorimétrique. En parallèle l'expression du gène *tx-xyn11* impliqué dans la production de cette activité (principalement l'enzyme Tx-xyn11) a été quantifiée. Des analyses de populations ont également été réalisées par cytométrie en flux. Les populations identifiées ont ensuite été triées et ont été caractérisées (suivi de croissance, dosage d'activité enzymatique et observations microscopiques) afin de mieux comprendre la dynamique des populations de *Thermobacillus xylanilyticus* et la relation avec sa production enzymatique.

Après avoir mis en évidence les causes de cette perte d'activité et caractérisé les différentes populations ainsi que leur lien avec l'activité enzymatique, des stratégies de contrôle de la diversité phénotypique et d'amélioration de la production d'enzyme ont été mises au point lors de cultures successives. Elles ont été basées sur plusieurs critères comme l'alternance de sources de carbone (glucose ou xylane), l'état physiologique des cellules (transferts en phase stationnaire). Par ailleurs pour améliorer le fractionnement des lignocelluloses, il est nécessaire de stimuler à la fois les productions d'enzymes de type xylanase et les enzymes débranchantes, une étude de culture successive utilisant comme source de carbone du son de blé et de la paille de blé a été mise en place afin de favoriser la production d'activités débranchantes telles que β -xylosidase ou acétyl estérase.

Pour aller plus loin dans l'optimisation de la production d'enzymes, des cultures en ségrégostat avec régulation des populations ont été faites. La régulation a été basée sur les signaux cytométriques préalablement identifiées lors des cultures successives et sur l'ajout d'une autre source de carbone pour modifier les dynamiques populationnelles.

Au préalable de cette approche ségrégostat, il était nécessaire d'optimiser la culture de la bactérie en bioréacteurs pour pouvoir définir les conditions de cultures afin de réguler les populations. Les effets de plusieurs paramètres sur la croissance de la bactérie ont été étudiée : présence de dioxyde de carbone, aération, agitation et effet des tampons utilisés.

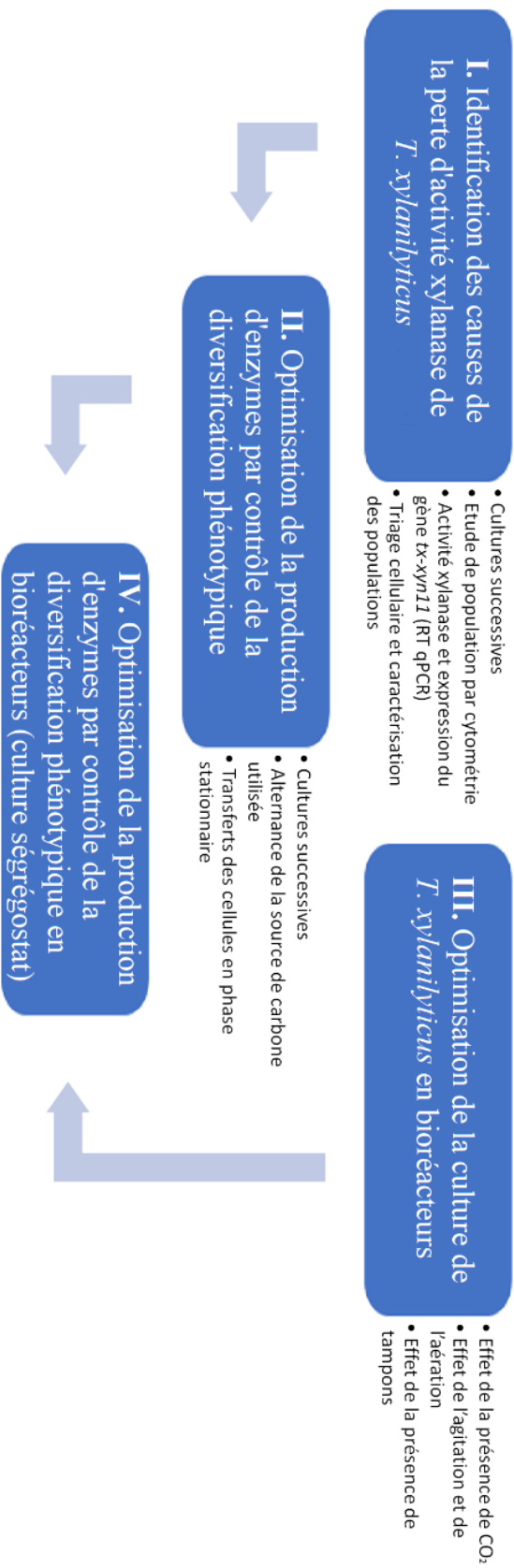


Figure 20 : Schéma global de la stratégie de la thèse ainsi que les approches méthodologiques utilisées.

PARTIE III : MATERIELS ET METHODES

1. Cultures de la bactérie *Thermobacillus xylanilyticus*

Toutes les cultures de *T. xylanilyticus* en bouteilles (hors des cultures en bioréacteurs) ont été faites selon la méthode décrite par Touzel (Touzel *et al.*, 2000). Les différentes étapes de préparation du milieu et de la mise en culture sont décrites brièvement ci-dessous.

1.1. Milieu de culture

Le milieu de culture de base de *Thermobacillus xylanilyticus* est composé de trois solutions différentes : une solution de macro-minéraux (contenant du KH_2PO_4 , du NaCl , du MgSO_4 et de CaCl_2) une solution de traces minérales (avec différents sels minéraux et des éléments métalliques) et une solution de vitamines. Les compositions et quantités ont été décrites précédemment (Touzel *et al.*, 2000). Ces 3 solutions sont ajoutées (volumes respectifs de 50 mL, 10 mL et 0,5 mL) à 890 mL d'eau distillée pour préparer 1 L de solution. La solution obtenue est complétée avec 1 g de NH_4Cl et 2 g d'extraits de levure. Le pH de la solution est ajusté à pH 7 avec du KOH 5N avant ajout de 5 g de KHCO_3 afin d'atteindre un pH de 7,75. Le milieu est réparti à 10 % (v/v) dans des bouteilles de 100 mL ou de 500 mL et est ensuite complété avec 10 % (v/v) de CO_2 à l'aide d'une seringue. Les bouteilles sont alors scellées et les milieux de cultures sont autoclavés à 120°C pendant 20 minutes.

Lorsque la source de carbone est du glucose (Sigma), celui-ci est ajouté à une concentration de 5 g/L après stérilisation. Si la source de carbone est du xylane de hêtre (5 g/L) (Carl Roth), celui-ci est solubilisé dans le milieu de base directement avant sa répartition. Du son de blé désamidonné (10 g/L) broyé 1-2 mm (ARD Pomacle-Bazancourt - France) ou de la paille de blé (15 g/L) broyée (< 3 mm) (ARD Pomacle-Bazancourt -France) ont également été utilisés comme sources de carbone. Les concentrations des 2 biomasses ont été déterminées selon leurs teneurs respectives en hémicelluloses (arabinose et xylose) pour avoir une quantité équivalente à 5 g/L de xylane, pour le son de blé, environ 50 % d'hémicelluloses alors que la paille de blé, n'en contient qu'environ 33 % (Rakotoarivonina *et al.*, 2012).

1.2. Culture de *Thermobacillus xylanilyticus*

La bactérie *Thermobacillus xylanilyticus* utilisée au cours de la thèse est la souche XE9/11/91 qui correspond à la souche sauvage isolée d'un sol agricole sous un tas de fumier dans le nord de la France (Samain *et al.*, 1992; Touzel *et al.*, 2000). La souche était conservée sous forme lyophilisée à température ambiante. Cette souche lyophilisée a été solubilisée dans du milieu basal afin de réaliser une première préculture en trois répliques dans des bouteilles scellées à 50°C et 150 RPM avec un agitateur Multitron (Infors). Après 5 heures de culture, les cellules ont été stockées dans du glycérol à -80°C. Au cours des différentes expériences effectuées, des volumes de cultures de 10 à 50 mL ont été utilisés. Les cultures ont été faites à 50°C et 150 RPM avec un agitateur Multitron (Infors) à partir des stocks de cellules à -80°C. La croissance des cultures est estimée par mesure de la densité optique à 600 nm (DO_{600nm}).

1.2.1. Cultures successives sur xylane avec transferts en phase exponentielle de croissance

Ces cultures ont été réalisées pendant 5 jours pour un total de 85 heures de cultures (environ 108 générations) à partir de la souche sauvage stockée dans du glycérol à -80°C. Des précultures de cellules non sporulées ont été faites dans du milieu de culture complété avec du glucose pendant 15 heures. Les milieux avec du xylane de hêtre ont été inoculés à partir de ces précultures jusqu'à atteindre une densité optique de départ de 0,1 et incubés à 50°C et 150 RPM pendant 5 heures. Les cultures de 5 heures servent à inoculer de nouvelles cultures (avec OD_{600nm} de départ de 0,1).

Toutes les 4 cultures, un suivi de la croissance a été fait par mesure de la DO_{600nm} . Le taux de croissance a été calculé pendant la phase exponentielle avec la formule : $\mu_{max} = \ln(N_2 / N_1) / t_2 - t_1$ avec N représentant la population bactérienne (ici la DO_{600nm} mesurée) et t le temps de culture. Les nombres de génération (n) ont été directement calculés avec la formule : $n = T/g$ où g représente le temps de génération (et $g = \ln(2) / \mu_{max}$) et T le temps total de culture avant le début de la nouvelle culture. Les cultures suivies représentent les cultures à génération 0 (G0), 23,5 (G20), 50,8 (G50), 80,3 (G80) et 107,7 (G100). A ces nombres de générations, des échantillons ont également été prélevés afin de réaliser des analyses de population par cytométrie, des cultures parallèles avec du xylane pendant 6 heures pour doser l'activité

xylanase et l'expression du gène *tx-xyn11* codant pour la principale xylanase GH11, Tx-xyn11. La figure 21 reprend schématiquement la stratégie de cultures successives avec du xylane comme source de carbone.

Au total, le nombre de transferts successifs sur 5 jours a été de 17. Les cultures ayant été réalisées en trois réplicats, cela a monté le nombre de cultures faites à 51.

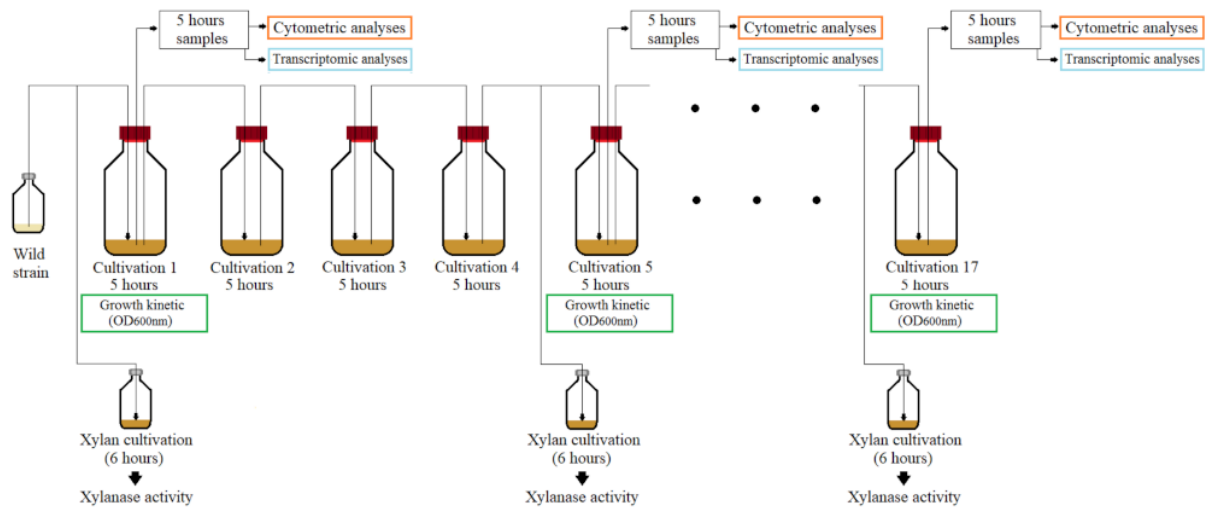


Figure 21 : Schéma de la méthodologie utilisée pour réaliser des cultures successives avec du xylane comme source de carbone. Ces cultures successives étaient complétées avec un suivi de la croissance (*growth kinetic*), une mesure de l'expression du gène *tx-xyn11* (*transcriptomic analyses*), un dosage de l'activité xylanase extracellulaire et des analyses de population (*cytometric analyses*).

2. Dosages enzymatiques

2.1. Préparation des différentes fractions enzymatiques

Les différents échantillons (de 2 à 5 mL, en fonction du volume restant après inoculation des cultures suivantes) pris lors de l'ensemble des cultures ont été centrifugés à $3354 \times g$ pendant 10 minutes à 4°C (Sorvall ST 8R centrifuge, Thermo Fisher Scientific). Le surnageant représente la fraction extracellulaire riche en xylanase.

Le culot obtenu (contenant les cellules) est utilisé pour préparer les fractions intracellulaires. Les culots ont été suspendus dans 1 mL du tampon de lyse, TRIS HCl 25 mM (pH de 7). La lyse des cellules est faite avec un FastPrep-24™ 5G (MP Biomedicals™) en présence des billes de verre (de 25 mm de diamètre). Le volume de billes de lyse pour un échantillon de 1 mL était équivalent à 0,25 mL. Le programme utilisé était quatre cycles de 30 secondes à 6,5 m/s avec une pause de 30 secondes entre chaque cycle. Après lyse, les cellules ont été centrifugées à $12108 \times g$ (centrifugeuse Sorvall ST 8R), le surnageant obtenu (fraction intracellulaire) a été récupéré et conservé à 4°C.

2.2. Dosage d'activité xylanase

L'activité xylanase a été mesurée par dosage des sucres réducteurs issus de l'hydrolyse enzymatique des xylandes selon la procédure décrite par (Kidby and Davidson, 1973). Ce dosage repose sur la réduction du ferricyanure de potassium par la fonction réductrice des sucres réducteurs. À pH basique et à 100°C, les extrémités réductrices des sucres réduisent le ferricyanure de potassium (jaune, qui absorbe à 420 nm) en ion ferrocyanate incolore de manière linéaire en fonction de leur concentration.

Pour réaliser une cinétique d'hydrolyse des xylandes, 0,1 mL des surnageants (dilués ou non) ont été incubés dans 0,9 mL de xylane de hêtre (Roth) à 0,5 % p/v en suspension homogène dans du tampon acétate de sodium 50 mM (pH de 5,8) à 60°C pendant 10 minutes. Les sucres réducteurs libérés ont été mesurés par des prélèvements de 100 µL toutes les 2 minutes. Ces prélèvements ont été placés dans 1,5 mL le réactif de Kidby (composé d'une solution aqueuse contenant 10 % de Na_2CO_3 (p/v) et 3 % de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (p/v)) pour arrêter la réaction enzymatique. La réduction du ferricyanure de potassium a été suivie par mesure de l'absorbance

à 420 nm sur un spectrophotomètre uv/vis Specord 200 Plus (Analytik Jena). Les sucres réducteurs libérés ont été quantifiés grâce à une gamme étalon réalisée avec des concentrations variables de xylose. L'activité a été alors exprimée en UI/mL selon la formule suivante :

$$\text{Activité} \left(\frac{\text{UI}}{\text{mL}} \right) = \frac{\text{Pente de la droite} * 1000 * \text{Facteur de dilution}}{\text{Masse molaire du xylose} * \text{volume d'enzyme} (\mu\text{L})}$$

Avec le facteur 1000 représentant le volume réactionnel en μL , la volume d'enzymes testées (diluées ou non) a été de 100 μL et avec la masse molaire du xylose étant égal à 150 g/mol. Une unité internationale (UI) d'activité enzymatique a été définie comme la quantité d'enzyme (xylanase) nécessaire pour libérer une micromole d'équivalent xylose par minute à 60°C.

2.3. Dosage des activités intracellulaires (acétyl estérase et β -xylosidase)

Pour l'évaluation des activités β -xylosidase et acétyl estérase, la vitesse d'hydrolyse du *p*-nitrophényl- β -xylopyranoside (Carbosynth) et du *p*-nitrophényl-acétate (Sigma) en *p*-nitrophénol a été déterminée par spectrophotométrie en mesurant son absorbance à 401 nm. Les expériences ont été réalisées dans un volume de 1 ml contenant 450 μl de tampon acétate de sodium 100 mM (pH 5,6), 450 μl de substrats (concentration finale de 0,5 mM) et 100 μl de fractions protéiques intracellulaires pendant une cinétique de 10 min à 50°C.

L'activité est exprimée en UI/mL selon la formule suivante :

$$\text{Activité} \left(\frac{\text{UI}}{\text{mL}} \right) = \frac{\text{Pente de la droite} * \text{Facteur de conversion} * VT * \text{Facteur de dilution}}{\varepsilon * VE}$$

Avec la pente de la droite représentant l'apparition de *p*-nitrophénol, ε représentant le coefficient d'extinction molaire du *p*-nitrophénol (pH de 5,6) soit 3053 $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, VT représentant le volume total de la réaction en mL soit 1 mL, VE représentant le volume d'enzyme pour la réaction en mL soit 0,1 mL et le facteur de conversion étant de 1000.

2.4. Dosage des protéines

Afin de normaliser les résultats d'activité enzymatique, celles-ci ont été exprimées en unité internationale (UI) par la quantité (en mg) de protéines totales dans les échantillons (fraction intracellulaire ou extracellulaire). Les concentrations de protéines totales ont été déterminées par la procédure de Bradford (Marion M. Bradford, 1976). La méthode de dosage de Bradford a permis de quantifier la concentration en protéine par spectroscopie en mesurant un changement d'absorbance à 595 nm après incubation de 10 minutes à température ambiante de 100 μ L d'échantillon (dilué ou non) mélangé avec 1 mL d'un réactif commercial 5 \times de Bradford (Serva) tel que recommandé par le fournisseur. Les différentes concentrations en protéines des échantillons ont été déterminées au moyen de gammes étalons de différentes concentrations d'albumine de sérum de bœuf (BSA Sigma). Après normalisation, l'activité enzymatique est exprimée en UI/mg de protéines totales.

3. Mesures de l'expression du gène *tx-xyn11*

L'expression du gène *tx-xyn11* codant pour la xylanase Tx-xyn11 a été mesurée par RT-qPCR quantitative à partir d'échantillons d'ARN prélevés aux différentes générations.

Pour cela, l'ARN a d'abord été extrait puis rétrotranscrit en ADN complémentaires (ADNc) par l'action d'une transcriptase inverse. Les ADNc générés ont ensuite été utilisés afin de réaliser une PCR quantitative (qPCR) permettant de mesurer la quantité initiale du gène étudié (*tx-xyn11*) grâce à un couple d'amorces spécifiques (Table 5). Les différentes étapes de cette méthode de RT-qPCR sont détaillées ci-dessous.

3.1. Extraction de l'ARN

Les échantillons pris lors des cultures successives (5 mL) ont été centrifugés à $3354 \times g$ pendant 10 minutes. Les culots cellulaires ont été conservés dans du RNAlater (1,5 mL) à -80°C avant extraction de l'ARN afin de prévenir la dégradation de l'ARN. L'extraction a été réalisée avec le kit RNeasy Mini (Qiagen) en suivant les recommandations du fournisseur. Les solutions d'ARN obtenues ont été traitées avec de la DNase RNase-Free (Qiagen) pour éliminer l'ADN résiduel dans les échantillons. L'absence d'ADN a été vérifiée par PCR avec le mix DreamTaq™ Hot Start Green PCR Master (Thermo Fisher Scientific) selon les recommandations du fournisseur en utilisant des amorces spécifiques pour le gène *tx-xyn11* (Table 5). La pureté des ARN a été suivie avec des migrations par électrophorèse sur gel d'agarose 1% tampon TBE RNase-Free 1× (Mupid® One, Eurogentec).

Les concentrations en ARN ont été déterminées à l'aide d'un fluoromètre Qubit™ et du kit de dosage d'ARN Qubit® (RNA Assay kit, Invitrogen). Les ARN extraits ont été aliquotés et conservés à -80°C jusqu'à usage

Table 5 : Amorces utilisées pour les mesures de l'expression du gène *tx-xyn11*.

Nom	Sens	Séquence
Amorces spécifiques à un gène codant pour une catalase-péroxydase de <i>T. xylanilyticus</i>	Directe	GCGCCATATGGACACGACGGCAAG CAC
	Inverse	GCTCGAGATGCGATAAAGCCAAAT CGTAGCGATCCG
Amorces spécifiques au gène <i>tx-xyn11</i> codant pour la xylanase Tx-xyn11 de <i>T. xylanilyticus</i>	Directe	GACGGCACGCAGACGTTCCA
	Inverse	GCCTTCGGTTGCGAGCACCT
Amorces spécifiques aux gènes de l'ARNr 16S de <i>T. xylanilyticus</i>	Directe	CGCGAGCGACGCAATCCCA
	Inverse	CGGTTACCCACCGGCTTCG

3.2. Synthèse des ADN complémentaires

Les ADNc ont été synthétisés en utilisant le kit de réaction de synthèse d'ADN complémentaire SuperScript® IV First-Strand (Thermo Fisher Scientific) avec 500 ng d'ARN totaux en présence d'amorces hexamères aléatoires (50 µM), un mélange de dNTP (0,5 mM de chaque), du tampon SuperScript IV 1×, DTT (100 mM), de l'inhibiteur de RNase recombinante RNaseOUT™ (2 U/µL) et 800 U (ou 40 U/µL) de transcriptase inverse Superscript IV dans un volume final de 20 µL. La synthèse a été effectuée à 23°C pendant 10 minutes suivie d'une étape à 52,5°C pendant 10 minutes. Une inactivation a été effectuée à 80°C pendant 10 minutes. Les ADNc générés ont été conservés à -80°C jusqu'à utilisation.

3.3. PCR quantitative

La PCR quantitative a été réalisée avec un système de PCR en temps réel QuantStudio™ 3 (Applied Biosystems™) pour déterminer l'expression du gène *tx-xyn11*. Les amorces utilisées ont été celles spécifiques au gène *tx-xyn11* et sont données dans la Table 5. Avant utilisation, la spécificité des amorces a été testée et confirmée. Les amplifications ont été

réalisées dans un volume final de 15 μL contenant 7,5 μL de mélange Absolute Blue qPCR SYBR green low ROX (Thermo Fisher Scientific), 1,4 μL de mélange d'amorces (280 nM), 1,1 μL d'eau sans DNase/RNase et 5 μL de matrice ADN complémentaires (dilué 10 fois). Le programme PCR était le suivant : une dénaturation initiale de 95°C pendant 15 secondes suivie de 40 cycles de 95°C pendant 10 secondes, une hybridation à 60°C pendant 45 secondes suivie d'une seule mesure de fluorescence, et une étape d'élongation de 72°C pendant 30 s (Figure 22).

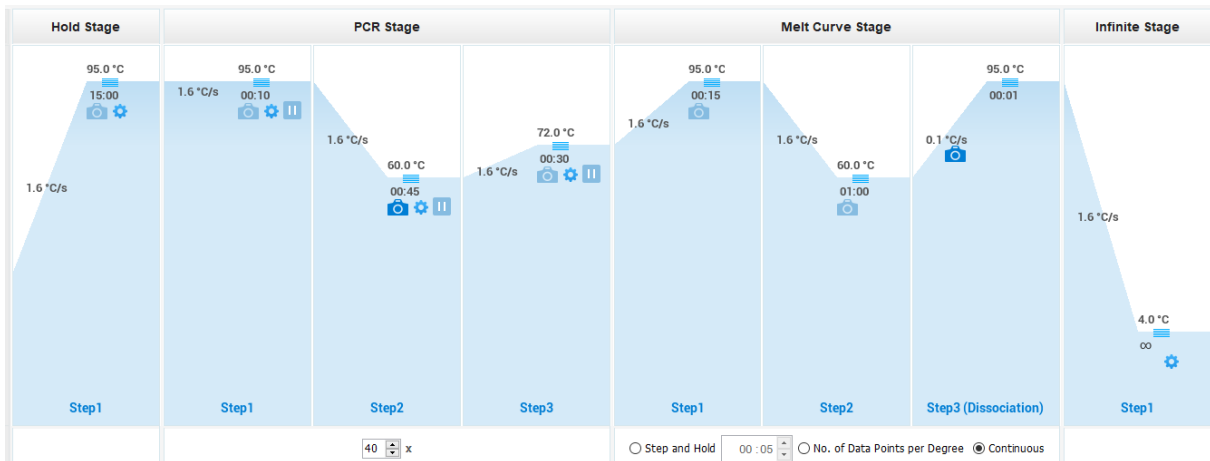


Figure 22 : Programme des cycles de T° pour l'amplification par PCR quantitative du gène *txyn11*.

La spécificité des produits PCR a été confirmée par l'analyse de la courbe de fusion (Figure 23). Après un palier à 95°C pendant 15 secondes, l'analyse de cette courbe a été réalisée entre 60 et 95°C avec une vitesse de chauffage de 0,1 °C/s. Différents témoins négatifs sans ADNc et témoins positifs (avec l'ADN génomique de *T. xylanilyticus*) ont également été inclus pour confirmer la spécificité des réactions d'amplification.

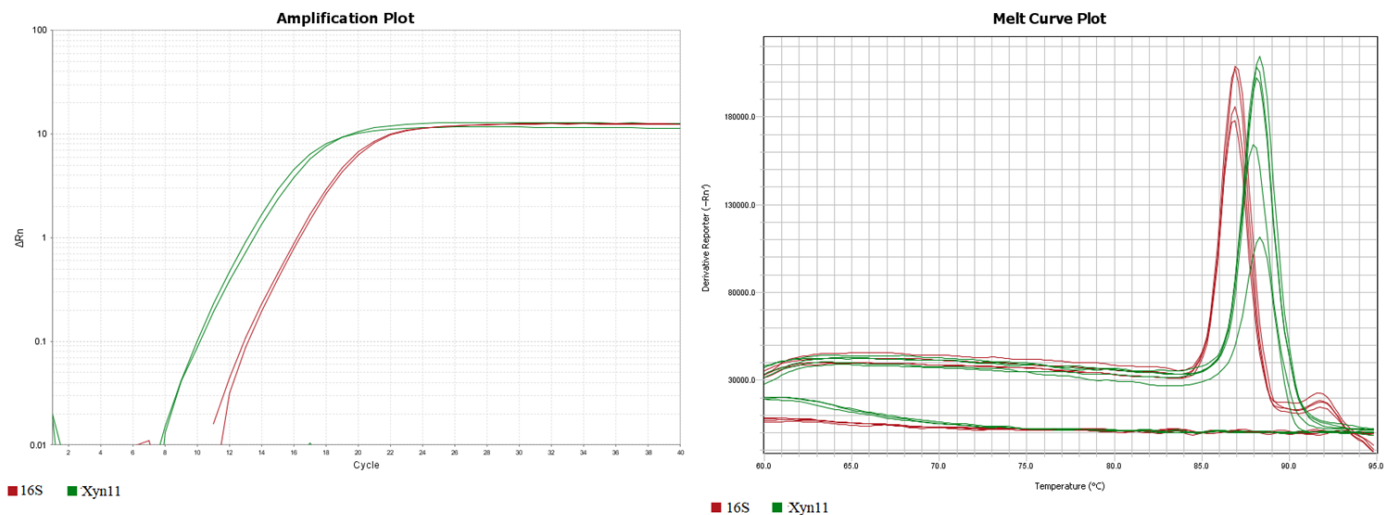


Figure 23 : Exemples de courbes d'amplification (gauche) et de fusion (droite) des gènes *tx-xyn11* et 16S obtenus avec les amorces spécifiques décrites (Table 5)

Les transcrits *tx-xyn11* ont été normalisés en utilisant l'expression du gène de l'ARNr 16S de *T. xylanilyticus* amplifié en utilisant les amorces spécifiques (Table 5). Pour quantification, l'expression relative du gène *tx-xyn11* a été calculée par la méthode $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak and Schmittgen, 2001). Pour la quantification des transcrits de *tx-xyn11* au cours des générations, les expressions de *tx-xyn11* au début des cultures successives (G0) ont été utilisées comme échantillons de référence. Pour comparer l'expression du gène *tx-xyn11* entre des cultures successives de glucose et de xylane, l'échantillon de référence a été défini comme la première culture sur glucose. Les résultats ont été exprimés sous forme de valeurs relatives d'ARNm par rapport aux échantillons de référence.

La PCR quantitative a été réalisée en double pour chaque réplica des cultures successives.

4. Analyse de populations

La stratégie adoptée pour l'analyse des populations de *Thermobacillus xylanilyticus* est la cytométrie en flux. Tel qu'expliqué dans l'étude bibliographique, les signaux FSC et SSC sont représentatifs de la taille cellulaire et de la granularité. Plus techniquement, les pulses électriques correspondants aux signaux FSC ou SSC peuvent être décomposés en trois composantes : une hauteur d'impulsion (FSC-H et SSC-H), une largeur d'impulsion (FSC-W et SSC-W) et l'intégrale de la hauteur et de la largeur, appelée surface d'impulsion (FSC-A et SSC-A). La cytométrie en flux permet de distinguer les populations rapidement car les cellules sont comptées et caractérisées à grande vitesse en utilisant ces différentes composantes des signaux enregistrés. La méthodologie précise utilisée au cours de la thèse pour réaliser les différentes analyses de population par cytométrie est décrite ci-dessous.

4.1. Mesures cytométriques lors des cultures successives

Les analyses de population aux différentes générations lors des cultures successives ont été réalisées avec un cytomètre BD Accuri™ C6 (BD Biosciences) via le plateau technique MOBICYTE (Université de Reims Champagne-Ardenne). Les paramètres analytiques ont été un débit (*flow rate*) de 35 $\mu\text{L}/\text{minute}$, une taille de noyau (*core size*) de 16 μm et le seuil était descendu à 30000 dans le FSC-H. Pour toutes les analyses, 20000 cellules ont été collectées à chaque fois, pour chaque échantillon et réplica.

Pour réaliser l'analyse, les échantillons prélevés aux différentes générations (5 mL) ont été filtrés avec des seringues à filtres en cellulose de 5 μm et dilués avec du tampon phosphate sel (ou PBS) 1 \times (composé de 8 g/L de NaCl, 0,2 g/L de KCl, 1,44 g/L de Na₂HPO₄ et 0,24 g/L de KH₂PO₄ avec un pH de 7,4) pour atteindre un maximum de 2500 événements/s détectés (et événements/ μL) et pour éviter la lecture de doublets. Les échantillons ont d'abord été analysés non colorés, et les populations ont été détectées par les signaux *forward* et *scatter* (respectivement FSC-A et SSC-A). Un déclenchement à 30000 en FSC-A a été utilisé pour déterminer le pourcentage de cellules de chaque population détectée. Le logiciel BD CSampler a été utilisé pour acquérir et traiter les données cytométriques.

Les échantillons ont également été analysés après coloration au BacLight™ RedoxSensor™ Green (RSG, 1 μM) ou à l'iodure de propidium (PI, 10 mg/L) (Invitrogen) pour

détecter respectivement l'activité métabolique et la perméabilité membranaire (Davey and Hexley, 2011; Konopka *et al.*, 2011). Après excitation avec un laser à 488 nm, la fluorescence verte a été collectée à $525 \text{ nm} \pm 30 \text{ nm}$ pour le RSG (FL1-A) et le signal de fluorescence rouge à 670 LP (FL3-A) pour le PI.

4.2. Triage cellulaire

En plus des analyses cytométriques, une approche de triage cellulaire a été adoptée afin de caractériser indépendamment les populations identifiées. Le principe consiste à charger les gouttes contenant les cellules présentant les signaux voulus (en taille, granularité, ...) avec certains systèmes spécifiques de cytométrie. Avec un champ magnétique provoqué par des plaques de déflexion fortement chargées, les gouttes d'intérêts sont déviées et récupérées indépendamment (Figure 16).

Le tri cellulaire a été réalisé à partir de cultures de *T. xylanilyticus* avec du milieu basal complété avec du xylane de hêtre (5 g/L) à G0 mais aussi au cours des générations suivantes (G20 et G50) lors de la chute mesurée d'activité xylanase. Le tri cellulaire a été réalisé avec un analyseur-trieur BD FACSAria™ II couplé au cytomètre en flux BD Accuri™ C6 Plus des installations du plateau technique URCACyt (Université de Reims Champagne-Ardenne). Afin de standardiser les signaux du cytomètre en flux BD Accuri™ C6 Plus (cytométrie en flux simple) et du trieur de cellules BD FACSAria™ II, une analyse de microbilles de 2,5 μm (BD Biosciences) a été effectuée avec les deux systèmes.

Lors du triage, 5×10^6 événements ont été collectés pour chaque population et le taux de tri était d'environ 2500 événements/seconde avec une buse de 70 μm . Chaque tri cellulaire a été effectué en triple. Les événements ont été collectés dans 10 mL de PBS 1 \times . Pour vérifier le bon tri des cellules, une analyse de chaque population collectée a été effectuée avec le cytomètre en flux BD Accuri™ C6 plus. Chaque solution de population a ensuite été centrifugée à $12108 \times g$ (Sorvall ST 8R, Thermo Scientific) pendant 30 minutes à température ambiante. Le culot cellulaire conservé dans 100 μL de PBS 1 \times a été solubilisé avec 1 mL de milieu basal complété avec du xylane de hêtre (5 g/L). Toute cette solution cellulaire a été utilisée pour ensemercer une nouvelle culture sur xylane et caractériser les populations séparées.

4.3. Culture après triage cellulaire

Les cultures de population ont été effectuées, comme décrites dans les parties précédentes, dans des bouteilles de 500 mL scellées remplies avec 10 % de milieu basal complétement avec du xylane (5 g/L) pendant 19 heures. La croissance a été suivie par une mesure régulière de la DO_{600nm} . Aux différentes phases de croissance déterminées (phase de latence, début et fin de la phase exponentielle et phase stationnaire), des échantillons de 5 mL ont été prélevés et centrifugés à $3354 \times g$ pendant 10 minutes (Sorvall ST 8R, Thermo Scientific). Les surnageants ont été utilisés pour les mesures de l'activité xylanase et des teneurs en protéines selon les procédures décrites ci-dessus.

4.4. Analyses par microscopie électronique à balayage

Au cours des cultures successives suivies, des échantillons ont été prélevés avant et après triage cellulaire aux différentes générations pour des analyses morphologiques et métaboliques (croissance et production enzymatique). Avant le tri cellulaire, des gouttes de 20 μ L ont été séchées sur une lamelle de verre. Après le tri cellulaire, 10 mL de différentes populations triées (à 500 cellules par μ L correspondant à 5×10^6 cellules au total) ont été concentrés par centrifugation à $16000 \times g$ pendant 40 minutes. Les culots cellulaires ont été solubilisés dans 500 μ L de milieu basal et 22,5 μ L ont alors été séchés sur lame de verre (correspondant à 225000 cellules).

Après séchage, les lames de verre ont été lavées 2 fois dans du PBS 1 \times , puis fixées dans du glutaraldéhyde à 2,5 % (p/v en PBS) (Sigma) à température ambiante pendant 1 heure. Après 2 lavages à l'eau distillée, les cellules ont été déshydratées à température ambiante dans des solutions d'éthanol calibré (50 %, 70 %, 90 %, et 2 fois avec de l'éthanol absolu) pendant 10 minutes et dans une solution d'éthanol (100 %) / hexaméthylsilazane (ou HMDS, v/v) pendant 5 minutes. Les lames de verre ont finalement été desséchées avec une dernière goutte de HMDS. Après séchage à l'air et à température ambiante, les échantillons ont été pulvérisés avec un mince film d'or-palladium à l'aide d'un instrument de pulvérisation ionique JEOL JFC 1100. Les échantillons ont ensuite été observés à l'aide d'un microscope électronique à balayage à émission de champ Schottky (JEOL JSM-7900F).

5. Optimisation de la production enzymatique

L'optimisation de la production enzymatique de *T. xylanilyticus* a été faite sur base des résultats d'analyse des populations au cours des cultures successives. Deux méthodologies ont été mises au point ayant chacune comme but de prévenir la sélection de populations moins productrices. Les méthodologies étaient basées sur l'alternance des sources de carbone, l'utilisation de lignocelluloses et sur le transfert en phase stationnaire lors de cultures successives.

5.1. Cultures successives avec alternance de sources de carbone

Afin de limiter la perte d'activité, des cultures successives avec alternance de la source de carbone ont été effectuées (17 cultures réalisées en trois réplicas pour un total de 51 cultures). Cette alternance de culture de la source de carbone du glucose (5 g/L) à du xylane de hêtre (5 g/L) dans du milieu basal a été faite à plusieurs générations : 24, 43, 63 et 79 (Figure 24). L'activité xylanase des diverses générations obtenues a été suivie en fin de croissance (sur xylane). Le même nombre de cultures successives avec du glucose que le nombre de cultures successives avec du xylane (point 1.2.1) ont été réalisées. Le taux de croissance sur les 2 sources de carbone étant différent, le nombre de générations atteint a été de 80. Lors du changement de substrat, des analyses de cytométrie en flux et activité xylanase par dosage des sucres réducteurs ont été faites.

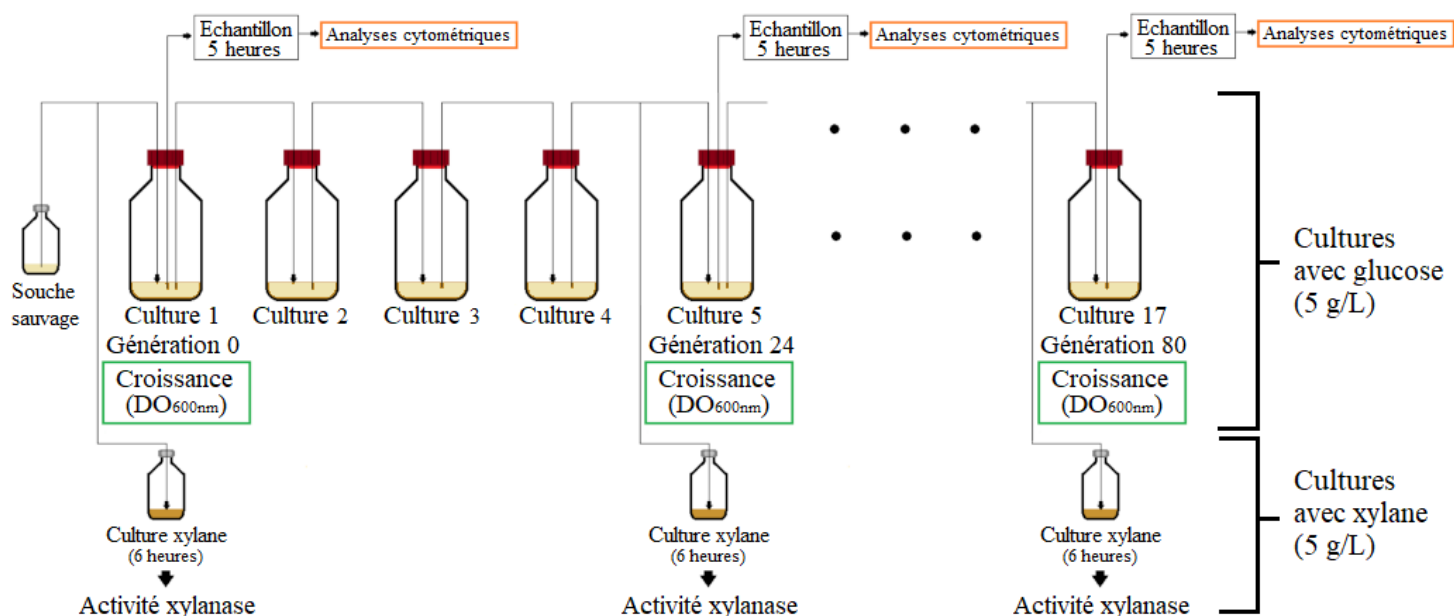


Figure 24 : Schéma du protocole appliqué aux cultures successives avec alternance de la source de carbone avant mesure de l'activité xylanase.

5.2. Cultures successives en présence de xylane et de lignocelluloses avec transferts en phase stationnaire

Ces cultures ont été réalisées sur des milieux xylane, son de blé ou paille de blé (en volume de 10 mL) qui ont étéensemencés avec une préculture de 15 heures diluée 100 fois. Cette fois-ci, la durée des cultures avant transferts a été de 15 heures pour atteindre la phase stationnaire. Les transferts ont ensuite été effectués par inoculation avec 100 μ L de culture après dilution de 100 fois (dilution totale de 10^4 -fois) pour les cultures de xylane et pas de dilution entre chaque culture de son de blé et de paille de blé avant ensemencement par inoculation avec 100 μ L de culture (dilution totale de 10^2 -fois). Pour chaque nouvelle série de cultures, des mesures de l'activité xylanase extracellulaire et de l'activité intracellulaire enzymatique (acétyl estérase et β -xylosidase) ont été effectuées comme décrites ci-dessus.

6. Cultures en bioréacteurs

L'étude des conditions optimales de culture de la bactérie en bioréacteurs ont été réalisées afin de pouvoir réguler la diversification phénotypique de la souche par une stratégie d'alternance des sources de carbone par des cultures en ségrégostat. Comme expliqué dans l'étude bibliographique, celles-ci consistent en des cultures continues avec mesures cytométriques automatisées en continu. Plus particulièrement, elles permettent d'effectuer des changements environnementaux des cellules (par pulses de milieu) en fonction des signaux cytométriques obtenus. Ces changements permettent de stabiliser les populations et donc de contrôler la diversification phénotypique (Sassi *et al.*, 2019; Nguyen *et al.*, 2021).

6.1. Définition des paramètres de culture de *T. xylanilyticus* en bioréacteurs

Les cultures ont été réalisées dans des systèmes de bioréacteurs parallèles DASGIP® (Eppendorf) dans un volume utile de 200 mL et un volume d'inoculation calculé pour atteindre une DO_{600nm} de départ de 0,1. Ces études ont été menées en présence de glucose à un pH fixé à 7,75 et régulé par ajout automatique de KOH et d' H_3PO_4 . En plus de ces conditions, de l'antimousse (KS911) a été ajouté (75 μ L/L de milieu) directement au milieu de culture avant autoclavage pour prévenir la formation de mousse et une montée en volume dans les bioréacteurs. Les paramètres décrits ci-dessus sont restés constants durant tous les tests de définition des paramètres de culture de *T. xylanilyticus* en bioréacteurs. Différents tampons ont été utilisés au cours des tests, le tampon bicarbonate/ CO_2 et le tampon potassium phosphate. Le premier était préparé en ajoutant 5 g/L de bicarbonate dans le milieu de culture et en réglant le pH d'une valeur initiale proche de 6 à 7,75 avec un bullage par CO_2 . Le second tampon a été préparé à une concentration de 0,05 M en solubilisant 7,1 g/L de K_2HPO_4 et 1,257 g/L de KH_2PO_4 . Afin de comparer les cultures avec tampon potassium phosphate et avec tampon bicarbonate/ CO_2 , le pH a été fixé à 6 avec le tampon potassium phosphate avant d'être ajusté à 7,75 avec le KOH et l' H_3PO_4 .

Une culture en bouteilles scellées a été réalisée en trois répliques avec du glucose (5 g/L) tel que décrit ci-dessus (point 1.2) pour comparer les croissances obtenues avec celles obtenues lors des définitions des paramètres de culture en bioréacteurs.

6.1.1. Définition de la nécessité en CO₂

Le premier paramètre de cultures en bioréacteurs testé a été la présence de CO₂. Celui-ci a été bullé dans le milieu de 2 réacteurs sur 4 à un débit de 20,16 mL/minute (0,1 VVM ou *Vessel Volume/Minute*, représentant l'unité d'aération exprimée en volume de cuve par minute) alors que pour deux autres réacteurs l'oxygène est amené via l'aération au même débit. L'agitation a été fixée à 500 RPM pour ces tests.

Deux systèmes de tampons ont été testés également, le tampon bicarbonate/CO₂ (par ajout de 5 g/L de bicarbonate de potassium dans le milieu afin de réguler le pH) et le tampon potassium phosphate (à 0,05 M et pH 7,75).

La figure 25 montre un schéma simplifié du dispositif de bioréacteurs utilisé ainsi que les conditions testées. Ces tests n'ont été réalisés qu'en un seul réplica afin de déterminer rapidement si la présence de CO₂ était nécessaire comme pour les cultures en bouteilles scellées.

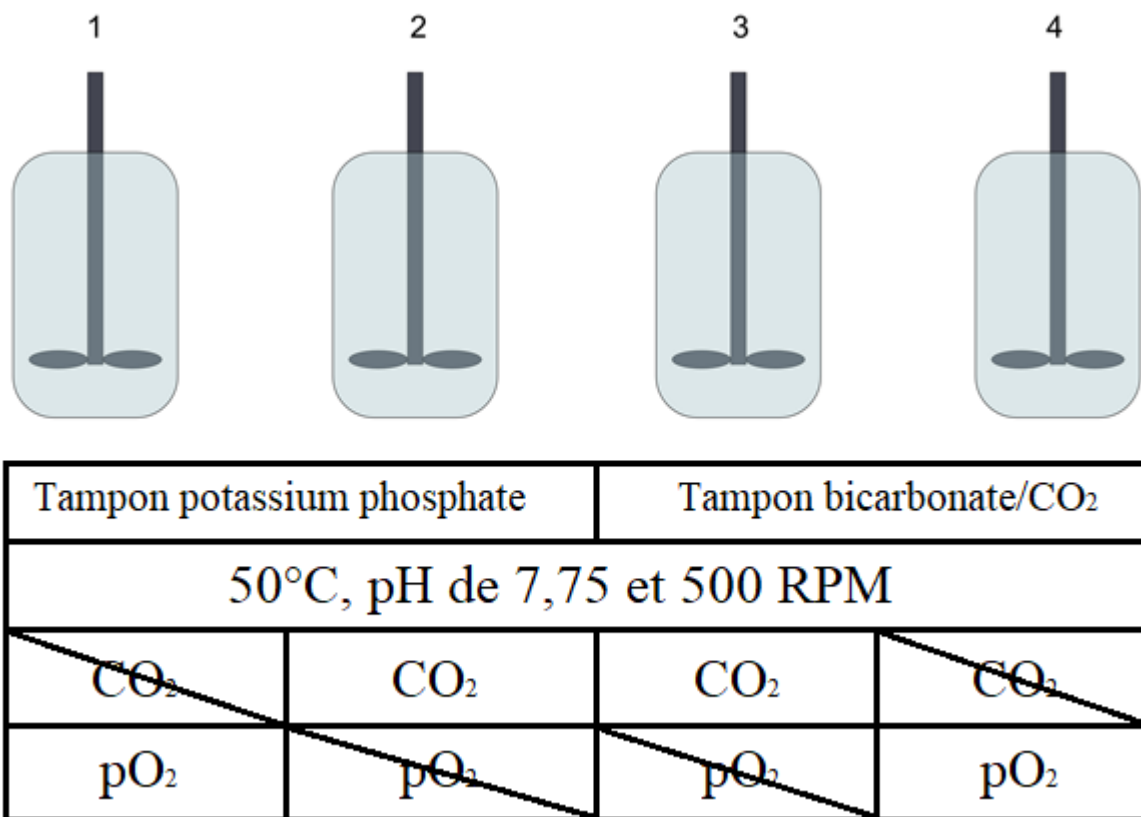


Figure 25: Test de cultures de *Thermobacillus xylanilyticus* en bioréacteurs avec et sans CO₂.

6.1.2. Définition du paramètre d'aération

L'autre paramètre d'importance a été l'aération, celle-ci a d'abord été testée avec une agitation de 500 RPM et un apport en oxygène de 0,1 VVM (20,16 mL/min) ou de 0,5 VVM (100,8 mL/min). Les cultures ont été également réalisées avec les 2 mêmes tampons que pour les tests d'apport en CO₂ et tous les autres paramètres définis ci-dessus ont été conservés excepté l'aération. Comme les tests précédents, ces tests n'ont été réalisés qu'en un seul réplica afin de déterminer rapidement de paramètres d'aération plus adaptés pour la culture de *T. xylanilyticus*.

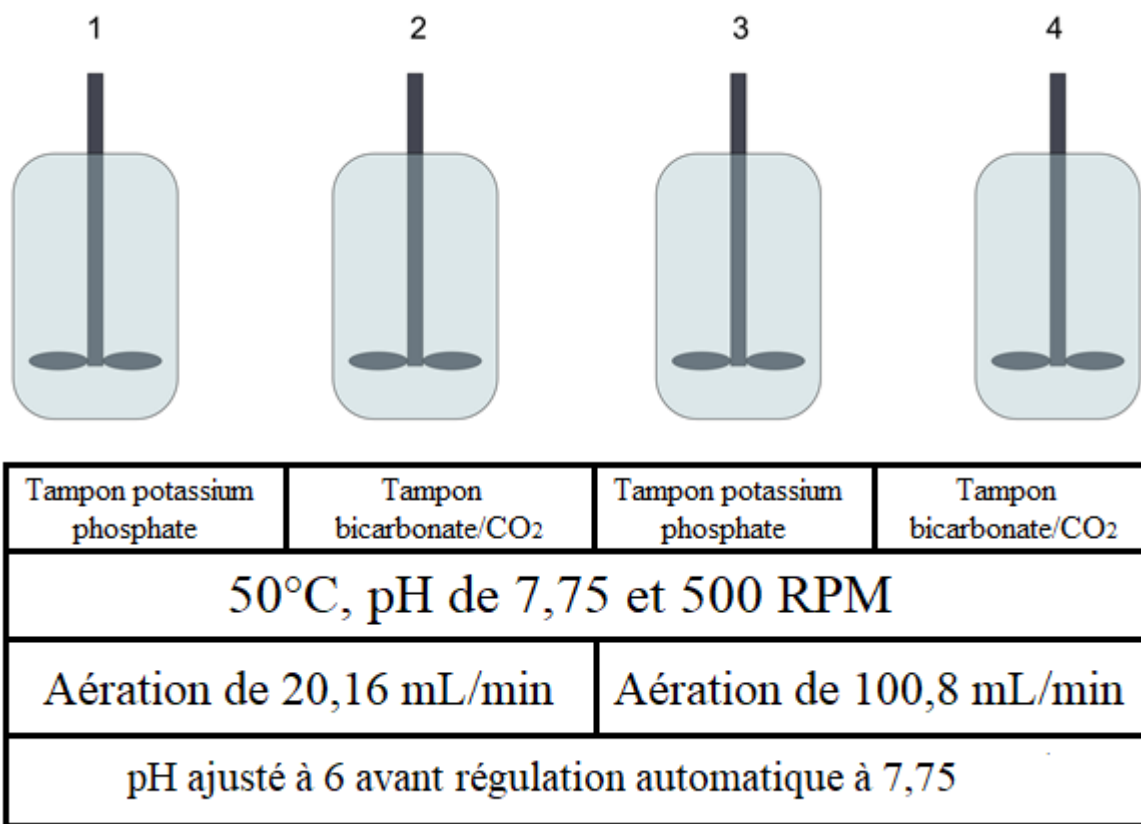


Figure 26 : Test d'aération lors de cultures de *Thermobacillus xylanilyticus* en bioréacteurs.

Une culture avec une agitation de 1000 RPM et un apport en oxygène de 0,1 VVM (20,16 mL/min) tout en conservant les autres paramètres décrits ci-dessus constants a également été réalisée afin de voir l'accès à l'oxygène dissout (transfert de masse). Cette étude se fait en absence de CO₂ et en présence de tampon potassium phosphate 0,05 M pH 7,75 dans le milieu de culture. Cette culture a été réalisée en trois répliques.

6.1.3. Tests de la nécessité de la présence d'un tampon

Une culture a été réalisée en trois répliques sans présence de tampon potassium phosphate avec une agitation de 1000 RPM et un apport en oxygène de 0,1 VVM (20,16 mL/min) tout en conservant les autres paramètres (T° , pH, milieu, source de carbone et présence d'antimousse) constants. Cette culture a été faite afin de constater si la présence ou l'absence de tampon influençait la culture en comparaison avec la culture précédente faite également à 1000 RPM et réalisée avec le tampon potassium phosphate 0,05 M (point 6.1.2).

La même comparaison a été faite avec une autre source de carbone, le xylane. Pour cela, deux cultures ont été faites en trois répliques chacune. Dans les deux cultures, le volume utile a été de 200 mL, le milieu de culture était du milieu basal complété avec du xylane (5 g/L) et de l'antimousse KS911 (75 μ L/L de milieu), le volume d'inoculation a été calculé pour atteindre une DO_{600nm} de départ de 0,1, l'agitation a été de 1000 RPM, l'aération a été de 0,1 VVM et le pH a été fixé à 7,75 et régulé par ajout automatique de KOH et d' H_3PO_4 . La seule différence entre les deux cultures a été la présence de tampon potassium phosphate 0,05 M (pH 7,75) pour une des deux cultures. L'autre culture ne contenait aucun tampon.

6.2. Cultures en ségrégostat

Dans le cadre de cette thèse, les cultures en ségrégostat ont été réalisées à partir de régénérations de *T. xylanilyticus* (à partir de la souche sauvage conservée dans du glycérol à $-80^\circ C$) faites pendant une nuit à $50^\circ C$ et 150 RPM dans du milieu glucose basal. Les cultures ont été conduites dans un bioréacteur à cuve agitée continue Biostat® B plus (Sartorius). Le volume de travail était de 1 L et les conditions de culture étaient les mêmes que celles finalement définies pour les cultures avec le système DASGIP® : une température de $50^\circ C$, un milieu basal complété avec une source de carbone (glucose 5 g/L ou xylane 5 g/L), absence de tampon, pH fixé à 7,75 et régulé par ajout automatique de KOH et d' H_3PO_4 , la présence d'antimousse KS911 (75 μ L par litre de milieu), une agitation de 1000 RPM, un apport en oxygène de 0,1 VVM et un volume d'inoculation calculé pour atteindre une DO_{600nm} de départ de 0,1. La source de carbone initialement choisie a été le xylane car c'est au cours des cultures successives avec celle-ci que les phénomènes de diversification phénotypique et l'apparition de cellules de type

cheaters ont été observés. Le glucose a été introduit par pulse afin de créer des perturbations environnementales en fonction des signaux cytométriques mesurés.

Une phase de batch a été premièrement réalisée et a duré 6 heures afin d'augmenter la biomasse de *T. xylanilyticus*. La phase de culture continue avec analyse des populations en temps réel (ségréostat) a commencé après cette période de culture. Le milieu basal complété avec du xylane a été fourni à un taux de dilution de $0,5 \text{ h}^{-1}$. Chaque 12 minutes, un échantillon a été prélevé et dilué pour des analyses cytométriques (avec les mêmes paramètres que pour les analyses successives des populations de sous-cultures dans les parties précédentes). Les dilutions (de 64 à 1024-fois en fonction des échantillons) ont été automatisées par un logiciel en ligne et les échantillons ont ensuite été automatiquement transférés au cytomètre de flux BD Accuri™ C6. Ils ont été analysés à un débit moyen de $35 \mu\text{L}/\text{minute}$, une taille de cœur de $16 \mu\text{m}$ et un seuil de 30000 en FSC-H. Tous les paramètres cytométriques ont été enregistrés en temps réel et étaient centrés sur les signaux FSC. Un script MATLAB de boucle de contrôle de rétroaction sur mesure basée sur les données cytométriques régula le profil d'un actionneur pour l'ajout de glucose (tel que décrit par Sassi et al., 2019). L'activation de l'actionneur a été établie pour un pourcentage de cellules de la *high* population (cellules sporulantes) supérieur à 50 % afin de fournir du glucose et prévenir les mécanismes de sporulation des cellules de *T. xylanilyticus*. Chaque pulse de glucose a fourni 0,5 g (correspondant à une concentration de 0,5 g/L de glucose et a donc représenté environ 9,1% de la source de carbone total) dans le système de culture en fonction des réponses de population obtenues (mesurées toutes les 12 minutes). Un pulse de glucose a donc été introduit toutes les 12 minutes si le pourcentage de cellules appartenant à la *high* population était supérieur à 50 %.

La culture en ségréostat a duré 2 jours pour un total d'environ 46 heures de culture.

7. Analyses statistiques

Les différents résultats de croissance, d'activités xylanase, de pourcentage cellulaire et d'expression du gène *tx-xyn11* ont été comparés par analyse statistique avec le test de Student à partir du logiciel MATLAB et de l'ensemble des formules du *statistics and machine learning toolbox*. Les différences ont été considérées comme significatives pour des probabilité $p \leq 0,05$. Les mêmes analyses statistiques ont été réalisées pour comparer les deux sous-populations obtenues après le triage cellulaire.

Afin de réaliser ces analyses statistiques, l'ensemble des cultures (et analyses) ont été faites en trois répliques (biologiques). Seules les cultures réalisées dans le but de définir les conditions idéales de culture de *T. xylanilyticus* en bioréacteurs n'ont pas été répétées afin de pouvoir déterminer rapidement les paramètres optimaux.

PARTIE IV : RESULTATS

A. Chapitre I : Impact des populations sur l'activité enzymatique de *Thermobacillus xylanilyticus* et caractérisation des populations – Article 1 accepté chez Microbial Cell Factories

1. Résumé étendu

L'identification des facteurs influençant la production enzymatique est le point pivot de la thèse car c'est à partir de l'identification de ces facteurs qu'une optimisation a pu être envisagée en se basant sur ceux-ci. Dans le cadre de cette thèse, l'hypothèse d'une diversification phénotypique amenant à la présence de sous-populations différentes au niveau du phénotype dans la population globale de *Thermobacillus xylanilyticus* a été avancée. Cette hypothèse a été faite suite à la présence de cellules en sporulation déjà observées lors des cultures de *T. xylanilyticus* et l'hétérogénéité de sa production enzymatique. De plus, des populations de type *cheaters* sont susceptibles d'apparaître lorsque la population microbienne repose sur une production enzymatique extracellulaire pour dégrader des substrats complexes en une forme utilisable (Velicer, 2003; Allison, 2005).

Afin de prouver l'impact de la présence de sous-populations différentes au niveau de la production hémicellulolytique, il était nécessaire de prouver la perte d'activité aux cours des cultures et d'enregistrer la diversification phénotypique et les changements populationnels en résultant au cours de cette perte. L'enregistrement de cette perte d'activité s'est fait par cultures successives avec mesure de l'activité xylanase et analyse des populations au cours des générations.

Les cultures successives ont été envisagées et ont permis de mettre en évidence la perte rapide d'activité xylanase au cours des générations (chute de plus de 75 % après 23,5 générations) et de l'expression du gène *tx-xyn11* (impliqué dans la production de la xylanase extracellulaire principale de la souche) après 23,5 générations également. Cette chute d'activité a lieu en même temps que des changements de populations. Deux sous-populations ont pu être détectées avec des propriétés de diffusion de la lumière différentes (signaux FSC différents). Une des sous-populations présentait des signaux FSC faibles (inférieurs à 30000) et l'autre présentait des signaux FSC élevés (supérieurs à 30000). Le triage cellulaire et l'observation directe des sous-populations triées ont révélé que la sous-population aux signaux FSC faibles n'était pas sporulante, alors que la sous-population aux signaux FSC élevés contenait des cellules au début du stade de sporulation. Les différences entre les sous-populations (croissance et activité xylanase) ont été évaluées pendant une croissance indépendante. La sous-population aux signaux FSC faibles a présenté une phase de latence de 10 heures de culture (et une activité xylanase allant de $0,15 \pm 0,21$ à $3,89 \pm 0,14$ UI/mL au cours de la culture) et la sous-

population aux signaux FSC élevés a présenté une phase de latence de 5 heures (et une activité xylanase allant de $0,52 \pm 0,00$ à $4,43 \pm 0,61$ au cours des sous-cultures). Ces résultats ont prouvé la différence de métabolisme des deux sous-populations au cours des cultures successives avec du xylane. Lors de celles-ci, la sous-population aux signaux FSC faibles a été sélectionnée au cours des générations et représentait alors une majorité de cellules de type *cheaters*. Les phénomènes de sporulation ont donc pu mettre en évidence une diversification phénotypique et une sélection de sous-populations ayant lieu au sein des cultures de *T. xylanilyticus*. La population présentant des signaux FSC faibles a été sélectionnée au cours des générations lors des cultures successives et de la perte d'activité enzymatique. Cette évolution peut alors être corrélée à la perte progressive de l'activité xylanase.

Afin de prévenir cette sélection de cellules de type *cheaters*, l'alternance de la source de carbone (proche de la technique utilisée en cultures ségréostat) a été envisagée. Des cultures en série sur du glucose, suivies d'un passage au xylane ont été faites et ont conduit à une amélioration de l'activité xylanase d'un facteur $\sim 1,5$ à ~ 15 -fois. Cela a donc suggéré que l'alternance des conditions de culture (sources de carbone) pourrait conduire à une stratégie efficace de gestion des sous-populations (et donc de la diversité phénotypique) pour l'optimisation de la production de xylanase chez *T. xylanilyticus*.

2. Article 1: Xylanase production by *Thermobacillus xylanilyticus* is impaired by population diversification but can be mitigated based on the management of cheating behavior

2.1. Abstract

Background: The microbial production of hemicellulasic cocktails is still a challenge for the biorefineries sector and agro-waste valorization. In this work, the production of hemicellulolytic enzymes by *Thermobacillus xylanilyticus* has been considered. This microorganism is of interest since it is able to produce an original set of thermostable hemicellulolytic enzymes, notably a xylanase GH11, Tx-xyn11. However, cell-to-cell heterogeneity impairs the production capability of the whole microbial population.

Results: Sequential cultivations of the strain on xylan as a carbon source has been considered in order to highlight and better understand this cell-to-cell heterogeneity. Successive cultivations pointed out a fast decrease of xylanase activity (loss of ~75 %) and Tx-xyn11 gene expression after 23.5 generations. During serial cultivations on xylan, flow cytometry analyses pointed out that two subpopulations, differing at their light-scattering properties, were present. An increase of the recurrence of the subpopulation exhibiting low forward scatter (FSC) signal was correlated with a progressive loss of xylanase activity over several generations. Cell sorting and direct observation of the sorted subpopulations revealed that the low-FSC subpopulation was not sporulating, whereas the high-FSC subpopulation contained cells at the onset of the sporulation stage. The subpopulation differences (growth and xylanase activity) were assessed during independent growth. The low-FSC subpopulation exhibited a lag phase of 10 hours of cultivation (and xylanase activities from 0.15 ± 0.21 to 3.89 ± 0.14 IU/mL along the cultivation) and the high-FSC subpopulation exhibited a lag phase of 5 hours (and xylanase activities from 0.52 ± 0.00 to 4.43 ± 0.61 over subcultivations). Serial cultivations on glucose, followed by a switch to xylan led to a ~1.5-fold to ~15-fold improvement of xylanase activity, suggesting that alternating cultivation conditions could lead to an efficient population management strategy for the production of xylanase.

Conclusions: Taken altogether, the data from this study point out that a cheating behavior is responsible for the progressive reduction in xylanase activity during serial cultivations of *T.*

xylanilyticus. Alternating cultivation conditions between glucose and xylan could be used as an efficient strategy for promoting population stability and higher enzymatic productivity from this bacterium.

Keywords: Hemicellulases, Xylanases, *Thermobacillus xylanilyticus*, successive cultivation, population diversification, cell sorting, substrate switch

2.2. Background

The use of lignocellulosic biomass has been identified as a promising approach in the biorefinery field for the production of bioderived products like energy, fuels, chemicals and materials to substitute the fossil carbon sources causing global warming (Naik *et al.*, 2010; Alghussain, 2018; Chandel *et al.*, 2018). In this valorization, hemicelluloses offer new possibilities of industrial applications (Qaseem, Shaheen and Wu, 2021). These ones are heteropolysaccharides and the most abundant are xylans formed by linear chains of D-xylopyranose linked by β -(1-4) glycosidic bonds (Ebringerová and Heinze, 2000; Kumar and Pruthi, 2014). Some substitutes (depending on the plant origin) such as L-arabinofuranose, D-glucuronic and 4-O-methyl-D-glucuronic acid and acetyl groups can be linked to the main chains by various bonds. In graminaceous plant cell walls, the L-arabinofuranose residues can be esterified by phenolic compounds such as ferulic and *p*-coumaric acids which can interfere with the hydrolysis process but also present interesting applications (Ebringerová and Heinze, 2000; Kumar and Pruthi, 2014; Boz, 2015). Among the different processes that could be used for lignocellulose depolymerization, the use of enzymes from different sources is a very interesting alternative already reviewed (Dodd and Cann, 2009; Deutschmann and Dekker, 2012; Van Dyk and Pletschke, 2012; Binod *et al.*, 2019). In the context of this work, the production of hemicelluloses by the bacterium *Thermobacillus xylanilyticus* will be considered.

This bacterium is indeed a very promising natural producer of enzymes for the deconstruction of xylans (Samain *et al.*, 1992). This bacterium was originally isolated from a farm soil located under a manure heap in northern France) is aerobic, gram-positive, thermophilic and hemicellulolytic (Touzel *et al.*, 2000). The hemicellulolytic enzymatic arsenal of this bacterium is composed by several enzymes including characterized two xylanases (GH10 and GH11 families, EC.3.2.1.8), one arabinofuranosidase (EC.3.2.1.55) and one feruloyl esterase (EC 3.1.1.73) (Samain, Debeire and Touzel, 1997; Debeche *et al.*, 2000; Rakotoarivonina *et al.*,

2011). This bacterium is able to mobilize a complex enzymatic arsenal according to the lignocellulosic biomass composition used as carbon source for promoting microbial growth (Rakotoarivonina *et al.*, 2012). The main hemicellulolytic activity of the strain is the GH11 xylanase secreted in the extracellular medium, Tx-xyn11 but it also produces debranching and exoenzymes (such as esterase, xylosidase, and arabinosidase) activities mainly detected in the intracellular compartment (Samain *et al.*, 1992; Rakotoarivonina *et al.*, 2012). One important feature of the enzymes produced by *T. xylanilyticus* is that they are thermostable and active over a wide range of pH values i.e., from 5 to 8.5 as pointed out by previous studies involving enzymes obtained from cultivation on wheat bran and wheat straw (Debeire-Gosselin *et al.*, 1991; Debeche *et al.*, 2000; Rakotoarivonina *et al.*, 2011) allowing their use under extreme reaction conditions e.g., for pulp and paper processing at high T° and high pH).

However, taking the microbial population out of its natural context for the industrial production of enzymes is still a challenge. Indeed, enzyme production is a highly regulated process, strongly dependent on the extracellular conditions. Additionally, it is known that the release of these enzymes in the extracellular environment can lead to cheating behavior (García-Contreras and Loarca, 2021). Cheaters are individuals among the population that benefit from the public goods released by the cooperators (i.e., in *T. xylanilyticus* case, microbial cells that are investing in enzyme production for the release of assimilable carbon sources), but that do not share the cost associated with the release of these public goods (Smith and Schuster, 2019). This is exactly what has been observed in this study, upon serial cultivations of *T. xylanilyticus* on xylan.

Typically, these cell-to-cell heterogeneity are due to epigenetic mechanisms leading to fluctuations at the level of the biochemical reactions of the cells, and modulating gene expression (Casadesús and Low, 2013; Delvigne *et al.*, 2014). In some case, these population heterogeneities are reinforced by fitness advantage (i.e., in this study, benefiting from the release of assimilable sugars without investing in enzyme production) and can cause a decrease of global productivity due to the presence of some specific non-producer (or low-producer) subpopulations (Dragosits and Mattanovich, 2013; Delvigne *et al.*, 2014).

For addressing such population heterogeneities, high throughput single-cell analyses can be provided by flow cytometry (FC). In this work, two basic FC signals will be mainly used i.e., the forward and side scatter signals (FSC and SSC), accounting for cell size and cell internal structure (Müller and Nebe-Von-Caron, 2010). This approach can be complemented based on

the utilization of metabolic sensors such as Redox SensorGreen (RSG) that allows to discriminate subpopulations in function of their metabolic activities (Baert *et al.*, 2016).

The production of specific hemicellulose enzymatic cocktails is a key for improving the profitability of the lignocelluloses biorefineries by using all parts of the lignocellulose (Kumar, Singh and Singh, 2008; Chandel *et al.*, 2018). *Thermobacillus xylanilyticus* represents an interesting source of thermostable and robust hemicellulolytic enzymes. A bottleneck for the utilization of this strain is the low enzyme production and the decrease of secreted xylanase activity with time and over successive cultivations. Accordingly, the main goals of this study are then 1) to study and understand the dynamics of enzyme production by population of *T. xylanilyticus*; 2) to attempt improving the enzyme productions by the bacteria. For this latter, whereas some cheater control strategies have been suggested (Strassmann and Queller, 2011; Wechsler, Kümmerli and Dobay, 2019), no real implementation of control/mitigation strategies have been considered so far. In this work, a simple and efficient control strategy will be implemented based on alternative cultivation conditions on glucose and xylan. To date, this work is the first to study the subpopulations from an isogenic population of a hemicellulolytic bacterium and their impacts on the extracellular xylanase/enzymatic production. It is also the first work to implement a control of the diversification process by switching between carbon sources during serial cultivations for the production of xylanase by a thermophilic bacterium.

2.3. Results

2.3.1. Successive cultivations of *T. xylanilyticus* on xylan leads to the progressive decline in xylanase activity

In order to characterize the behavior of *T. xylanilyticus* in presence of xylan and the resulting xylanase production, the growth rate (h^{-1}) and its enzymatic activity (IU/mg) were measured during 107.7 generations. For this purpose, successive cultivation in sealed bottles was considered even if the strain is aerobic. Indeed, in sealed bottles, carbon dioxide is added in the headspaces of the bottles. The carbon dioxide and the bicarbonate present in the medium are in equilibrium and create a buffer system with a pH at 7.75 necessary for the growth of the strain as described by Touzel (Touzel *et al.*, 2000). It is with these conditions that production heterogeneity was observed. These conditions were then necessary to identify the factors influencing the enzymatic production of the strain along the generations.

The initial growth rate on xylan for the first cultivation was $0.72 \pm 0.12 \text{ h}^{-1}$ (generation 0, Table S1), and this value was considered as the reference (100 %, generation 0, Figure 27). We observed that the growth increased over the generations, this increase being more important and significant ($p < 0.01$) during the first generations (increase of 31.56 % after 23.5 generations). A stabilization was then noticed around a value of 0.95 h^{-1} until the end of the successive cultivation experiment. During this stabilization, no significant difference was observed. The xylanase activity, the main enzyme secreted by *T. xylanilyticus*, was also followed. At the beginning of the cultivations, xylanase activity was $141.36 \pm 7.76 \text{ IU/mg}$ of proteins. The xylanase activities revealed a drastic decrease over generations, a significant decrease of almost 88.86 % during the first 23.5 generations ($p < 0.01$) followed by a stabilization around a value of $28.10 \pm 10.32 \text{ IU/mg}$ (Table S1). At the end of the successive cultivations (after more than 100 generations), the xylanase activity value represented only $18.51 \pm 4.54 \text{ IU/mg}$ i.e., exhibiting a significant reduction of more than 90 % by comparison with the first cultivation ($p < 0.01$).

The evolution of the *tx-xyn11* gene expression, encoding the main xylanase GH11 secreted by *T. xylanilyticus* was also assessed along generations during cultivations on xylan and on glucose as a control. At the beginning of the cultivations, and as expected, the expression level of *tx-xyn11* gene was very low in presence of glucose. On xylan, *tx-xyn11* expression level was almost 30-fold higher than on glucose (Figure S1), this observation being in accordance with the induction level previously recorded for this strain (Debeche *et al.*, 2000).

Upon successive cultivations on xylan, a progressive decrease of *tx-xyn11* expression over the generations was observed (Figure 27B). This decrease accounted for 36.49 % of the maximum level after 23.5 generations by comparison with the *tx-xyn11* expression level measured at the beginning of the cultivation tests which was significant ($p < 0.01$). After this first decrease, the expression level of *tx-xyn11* remained close to 60 % of the initial level for 108 generations. Interestingly, the evolution of the expression level followed the same trend as the one recorded for the enzymatic activity during successive cultivations on xylan (Figure 27A). Gene expression can be thus considered as the main cause for the decrease observed for the xylanase activity. Considering the fact that the xylanase is an extracellular enzyme and that some cells can adopt a cheating strategy for avoiding the cost related to the synthesis of this molecule (Perkins and Swain, 2009), single-cell experiments were then considered for determining the possible impact of cell-to-cell variability on xylanase production.

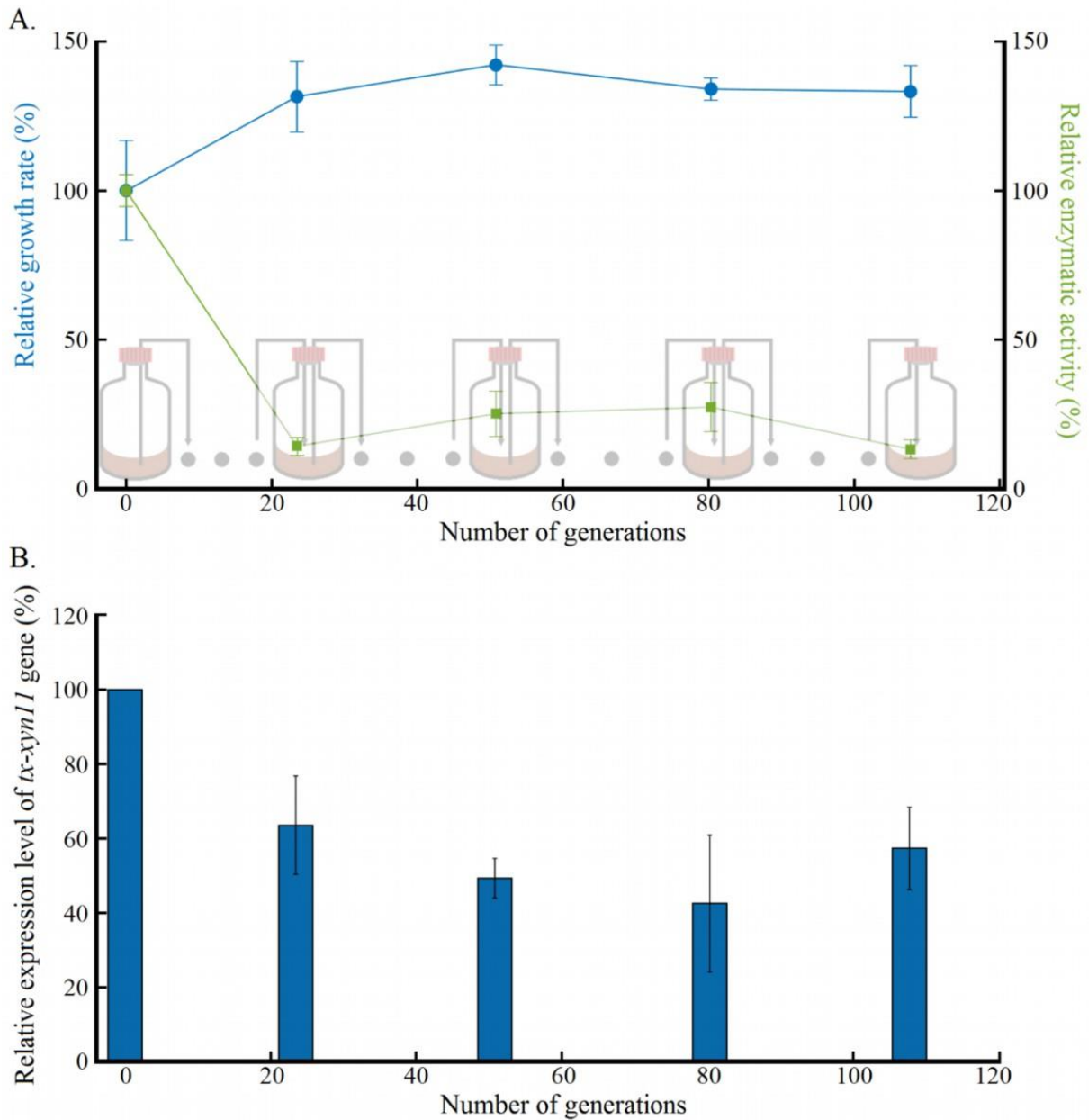


Figure 27 : Evolutions of growth rate and xylanase production characteristics of *Thermobacillus xylanilyticus* over generations.

Evolution of relative growth rate (blue circles) and relative xylanase activity (green square) over generations normalized with the values at generation 0 (A); Relative expression level of *tx-xyn11* gene over generations (B). Absolute values of growth rate and enzymatic activity can be found in Table S1. The level of *tx-xyn11* gene expression was normalized with the 16S rRNA gene expression before comparison along the generations during successive cultivations with

xylan. The first cultivation (generation 0) was then defined as the 100 % expression level and as reference sample. The expression levels over the generations were expressed as the fold increase of *tx-xyn11* mRNA level over the generation 0.

2.3.2. Flow cytometry (FC) reveals two subpopulations exhibiting different light scattering properties

FC analyses were then performed for determining the possible occurrence of different subpopulations of *T. xylanilyticus* during the successive cultivation experiments. Results highlighted the presence of two subpopulations in *T. xylanilyticus* cultivations after 5 hours of cultivations (Figures 28A, 28B and 28C). Indeed, the segregation between the two subpopulations can be observed based on the Forward Scatter (FSC) signal which is proportional to the cell size. A FSC-A threshold value of 30,000 (Arbitrary Unit) can discriminate two subpopulations. The subpopulation with values below 30,000 in FSC-A has been called *low* subpopulation (*L*) and the subpopulation with values above 30,000 in FSC-A has been called *high* subpopulation (*H*).

This clear segregation based on the FSC-A threshold allowed tracking the two subpopulations over the different generations (Figure 29). At the beginning of the cultivations (generation 0), the two subpopulations were present at a similar level (47.09 ± 11.84 % and 52.91 ± 11.84 % for the *low* and the *high* subpopulation respectively). The evolution of the ratio between the subpopulations over the different generations was marked by an increase of the *low* subpopulation. This increase was more important during the 23.5 first generations, where the percentage rose significantly from 47.08 % to 73.87 % ($p < 0.01$) and then stabilized (with no more significant change) to 83.77 % after 108 generations.

The two subpopulations did not exhibit any differences upon staining respectively with RedoxSensor green and Propidium Iodide (FL1-A and FL3-A values), indicating that it did not differ by their respective metabolic activity and membrane permeability.

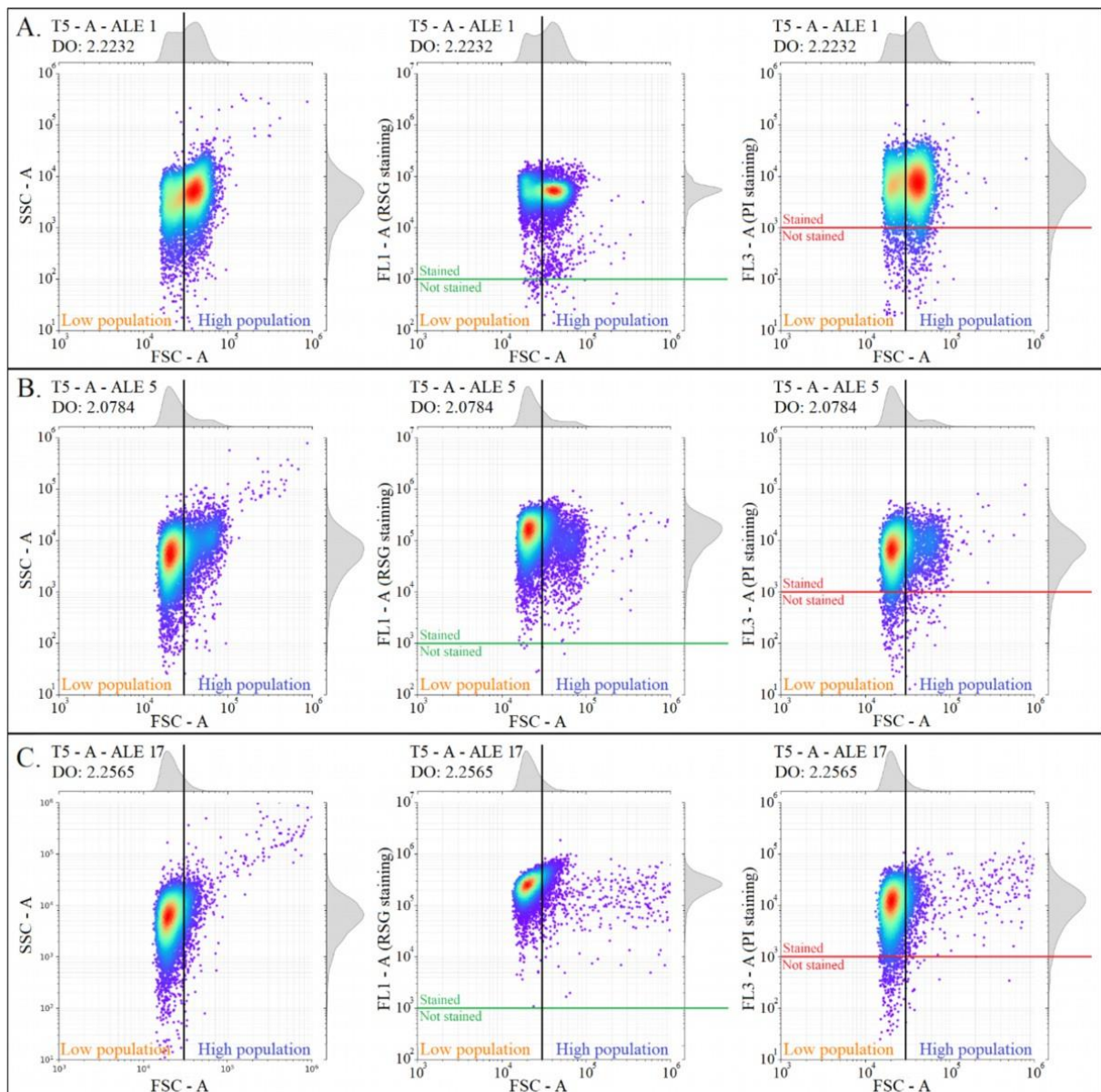


Figure 28 : Subpopulations of *Thermobacillus xylanilyticus* analyzed by flow cytometry during successive cultivations on xylan. The subpopulations were resolved based on the FSC-A values. The segregation between the two subpopulations was done by considering a gating value of 30,000 in FSC-A (orange line). The figures represent the SSC-A values (on the left), the FL1-A values (on the middle) and the FL3-A values (on the right) in function of the FSC-A values. Generations 0 (A); 23.5 (B) and 107.7 (C) respectively.

Complementary FC analyses were performed on different substrates (i.e., xylan, glucose and wheat bran) in order to better characterize the occurrence of the two subpopulations (Figure 30). Wheat bran was selected as an interesting carbon source, considering its high xylan content

(Rakotoarivonina *et al.*, 2012). At the beginning of the culture and during the exponential phase (4 hours of cultivations) whatever the substrate used, the *low* subpopulation was dominant and accounted for 72.1, 87.3 and 84.9 % of the total number of cells on xylan, glucose and wheat bran respectively. At the end of exponential phase on glucose and xylan, an increase of the *high* subpopulation was observed (Figure 30A and 30B). For wheat bran cultivations, the *low* subpopulation remained dominant during all the experiment. It is also on wheat bran that less sporulation was always observed. Then, the balance between the two subpopulations seems to be easier to achieve when rich carbon source (i.e., glucose) is considered instead of more difficult to assimilate ones (i.e., xylan and wheat bran). Taken altogether, these data point out a possible occurrence of sporulation. This hypothesis is reinforced by the fact that cells triggering the formation of endospore tend to modify their light scattering properties as detected based on flow cytometry analyses. Accordingly, microscopy analyses will be considered in the next section.

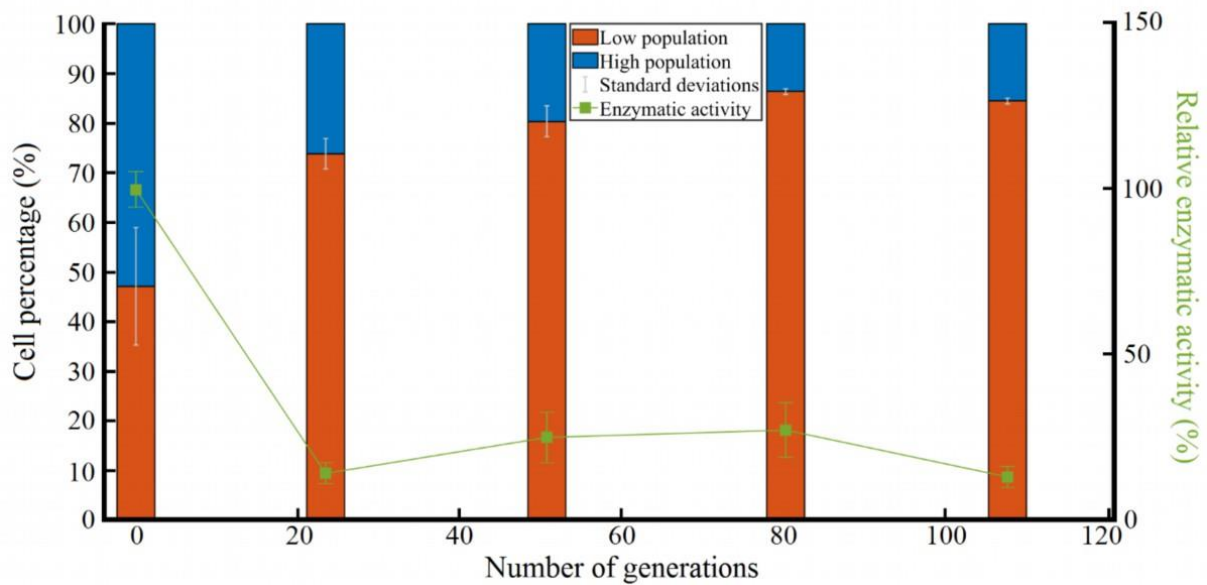


Figure 29 : Evolution of each subpopulation cell percentage and xylanase activity upon successive xylan cultivations.

The orange and blue bars represent the means of cells belonging to the *low* and *high* subpopulation respectively. The standard deviations are represented by white lines. The evolution of the enzymatic activity expressed in IU/mg of proteins (green lines) is also presented.

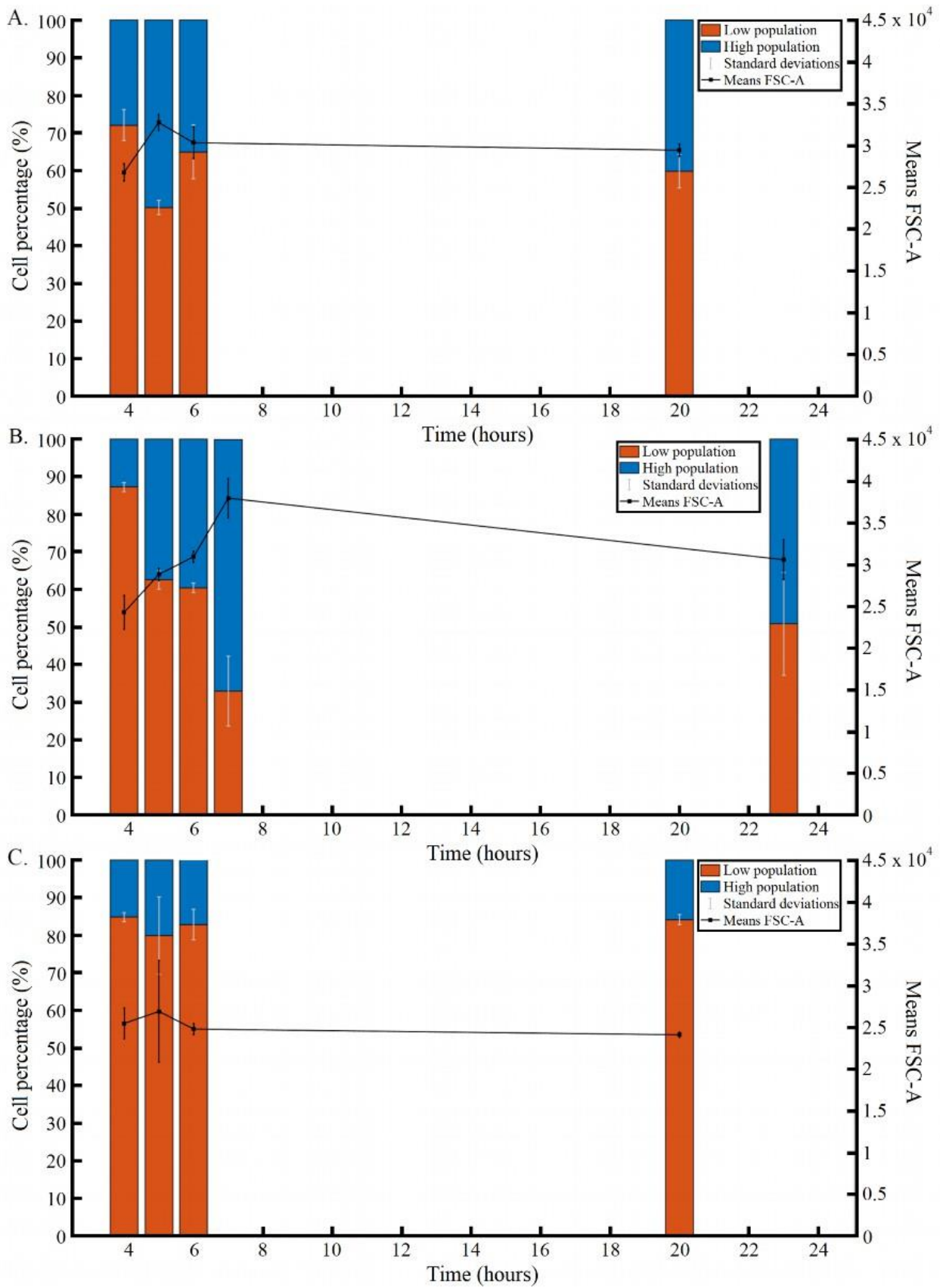


Figure 30 : Physiological changes of *T. xylanilyticus* detected by flow cytometry on different substrates. The substrates considered are either xylan (A), glucose (B) and wheat bran (C).

2.3.3. Cell sorting reveals that the high-FSC subpopulations contains cells at the onset of sporulation

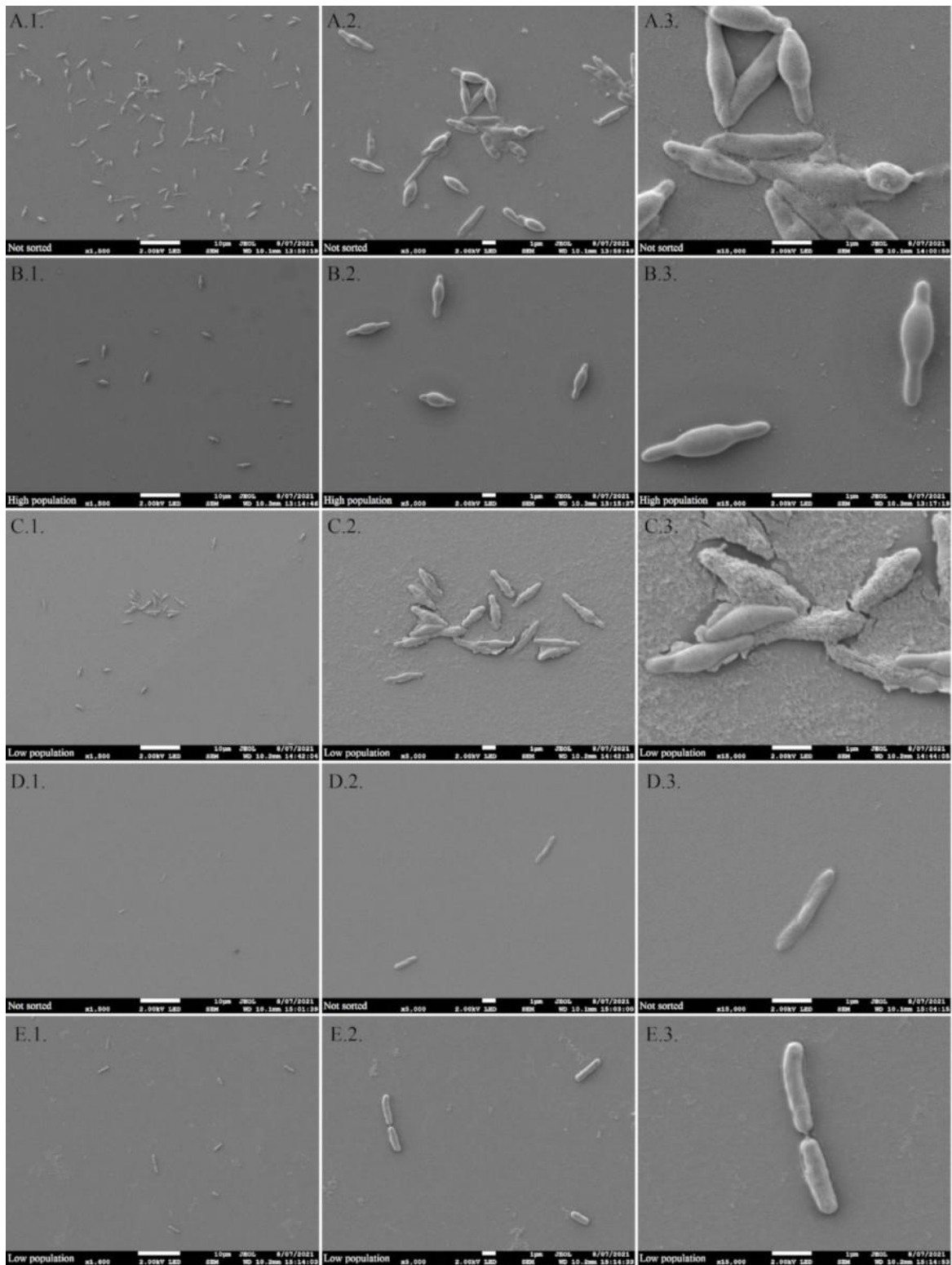


Figure 31 : Morphological changes along the generations. Cells were observed by SEM at magnification 1500-fold (1), 5000-fold (2) and 15000-fold (3). Generation 0 not sorted (A),

generation 0 sorted to obtain *high* subpopulation (B), generation 0 sorted to obtain *low* subpopulation (C), G50 not sorted (D) and G50 after cell sorting (E).

In order to get more insights about the possible physiological differences between the *low* and the *high* subpopulations, cells collected from samples acquired during successive cultivations on xylan were sorted based on their FSC properties, and morphological analyses were performed with Scanning Electron Microscopy (SEM). More specifically, the generations for which a strong modification of the enzyme activity was recorded were analyzed i.e., the 20th generation (G20) and the 50th generation (G50). The SEM pictures revealed that two types of morphologies were present at G0 after 5h of cultivation (Figure 31A) i.e., either very long (or dividing) cells and sporulating cells. After cell sorting of the two subpopulations at G0, the *high* subpopulation contained cells with well-formed sporangia in central position (Figure 31B). Some sporulating cells were also observed in *low* subpopulation but at an earlier sporulation stage (Figure 31C). From G20 to G50, a predominance of the *low* subpopulation was observed by flow cytometry, most of the cells being in the vegetative state (at the same cultivation time) up to G50 (Figure 31D). The cell sorting at G20 and G50 revealed the predominance of the *low* subpopulation with vegetative cells (Figure 31E).

These observations confirmed the morphological and physiological diversification of the subpopulations upon successive cultivations and the progressive decrease of the *high* subpopulation. It also correlated the *high* subpopulation with cells exhibiting advanced sporulation stage and the *low* subpopulation containing vegetative cells.

In order to determine the impact of this diversification process on the production of extracellular xylanase by *T. xylanilyticus*, the *low* and the *high* subpopulations were sorted and subcultivated. The cell sorting was done at generation 0, after 5 hours of cultivation during the exponential growth phase (Figure 32A) when the two subpopulations were present similarly at approximately the same ratio.

The growth rate and the xylanase activity for each subpopulation were assessed in the presence of xylan. A common feature observed for the two subpopulations was the lag phase, which was very long, probably due to the very low inoculum used after cell sorting. However, the lag phase

was longer for the *low* subpopulation (Figure 32B). The growth began after 5 hours for the *high* subpopulation and after 10 hours of incubation for the *low* subpopulation. However, the duration of exponential growth phase was similar for the two subpopulations. (3, 5 and 4 hours for the *low* and *high* subpopulation respectively) with growth rates of $0.55 \pm 0.01 \text{ h}^{-1}$ and $0.82 \pm 0.02 \text{ h}^{-1}$ respectively.

About the xylanase activity, an important difference of xylanase activity was noticed at the beginning and at the onset of the exponential phase. Statistical analyses did not allow to conclude to a significant difference ($p = 0.127$) but the means xylanase activity production was 3.5-fold higher for the *high* subpopulation by comparison with the production level of the *low* subpopulation at the beginning of the exponential phase ($\sim 0.52 \pm 0.00 \text{ IU/mL}$ vs $\sim 0.15 \pm 0.21 \text{ IU/mL}$ for the *high* and *low* subpopulations respectively) (Figure 32C). At the end of the exponential phase, a difference between the two subpopulations was also observed as the xylanase activity produced by the *high* subpopulation was 1,89-fold higher than the one observed for the *low* subpopulation. It was not a significant difference, but it was more important than at the onset of sporulation ($p = 0.0793$). A sharp increase of xylanase production was observed between the end of exponential phase and stationary phase ($1.33 \pm 0.5 \text{ IU/mL}$ to $3.89 \pm 0.14 \text{ IU/mL}$ and $2.52 \pm 0.06 \text{ IU/mL}$ to $4.43 \pm 0.61 \text{ IU/mL}$ for the *low* and *high* subpopulations respectively) with the two subpopulations exhibiting similar level of xylanase concentration after this phase. The cell sorting confirmed then the presence of different subpopulations related to xylanase production. The difference is more noticeable with the required time for the production and not the production level itself. Indeed, both populations exposed xylanase production, but it required more time for the low population which needs to adapt its metabolism for production when cultivated alone.

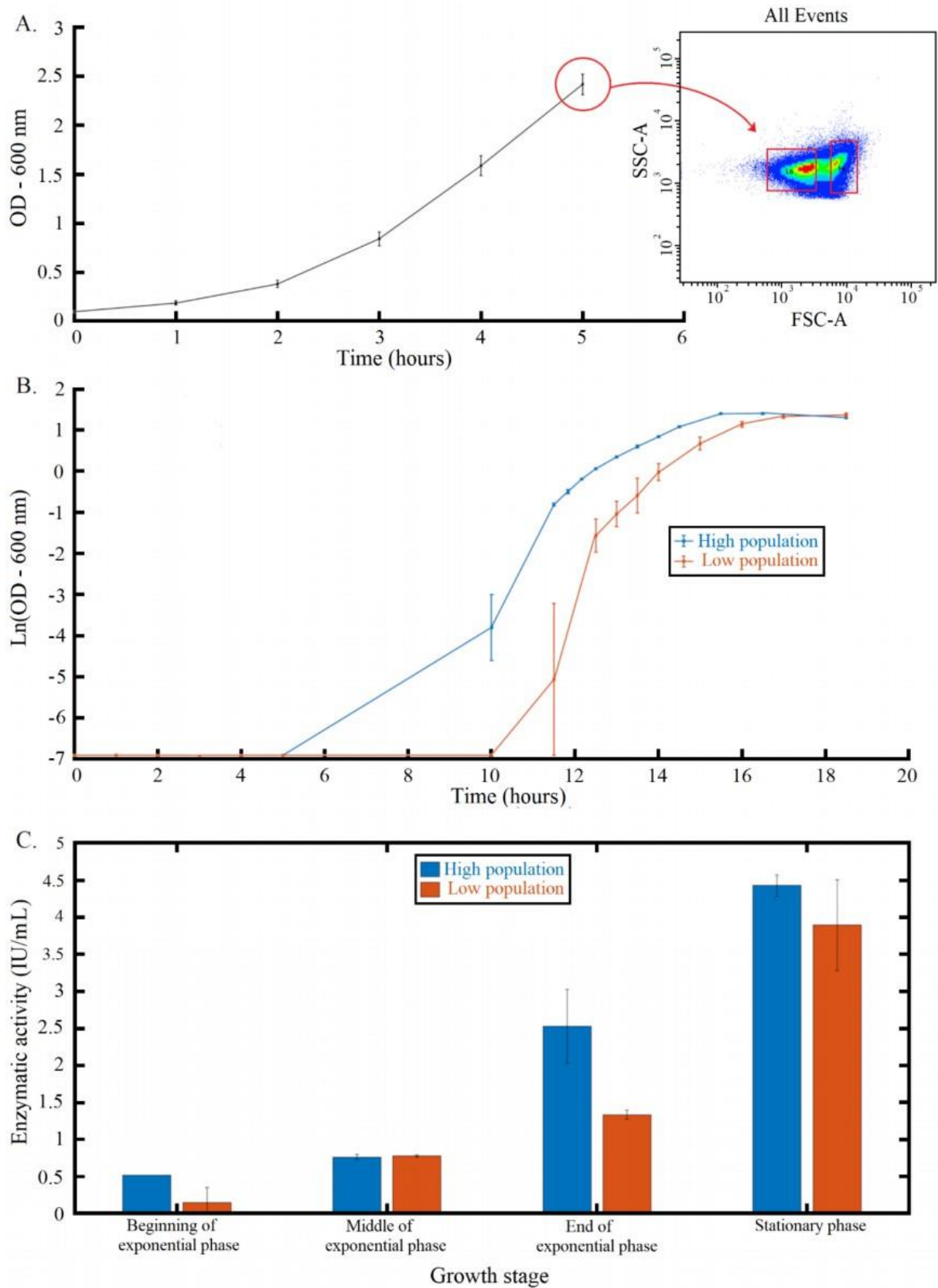


Figure 32 : Characterization of the two subpopulations of *T. xylanilyticus*. Growth and flow cytometry profiles of generation 0 cultivations before cell sorting (A). The red boxes on the

FSC-SSC dotplot represent the gates used for discriminating the two subpopulations; Growth profiles of the two subpopulations (B); Xylanase activities for the two subpopulations at different growth phases (C). The blue lines and bars represent the *high* subpopulation, and the orange ones represent the *low* subpopulation.

2.3.4. Improving the xylanase production based on a cheater management strategy

As shown in the previous section, the presence of a subpopulation exhibiting reduced extracellular enzyme production during successive cultivations led to a global decrease of xylanase production by *T. xylanilyticus*. This *low*, non-producing, subpopulation was considered as a cluster of cheater cells. In order to validate this hypothesis, and as an attempt to control the occurrence of cheater cells, successive cultivations on glucose instead of xylan were considered. Indeed, glucose being a more easily usable carbon source, *T. xylanilyticus* does not require xylanase for its growth with this carbon source. The strategy was then to prevent the selection of one subpopulation along generations by providing an important pool of usable carbon source before switching to more complex substrates requiring enzymes to produce a usable form of carbon source. For this, *T. xylanilyticus* was cultivated during the successive cultivations experiment on glucose and carbon source shifts from glucose to xylan were done to evaluate the impact on xylanase production. The occurrence of the two subpopulations was done on flow cytometry analyses and xylanase production was also assessed (Table S2 and Figure 33).

The growth rate on glucose at the beginning of the cultivations (generation 0) was 0.87 ± 0.05 h⁻¹ and did not change significantly over the generations considering the standard deviations (Figure 33A).

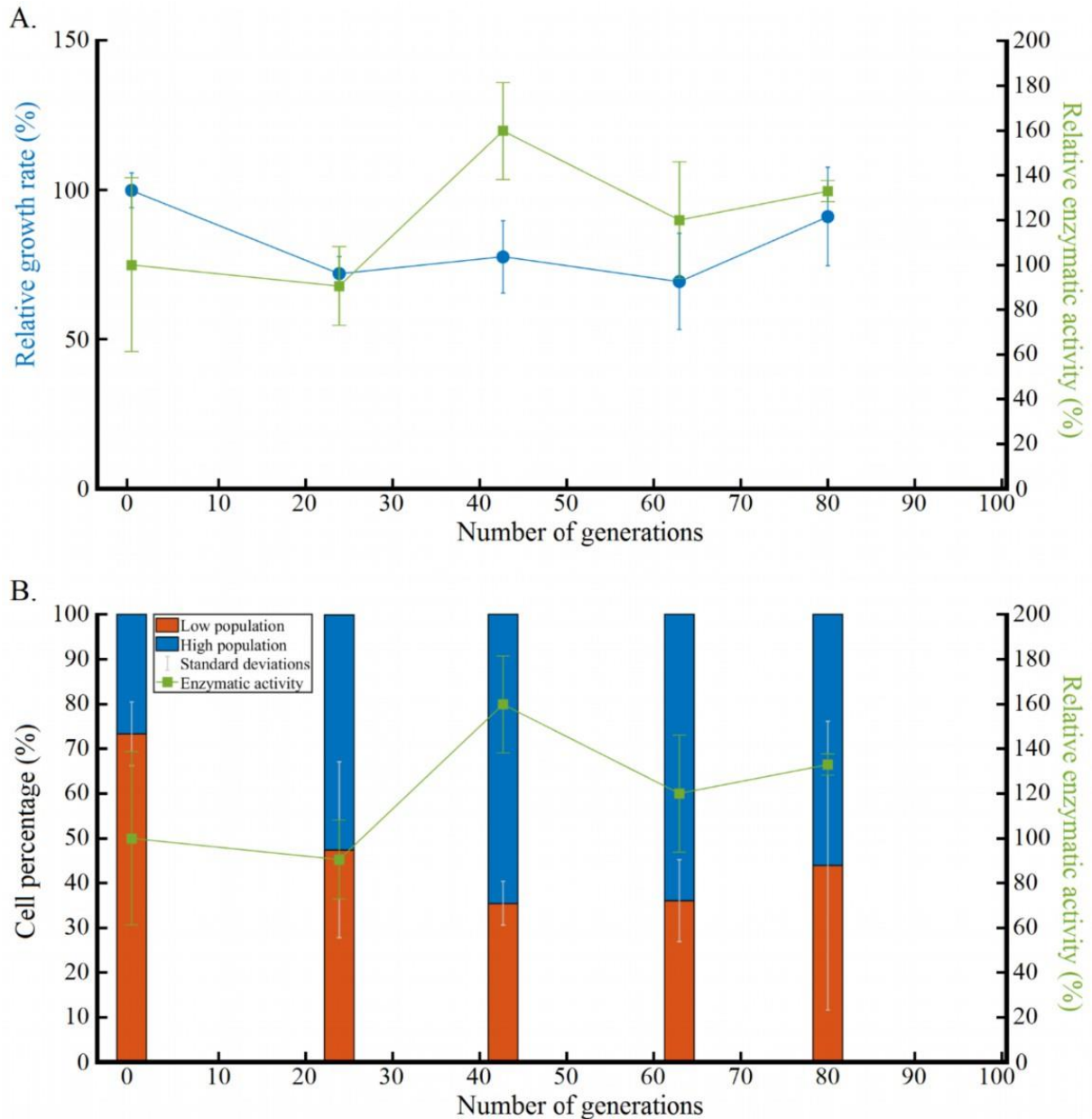


Figure 33 : *Thermobacillus xylanilyticus* subpopulations evolution during glucose successive cultivations with xylanase activity being recorded after xylan switching. Relative evolution of the growth rate (blue circles) and enzymatic activity after substrate switch (green squares) over generation (A); Evolution of cell subpopulations in percentage over generations after flow cytometry analyses (B). The xylanase activity was measured after a switch of carbon source from glucose to xylan at the same growth stage (green lines in A and B).

At the beginning of the cultivation, the measured xylanase activity represented 217.07 ± 84.20 IU/mg of proteins (values closed to the ones obtained at generation 0 on xylan successive cultivations, 141.36 ± 7.77 IU/mg of proteins, considering the standard deviations). The xylanase enzymatic activity after the carbon source switch (from glucose to xylan) over the different generations pointed out a stabilization of the production and the enzymatic levels quantified were comprised between 217.07 ± 84.20 and 288.55 ± 10.70 IU/mg between generations 0 to 79.9 with a peak at 346.99 ± 47.07 IU/mg after 42.7 generations (Figure 33A). In contrast to the experiments carried out on xylan, no significant loss of activity was observed when xylan was replaced by glucose. The level of xylanase activity was relatively high for all the generations when glucose was used as the main carbon source and subpopulations were switched to xylan at the end of each cultivation cycle. Globally the production of xylanase by *T. xylanilyticus* over successive cultivations was stabilized when glucose was used as the main carbon source (data from Table S2, by comparison with data from Table S1).

The flow cytometry analyses performed during the successive cultivations on glucose pointed out the presence of the two previously observed subpopulations (*low* and *high*) such as for the successive cultivations on xylan. Figure 33B showed that, at the beginning of the experiment, the *low* subpopulation represented 73.36 ± 7.13 % of the total population. Over successive cultivations on glucose, the percentage of cells into the *high* subpopulation significantly increased up to 64.51 % ($p < 0.05$) after 42.7 generations where the maximal level of xylanase activity was obtained. On the opposite, successive cultivations on xylan led to a drastic reduction of the *high* subpopulation.

2.4. Discussion

Successive cultivation tests pointed out a population degeneration effect at the level of extracellular xylanase activity by *T. xylanilyticus*. This decrease was linked with a significant drop at the level of the transcriptional activity linked to this enzyme and was characterized for the first time for this bacterium. This kind of production decrease has already been observed for many other microorganisms (bacteria and fungi) of industrial interest (Peng and Liang, 2020). The main question is to know whether this decrease can be attributed to a global reduction of enzyme production by all the cells within the population or due to a subpopulation of cells. Single-cell analyses revealed that two subpopulations were generated during the successive cultivations on xylan i.e., a subpopulation exhibiting a *low* FSC signal and the other

exhibiting a *high* FSC signal. Such modulation of the FSC signal suggests a significant alteration of the cellular morphology (Bouchedja *et al.*, 2018). According to microscopy observations, the *high* subpopulation comprised cells in a premature stage of sporulation (onset to sporulation being triggered during the exponential phase). Upon cell sorting and subcultivation, the *high* subpopulation exhibited a shorter lag phase and an earlier xylanase production, suggesting that these sporulating cells are still able to produce the target enzyme. These differences at the level of the enzyme production capability suggest that a cheating mechanism can be at the origin of the population degeneration effect observed during successive cultivation. The cheater phenotype is prone to appear when microbial population relies on an extracellular enzymatic production to degrade complex substrates into an usable (Velicer, 2003; Allison, 2005). In *T. xylanilyticus* case, since xylanase is excreted to the extracellular medium, some cells can avoid the metabolic burden associated with the production of this enzyme but still take benefit from the monomers released by the active members of the population (García-Contreras and Loarca, 2021).

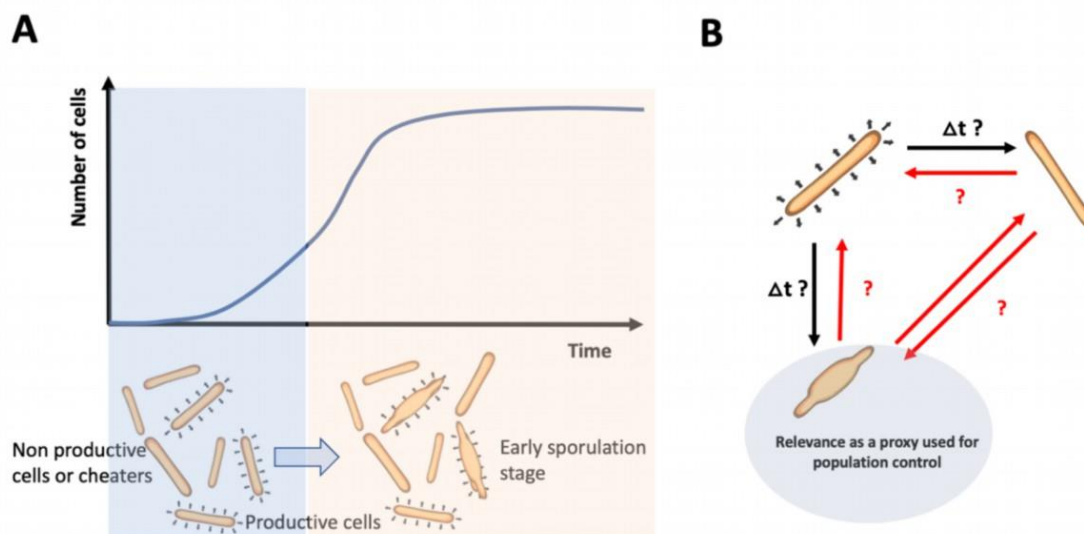


Figure 34 : Model for *T. xylanilyticus* diversification at the population (A) and single-cell level (B).

According to these observations, a preliminary model can be advanced (Figure 34). At the population level (Figure 34A), diversification and split into two subpopulations with distinct FSC properties are observed during the exponential phase. In this case, the premature

sporulation can be due to the metabolic burden carried by the non-cheating cells. At the single-cell level, the picture is more complex (Figure 34B). First, if there is a need for a better characterization of the population dynamics, the transition rates between the main phenotypes (either productive or non-productive cells) and morphotypes (either sporulating or non-sporulating cells) need to be quantified. Additionally, a series of unknown remains i.e., some transitions that have not been considered in the initial view of the process (delineated by red arrows on Figure 34B). However, a common observation is that the “sporulating” state can be easily detected based on single-cell technologies and could be used as a proxy for detecting population degeneration. Some studies have already proven the presence of sporulating cells or morphologically different cells directly impacting the productivity of the process such as *Clostridia* (Tracy, Gaida and Papoutsakis, 2008; Dürre, 2014). This work is the first to study bacterial subpopulations from an isogenic global population and highlights their impacts on an hemicellulase production. Some studies already exist for the application of flow cytometry for the identification and cell sorting (by FACS) of fungal cells (*Aspergillus niger* and *Trichoderma reesei*) to detect cellulase activity and select improved strains for cellulase production but not on hemicellulase production. Moreover, this study provides a strategy based on a cheater management which is a first for improving xylan hydrolysis of lignocellulosic biomasses. Unlike fungal studies, it is not based on mutagenesis, screening and cell sorting.

Advanced single-cell technologies could be implemented in order to refine the resolution about microbial population dynamics. Among them, single-cell cultivation microfluidics could be used for tracking cells and determining more precisely the transition rate between the different morphotypes (Täuber *et al.*, 2020). Another alternative would be to use automated flow cytometry and feedback control. Such technologies have already been used for characterizing population dynamics of Gram-negative bacteria based on an approach called segregostat (Sassi *et al.*, 2019; Nguyen *et al.*, 2021).

2.5. Conclusions

This study pointed out the importance of populations diversification processes during long-time cultivation experiments. Four main observations can be highlighted: 1) the strain degeneration at the level of xylanase production from *T. xylanilyticus* along generations on xylan (decrease of 88.86 % after 23.5 generations); 2) the presence of two different populations for this bacterium; 3) the difference between the two populations (the *low* population which is not

sporulating but less producing and the *high* population which is sporulating but more producing) and the impact of balancing the two population on the xylanase production (selection of the *low* population along generations with xylanase production decrease); 4) the impact of substrate switching (from glucose to xylan) on populations stability according to xylanase activity (increase of 1.54-fold) and stability of this production with no more decrease of xylanase production along generations. All these elements open up new perspectives for the effective control of population diversification, notably by using advanced single-cell technologies.

This study is the first to date to highlight phenotypic diversification process as being responsible for the progressive decrease in xylanase production by a thermophilic hemicellulolytic bacterium. Also, based on the characterization of the diversification process, a mitigation strategy has been derived in order to force the population for producing the target enzyme. This strategy, relying on the alternance between glucose and xylan, was used effectively to mitigate the diversification of the population based on the FSC signal, leading to an improved xylanase production during successive cultivation. This strategy has been notably applied in adaptive evolution studies by switching between cellobiose and glucose in order to obtain *Thermobifida fusca* strain exhibiting higher cellulase production (Deng and Fong, 2011). In *T. xylanilyticus* case, phenotypic diversification is more likely to occur, and such strategy could be implemented into a more sophisticated control procedure relying on automated single-cell measurement in order to prevent the appearance of cheaters during successive or long-term continuous cultivations.

2.6. Methods

2.6.1. Strains and media

Thermobacillus xylanilyticus XE9/11/91 isolated from a farm soil under a manure heap in northern France, already characterized by different studies and conserved in glycerol at -80°C was used in this work. The bacterium was cultivated on basal medium composed by three different solutions, a macro-mineral solution, a vitamin solution, and a metallic trace solution complemented with NH₄Cl (1 g/L), yeast extract (2 g/L), NaHCO₃ and supplemented with 10 % CO₂ as previously described by (Touzel *et al.*, 2000). Cultivation volumes are 10 mL or 50 mL of media in sealed contents (100 mL or 500 mL bottles). Various carbon sources were used:

xylan from beechwood 5 g/L (Roth), glucose 5 g/L (Sigma Aldrich) or destarched wheat bran 10 g/L (ARD Pomacle-Bazancourt, France).

2.6.2. Successive cultivations of *Thermobacillus xylanilyticus*

The strain was regenerated from glycerol stock and an overnight non sporulated preculture (OD_{600 nm} between 1.5 and 2) was prepared on glucose basal medium at 50°C and 150 RPM in glucose basal medium with Multitron shakers (Infors). The xylan media (in 50 mL volume) were inoculated with the preculture to reach a start optical density of 0.1 for the cultivations start. The cultivation was done at 50°C, 150 RPM during 5 hours in xylan basal medium. After 5 hours, a new cultivation was started from the previous one. The successive cultivation was performed every 5 hours (Figure 35). Each 4 cultivations (G20 or generation 23.5, G50 or generation 50.8, G80 or generation 80.3 and G100 or generation 107.7 for xylan), a following of the growth was done by measuring the OD_{600 nm}. The growth rate was calculated during the exponential phase with the formula: $\mu_{\max} = \ln(N_2/N_1)/t_2-t_1$ with N representing the bacterial population (here the optical density measured) and t the cultivation time. The generation numbers (n) were directly calculated with the formula: $n=T/g$ where g represents the generation time ($g=\ln 2/\mu_{\max}$) and T the total cultivation time. Successive cultivations experiment was performed in triplicate for 17 serial transfers (corresponding to more than 100 generations).

For the followed generations, population analyses were also done by cytometry, xylanase activity production and the xylanase (*tx-xynII*) gene expression measured. Figure 35 summarizes the main experiments performed during the successive cultivations.

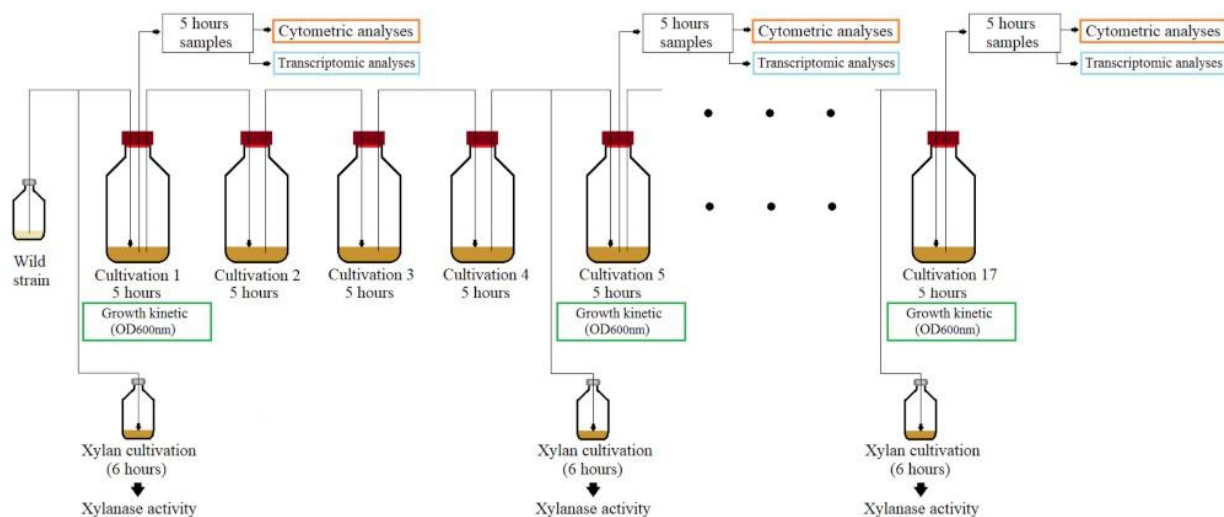


Figure 35 : Schematic representation of the successive cultivations experiment of *Thermobacillus xylanilyticus*.

2.6.3. Measurements of the xylanase enzymatic activity

To evaluate the xylanase activity secreted by *T. xylanilyticus*, for each followed generation, new 6h (to reach the early stationary phase) cultivations on xylan in 10 mL were prepared. At the end of the cultivations, samples were centrifuged at $3354 \times g$ for 10 minutes (Sorvall ST 8R centrifuge, Thermo Fisher Scientific) at 4°C and the supernatant was recovered. The xylanase activity was determined in triplicate by using the reducing end sugars measurement according to the procedure described by Kidby and Davidson (Kidby and Davidson, 1973).

Briefly, 0.1 mL of the supernatants (diluted or not) are incubated in 0.9 mL beechwood xylan (Roth) at 0.5 % w/v homogeneously suspended in 50 mM sodium acetate buffer (pH of 5.8) at 60°C for 10 minutes. The reducing sugars were measured by following the absorbance at 420 nm on a Specord 200 Plus uv/vis spectrophotometer (Analytik Jena) and by comparing the values with a standard curve done with varying concentrations of xylose. The activity was expressed in IU/mL. One international unit (IU) of enzyme activity was defined as the quantity of enzyme (xylanase) required to liberate one μmol of equivalent xylose per minute at 60°C .

The IU values were normalized with the quantity (in mg) of total protein in the supernatants. The concentrations of total protein in the samples were determined by the Bradford procedure (Marion M. Bradford, 1976) with a commercial reagent $5\times$ (Serva) as recommended by the supplier. After normalization, the activity was expressed in IU by milligrams of total proteins (IU/mg).

2.6.4. Measurements of the *tx-xyn11* gene expression

The cultivation samples for gene expression (5 mL) were centrifuged at $3354 \times g$ for 10 minutes (Sorvall ST 8R centrifuge, Thermo Fisher Scientific) at 4°C. Cell pellets were kept in 1.5 mL of RNAlater at -80°C before the analyses. The cells pellets were used for RNA extraction with RNeasy Mini Kit (Qiagen) by following the supplier recommendations. The obtained RNA solutions were treated with RNase-Free DNase Set (Qiagen) to prevent the presence of DNA in the samples. Absence of DNA was verified by polymerase-chain reaction with DreamTaq™ Hot Start Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific) by using specific primers for *tx-xyn11* gene, followed by electrophoresis migrations on RNase-free TBE buffer 1× agarose gel 1 % (Mupid® One Electrophoresis System, Eurogentec). The RNA concentrations were determined using a Qubit™ Fluorometer and Qubit® RNA Assay Kit (Invitrogen).

First strand cDNAs were synthesized by using SuperScript® IV First-Strand cDNA Synthesis Reaction kit (Thermo Fisher Scientific) with 500 ng of total RNA in presence of random hexamer primers (50 µM), DNTP mix (0.5 mM of each), 1× SuperScript IV buffer, DTT (100 mM), RNaseOUT™ Recombinant RNase Inhibitor (2 U/µL) and 800 U (or 40 U/µL) of Superscript IV reverse transcriptase in a final volume of 20 µL. The synthesis was done at 23°C for 10 minutes followed by a step at 52.5°C for 10 minutes. An inactivation was done at 80°C for 10 minutes. The generated cDNAs were kept at -80°C until utilization.

Quantitative PCR was realized with a QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System (Applied Biosystems™) to determine the *tx-xyn11* gene expression. Specific primers (forward primer: GACGGCACGCAGACGTTCCA, reverse primer: GCCTTCGGTTGCGAGCACCT) previously described (Rakotoarivonina *et al.*, 2014) was used and yielded a specific 162 bp long product. Before utilization, the specificity of the primers was tested and confirmed.

The amplifications were performed in 15 µL final volume containing 7.5 µL of Absolute Blue qPCR SYBR green low ROX mix (Thermo Fisher Scientific), 1.4 µL of primers mix (280 nM), 1.1 µL of DNase/RNase-free water and 5 µL template cDNA (10-fold diluted).

The PCR program was the following: an initial denaturation of 95 °C for 15 s followed by 40 cycles of 95 °C for 10 s, 60 °C for 45 s with a single fluorescence measurement before an elongation step of 72°C for 30 s. The specificity of the PCR products was confirmed by melting curve analysis (after a step at 95°C for 15 s, the melting curve analysis was performed between

60–95 °C with a heating rate of 0.1 C°/s). Different non-template controls and positive controls (with genomic DNA of *T. xylanilyticus*) were also included to confirm the specificity of the reactions. The *tx-xyn11* transcripts were normalized by using the expression of *T. xylanilyticus* 16S rRNA gene amplified by using the specific primers (forward primer: CGCGAGCGACGCAATCCCA, reverse primer: CGGTTACCCCACCGGCTTCG). For the relative expression of *tx-xyn11* gene, calculation was done using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method (Livak and Schmittgen, 2001). For the quantification of *tx-xyn11* transcripts over generations, the expressions of *tx-xyn11* at the beginning of the successive cultivations (generation 0) were used as reference samples. In order to compare, the expression of *tx-xyn11* gene between glucose and xylan successive cultivations, the reference sample was defined as the first cultivation on glucose. The results were expressed as the fold increase of mRNA level over the reference samples. Quantitative PCR was realized in triplicates for each sample of successive cultivations.

2.6.5. Population analyses by flow cytometry

Population analyses at the different generations described above (for the successive cultivations) were done by flow cytometry with a BD Accuri™ C6 (BD Biosciences) using the MOBICYTE core facilities (University of Reims Champagne-Ardenne). The analytical parameters were flow rate of 35 µL/minute, core size of 16 µm and the threshold were down to 30000 in FSC-H. 20 000 cells were collected for each sample.

Samples taken at different generations (5 mL) were filtered with 5 µm cellulose syringe filters and diluted with PBS 1× to reach maximum 2500 detected events/s (and events/µL) to prevent doublet reading. Samples were analyzed first unstained, and populations were detected by the forward and scatter signals (respectively FSC-A and SSC-A) to determine cell percentage of each detected population with a gating at 30 000 in FSC-A. The BD CSampler Software was used to acquire and treat the cytometric data.

Samples were also analyzed after staining with BacLight™ RedoxSensor™ Green (RSG, 1 µM) or propidium iodide (PI, 10 mg/L) (Invitrogen) to detect the metabolic activity and the membrane permeability respectively (Shi *et al.*, 2007; Sassi *et al.*, 2019). After 488nm laser excitation, green fluorescence were collected at 525 nm ± 30 nm for RSG (FL1-A) and the red fluorescence signal at 670LP (FL3-A) for PI.

Cells were also analyzed at different growth phases (exponential phase, stationary phase and sporulation) on different carbon sources (glucose, xylan and destarched wheat bran) with the same cytometric parameters.

2.6.6. Cell sorting

The cell sorting was realized from *T. xylanilyticus* cultivated on xylan basal medium at the generation 0 but also along generations (G20 and G50). The cell sorting was performed with a BD FACSAria™ II Cell Sorter coupled with the BD Accuri™ C6 Plus flow cytometer from the URCACyt technical platform facilities.

In order to standardize the signals of the BD Accuri™ C6 Plus flow cytometer and BD FACSAria™ II cell sorter, an analysis of 2.5 µm microbeads (BD Biosciences) was done with both systems.

5×10^6 events were collected for each population and the rate of sorting was around 2500 events/second with a 70 µm nozzle. Each cell sorting was performed in triplicate. The events were collected in 10 mL of PBS 1×. To check for a correct cell sorting, an analysis of each population collected was done with BD Accuri™ C6 plus flow cytometer. Each population solution was then centrifuged at $12108 \times g$ (Sorvall ST 8R centrifuge, Thermo Scientific) for 30 minutes at room temperature. The cell pellet conserved in 100 µL of 1× PBS was solubilized with 1 mL of xylan basal medium. All the cell solution was used to inoculate a new cultivation on xylan and characterize the separated populations.

2.6.7. Cultivations of the sorted populations

Population cultivations were performed as described in the previous parts for 19 hours. The growth was followed with regular measurement of the OD_{600 nm}. At the different growth phases determined (lag, beginning and end of the exponential phase and stationary phase), samples of 5 mL were taken and centrifuged at $3354 \times g$ for 10 minutes (Sorvall ST 8R centrifuge, Thermo Scientific). The supernatants were used for the measurements of xylanase activity and protein contents according to the procedures described above.

2.6.8. Scanning electron microscopy analyses

During the followed successive cultivations, samples were taken before and after the cell sorting for analyses. Before the cell sorting, drops of 20 μL were dried on glass coverslip. After the cell sorting, 10 mL of different sorted populations (at 500 cells by μL corresponding to 5×10^6) were concentrated by centrifugation at $16000 \times g$ for 40 minutes. The cell pellets were solubilized in 500 μL and 22.5 μL drops were dried on glass slide (corresponding to 225000 cells).

After drying, glass slides were washed 2-times in $1 \times \text{PBS}$, then fixed in 2.5 % (W/V in PBS) glutaraldehyde (Sigma-Aldrich) at room temperature for 1 hour. After 2 distilled water washing, cells were dehydrated at room temperature in graded ethanol solutions (50, 70, 90, and twice with absolute ethanol) for 10 minutes and in a solution of ethanol (100 %)/hexamethyldisilazane (V/V) for 5 minutes. Glass slides were finally desiccated with one final drop of HMDS. After air-drying at room temperature, samples were sputtered with a thin gold-palladium film using a JEOL ion sputter JFC 1100 instrument. Samples were then observed using a Schottky Field Emission Scanning Electron Microscope (JEOL JSM-7900F).

2.6.9. Successive cultivation on glucose

Successive cultivations were also performed by using glucose as carbon source during 80 generations. For the generations 23.9, 42.7, 62.9 and 79.9 (due to a different growth rate than on xylan), a switch of the carbon source between glucose and xylan was performed and the same analyses (flow cytometry and xylanase activity) as those for xylan successive cultures were done.

2.6.10. Statistical tests

The different results of growth, xylanase activities, cell percentage and *tx-xyn11* gene expression were compared for the different generations by statistical analysis with Student's test from MATLAB statistics and machine learning toolbox. Differences were considered significant for $p \leq 0.05$. The same statistical analyses were performed to compare the two subpopulations after cell sorting.

B. Chapitre II : Stratégie de contrôle de la diversité phénotypique sur différentes biomasses lignocellulosiques - Article 2 accepté chez Bioprocess and Biosystems Engineering

1. Résumé étendu

Après l'identification des facteurs influençant la production enzymatique de *T. xylanilyticus*, des stratégies d'amélioration de cette production enzymatique doivent être envisagées. L'alternance de la source de carbone (entre le xylane et le glucose) au cours de cultures successives a déjà été envisagée précédemment afin de prévenir la sélection de cellules de type *cheaters*. Cette stratégie a permis d'augmenter l'activité xylanase d'un facteur $\sim 1,5$ à ~ 15 -fois en comparaison avec les cultures successives réalisées avec du xylane uniquement et en fonction des générations. Des stratégies basées sur la gestion des sous-populations (et donc de la diversité phénotypique) se sont donc avérées efficaces pour l'optimisation de la production de xylanase. Dans le cas de *T. xylanilyticus*, ces stratégies de gestion doivent se focaliser sur la prévention de la sélection des cellules appartenant à des populations de type *cheaters*. Celles-ci sont susceptibles d'apparaître lors d'une production enzymatique extracellulaire nécessaire pour dégrader des substrats complexes en une forme utilisable pour la croissance bactérienne (Velicer, 2003; Allison, 2005).

Lors des caractérisations des deux sous-populations identifiées au cours de l'étude précédente, les sous-populations ont présenté la même activité xylanase en phase stationnaire de culture : $3,89 \pm 0,14$ UI/mL et $4,43 \pm 0,61$ UI/mL pour la *low* population et la *high* population respectivement. En plus de ces résultats, l'importance des phénomènes de sporulation dans la dynamique des populations de *T. xylanilyticus* au cours des générations a pu être prouvée. En effet, la population productrice a présenté des phénomènes de sporulation prématurés dus à la charge métabolique de production et la compétition pour les ressources avec les populations de type *cheaters*. C'est suite à ces phénomènes de sporulation prématurés que cette sous-population a été détectée à des signaux FSC-A plus importants. Suite à ces résultats, une hypothèse a été avancée pour développer une autre stratégie de management des populations.

Cette hypothèse est que la sélection des populations de type *cheaters* au cours des générations (et des cultures successives) peut être empêchée par des transferts successifs des cellules en phase stationnaire où l'entièreté des populations de *T. xylanilyticus* seraient dans des étapes de sporulation plus avancées, ce qui empêcherait la sélection de l'une d'entre elles au cours des cultures successives. La stratégie serait donc de cultiver successivement la souche et d'effectuer les transferts en phase stationnaire et non plus en phase exponentielle. Cette stratégie a été adaptée lors de cultures avec du xylane, du son de blé et de la paille de blé afin d'améliorer

l'activité extracellulaire xylanase et des activités débranchantes intracellulaires (activités estérase et β -xylosidase).

Les cultures successives avec ces conditions ont permis d'améliorer l'activité xylanase extracellulaire de 7,15-fois après 4 cultures successives avec du xylane comme source de carbone et avec transferts des cellules en phase stationnaire en comparaison de la première culture réalisée. Toutes les cellules observées étaient alors en sporulation. Les activités débranchantes ont également été améliorées après 4 cultures successives avec du son de blé ou de la paille de blé. L'augmentation des activités débranchantes ont été de 5,88-fois et 57,2-fois pour les activités acétyle estérase et β -xylosidase lors des cultures successives avec de la paille de blé comme source de carbone et avec transfert des cellules en phase stationnaire en comparaison de la première culture réalisée. Lors de l'utilisation de son de blé, les facteurs d'augmentation ont été de 2,77-fois et 3,34-fois après 4 cultures successives. Au cours de ces différentes cultures et pour chaque source de carbone, une seule population était observée par cytométrie en flux en phase stationnaire démontrant l'absence de diversification phénotypique au stade de culture de la phase stationnaire et confirmant l'hypothèse faite. Après avoir atteint un pic avec 4 cultures successives, les activités enzymatiques ont ensuite chuté prouvant la réversibilité des changements pour chaque activité enzymatique et chaque source de carbone. L'étude de la réversibilité a montré des hétérogénéités cellulaires dans les activités métaboliques qui pourraient être liées à la réversibilité de ces changements d'activité enzymatique.

En conclusion, la stratégie de transferts successifs en phase stationnaire avec différentes sources de carbone pourrait être utilisée comme une bonne stratégie pour optimiser les différentes productions enzymatiques de *T. xylanilyticus* par la prévention de la sélection de populations de type *cheaters*. Cette stratégie est novatrice pour modifier la dynamique de population entre les cellules de type *cheaters* et les cellules productrices impliquées dans la production d'enzymes lignocellulolytiques.

2. Article 2: Control of phenotypic diversification based on serial cultivations on different carbon sources leads to improved bacterial xylanase

2.1. Abstract

Thermobacillus xylanilyticus is a thermophilic and hemicellulolytic bacterium of interest for the production of thermostable hemicellulases. Enzymes production by this bacterium is challenging because the proliferation of a cheating subpopulation of cells during exponential growth impairs the production of xylanase after serial cultivations. Accordingly, a strategy of successive cultivations with cells transfers in stationary phase and the use of wheat bran and wheat straw as carbon sources were tested. The ratio between subpopulations and their corresponding metabolic activities were studied by flow cytometry and the resulting hemicellulases production (xylanase, acetyl esterase and β -xylosidase) followed. During serial cultivations, the results pointed out an increase of the enzymatic activities. On xylan, compared to the first cultivation, the xylanase activity increases by 7.15-fold after only four cultivations. On the other hand, the debranching activities were increased by 5.88-fold and 57.2-fold on wheat straw and by 2.77-fold and 3.34-fold on wheat bran for β -xylosidase and acetyl esterase respectively. The different enzymatic activities then stabilized, reached a plateau and further decreased. Study of the stability and reversibility of the enzyme production revealed cell-to-cell heterogeneities in metabolic activities which could be linked to the reversibility of enzymatic activity changes. Thus, the strategy of successive transfers during the stationary phase of growth, combined with the use of complex lignocellulosic substrates as carbon sources, is an efficient strategy to optimize the hemicellulases production by *T. xylanilyticus*, by preventing the selection of cheaters.

Keywords: Xylanases, *Thermobacillus xylanilyticus*, successive cultivations, lignocellulosic substrates, phenotypic heterogeneity, sporulation

2.2. Background

Hemicellulases, and notably xylanases, are widely used in various industrial processes (bread-making, pulp bleaching in paper process, fruit juice clarification, improvement of digestibility for animal feeding, ...) (Subramaniyan and Prema, 2002; Bhardwaj, Kumar and Verma, 2019). More recently, an increase of interest for hemicellulases occurred in the context of the development of lignocellulosic substrates biorefining for biofuels and biomolecules production (Dodd and Cann, 2009; Gírio *et al.*, 2010; Takkellapati, Li and Gonzalez, 2018). In this context, *Thermobacillus xylanilyticus* a Gram positive and thermophilic bacterium exhibiting interesting features as a natural producer of hemicellulases (Samain *et al.*, 1992; Touzel *et al.*, 2000). Its hemicellulolytic enzymes arsenal includes two xylanases (from glycoside hydrolase families GH10 and 11, EC 3.2.1.8), one arabinofuranosidase (GH51, EC 3.2.1.55) and one feruloyl esterase (Carbohydrate esterase family CE1, EC 3.1.1.73) (Samain, Debeire and Touzel, 1997; Debeche *et al.*, 2000; Rakotoarivonina *et al.*, 2011). Moreover, its genome sequence pointed out the presence of several GH 3, GH 43 GH 51 and GH 120 annotated as β -xylosidases (Rakotoarivonina *et al.*, 2022). Previous studies indicated that the xylanase GH11 is secreted by the strain during the microbial growth whereas the other produced enzymatic activities are intracellular. Interestingly, *T. xylanilyticus* can adapt its complex enzymatic arsenal according to the lignocellulosic biomass used for its microbial growth. Debranching activities, such as xylosidases and esterases, are stimulated in presence of complex substrates (Rakotoarivonina *et al.*, 2012, 2016)(Rakotoarivonina *et al.*, 2012, 2016). Esterase activity is promoted by growth with wheat straw and wheat bran as carbon source probably due to the high content in ferulic acid and acetate groups in xylans from these substrates respectively (Rakotoarivonina *et al.*, 2012; Rakotoarivonina *et al.*, 2014). The use of the enzymes produced by this bacterium in various enzymatic processes is promising due to their thermostability, their activity over a wide range of pH values and their ability to release sugars and phenolic compounds from complex lignocelluloses (Debeire-Gosselin *et al.*, 1991; Debeche *et al.*, 2000; Rakotoarivonina *et al.*, 2011).

In a recent study, we identified a significant physiological bottleneck impacting the production of hemicellulases by *Thermobacillus xylanilyticus* (Bouchat *et al.*, 2022). Indeed, this bacterium exhibited a decrease of xylanase production caused by phenotypic instabilities due to the presence of a phenotypically distinct subpopulation made of cells displaying a cheater phenotype i.e., taking benefit from the monomers released but not producing the associated

enzymes. These differences were easily observable since cheaters exhibited a different morphology (Bouchat *et al.*, 2022). Accordingly, in exponential phase, two subpopulations exhibiting different FSC properties and different levels of xylanase production were observed. More precisely, we observed *high* population i.e., displaying a high Forward Scatter Signal (FSC-A) in flow cytometry (superior to 30,000) and a *low* population, displaying a low FSC-A signal (inferior to 30,000). We hypothesized that, for *T. xylanilyticus*, premature sporulation of the producing cells can be induced because of the metabolic burden associated with enzymes productions. The other subpopulation, composed of cheaters, can avoid this metabolic burden but is taking benefit from the monomers released by the active members of the population (Figure 36) (Bouchat *et al.*, 2022). This phenomenon was previously described and this kind of subpopulation can be recognized as cheaters and can appear when microbial population relies on an extracellular enzymatic production for degrading complex substrates (Velicer, 2003; Allison, 2005). In *T. xylanilyticus* cultivation, this diversification occurred during exponential phase, allowing the selection of cheater cells over multiple generations (Figure 36). We also showed, based on cell sorting, that the two subpopulations exhibited the same level of xylanase activity in stationary phase, opening new possibilities for the optimization of hemicellulases production based on the mitigation of the phenotypic diversification mechanism involved in the generation of cheaters.

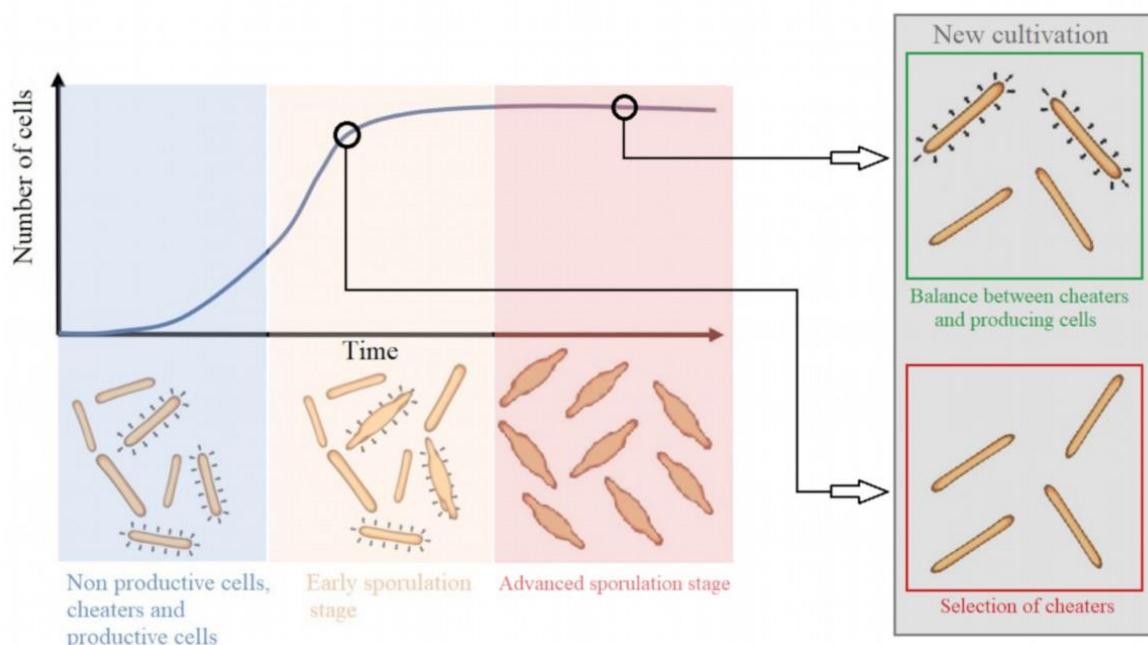


Figure 36 : Population dynamics during cultivation of *T. xylanilyticus* with the hypothesis of cheaters selection along the successive cultivations on exponential phase, which could be

prevented by successive transfers during stationary phase (with advanced sporulating cells) adapted from (Bouchat *et al.*, 2022).

With the aim to control the phenotypic population diversity within *T. xylanilyticus* during growth on xylan, we tried to alternate between the utilization of glucose and xylan as carbon source. By this way, it was possible to obtain an improvement of xylanase activity until to ~15-fold by comparison with continuous cultivation on xylan only (Bouchat *et al.*, 2022). The aim of this study was to further investigate the effect of phenotypic diversification on the production of hemicellulases by *T. xylanilyticus*. More specifically, the goals were: 1) to prevent the selection of cheaters by keeping the phenotypic diversification process under control. Our strategy was based on successive cultivations with serial transfers in stationary phase in presence of complex lignocellulosic biomasses; 2) to study the reversibility of the phenotypic states obtained during serial transfers experiments.

2.3. Materials and methods

2.3.1. Strains and media

Thermobacillus xylanilyticus XE9/11/91, isolated from a farm soil under a manure heap in northern France, was used in this study. The bacterium was cultivated on basal medium composed by three different solutions, a macro-mineral solution, a vitamin solution, and a metallic trace solution complemented with NH₄Cl (1 g/L), yeast extract (2 g/L) and KHCO₃ (5 g/L). The medium was supplemented with 10 % (v/v) CO₂ as previously described by (Touzelet *et al.*, 2000). Cultivation volumes are 10 mL of media in sealed contents (100 mL bottles). Various carbon sources were used: glucose 5 g/L (Sigma Aldrich), xylan from beechwood 5 g/L (Roth), destarched wheat bran 10 g/L, and wheat straw 15 g/L, (ground to 1-2 mm) (ARD Pomacle-Bazancourt, France) (Table 6).

The complementation of xylan medium with glucose was done by reducing the xylan concentration from 5 g/L to 4 g/L (ratio 80/20) or 2.5 g/L (ratio 50/50) before completing with glucose. The final concentration was 1 g/L or 2.5 g/L for the ratios 80/20 and 50/50 respectively) to reach the total carbon source concentration of 5 g/L. The addition of glucose was realized after sterilization of the medium.

Table 6 : Chemical composition of destarched wheat bran and wheat straw (Rakotoarivonina *et al.*, 2012).

	Wheat bran	Wheat straw
Total sugar (% DM)	86	84
Glucose	22	44
Arabinose	21	4
Xylose	31	28
Phenolic compounds (mg/g DM)		
<i>p</i> -Coumaric acids	0.2 ± 0.0	5.7 ± 0.3
Ferulic acids	6.8 ± 0.1	3.2 ± 0.1
Diferulic acid	0.9 ± 0.0	0.3 ± 0.0
Acetyl esters	8 ± 0.9	31.0 ± 0.1

2.3.2. Successive cultivations of *Thermobacillus xylanilyticus*

The strain was regenerated from a glycerol stock and an overnight non sporulated preculture was prepared in glucose basal medium at 50°C and 150 RPM with Multitron shakers (Infors). The xylan, wheat bran or wheat straw media were inoculated (1 % v/v) with the preculture diluted 100-fold. The cultivation was done at 50°C, 150 RPM for 15 hours to reach stationary phase. The transfers were then done after dilution of 100-fold for xylan cultivations whereas there was no dilution between each wheat bran and wheat straw cultivation.

For each cultivation, when the stationary phase was reached (OD_{600nm} between 2.5 – 4, 0.75 – 1.6 and 2.2 – 3.2 for xylan, wheat bran and wheat straw cultures respectively), the transfers of the cells in fresh media for starting new cultivations were done. For each new set of cultivations, a measurement of the xylanase activity, β-xylosidase and esterase activities were performed.

Each cultivation and measurements were performed in triplicate.

2.3.3. Measurements of the enzymatic activities

To evaluate the xylanase activity secreted by *T. xylanilyticus*, for each cultivation, samples were centrifuged at $3354 \times g$ for 10 minutes (Sorvall ST 8R centrifuge, Thermo Fisher Scientific) at 4°C and the supernatants were recovered. The xylanase activity was quantified by using the reducing end sugars measurement according to the procedure described by (Kidby and Davidson, 1973). Briefly, 0.1 mL of the supernatants (diluted or not with 50 mM sodium acetate buffer pH 5.8) were incubated in 0.9 mL beechwood xylan (Roth) at 0.5 % w/v homogeneously suspended in 50 mM sodium acetate buffer (pH of 5.8) at 60°C for 10 minutes. Each 2 minutes, the hydrolysis reaction was stopped by transferring 100 μL of the supernatant-substrate mix in 1.5 mL of reagent composed of 0.3 g/L of potassium ferricyanide and 10 g/L of sodium carbonate. The ferricyanide was reduced by the liberated reducing sugars which resulted in a discoloration which could be tracked by a decrease of the absorbance. The reducing sugars were then measured by following the evolution of absorbance at 420 nm on a Specord 200 Plus uv/vis spectrophotometer (Analytik Jena) and by comparing the values with a standard curve done with varying concentrations of xylose. The activity was expressed in IU/mL. One international unit (IU) of enzyme activity was defined as the quantity of enzyme (xylanase) required to liberate one μmol of equivalent xylose per minute at 60°C .

For the evaluation of the intracellular enzymatic activities, cells were first concentrated 5-fold by centrifugation at $12108 \times g$ (Sorvall ST 8R centrifuge) and resuspended in 1 mL of a lysis buffer, TRIS HCl 25 mM (pH of 7). The cells were then lysed with FastPrep-24™ 5G (MP Biomedicals™) and 0.25 mL of lysis matrix beads (0.25 mm diameter). The lysis program was four cycles of 30 seconds at 6.5 m/s with break of 30 seconds between each cycle. The supernatant (intracellular fractions) was recovered after a centrifugation step at $12108 \times g$ (Sorvall ST 8R centrifuge). The samples were kept at 4°C until analyses.

For the evaluation of the β -xylosidase and esterase activities, the rate of hydrolysis of *p*-nitrophenyl β -xylopyranoside (Carbosynth) and *p*-nitrophenylacetate (Sigma) to *p*-nitrophenol was determined spectrophotometrically by measuring the absorbance at 401 nm. The experiments were performed in a volume of 1 mL containing 450 μL of TRIS HCl 25 mM (pH 7), 450 μL of the substrates (final concentration of 0.5 mM) and 100 μL of the intracellular protein fractions for 10 min at 50°C .

2.3.4. Study of the strain stability

To study the stability and reversibility of the production modifications during serial transfers in stationary phase, the strain obtained after six and ten successive cultivations on xylan medium, the conditioned strain C6 (corresponded to the strain with stabilized xylanase production peak) and the strain C10 (with decreased production of xylanase activity) were kept at 4°C for 2 months. Then, new successive cultivations were started with serial transfers in the stationary phase on xylan medium as described above. Measurements of xylanase activity productions and the metabolic activities of the populations were followed.

2.3.5. Population analyses by flow cytometry

Population analyses at the different cultivations during the reversibility and stability study, were done by flow cytometry with a BD Accuri™ C6 (BD Biosciences) using the MOBICYTE core facilities (University of Reims Champagne-Ardenne). The analytical parameters were flow rate of 35 µL/minute, core size of 16 µm and the threshold was down to 30,000 in FSC-H. 20,000 cells were collected for each sample as previously described in (Bouchat *et al.*, 2022).

Samples were first filtered with 5 µm cellulose syringe filters and diluted with PBS 1× to reach maximum 2500 detected events by second (and events/µL) to prevent doublet reading. Samples were analyzed first unstained, and populations were detected by the forward and scatter signals (respectively FSC-A and SSC-A) to determine cell percentage of each detected population with a gating at 30,000 in FSC-A as previously described in (Bouchat *et al.*, 2022). The BD Csamplere Software was used to acquire and treat the cytometric data.

Samples were also analyzed after staining with BacLight™ RedoxSensor™ Green (RSG, 1 µM) or propidium iodide (PI, 10 mg/L) (Invitrogen) to detect the metabolic activity and the membrane permeability respectively (Davey and Hexley, 2011; Konopka *et al.*, 2011). After 488 nm laser excitation, green fluorescence was collected at 525 nm ± 30 nm for RSG (FL1-A) and the red fluorescence signal at 670LP (FL3-A) for PI. For the study of metabolic activity, a gating at 50,000 in FL1-A was used to detect some subpopulations such as for the gating at 30,000 in FSC-A described above and in (Bouchat *et al.*, 2022).

2.3.6. Statistical analyses

The data of enzymatic activities and metabolic activities were acquired for each replicate of cultivation. FL1-A means data of each replicate were used for metabolic activities. The calculation of the means and standard deviations (STDEVA) were performed for each cultivation from the data acquired for each replicate. All the means and STDEVA were then compared for each successive cultivation by statistical analysis with Student's test from MATLAB statistics and machine learning toolbox. Differences were considered significant for $p\text{-value} \leq 0.05$.

2.4. Results

2.4.1. Serial cultivations on xylan with transfer of cells collected during stationary led to improved xylanase activity

In order to avoid the selection of cheaters during successive cultivations, serial transfers in stationary phase have been considered, by systematically starting new cultivations with sporulating cells (Figure 36). In presence of xylan as the only carbon source, xylanase production in the cultivation medium of *T. xylanilyticus* was increased over the successive cultivations (Figure 37). During the first cultivation, the enzymatic activity was found to be low (4.91 ± 0.03 IU/mL). After only four successive cultivations, it increased significantly and reached 37.78 ± 9.70 IU/mL ($p\text{-value} < 0.05$). A stabilization around this maximal activity was observed during five transfers. The increasing factor between the first cultivation and the stabilization phase was around 7.15-fold. After this stabilization and until the end of the cultivations, the xylanase activity significantly decreased to a value of 11.60 ± 1.17 ($p\text{-value} < 0.05$). However, the activity remained 2.36-fold higher, which was significantly higher ($p\text{-value} < 0.01$) than for the beginning of the cultivation. When xylanase enzymatic activity was normalized with the secreted protein concentrations (IU/mg), the peak of xylanase activity was observed at the seventh cultivation. At this level, the xylanase enzymatic activity reached 2820.81 ± 408.48 IU/mg corresponding to a significant 20.11-fold increase of xylanase activity by comparison with the first cultivation on xylan ($p\text{-value} < 0.01$) (data not shown).

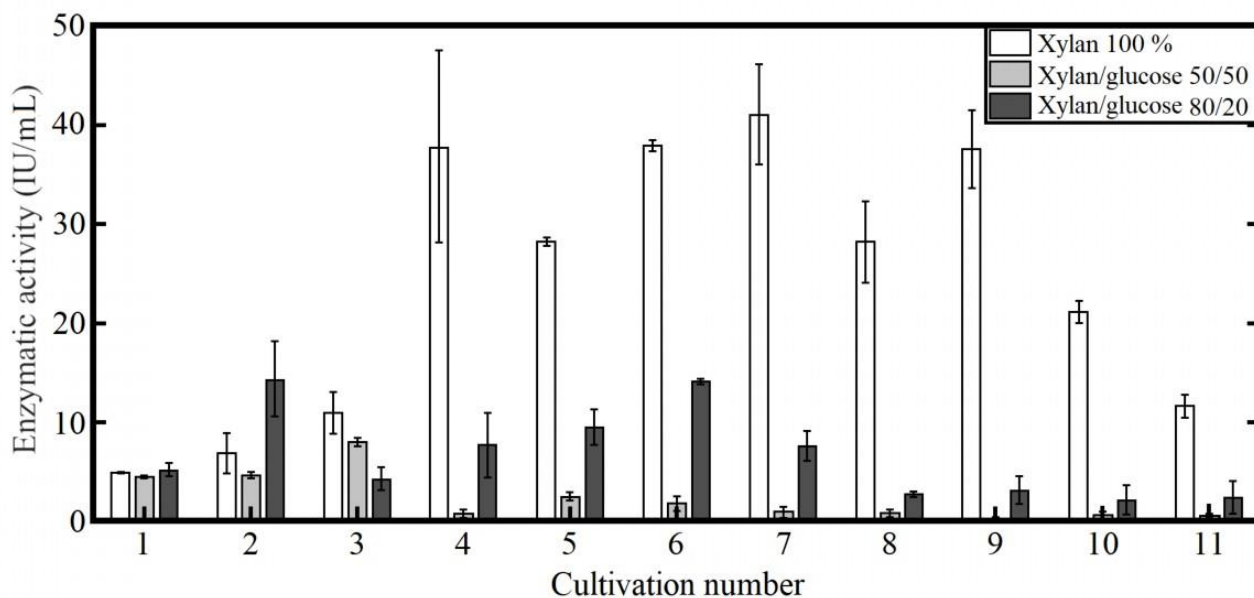


Figure 37 : Evolution of the xylanase activity over eleven successive cultivations during stationary phase on xylan or with different ratios of xylan and glucose. Xylanase activity is expressed in IU/mL.

During the three first successive cultivations on xylan, the optical densities (OD_{600nm}) after the 15 hours of cultivation were around 2.43 ± 0.10 . When xylanase production increased, the growth increased accordingly (mean value of 3.40 ± 0.37). However, when xylanase production began to decrease, the growth remained at the same level (mean value of 3.21 ± 0.34).

During the experiment, the complementation of xylan with glucose with various proportions (mixtures of xylan and glucose with ratio 80/20 or 50/50) as carbon source was also tested (Figure 37). The complementation with glucose did not improve the xylanase activity during serial transfers in stationary phase. The successive cultivations with only xylan as carbon source exhibited higher xylanase activity level. Thus, after 4 transfers, the xylanase activity was 2.48-fold higher on xylan alone compared to the activity on a mixture of xylan:glucose 80/20. The increase of glucose proportion (50/50) in the medium led to lower xylanase activity.

During the cultivations with the complementations, the growths did not change significantly, and the measured OD_{600nm} values were close to the ones obtained with only xylan. The mean values of OD_{600nm} were 2.78 ± 0.56 and 2.88 ± 0.71 for the successive cultivations performed with mixtures of xylan and glucose with ratio 80/20 or 50/50 respectively.

2.4.2. Study of strain stability for xylanase production

In order to evaluate the stability of the metabolic change related to the xylanase production after successive cultivations with xylan as carbon source, the strains obtained after six and ten successive cultivations (strains C6 and C10) and kept at 4°C were further cultivated (Figure 38). Six new successive cultivations were performed with the same cultivation parameters as the ones used for the optimization of the xylanase production with only xylan as a carbon source.

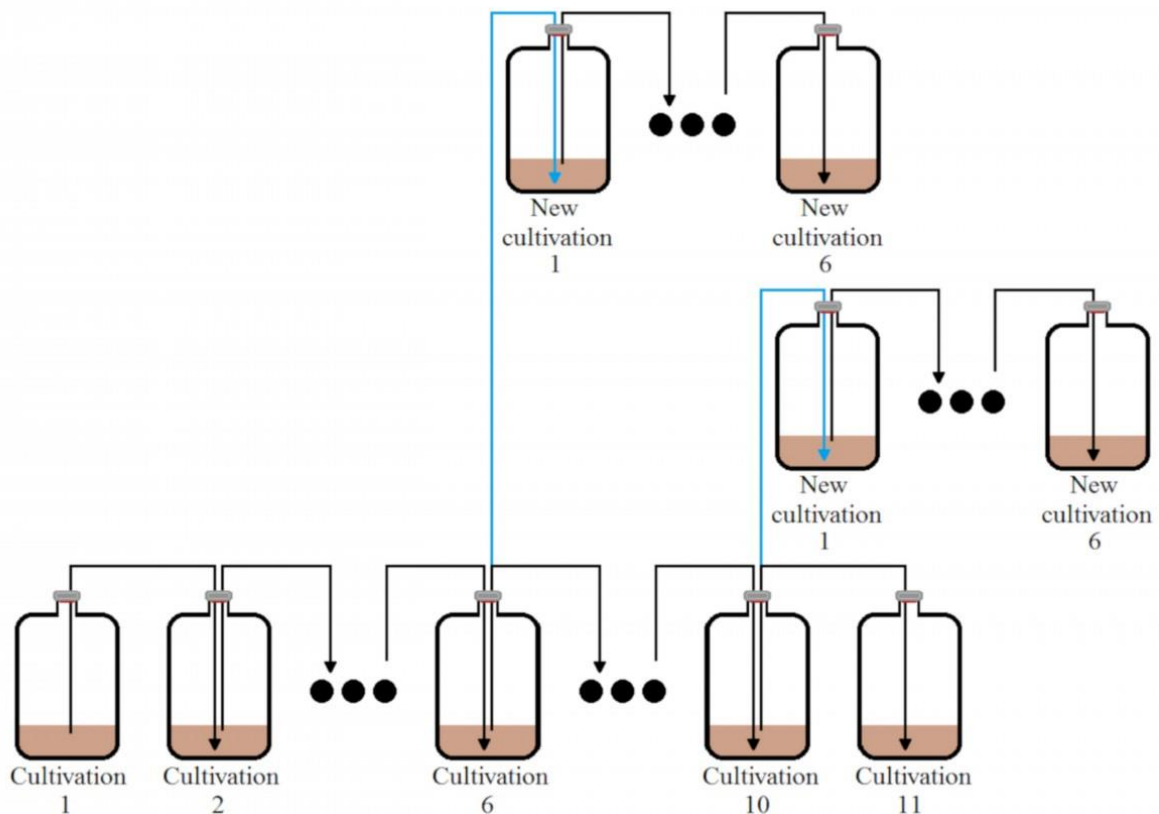


Figure 38 : Strategy for the study of *T. xylanilyticus* strain stability for xylanase production with xylan as carbon source. The blue lines correspond to the starting of new cultivations from the conditioned strains C6 and C10 conserved at 4°C for 2 months.

The strain C6, conditioned on xylan, exhibited originally a xylanase activity of 37.94 ± 0.54 IU/mL (or 1014.21 ± 137.48 IU/mg). When recultivated, the strain exhibited firstly a low xylanase activity of 4.55 ± 0.03 IU/mL (253.92 ± 90.58 IU/mg) before reaching a value of 38.11 ± 7.06 IU/mL (707.46 ± 233.42 IU/mg) after four successive cultivations (p -value < 0.01).

Then, the xylanase activity decreased to 16.82 ± 3.12 IU/mL (299.04 ± 95.91 IU/mg) even if this decrease was not statistically significant (Figure 39). The results of xylanase activity after four successive cultivations were statistically similar to the original level of xylanase activities of the conditioned strain C6 (p -value of 0.9829). It corresponded approximatively to the levels of xylanase activity from the wild strain after 4 successive cultivations on xylan. The maximum level of xylanase was obtained after a lower number of cultivations i.e., four successive cultivations instead of six during the first experiment even if the activities after four cultivations of the wild strain and C6 strain were not significantly different. However, at the opposite of the wild strain successive cultivations, the xylanase activity of the C6 strain remained stable after only two to three cultivations after the maximal obtained activity production has been reached for the C6 strain ... The same trend was observed for the strain C10 obtained after ten cultivations, but with lower xylanase activity during all successive cultures (data not shown). These results indicated that *T. xylanilyticus* cells stored at 4°C are still able to produce xylanase but required a minimal of four cultivations with transfers in stationary phase to recover the maximal level of xylanase activities. As for the main serial cultivation experiments, the growth of *T. xylanilyticus* did not change during the study of reversibility. The mean values of OD_{600nm} after 15 hours of cultivation were 2.81 ± 0.81 for C6 and 2.18 ± 0.24 for C10.

In order to get more insights about the reversibility and stability of the obtained phenotypes, flow cytometry analyses were performed in stationary phase of each successive cultivations on xylan. The analysis of the forward scatter signal (FSC-A) defined during our previous works allowed to discriminate between two subpopulations of cells i.e., one exhibiting FSC-A signals higher than 30,000 and one exhibiting signals lower than 30,000. These subpopulations were labelled *high* subpopulation and *low* subpopulation respectively. The *high* subpopulation contained cells in premature sporulation process (cells in the *high* population) (Bouchat *et al.*, 2022). In the present work, only one population with signals below 30,000 in FSC-A (*low* population) was observed during the successive cultivations with transfers in stationary phase. We then analyzed the metabolic activity based on the use of the RedoxSensor Green (RSG) molecular marker and flow cytometry. After the first cultivation, the cells exhibited a very high metabolic activity according to RSG staining (with an average green fluorescent level of $54,051 \pm 3718$, as recorded by the FL1-A channel of the flow cytometer). Interestingly, xylanase activity was very low after the first cultivation (Figure 39). During the second and third cultivation rounds, the metabolic activities of the cultures decreased (around 9626 ± 2559 in FL1-A), by comparison with the first cultivation (p -value < 0.001). After four cultivations the

metabolic activity increased (into $21,227 \pm 1352$ in FL1-A), together with the xylanase activity that reached the maximal peak of production (Figure 39). The two last cultivations exhibited metabolic activities that tend to increase, but not significantly different from the fourth cultivation ($29,794 \pm 18,088$ and $40,610 \pm 27,136$ in means FL1-A respectively). For fifth and sixth cultivations, the standard deviations were very important. Several features can explain these high standard deviations measured. Some differences in cells metabolic activities (due to various physiological states of the cells) between each replicate of the fifth and sixth cultivations have probably high impact on the cytometric signals (FL1-A) and on the measurement of GFP positive cells. Moreover, the presence of some traces (insoluble) in the medium could have impacted the cytometric measurements. Xylanase activities decreased significantly during the last phase. Taken altogether, these data pointed out that, upon serial cultivations, low xylanase production levels are related to high metabolic activities.

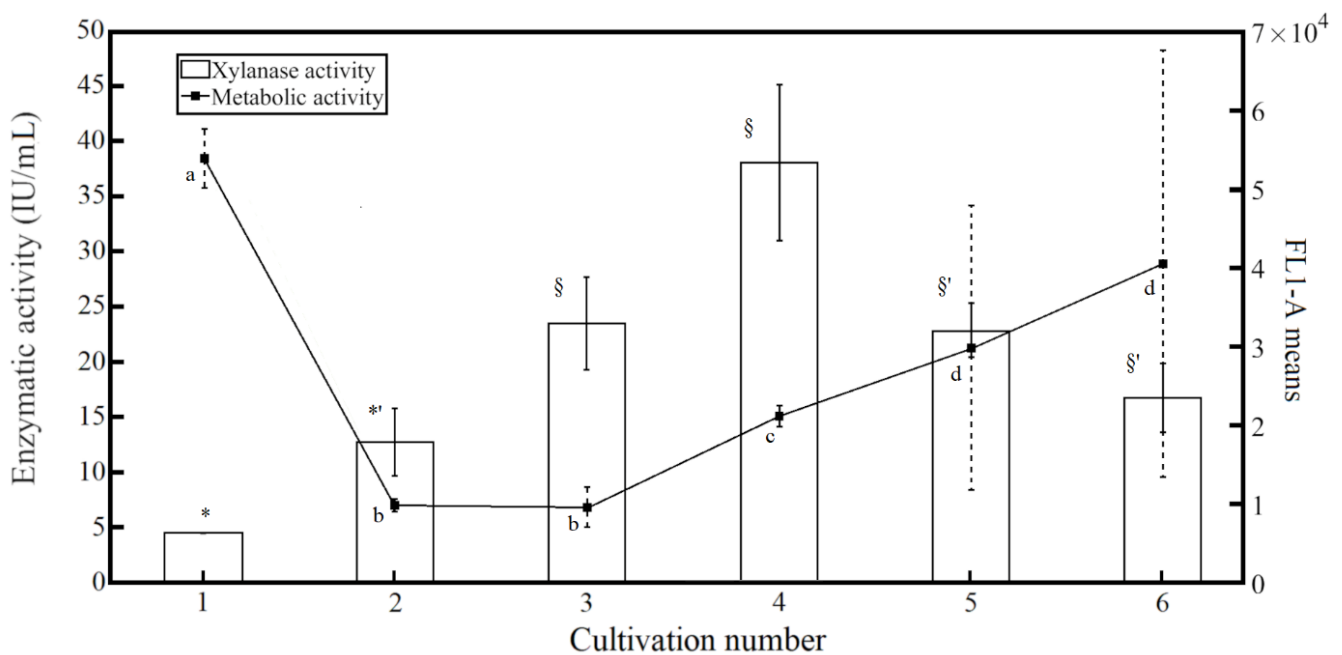


Figure 39 : Evolution of *T. xylanilyticus* metabolic activity and xylanase activity during successive cultivations in presence of xylans and with transfers in stationary phase. The cultivations were done with C6. The metabolic activities are represented by the green fluorescence collected at $525 \text{ nm} \pm 30 \text{ nm}$ (FL1 detector). For each cultivation replicate, the mean fluorescence was collected and used to obtain the global mean fluorescence of the cultivation and the fluorescence standard deviations. The symbols * and § represent the significantly different group of xylanase activity between each cultivation (* = significantly

lower of each other cultivation (p -value < 0.05); *' = significantly different of each other cultivation excepted cultivations 5 and 6 (p -value < 0.05); § = significantly higher from cultivations 1 and 2 (p -value < 0.05) but not significantly different from cultivations 3, 4, 5 and 6; §' = significantly higher from cultivations 1 (p -value < 0.05) but not significantly different from cultivations 2, 3, 4, 5 and 6). The alphabetical symbols represent the significantly different group of metabolic activity between each cultivation (a = significantly higher of each cultivations (p -value < 0.001) excepted cultivations 5 and 6; b = significantly lower of cultivations 1 and 4 (p -value < 0.01) but not significantly different from cultivations 2, 3, 5 and 6; c = significantly lower than cultivation 1 (p -value < 0.001), higher than cultivations 2 and 3 (p -value < 0.01) but not significantly different from cultivations 5 and 6; d = not significantly different of each cultivation).

To better highlight this relation, a gating procedure based on a FL1-A threshold of 50,000 was applied in flow cytometry. Based on this procedure, two subpopulations were observed in terms of metabolic activities (Figure 40). These two subpopulations exhibited a high metabolic activity (with a mean FL1-A signal above 50,000 i.e. corresponding to the *high metabolism* subpopulation) or low metabolic activity (with a mean FL1-A signal below 50,000, considered as the *low metabolism* subpopulation). Upon the first cultivation, the *high metabolism* subpopulation was predominant ($63.4 \pm 4.4\%$). During the second, third and fourth cultivations, an abrupt shift in the metabolic activity profile was observed, the *high metabolism* population disappearing to the benefit of the *low metabolism* subpopulation with ratio of $99.9 \pm 0.06\%$, $99.8 \pm 0.06\%$ and $98.2 \pm 0.62\%$ respectively. The *low metabolism* subpopulation was also predominant after the fifth and sixth serial cultivation but with the presence of *high metabolism* subpopulation too (Figure 40).

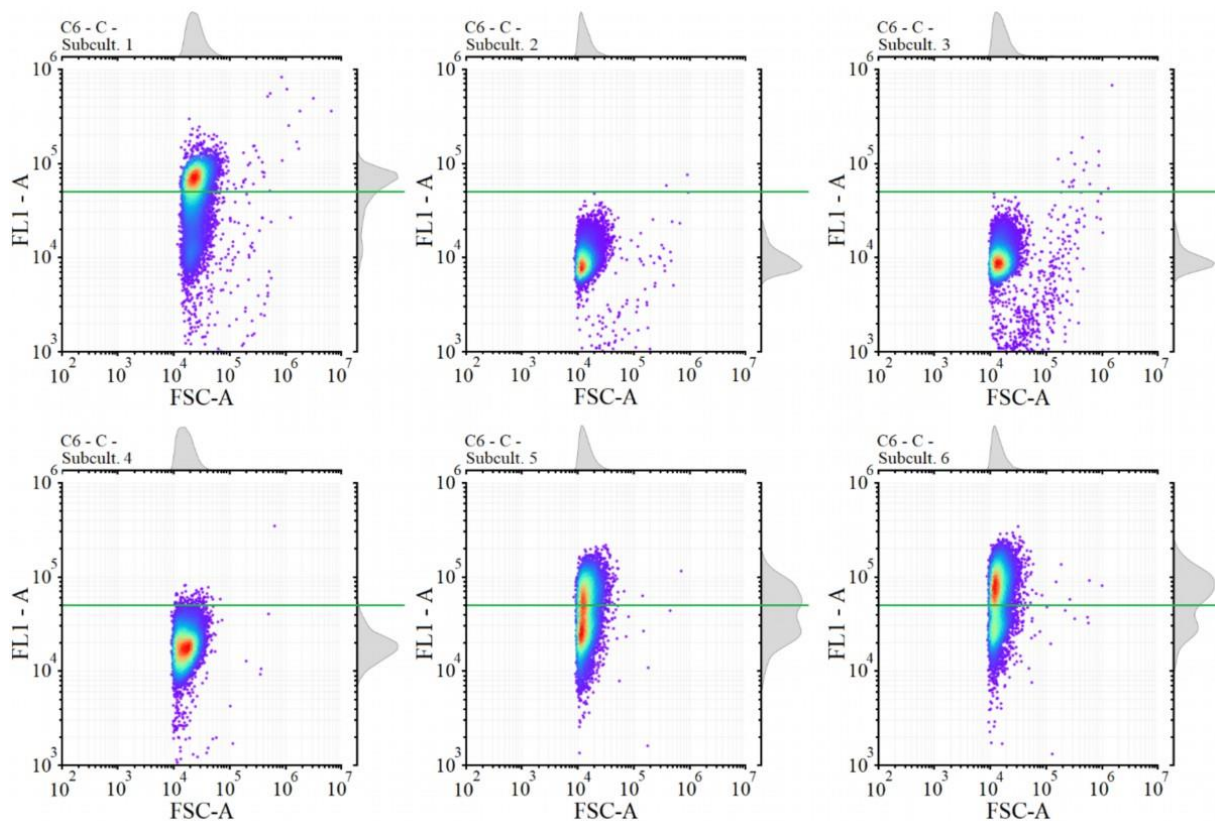


Figure 40 : Evolution of *T. xylinilyticus* metabolic activity and presence of subpopulations during cultivations in presence of xylans and with transfers in stationary phase. An example of cytograms corresponding to the six successive cultivations of one replicate from the “conditioned strain C6“. The green line corresponds to the gate of 50,000 in FL1-A for the detection of green fluorescence from RedoxSensor Green (between 490 and 520 nm).

2.4.3. Evolution of enzymatic activities during serial cultivation on wheat bran and wheat straw

In order to study the evolution of hemicellulases production by *T. xylinilyticus*, the production levels of the extracellular xylanase activity as well as the intracellular β -xylosidase and acetyl esterase activities were measured during successive cultivations in presence of two different complex carbon sources i.e., wheat bran and wheat straw. Indeed, these complex substrates are known to induce the production of debranching enzymes by *T. xylinilyticus*(particularly esterases). Bacterial growth was lower on these two carbon sources. The mean OD_{600nm} was 1.10 ± 0.25 on wheat bran and 1.40 ± 0.27 on wheat straw after 22 hours of cultivation.

At the beginning of the experiments, in presence of wheat bran, the extracellular xylanase activities quantified were similar to the activities obtained with xylan (Figure 41A). The xylanase production firstly significantly decreased from 8.47 ± 1.89 IU/mL to 0.54 ± 0.38 IU/mL (p -value < 0.05) after three successive transfers. Then, it increased to a level similar to the one obtained for the first cultivation round (i.e., around 7.73 ± 1.90 IU/mL), before stabilizing around a value of 5.72 ± 1.76 IU/mL. In presence of wheat straw, at the beginning of the experiments, the xylanase activity produced was 80.39 and 4.88-fold lower than activity obtained on xylan and wheat bran respectively. Xylanase production significantly increased from 1.73 ± 0.37 IU/mL to 8.67 ± 0.42 IU/mL (p -value < 0.001) after four successive cultivations. Then the activity remained similar at this level until the end of the transfers. For both complex substrates, after stabilization at the maximal level, the xylanase activity did not decrease until the end of the experiments.

In presence of xylan as carbon source, the acetyl esterase activity level was around 187 ± 36 mIU/mL and did not change significantly over six successive cultivations. This activity was significantly increased from 168.35 ± 12.71 mIU/mL to 466.43 ± 16.32 mIU/mL (increase of 2.77-fold, p -value < 0.001) with wheat bran and increased from 71.30 ± 19.76 mIU/mL to 419.26 ± 26.59 mIU/mL (significant increase of 5.88-fold, p -value < 0.001) in presence of wheat straw. These increased enzymatic activities were observed for both substrates after four successive cultivations. If the esterase production values stabilized for wheat straw until the end of the cultivation, for wheat bran, fluctuations in activity are still observed (Figure 41B).

The mean values of β -xylosidase activity were around 167 ± 23 mIU/mL with xylan and did not change significantly over the six successive cultivations. During cultivation on wheat bran and wheat straw, the maximal level of this activity was lower (between 11.8-fold and 4.9-fold respectively) than for xylan cultures. However, it significantly increased from 4.15 ± 3.56 mIU/mL to 13.87 ± 0.94 mIU/mL (3.34-fold increase, p -value < 0.05) after four cultivations with wheat bran and increased to a maximal value of 31.23 ± 3.64 mIU/mL after four cultivations with wheat straw. Taken altogether, the data point out that serial cultivations led to a significant, 57.2-fold increase, of enzymatic activities by comparison with the first cultivation round (p -value < 0.001) (Figure 41C).

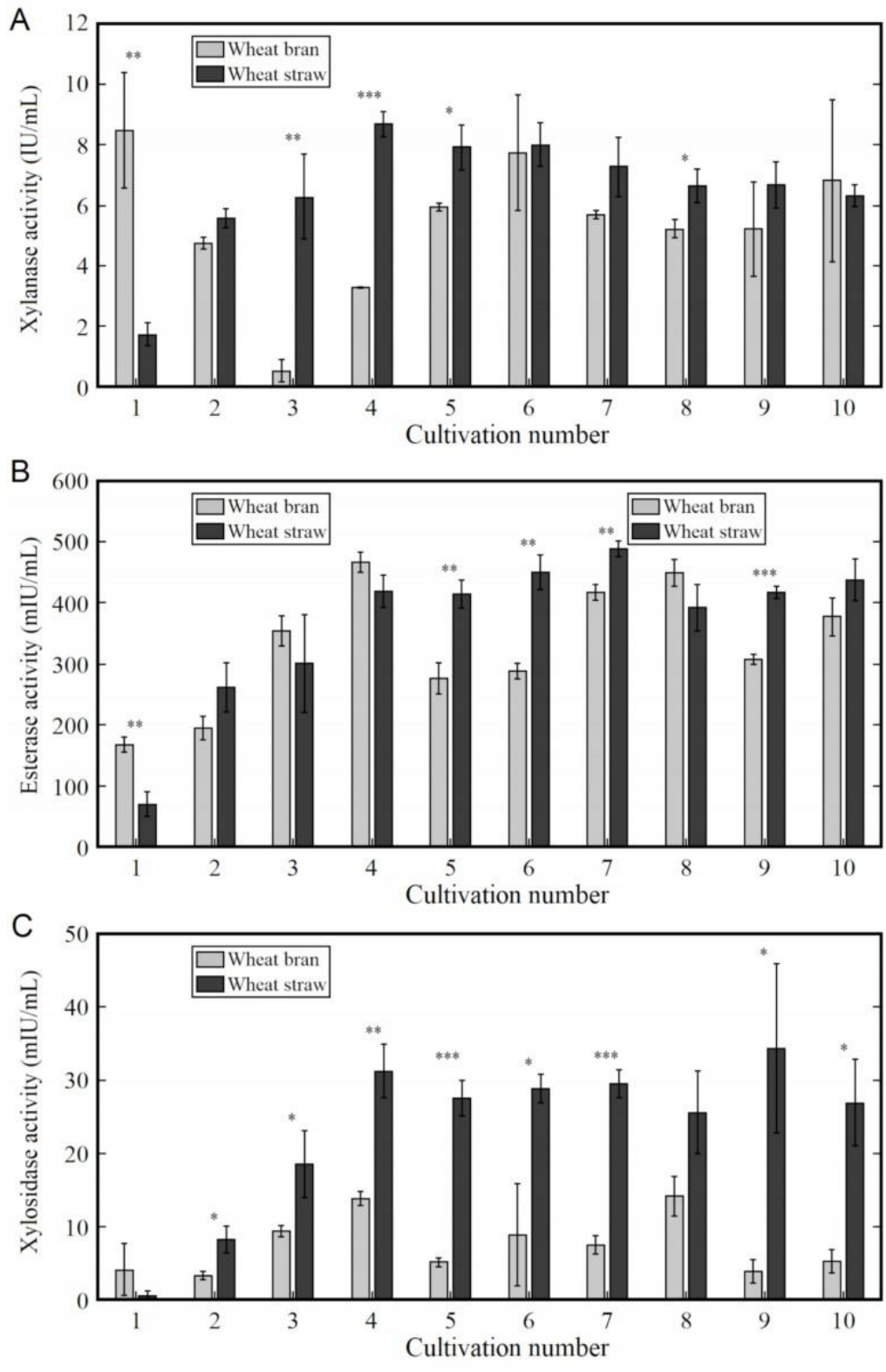


Figure 41 : Evolution of the extracellular xylanase activity (A) and intracellular enzymatic activities (B and C) changes during cultivations in presence of wheat bran and wheat straw. The intracellular activities correspond to acetyl esterase activity (B) and β -xylosidase activity (C).

The asterisk represents the significantly different activity between wheat bran and wheat straw (* = (p -value < 0.05), ** = (p -value < 0.01) and *** = (p -value < 0.001).

2.5. Discussion

In microbial processes, most of the strategies used for improving growth or metabolite productions by microorganisms rely on strain modifications, metabolic engineering or nutrient changes (or stress) (Binder *et al.*, 2017; Sassi *et al.*, 2019). Strain optimization, also can be done by successive cultivations (Portnoy, Bezdán and Zengler, 2011; Dragosits and Mattanovich, 2013) even if the phenotypes are not always stable (Schwenk and Wagner, 2001). For example, the lignocellulolytic enzymes production of *Aspergillus niger* and a thermophilic *Geobacillus* strain have already been enhanced by this methodology (Patyshakuliyeva *et al.*, 2016; Govil *et al.*, 2020). The cultivation conditions, including the composition of the medium, the substrate diffusion rate, the presence of inductor, ... can impact directly the enzymatic production of various bacterial species (Dalmau *et al.*, 2000; Rakotoarivonina *et al.*, 2012; Allison *et al.*, 2014; da Silva, Melo and Luna Finkler, 2021). The basic principle behind the optimization of enzyme production based on serial cultivation relies on the genotypic diversification of the strain of interest. However, in our work, we point out that phenotypic diversification, involving epigenetic mechanisms without changes in DNA composition, are also involved. In our study, the application of successive cultivations resulted in the management of subpopulations and the improvement of hemicellulases production by *T. xylanilyticus*. The strategy used in this study is the transfer of cells after reaching the stationary phase, since transfer of exponentially growing cells has been shown to lead to a progressive reduction in extracellular xylanase activity due to cheaters selection (Bouchat *et al.*, 2022). During our previous works, the xylanase activity was observed to be similar in stationary phase for the different subpopulations (i.e. cheaters and producing cells characterized upon cell sorting) (Bouchat *et al.*, 2022). Our hypothesis was that a transfer in stationary phase would allow to increase the xylanase production without selection of cheaters over generations (Figure 36). With all the cells in advanced sporulation, there would be no selection of vegetative cheater cells when a new cultivation is started and producing cells would be favored over the successive cultivations. The results obtained confirmed this hypothesis as the maximal level of enzyme production was reached more quickly under these conditions. After only four successive cultivations on xylan

and complex substrates, the extracellular xylanase activity and intracellular enzymatic activities (esterase and xylosidase) reached their maximal levels. Additionally, the loss of xylanase activity typically observed during classical serial cultivation is delayed. The hemicellulases production by *Thermobacillus xylanilyticus* was stabilized and was maintained for a longer period of time. To our knowledge, few studies focusing on the improvement or stabilization of microbial populations rely on successive cultivations in stationary phase, except some studies about the influence of the inoculum age on the frequency of persistent subpopulation in *E. coli* (Jöers, Kaldalu and Tenson, 2010; Luidalepp *et al.*, 2011). The impact of growth phases on phenotypic diversification and the presence of cheaters is already known for some bacteria, such as *Pseudomonas aeruginosa* or *Escherichia coli* (Vulić and Kolter, 2001; Heins and Weuster-Botz, 2018; Feng *et al.*, 2019). For both bacteria, the cheater invasion (due to quorum sensing and cooperation for *Pseudomonas aeruginosa* and due to growth arrest of ancestral population from *E. coli*) seems to be a case of evolutionary cheating but affects the representation of the wild type in the following generations (Vulić and Kolter, 2001; Feng *et al.*, 2019).

The different diversification control strategies can also rely on adaptation to carbon limitation and switching to an alternative carbon source as previously studied (Deng and Fong, 2011; Feng *et al.*, 2019; Sassi *et al.*, 2019; Nguyen *et al.*, 2021). By the combinations of successive cultivations on cellobiose or by switching carbon sources (cellobiose and glucose) daily, two mutant strains (muC and muS) of *Thermobifida fusca* with higher cellulase activities compared to the wild-type strain were obtained (Deng and Fong, 2011). In case of *T. xylanilyticus*, the switch between glucose and xylan as carbon source during successive cultivations allowed to improve (~1.5-fold to ~15-fold in function of generations) and stabilize the xylanase production compared to continuous cultivation on xylan (Bouchat *et al.*, 2022).

In this study, we tried to go further by testing the effect of nutrient changes and combining glucose and xylan with various ratios (80/20 or 50/50). However, this strategy did not increase the xylanase activity upon serial transfers in stationary phase. An explanation could be that the strain efficiently used all the glucose before switching to the consumption of xylan due to the production of the xylanase. After this switch, the strain was not in the same growth phase (or production state) than during cultivation with only xylan. With both carbon sources in medium, the cultivation time required to reach the stationary phase (and the significant level of xylanase activity production) is increased. Indeed, xylanase production is known to be higher at the end of exponential phase and the beginning of the stationary phase (Rakotoarivonina *et al.*, 2012).

In order to improve the production of other hemicellulases (mainly debranching enzymes), complex lignocellulosic substrates were used as carbon sources during successive cultivations. Previous studies indicated that *T. xylanilyticus* can adapt its enzymatic production, depending on the carbon sources used for the microbial growth (Rakotoarivonina *et al.*, 2012). The results from this study validated these observations, as the acetyl esterase activity was higher on WS than on WB, probably due to a higher content of acetyl ester into WS as seen in Table 1 (Rakotoarivonina *et al.*, 2012). As for the cultures performed on xylan, the higher β -xylosidase activity obtained during cultivation on WS could be related to an increased xylanase production with these carbon sources leading to a higher accumulation of xylo-oligosaccharides which are substrates for β -xylosidases. Xylan and wheat straw can then be considered as complementary for the improvement of hemicellulases production by *T. xylanilyticus*. An efficient hydrolysis of hemicelluloses requires an optimal mixture of hemicellulolytic enzymes and is dependent on the composition of the lignocellulosic substrate and also on the physiological state of the producing cells (Rakotoarivonina *et al.*, 2014). Given an optimal production of xylanase (by successive cultivations with xylan as carbon source) and induction of β -xylosidase and acetyl esterase productions (by successive cultivations with complex lignocellulosic biomass), specific and adapted hemicellulasic cocktails containing xylanase and debranching enzymes can be obtained. For this purpose, the strategy of successive cultivations by playing on the age of inoculum is efficient. It is preferable to transfer *T. xylanilyticus* cells in stationary phase to manage the presence of cheater cells and to control phenotypic diversification

Interestingly our study pointed out that the phenotypic changes of *T. xylanilyticus* were not irreversible, as most of the changes in enzymatic activity were not stable over time particularly for xylanase activity (Figures 37, 39 and 41). These phenotypic changes could therefore not be considered as an evolutionarily stable configuration as described by Wagner and Schwenk, because the obtained changes were not stable over short period of time (Schwenk and Wagner, 2001).

Another possible explanation about this effect is-that enzyme production can be controlled by regulatory loops, particularly phosphorelays and two-component systems (Burbulys, Trach and Hoch, 1991; Smits, Kuipers and Veening, 2006). It is indeed observed that transcriptional regulators and sensor proteins are present in the genome of *T. xylanilyticus* and some of these components are found within gene clusters coding for hemicellulolytic enzymes (Rakotoarivonina *et al.*, 2022). However, the functional dynamics of the network is not yet known. To verify the involvement of this type of regulation in population stability and

reversibility and to better improve enzyme production further studies are then needed. Our reversibility study pointed out that the strains obtained during the first successive cultivations (C6 and C10) exhibited higher level of xylanase activities. Additionally, this production occurred more quickly when the isolates C6 and C10 were recultivated but less stable over successive cultivations. One mechanism possibly explaining this effect is the microbial memory. Indeed, microbes are able to display memory based on the accumulation of stable proteins in order to obtain fitness advantages (Casadesús and D'Ari, 2002; Wolf *et al.*, 2008). Memory is mainly due to epigenetic mechanisms, and can be diluted over successive generations if the proteins involved are very stable (Casadesús and D'Ari, 2002; Lambert and Kussel, 2014). The phenotypic memory is due to the transmission of stable cytoplasmic proteins between the mother and daughter cell during cell division as already proven for *lac* proteins transmitted during *E. coli* cultivations (Lambert and Kussel, 2014). In the case of *T. xylanilyticus*, the epigenetic mechanisms responsible for the memory to recover higher levels of hemicellulases productions, as well as the mechanisms leading to the emergence of the cheating behavior and population heterogeneity, are not yet identified. The possible memory effect observed in this study seems to be closer to a phenotypic memory obtained by transmission of cytoplasmic proteins under fluctuating conditions.

Further studies implicating other approaches, like advanced single-cell technologies (microfluidics, automated flow cytometry with feedback control) have to be considered in order to refine the resolution about microbial population dynamics of *T. xylanilyticus* and stabilize the obtained phenotypes. Omic analyses, such as proteomics or genomics analyses, could also be used to better understand the diversification process occurring in *T. xylanilyticus*, as well as the organization of regulation network over successive cultivations (Delvigne and Goffin, 2014).

2.6. Conclusion

This study pointed out that epigenetic mechanisms, like phenotypic switching and memory, are involved in the long-term production of enzymes by *T. xylanilyticus*. Accordingly, the use of successive transfers in stationary phase with xylan or complex lignocellulosic biomasses led to the effective control of enzyme production by avoiding the generation of cheaters and promoting the presence of actively producing cells. This strategy was successfully used and improved the extracellular activity (xylanase) and some debranching activities (acetyl esterase

and β -xylosidase) from *T. xylanilyticus* in this study. However, this strategy was never adopted before for the control of population dynamics for the production of hemicellulases and open up new ways for the effective management of microbial population during long-term, serial, cultivations.

C. Chapitre III : Optimisation de la production enzymatique par stabilisation des populations en bioréacteurs

1. Contexte

Après avoir mis en évidence des phénomènes de diversification phénotypique de *T. xylanilyticus* et après avoir mis en place diverses stratégies de stabilisation des sous-populations par des approches de cultures successives, la question de l'optimisation de la production enzymatique en bioréacteurs a été abordée. Dans un premier temps, les paramètres optimaux de culture de *T. xylanilyticus* en bioréacteurs ont été étudiés. Plusieurs paramètres ont été testés tels que la présence de dioxyde de carbone (CO₂), le pouvoir tampon et l'aération lors de la culture de la bactérie. Par ailleurs, une approche de culture en ségréostat avec un suivi des populations par cytométrie en flux en temps réel a été mise en place. En effet, comme montré avec les résultats présentés dans les deux chapitres précédents, la charge métabolique de production des enzymes et la compétition pour les ressources amènent les cellules productrices de la souche à sporuler prématurément, ce qui génère la sélection des cellules tricheuses. L'hypothèse a donc été que l'introduction de pulses de glucose (changements environnementaux pour les cellules) permettrait de changer cette dynamique de populations. Le glucose, ne nécessitant pas de production d'enzymes hydrolytiques pour être utilisable par *T. xylanilyticus*, serait ainsi ajouté aux ressources mobilisables pour la croissance. Ce nouvel apport de ressources mobilisables limiterait donc la compétition entre les cellules productrices d'enzymes et les cellules tricheuses.

2. Résultats

2.1. Effet des paramètres environnementaux sur la croissance de *T. xylanilyticus* en bioréacteurs

Les cultures ont été réalisées avec quatre bioréacteurs parallèles DASGIP® (Eppendorf) permettant de tester différentes conditions de cultures en parallèle. Le volume utile des bioréacteurs était de 200 mL. Le milieu de culture était du milieu basal pour la culture de *T. xylanilyticus* complété avec 5 g/L de glucose. L'inoculation a été faite avec une préculture de la souche sauvage XE de *T. xylanilyticus*. Le volume d'inoculum a été calculé afin d'atteindre une densité optique de départ de 0,1 pour les cultures en bioréacteurs. La température de croissance était de 50°C. Une régulation du pH à 7,75 par ajout automatique de KOH et d'H₃PO₄ a été réalisée. Les effets du CO₂, de l'agitation, de l'aération et de différents tampons ont été testés.

2.1.1. Effet de la présence de CO₂

Des études antérieures menées au laboratoire FARE avaient montré que le démarrage de la croissance de *T. xylanilyticus* nécessite la présence de CO₂ 10 % (v/v) dans l'espace de tête de bouteilles scellées. Le milieu de culture de base usuel était complété avec du bicarbonate de potassium 5 g/L pour former un équilibre avec le CO₂ ajouté à la seringue et atteindre le pH optimal de 7,75. Aucune régulation de pH n'était réalisée pendant les cultures effectuées dans des bouteilles scellées.

Afin d'étudier l'influence du CO₂, celui-ci a été ajouté continuellement dans deux bioréacteurs par bullage à une vitesse de 0,1 VVM (ou *Vessel Volume/Minute*, représentant l'unité d'aération exprimée en volume utile par minute). Deux autres bioréacteurs ont été approvisionnés par de l'O₂ à la même vitesse de bullage (0,1 VVM, Figure 25). Le bullage de 0,1 VVM correspond à un flux de 20,16 mL/min dans le cas de ces bioréacteurs remplis avec 200 mL de milieu. L'agitation a été fixée à 500 RPM dans les deux conditions. Un témoin avec une culture classique en bouteille scellée avec du CO₂ 10 % v/v en présence de bicarbonate de potassium a été effectué dans les mêmes conditions. Dans ces deux conditions, l'effet de deux tampons a également été étudié, le tampon bicarbonate (5 g/L) qui forme un équilibre avec le

CO₂ (pour obtenir un pH de 7,75) et un tampon potassium phosphate (0,05 M pH 7,75). Le deuxième tampon a été sélectionné pour sa gamme de pH allant de 5,8 à 8, la facilité de sa préparation et la présence de potassium qui le rapprochait du bicarbonate de potassium utilisé pour le tampon bicarbonate/CO₂. Après inoculation, les densités optiques (à 600 nm) de départ pour les 4 réacteurs étaient comprises entre 0,17 et 0,2.

Les résultats de croissance en bioréacteurs de *T. xylanilyticus* avec les différentes conditions testées ci-dessus sont données par la Figure 42. La culture témoin de *T. xylanilyticus* effectuée en bouteilles scellées avec un inoculum de départ similaire (DO_{600nm} de 0,1) a atteint une DO_{600nm} de $2,64 \pm 0,14$ après 5 heures de culture (Figure 42A). Les résultats montrent que la croissance en bioréacteur n'a pas démarré avec les deux conditions de culture contenant du CO₂ injecté en continu (avec tampon phosphate ou bicarbonate/CO₂). Les valeurs des DO_{600nm} ont baissé légèrement jusqu'à atteindre une valeur de 0,12 après 5 heures de croissance. À l'inverse, la croissance a démarré lorsque les bioréacteurs ne contenaient pas de CO₂. On constate qu'après 5 heures de culture, les densités optiques atteignent respectivement les valeurs de 0,34 et 0,42 pour les bioréacteurs non approvisionnés en CO₂ avec les tampons potassium phosphate et bicarbonate. Par ailleurs, il n'y a pas d'effet significatif noté lors de l'utilisation des différents tampons sur la croissance en bioréacteur à ce stade.

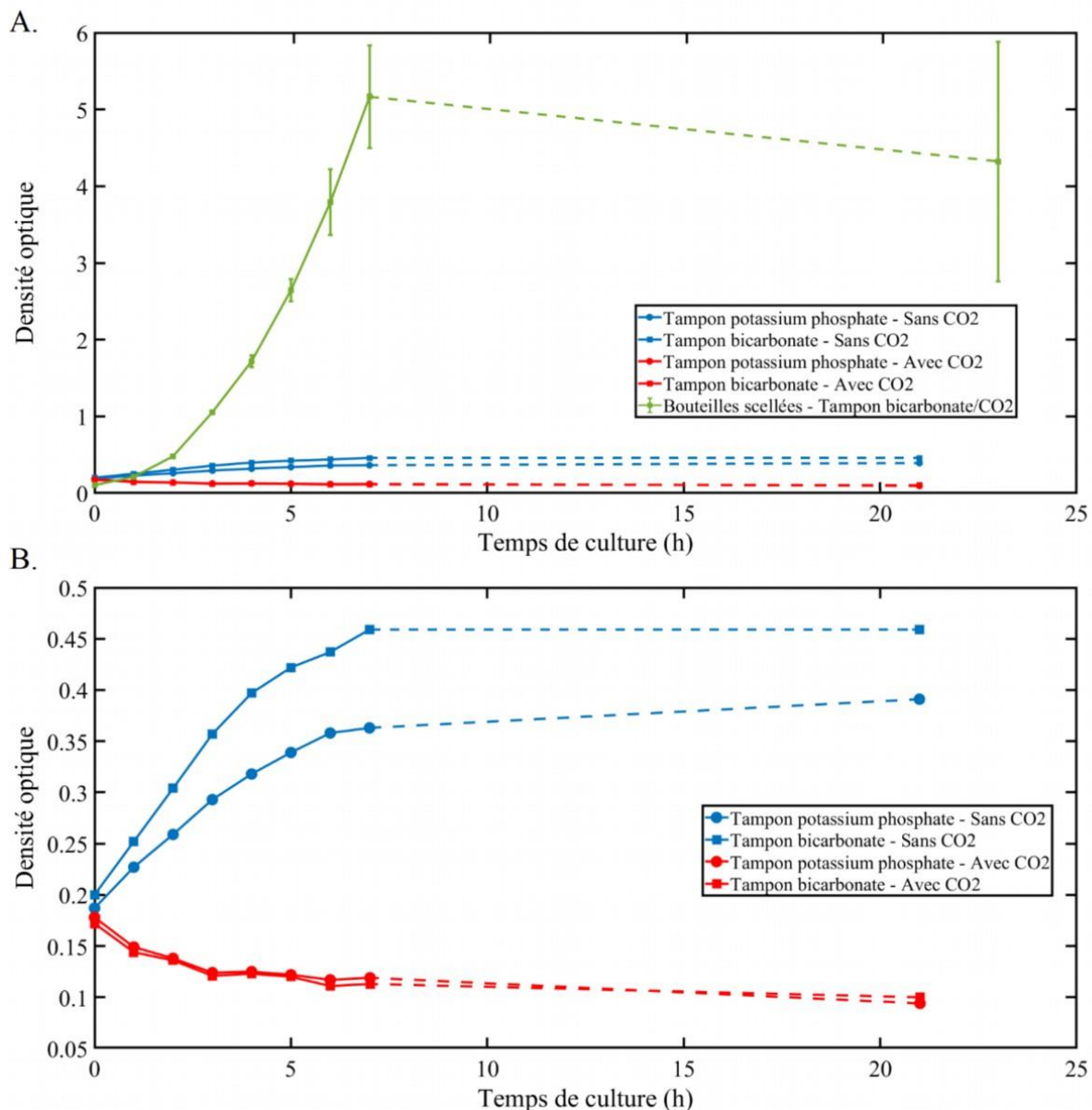


Figure 42 : Croissance de *T. xylanilyticus* dans des bioréacteurs parallèles DASGIP® avec différentes conditions de tampons et d'apports en CO₂ et comparaison avec la croissance en bouteilles scellées avec 10 % de CO₂ (v/v). A : Zoom sur les comparaisons de croissance en bioréacteurs parallèles DASGIP® avec différentes conditions de tampons. B : Zoom sur les comparaisons de croissance en bioréacteurs parallèles DASGIP® avec différents apports en CO₂. Les cultures en réacteurs n'ont été fait qu'en un seul réplica alors que la culture en bouteille scellée a été réalisée en 3 réplicas.

Le pourcentage d'air saturé en O₂ a été suivi dans les réacteurs au cours de la croissance pour les bioréacteurs sans apport de CO₂ (le bullage du CO₂ empêchant la mesure du

pourcentage d'air saturé en oxygène, pO_2). Ce pourcentage d'air saturé en O_2 est de 0 après seulement une heure de culture de la souche avec les conditions de dispersion d' O_2 définies ci-dessus (aération de 0,1 VVM et agitation de 500 RPM).

Les conditions de culture testées ici ne sont donc pas les mieux adaptées pour la croissance de *T. xylanilyticus* en bioréacteurs. La croissance en bioréacteur reste très faible en comparaison avec les cultures en bouteilles scellées. Cependant, il a pu être démontré qu'il est possible de démarrer la croissance de la bactérie en absence de CO_2 avec une bonne régulation automatique du pH. Les croissances moins importantes pourraient s'expliquer par une trop faible aération des bioréacteurs pour chaque condition.

2.1.2. Effet de l'aération et de la concentration en oxygène

Des essais de cultures ont donc été réalisés en variant le débit d'apport en oxygène et en gardant les autres paramètres de culture constants principalement la régulation automatique du pH. L'agitation est restée fixe à 500 RPM. Les expériences ont été menées sans apport de CO_2 mais avec un apport en O_2 de 0,1 VVM ou de 0,5 VVM (ce dernier correspondant à un flux de 100,8 mL/min d' O_2) dans deux bioréacteurs contenant un milieu avec le tampon phosphate de sodium ou le tampon bicarbonate/ CO_2 (Figure 26). Il est à noter que dans le cas du tampon bicarbonate/ CO_2 , le CO_2 a été uniquement apporté au milieu afin d'atteindre le pH de 7,75 avant inoculation. Les 2 tampons ont donc été utilisés malgré la présence d'insolubles remarquables (voir point 2.1.3) afin de constater s'ils avaient une influence sur la croissance de la souche dans de meilleures conditions d'aération. De l'antimousse, KS911 (Evonik Nutrition & Care GmbH) a été ajouté (75 μ L/L de milieu) directement au milieu de culture avant autoclavage pour prévenir la formation de mousse et une montée en volume dans les bioréacteurs.

Dans chaque condition testée, un pourcentage d'air saturé en O_2 (pO_2) de 100 % a été défini lors de l'absence d'inoculation et de croissance de la souche en aérant le système avec de l'oxygène à un débit de 20,16 ou 100,8 mL/min. Ce pourcentage d'air saturé en O_2 a rapidement chuté pour toutes les conditions à 0,1 VVM (Figure 43). Les pO_2 ont été d'environ 44 % pour ces conditions de culture avec les tampons potassium phosphate et bicarbonate/ CO_2 respectivement après environ 1h15 de culture et ont atteint une valeur de 0 % après seulement 3 heures et 5 heures de culture.

Il a été noté que la chute a été plus rapide pour la condition d'aération de 0,1 VVM avec le tampon potassium phosphate. En effet, après environ 35 minutes, le pourcentage d'air saturé a atteint une valeur de 40,11 % alors qu'en présence de tampon bicarbonate/CO₂, la valeur était de 66,37 % au même temps de culture. Avec une aération de 0,5 VVM, les pO₂ ont diminué plus lentement et ont atteint 83,38 % et 82,64 % après 35 minutes de culture avec les tampons potassium phosphate et bicarbonate/CO₂ respectivement. Les diminutions des pO₂ ont été progressives et ont atteint une pO₂ nulle après environ 5h35 et 5h45 de culture avec les tampons potassium phosphate et bicarbonate respectivement.

Les résultats de suivi des pO₂ montrent donc que les conditions d'agitation de 500 RPM et d'aération de 0,1 VVM ou 0,5 VVM n'ont pas été suffisantes afin de cultiver *T. xylanilyticus*. En effet, la consommation d'oxygène a été beaucoup trop importante par rapport aux conditions de culture fixées. En effet, avec l'O₂ atteignant des valeurs proches de 0 après 5 à 6 heures dans les meilleures conditions (aération de 0,5 VVM), il a pu être conclu que l'O₂ a été limitant pour la culture de *Thermobacillus xylanilyticus* (Figure 43).

Il est à noter que pour une agitation à 500 RPM une formation de mousse a été observée quelle que soit le niveau d'aération. Dans le cas des conditions de culture faites avec un apport en O₂ de 0,5 VVM, une formation plus importante de mousse a été observée malgré la présence d'antimousse.

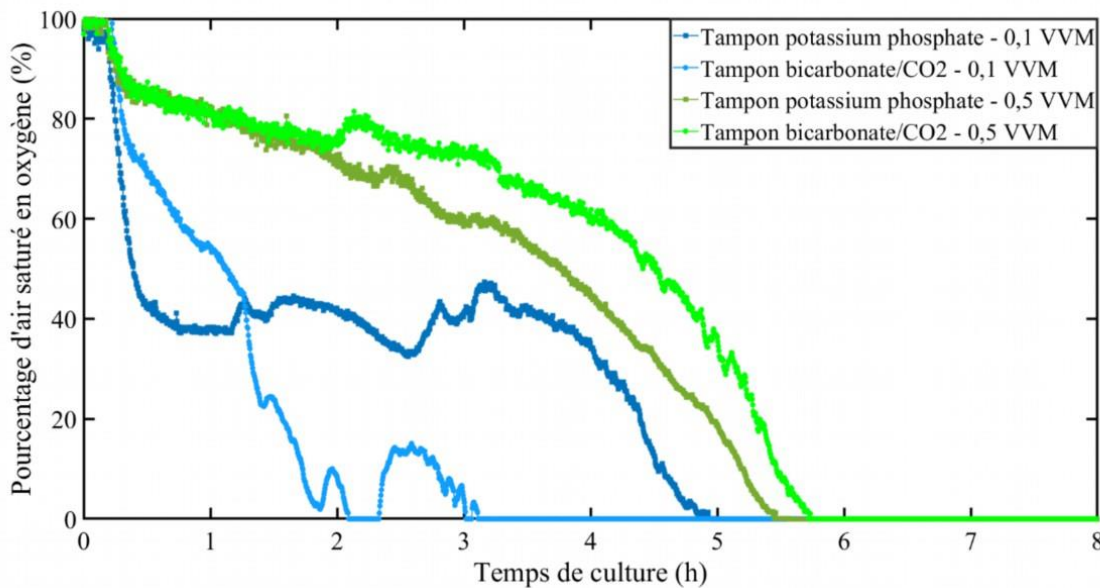


Figure 43 : Consommation d'O₂ de *T. xylanilyticus* en bioréacteurs avec différents tampons (tampon potassium phosphate et tampon bicarbonate/CO₂) et différentes aérations (0,1 VVM et 0,5 VVM).

Au cours des cultures en bioréacteurs, il a été décidé d'augmenter la vitesse d'agitation à 1000 RPM tout en conservant un apport en O₂ de 0,1 VVM et en conservant les autres paramètres utilisés précédemment. Le choix d'augmenter la vitesse d'agitation a été fait afin de substituer l'apport d'O₂ de 0,5 VVM par une agitation plus importante. En effet, le coefficient de transfert de l'oxygène aux cellules est directement dépendant de l'agitation et du débit d'air (Delvigne and Lecomte, 2010). Les expériences ont été réalisées en trois répliques avec la présence du tampon potassium phosphate. Le pH a été fixé avant inoculation à une valeur de 7,75 avec du KOH et de l'H₃PO₄. Après inoculation, la valeur de départ de croissance a été de $0,13 \pm 0,01$. Le pourcentage d'air saturé en oxygène a chuté après environ 4 heures de culture. Le pourcentage d'air saturé en oxygène a fini par atteindre une valeur minimale moyenne proche de 0 % après 6 à 8 heures de culture en fonction des répliques, ce qui correspond au début de la phase stationnaire.

Concernant la croissance, la phase exponentielle a débuté en moyenne dès 3h30 de culture. Après 6 heures de culture, la phase stationnaire a été atteinte avec une densité optique moyenne de $2,97 \pm 0,34$. Après le début de la phase stationnaire passé, l'oxygène n'a plus été

consommé par la souche. La pO_2 est alors remontée à des valeurs se rapprochant de 100 % prouvant que la souche avait arrêté sa croissance (Figure 44).

De plus, lors de ces cultures, la montée en volume par formation de mousse a été moins importante que lors des cultures réalisées avec une aération de 0,5 VVM et une agitation de 500 RPM.

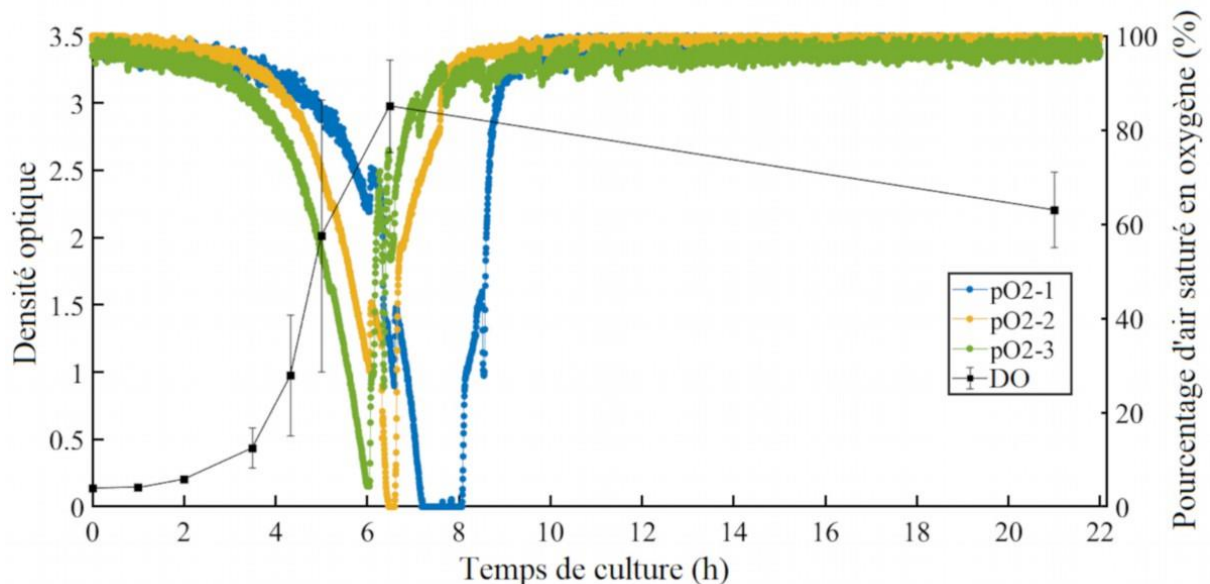


Figure 44 : Croissance et consommation d' O_2 de *T. xylanilyticus* obtenues en bioréacteurs en présence de glucose comme source de carbone et avec les paramètres d'agitation et d'aération suivants : 1000 RPM et 0,1 VVM. Le milieu basal de culture contenait du tampon potassium phosphate 0,05 M. La régulation du pH était également faite avec du KOH et de l' H_3PO_4 .

2.1.3. Effet de la présence de tampon sur la croissance

La présence d'insolubles a été observée dans le milieu de culture lorsque du bicarbonate de potassium (ou du phosphate de potassium) était ajouté dans celui-ci. En effet, un trouble important était observable lorsque du bicarbonate de potassium était ajouté dans le milieu de culture basal encore non complété avec une source de carbone. La figure 45 montre l'observation de ce trouble qui est, ici, apparu après ajout de 5 g/L de bicarbonate de potassium. Il s'agit de la concentration ajoutée pour les cultures de *T. xylanilyticus* en bouteilles scellées. Il est à noter que ce trouble est également observable lorsque le tampon utilisé est du potassium phosphate 0,05 M préparé par ajout de 7,1 g/L de K_2HPO_4 et 1,257 g/L de KH_2PO_4 .



Figure 45 : Présence d'insolubles dans le milieu basal de culture de *T. xylanilyticus* lorsque du bicarbonate de potassium (5 g/L) était ajouté dans le milieu afin de réaliser un système tampon avec du dioxyde de carbone. La photo est prise à la sortie de la stérilisation des milieux par autoclavage.

L'expérience de culture en bioréacteurs avec du glucose et les paramètres d'agitation et d'aération de 1000 RPM et 0,1 VVM a alors été réitérée en trois réplicas mais sans la présence de tampon dans le milieu. Tous les paramètres précédemment définis ont été conservés mais en ajoutant aucun tampon dans le milieu de culture. Le pH a été fixé avant inoculation à une valeur de 7,75 avec du KOH et de l' H_3PO_4 sans présence de tampon (nécessitant plus d'acides et de bases donc). Après inoculation, la valeur de densité optique de départ de croissance a été de $0,22 \pm 0,01$ sans présence de tampon (en comparaison à $0,13 \pm 0,01$ avec présence de tampon).

Les DO_{600nm} ont atteint des valeurs de plus de 1 après 5 heures de culture, $1,39 \pm 1,01$ exactement (Figure 46). La phase exponentielle a débuté en moyenne après 3 heures de culture, ce qui est proche des 3h30 nécessaires avec la présence d'un tampon dans le milieu. Le pourcentage d'air saturé en oxygène a chuté également après environ 4 heures de culture comme pour les cultures avec présence de tampon (Figure 44). Le pourcentage d'air saturé en oxygène a fini par atteindre une valeur minimale moyenne proche de 0 % également avec ces conditions après 6 à 8 heures de culture en fonction des répliques, ce qui correspond au début de la phase stationnaire. Celle-ci a été atteinte après 6 heures de culture avec une densité optique moyenne de $2,58 \pm 0,17$ (en comparaison à $2,97 \pm 0,34$ avec présence de tampon). Après le début de la phase stationnaire passé, l'oxygène n'a plus été consommé par la souche également. La pO_2 est alors remontée à des valeurs se rapprochant de 100 % prouvant que la souche avait arrêté sa croissance.

Les croissances avec et sans tampon ont donc été assez semblable (Figures 44 et 46) mais la croissance était plus rapide sans présence de tampon dans le milieu même si les densités optiques les plus hautes ont été atteintes avec du tampon dans le milieu de culture. Cependant, il est à noter que les écart-types des densités optiques mesurées étaient plus importants lors des cultures avec présence d'un tampon que sans celui-ci. En effet, après 5 et 6 heures de cultures avec présence du tampon potassium phosphate, les écarts-types des densités optiques mesurées étaient de 1,01 et 0,34 pour des valeurs moyennes de 2,01 et 2,98. Cela correspond à des coefficients de variation de 50,13 % et 11,49 % respectivement. Aux mêmes temps lors des cultures sans présence de tampon, les écarts-types s'élevaient à 0,04 et 0,18 pour des densités optiques moyennes de 1,39 et 2,58 respectivement après 5 heures et 6 heures de culture. Les coefficients de variation étaient alors de 3,06 % après 5 heures de culture et de 6,8 % après 6 heures de culture. Les coefficients de variation étaient donc 16,38-fois et 1,69-fois plus importants avec présence d'un tampon que sans présence d'un tampon. Après seulement 4 heures de culture la différence était aussi importante et le coefficient de variation était 19,91-fois plus important avec présence d'un tampon (coefficient de variation de 45,96 %) que sans présence d'un tampon (coefficient de variation de 2,31 %).

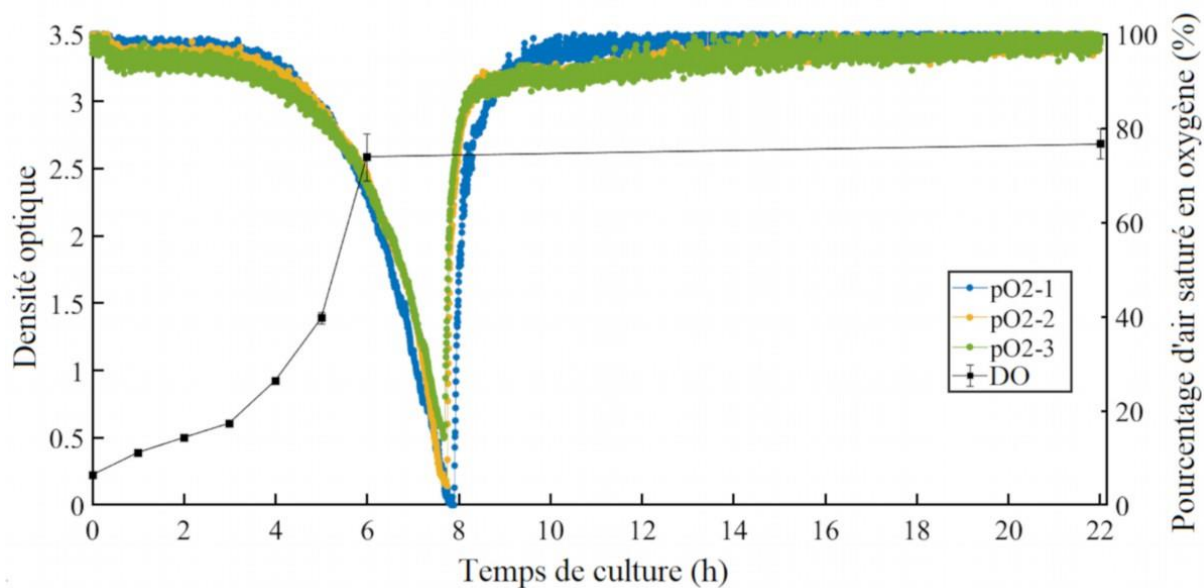


Figure 46 : Croissance et consommation d'oxygène de *T. xylanilyticus* obtenues en bioréacteurs avec du glucose comme source de carbone et les paramètres d'agitation et d'aération suivants : 1000 RPM et 0,1 VVM. Le milieu basal de culture ne contenait aucun tampon. La régulation du pH était faite avec du KOH et de l' H_3PO_4 .

Les paramètres définis ont été conservés pour réaliser la même étude avec une autre source de carbone, le xylane à 5 g/L. Les autres paramètres de cultures ont été conservés (milieu basal de culture, agitation de 1000 RPM, aération de 0,1 VVM, température de 50°C, volume de 200 mL, présence d'antimousse KS911 et pH régulé à 7,75 par ajout automatique de KOH et d' H_3PO_4). Les cultures ont été réalisées en trois répliques avec et sans présence du tampon potassium phosphate 0,05 M préparé comme décrit précédemment afin de tester si la présence d'un tampon était également non nécessaire dans le cadre des cultures avec du xylane.

Avec les paramètres définis, la bactérie s'est bien développée en présence de xylane dans les bioréacteurs (Figure 47). Après 5 heures d'incubation, les cultures avec du xylane ont atteint des DO_{600nm} , respectivement de $1,22 \pm 0,29$ et $2,41 \pm 0,19$ avec présence du tampon potassium phosphate et sans tampon. L'oxygène était consommé rapidement et les pO_2 chutaient après environ 4 heures de culture en présence du tampon potassium phosphate et dès 2 heures en absence de tampon de potassium phosphate. Après la phase de croissance exponentielle (après 3 heures de culture avec présence de tampon et après seulement 1 heure de culture avec le tampon potassium phosphate), la pO_2 atteignait des valeurs moyennes de

61,9 ± 2,2 % et de 43,7 ± 7,4 % après environ 6h45 et 4 heures de culture respectivement en présence et absence de tampon phosphate de sodium. Si on compare avec la croissance en présence de glucose, la consommation d'oxygène était donc plus importante avec le glucose qu'avec le xylane comme source de carbone.

Il est à noter que comme pour la culture en présence de glucose, la croissance a été plus rapide lors de la culture effectuée sans tampon potassium phosphate. En effet, la phase stationnaire a été atteinte après 4 environ heures de culture, ce qui a correspondu également aux valeurs minimales de pourcentage d'air saturé en O₂. À ce temps de culture, la densité optique moyenne mesurée est de 2,81 ± 0,25 et elle a chuté progressivement ensuite jusqu'à atteindre une valeur de 0,86 ± 0,11 après 21 heures de culture (phase de sporulation importante). Lors des cultures avec présence d'un tampon, la phase stationnaire n'a été atteinte qu'à environ 6 heures de culture avec une densité optique moyenne de 2,72 ± 0,55 suivie d'une chute de la densité optique jusqu'à atteindre une valeur moyenne de 1,35 ± 0,27 après 21 heures de culture. C'est également après la phase stationnaire que la pO₂ est alors remontée à des valeurs se rapprochant de 100 % prouvant que la souche avait arrêté sa croissance active et ne consommait plus d'oxygène.

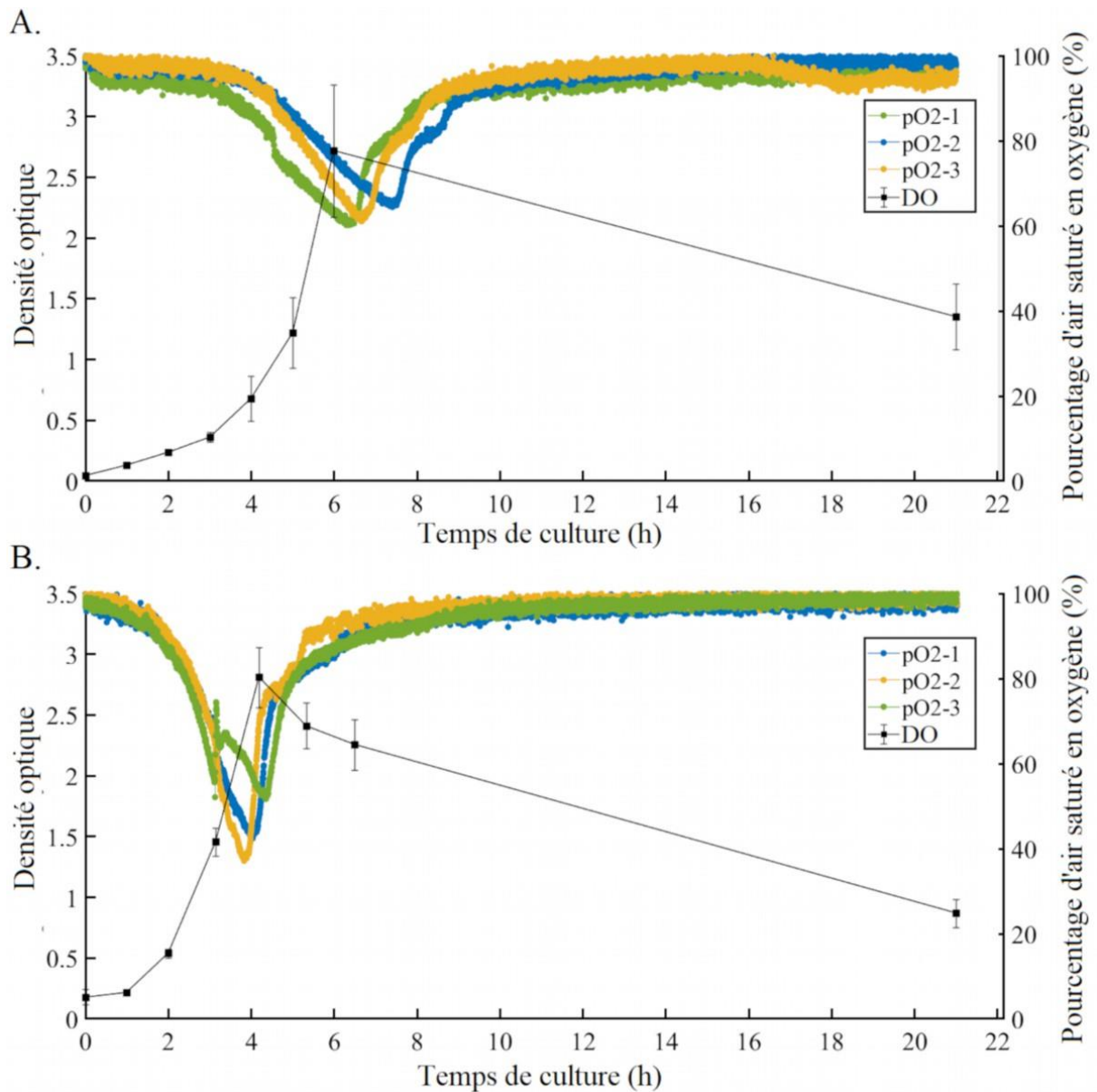


Figure 47 : Croissance et consommation d'oxygène de *T. xylanilyticus* obtenues en bioréacteurs en présence de xylane comme source de carbone et avec les paramètres d'agitation et d'aération suivants : 1000 RPM et 0,1 VVM. Le milieu basal de culture contenait un tampon potassium phosphate (A) ou sans aucun tampon (B). Une régulation du pH était faite avec du KOH et de l' H_3PO_4 .

En comparant les cultures en présence de glucose ou de xylane comme source de carbone, la consommation d'oxygène était moins importante lors des cultures avec du xylane. Les pourcentages minimaux d'air saturé en oxygène ($61,9 \pm 2,2 \%$ et $43,7 \pm 7,4 \%$) restaient supérieurs aux valeurs nulles relevées lors des cultures avec du glucose comme source de

carbone. Ces valeurs nulles étaient également atteintes lors de la fin de la phase exponentielle et le début de la phase stationnaire. Ces résultats prouvent bien une différence de consommation de l'oxygène de *T. xylanilyticus* en fonction de la source de carbone utilisée.

Il a donc été confirmé que les conditions de culture définies en présence de glucose sont aussi transposables avec une autre source de carbone, le xylane. Suite à ces expérimentations, les paramètres suivants de culture en bioréacteurs ont été sélectionnés pour la poursuite de l'étude : température de 50°C, pH de 7,75 régulé par ajout continu de KOH et d'H₃PO₄, aération de 0,1 VVM, agitation de 1000 RPM, présence d'antimousse KS911 (75 µL/L de milieu) et utilisation du milieu basal de culture préparé dans l'eau distillée sans tamponner le pH avant autoclavage.

En conclusion, cette première partie a permis de mettre en place une culture plus robuste de *T. xylanilyticus* en bioréacteurs en mode aérobie lorsqu'une régulation automatique correcte du pH est effectuée. Les conditions de cultures retenues sont :

- Absence de CO₂ avant et après inoculation.
- Milieu basal de culture de *T. xylanilyticus* complété avec du glucose 5 g/L ou du xylane 5 g/L mais non complété ni avec du bicarbonate de potassium ni par un tampon potassium phosphate.
- Mise en place d'une régulation de pH à 7,75 avec ajout automatique de KOH et H₃PO₄.
- Aération de 0,1 VVM et agitation de 1000 RPM.
- Présence d'antimousse pour éviter la montée en volume.

2.2. Cultures ségréostat pour diminuer l'hétérogénéité de populations en bioréacteurs

Les dynamiques de population peuvent être différentes en bioréacteurs par rapport à des cultures à des échelles moins importantes du fait de la présence de gradients (de température, pH, oxygène ou substrat) plus importants qui peuvent créer une hétérogénéité dans les conditions environnementales des cellules. Ces gradients peuvent être souvent responsable de l'hétérogénéité des cellules dans les bioprocédés industriels (Delafosse *et al.*, 2015; Delvigne *et al.*, 2018). Les paramètres de culture en bioréacteurs définis dans la section précédente ont rendu possible l'étude des populations de *T. xylanilyticus* par cytométrie en flux et en ligne lors de cultures en bioréacteurs.

Comme présenté dans l'étude bibliographique, les cultures en ségréostat offrent une stratégie de contrôle de la diversité phénotypique par l'introduction de perturbations environnementales en fonction des signaux cytométriques mesurés (Sassi *et al.*, 2019; Nguyen *et al.*, 2021). Dans le cas de *T. xylanilyticus*, il a déjà été prouvé dans la première partie des résultats qu'une stratégie de gestion des sous-populations (et plus particulièrement de prévention de l'apparition de cellules de type *cheaters*) pouvait être utilisée par l'alternance de la source de carbone employée (entre le xylane et le glucose). Les cultures en ségréostat semblent bien appropriées pour la culture de *T. xylanilyticus* et le contrôle de sa diversification phénotypique en bioréacteurs en se basant sur le pourcentage de cellules appartenant à la *high* population. En effet, comme montré avec les résultats des chapitres précédents, la charge métabolique de production d'enzymes et la compétition pour les ressources amènent les cellules productrices de la souche à sporuler prématurément, ce qui conduit à la sélection des cellules de type *cheaters*. L'hypothèse a donc été que l'introduction de pulses de glucose (changements environnementaux pour les cellules) permettrait de changer cette dynamique de populations car le glucose ne nécessite pas la production d'enzymes hydrolytiques pour être utilisable par *T. xylanilyticus*. Le glucose serait ainsi ajouté aux ressources mobilisables pour la croissance. Ce nouvel apport de ressources mobilisables limiterait donc la compétition entre les cellules productrices d'enzymes et les cellules de type *cheaters*.

Les cultures en ségréostat ont été menées avec les paramètres de culture définis ci-dessus mais avec un bioréacteur de volume plus important (volume utile de 2 litres avec 1 litre de milieu de culture). Le choix de la source de carbone de base s'est fait sur le xylane car c'est au cours des cultures successives avec celui-ci que les phénomènes de diversification

phénotypique et l'apparition de cellules de type *cheaters* ont été observés. La perturbation environnementale choisie a été l'ajout de glucose par pulse de 0,5 g (équivalent donc à 0,5 g/L ou un dixième de la concentration en xylane dans le milieu) toutes les 12 minutes seulement lorsque plus de 50 % de la population présentait des signaux FSC-A supérieurs à 30000 (cellules en sporulation ou *high* population). Une limite est effectivement nécessaire afin d'actionner l'ajout ou non de glucose dans le milieu. Le temps de 12 minutes correspondant au temps séparant 2 mesures cytométriques en ségrégostat. Les changements environnementaux peuvent donc être effectués que toutes les 12 minutes. Les cultures de type ségrégostat se font de manière continue. Pour cela, le milieu basal de culture contenant le xylane (5 g/L) a été apporté avec un taux de dilution de 0,5 h⁻¹. L'inoculation a été réalisée comme décrite précédemment (pour les cultures avec le système DASGIP®) et la culture a duré environ 46 heures avant la formation d'agrégats de cellules et de biofilms empêchant de bonnes lectures cytométriques.

Avant de démarrer l'ajout de perturbations, une phase de batch a d'abord été réalisée pour augmenter la biomasse de *T. xylanilyticus*. Celle-ci a duré 6 heures (jusqu'à atteindre la fin de la phase exponentielle) et a permis d'obtenir une DO_{600nm} de 2,79 (Figure 48). Au cours de cette phase de batch, l'activité extracellulaire xylanase a été mesurée par dosage des sucres réducteurs. L'activité xylanase était nulle jusqu'à environ 2 heures de culture où elle a atteint 5,89 UI/mg. Après la phase de culture en batch, l'activité a augmenté d'un facteur 6,45-fois jusqu'à atteindre une valeur de 38,01 UI/mg.

À la fin de la phase de batch, la phase de culture continue a commencé et 48,49 % de la population appartenait déjà à la *high* population. L'activité xylanase a alors chuté lors des 2 heures suivant le début de la phase de culture continue pour atteindre 26,01 UI/mg après 7 heures de culture et 17,12 UI/mg après 8 heures de culture.

C'est 1 heure après le démarrage de la phase de culture continue que l'ajout de glucose par pulses a commencé car le pourcentage de cellules appartenant à la *high* population mesurée atteignait 51,53 % avec une DO_{600nm} de 2,65 (proche de la valeur obtenue à la fin de la phase de culture en batch). Le pourcentage de cellules appartenant à la *high* population a augmenté jusqu'à une valeur de 79,77 % après 2 heures et 20 minutes de culture continue (dont 1 heure et 20 minutes d'ajout de glucose). C'est après ce pic passé que le pourcentage de cellules de la *high* population a chuté jusqu'à atteindre une valeur de 55,85 % après 4 heures et 20 minutes avant de se stabiliser autour d'une valeur de 57,73 ± 2,85 % pendant 9 heures et 24 minutes. Tout au long de ces changements, des pulses de 0,5 g de glucose ont été apportés dans le milieu.

Le pourcentage de cellules de la *high* population a finalement chuté à moins de 50 % (49,92 % précisément) après 20 heures de culture totale. L'ajout de glucose s'est donc arrêté également à ce moment. La densité optique et l'activité xylanase ont été mesurés pendant cette période d'arrêt. Celles-ci étaient de 1,88 et 17,88 UI/mg après 22 heures de culture totale et 3,72 et 70,36 UI/mg après 24 heures de culture totale. Cette dernière activité enzymatique (70,36 UI/mg) était la valeur la plus haute mesurée pour l'activité xylanase lors de la culture. Cette valeur correspond à une amélioration de l'activité xylanase d'un facteur 11,94-fois en comparaison au début de la phase de batch et d'un facteur 1,85-fois en comparaison à la fin de la phase de batch. Lors de ces mesures, les pourcentages de cellules appartenant à la *high* population étaient 41,44 % et 31,83 % après 22 et 24 heures de culture respectivement. Le pourcentage relevé après 24 heures de culture correspondait à la plus faible valeur du pourcentage de cellules de la *high* population au cours de la culture.

Une autre période d'ajout de glucose a eu lieu de 25 heures de culture à 31 heures et 20 minutes de culture. Au cours de cette période, le pourcentage de cellules appartenant à la *high* population est passé progressivement de 52,42 % après 25 heures de culture à 72,27 % après 27 heures de culture pour ensuite atteindre une valeur de 48,09 % après 31 heures et 20 minutes de culture. Au cours de cette période, les activités enzymatiques étaient de 45,11 UI/mg après 26 heures, de 40,52 UI/mg après 28 heures et de 15,75 UI/mg après 30 heures de culture montrant une chute progressive de l'activité enzymatique. À ces temps précis, les densités optiques et le pourcentage de cellules appartenant à la *high* population étaient respectivement de 3,84 et 67,49 % après 26 heures, de 2,34 et 63,41 % après 28 heures et de 2,78 et 55,17 % après 30 heures.

Après cette période, l'ajout de glucose a été arrêté pendant environ 6 heures pour atteindre un total de 37 heures et 30 minutes de culture. Au cours de cette période, le pourcentage de cellules appartenant à la *high* population est passé par un minimum à 37,01 % après 36 heures de culture. Cette période a été suivie par une nouvelle période d'ajout de glucose après 37 heures et 30 minutes de culture jusqu'à 41 heures et 30 minutes de culture totale. Après cette étape, l'ensemble du système a commencé à présenter des agglomérats de cellules qui semblaient s'accumuler pour former ce qui s'apparentaient à des biofilms. Suite à la formation de ceux-ci, la dynamique de populations de *T. xylanilyticus* a été totalement altérée. Le système a donc été arrêté après plus de 46 heures de culture. Après ces 46 heures de culture, la densité optique mesurée était de 3,51 et l'activité extracellulaire de 11,95 UI/mg.

Dans l'ensemble, après la fin de la phase batch, le système a donc alterné entre 3 périodes d'ajout de glucose et 3 périodes sans ajout de glucose. La dernière période sans ajout de glucose correspond à la dégénérescence du système suite à la formation d'agglomérats de cellules. Au cours des périodes d'ajout de glucose, l'activité xylanase et le pourcentage de cellules appartenant à la *high* population ont tendance à baisser. C'est seulement après la première période d'ajout de glucose que le pourcentage de cellules appartenant à la *high* population est descendu à sa valeur minimale, soit 31,83 %. C'est également à ce moment que la valeur maximale d'activité enzymatique a été relevée, soit 70,36 UI/mg. Ces 2 valeurs correspondent à 24 heures de culture dont 6 heures de culture continue, 5 heures de culture continue et 13 heures de culture continue avec ajout de glucose toutes les 12 minutes.

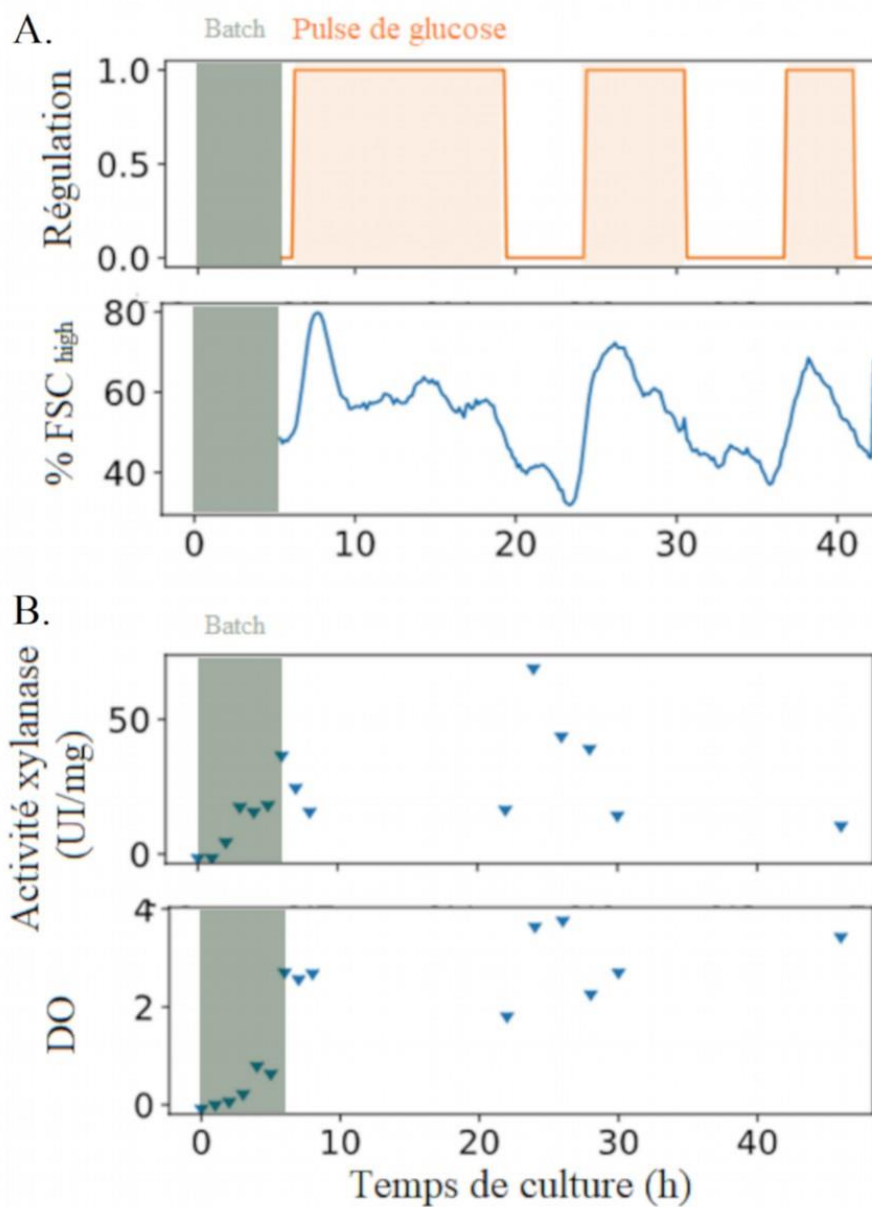


Figure 48 : Evolution des populations, de la densité optique et de l'activité xylanase en fonction des pulses de glucose lors de la culture en ségrégostat. A : Evolution du pourcentage de cellules appartenant à la *high* population en fonction des périodes de pulses de glucose lors de la culture en ségrégostat ; B : Evolution de l'activité xylanase (en UI/mg) et de la densité optique (mesurée à 600 nm) au cours de la culture en ségrégostat.

3. Discussion

Les paramètres définis au cours des tests de culture en bioréacteurs ont donc permis de cultiver *T. xylanilyticus* de manière plus répétable en bioréacteurs. Le régime aérobie de cette bactérie thermophile a déjà été prouvé lors de précédentes études de caractérisation de la bactérie (Samain *et al.*, 1992; Touzel *et al.*, 2000). Cependant la dépendance de *T. xylanilyticus* au CO₂ n'a jamais été étudié. Par l'utilisation de système parallèle de cultures en bioréacteurs, les résultats ont permis de montrer que le CO₂ n'est pas nécessaire à la croissance de la souche en bioréacteurs. Le CO₂ semble uniquement essentiel pour former un tampon avec le bicarbonate (de potassium) afin d'atteindre un pH optimal de 7,75 pour la croissance de la souche selon la formule suivante : $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{H}_2\text{CO}_3 \leftrightarrow \text{H}^+ + \text{HCO}_3^- \leftrightarrow \text{CO}_3^{2-} + 2\text{H}^+$. Cet équilibre est donc lié au pH et les constantes d'équilibre sont les suivantes (Bailey, James Edwin, Ollis, 1986; Blombach and Takors, 2015) :

$$K_1 = \frac{[\text{H}^+][\text{HCO}_3^-]}{[\text{CO}_2] + [\text{H}_2\text{CO}_3]} \cong \frac{[\text{H}^+][\text{HCO}_3^-]}{[\text{CO}_2]} = 10^{-6.3} M$$

$$K_2 = \frac{[\text{H}^+][\text{CO}_3^{2-}]}{[\text{HCO}_3^-]} = 10^{-10.25} M$$

L'utilisation d'un système automatisé de régulation du pH (par ajout de KOH et H₃PO₄ par exemple) est suffisante pour la régulation du pH en bioréacteurs sans devoir passer par cet équilibre. L'utilisation de ce système a permis alors la culture de *T. xylanilyticus* dans des conditions totalement aérobies. Cependant, des études plus approfondies de la relation qu'entretient la souche avec le CO₂ serait tout de même nécessaire car certains gènes ont été identifiés chez *T. xylanilyticus* impliqués dans la conversion enzymatique du CO appartenant à l'une des six voies existantes (cycle de Calvin, cycle réducteur de l'acide citrique, voie réductrice de l'acétyl-CoA, cycle du 3-hydroxypropionate, cycle du 3-hydroxypropionate/ 4-hydroxybutyrate et le cycle du dicarboxylate/4-hydroxybutyrate) pour cette conversion (Fuchs, 2011a; Shi *et al.*, 2015; Rakotoarivonina *et al.*, 2022). De plus, le CO₂ et le bicarbonate peuvent également servir pour les réactions de carboxylation et de décarboxylation, modifier les propriétés physicochimiques des protéines, acidifier le pH interne et réguler la virulence et la production de toxines chez les agents pathogènes (Blombach and Takors, 2015). L'équilibre entre le CO₂ et l'HCO₃⁻ peut donc agir comme des inhibiteurs métaboliques ou des effecteurs

transcriptionnels pouvant donc impacter la production des cellules rendant les niveaux de CO₂ dissous comme un élément important à considérer (Blombach and Takors, 2015).

Ces paramètres ont permis également le suivi des populations par cytométrie en flux en temps réel. En effet, la présence de particules d'insolubles en suspension dans le milieu peut être détectée par cytométrie en flux et peut impacter les signaux obtenus pour les cellules. Par exemple, il a déjà été prouvé que des précipités de phosphate de calcium ont déjà pu imiter les microparticules au niveau de la diffusion de la lumière conduisant à la présence de faux positifs en cytométrie (Larson *et al.*, 2012). Bien que les systèmes bactériens ici étudiés soient différents des microparticules (étudiés principalement en pathologie), la conclusion peut être la même : la présence de précipités en suspension dans le milieu de culture peut influencer les différents signaux lumineux obtenus en cytométrie et sont donc à éviter pour des études de population bactérienne par cytométrie en flux.

La culture en ségrégostat s'est avérée être une stratégie prometteuse afin d'ajuster automatiquement le taux de perturbation de l'environnement comme réalisée pour l'induction de l'opéron arabinose chez *E. coli* (Nguyen *et al.*, 2021). Dans le cas de *T. xylanilyticus*, l'ajustement du taux de perturbation a été fait par l'ajout d'une nouvelle source de carbone. En effet, il a pu être observé que l'incorporation de glucose (0,5 g à chaque pulse) lors des cultures de *T. xylanilyticus* a permis de contrôler la diversification phénotypique de la souche et de limiter la sporulation précoce des cellules productrices. Cela a été observé par l'évolution du pourcentage de cellules de la *high* population qui a constamment alterné autour de la valeur seuil de 50 % fixé pour l'ajout de glucose. L'ajout de glucose a probablement permis d'avoir une nouvelle source de carbone mobilisable par les cellules de type *cheaters* ou par les cellules productrices afin de sortir de leur état de sporulation. En effet, le glucose est une source de carbone qui n'a pas besoin d'être hydrolysée pour être mobilisable par *T. xylanilyticus* à l'inverse du xylane. Il a été d'ailleurs observé que la plus haute activité enzymatique mesurée était de 70,36 UI/mg, soit une évolution d'un facteur 1,85-fois par rapport à la fin de la phase batch ou une évolution de 11,94-fois par rapport au début de la culture. Cette activité a été obtenue après baisse du pourcentage de la population en sporulation précoce (*high* population) après une première période d'ajout de glucose (d'environ 13 heures). C'est également au cours de cette période que le pourcentage minimum de cellules en sporulation a été atteint, 31,83 %, précisément au même temps de culture que le plus haut niveau d'activité xylanase. Cependant, le manque de données à certaines périodes de la culture, précisément lors de la première période

d'ajout de glucose (de 7 heures à 20 heures de culture) et après la deuxième période d'ajout de glucose (entre 31 heures et 37 heures de culture environ), ne permet pas de confirmer totalement la hausse d'activité enzymatique entre chaque période d'ajout de glucose. Ces périodes d'ajout permettraient hypothétiquement aux cellules productrices d'enzymes de rester en compétition avec les cellules de type *cheaters* à l'inverse des cultures avec uniquement du xylane où les cellules de type *cheaters* sont sélectionnés au cours des générations au détriment des cellules productrices. Ce phénomène de sélection serait dû à la charge métabolique de production des enzymes et la compétition pour les ressources (nécessitant l'hydrolyse du xylane), ce qui semble se confirmer par les résultats préliminaires obtenus au cours de la thèse.

Tout comme les autres études réalisées avec le système ségréostat, le paramètre suivi ici a donc été le pourcentage de cellules appartenant à une sous-population précise, ici les cellules en sporulation. Cependant, dans le cas de *T. xylanilyticus*, la détection de la sous-population s'est faite avec les signaux FSC et pas avec un marqueur fluorescent (RSG ou PI). De plus, l'oscillation autour de la valeur seuil définie pour l'ajout d'une perturbation dans le milieu a été plus longue et plus fréquente dans les précédentes études entraînant donc un nombre de perturbations plus important (Sassi *et al.*, 2019; Nguyen *et al.*, 2021). Cette différence est probablement due à la présence d'agglomérats et de biofilms en fin de culture de *T. xylanilyticus*, à l'inverse des précédentes études réalisées avec le système ségréostat. Un taux de dilution différent pourrait prévenir la formation de biofilms et permettre de poursuivre l'étude au-delà de 46 heures de culture (Kundra *et al.*, 2019).

Une optimisation de l'activité xylanase a eu lieu après la première période de pulses de glucose ayant permis de réduire le nombre de cellules appartenant à la *high* population (ou cellules en sporulation). Cependant, l'activité xylanase n'a pas été quantifiée après la seconde période de pulses de glucose ayant permis de diminuer ce pourcentage. Ce manque de données empêche d'apporter une conclusion à cette expérience qui nécessite donc d'autres essais malgré une tendance à démontrer que la réduction de l'instabilité phénotypique (en prévenant l'apparition de phénomènes de sporulation) augmente la production d'enzymes extracellulaires (xylanases) de *T. xylanilyticus*. Deux hypothèses peuvent être faites concernant la réduction des phénomènes de sporulation et l'optimisation de l'activité xylanase. La première hypothèse est que les cellules productrices qui ont sporulé ont utilisé le glucose avant de sortir de l'état de sporulation pour ensuite produire des xylanases afin d'hydrolyser le xylane de hêtre. La seconde hypothèse est que les cellules de type *cheaters* ont consommé du glucose à la place des

monomères libérés par l'hydrolyse du xylane laissant donc ceux-ci aux cellules productrices. Dans les 2 hypothèses, les cellules productrices resteraient en compétition avec les cellules de type *cheaters* à l'inverse des cultures avec uniquement du xylane où les cellules de type *cheaters* sont sélectionnées suite à la charge métabolique de production et la compétition pour les ressources mobilisables. En conclusion, d'autres expériences de cultures en ségréostat sont nécessaires avec *T. xylanilyticus* afin d'obtenir des niveaux encore plus élevés d'activité xylanase extracellulaire avec une régulation plus longue des populations de *T. xylanilyticus* qui serait possible en prévenant l'apparition d'agglomérats de cellules et de biofilms. Les résultats préliminaires sont cependant positifs pour continuer à essayer d'appliquer la stratégie de cultures en ségréostat afin d'augmenter la production d'enzymes hémicellulolytiques de *T. xylanilyticus*.

PARTIE V : DISCUSSION

1. Réponses aux objectifs de la thèse

Le principal objectif de la thèse était d'identifier les facteurs liés aux populations qui pourraient influencer la croissance et la production d'hémicellulases de *T. xylanilyticus* lors de cultures avec des biomasses lignocellulosiques. Le second objectif était de pouvoir améliorer la production d'enzymes par la bactérie en développant une stratégie de contrôle de la diversification phénotypique si ce phénomène est bien responsable des changements de croissance et de production d'enzymes hémicellulolytiques.

Ces objectifs ont pu être en grande partie atteints. En effet, la première partie de la thèse a permis de mettre en évidence que l'activité xylanase de *T. xylanilyticus* avait tendance à baisser au cours des cultures et des générations bien que cela n'avait jamais été prouvé ni publié auparavant. Afin d'étudier et de comprendre cette perte d'activité, la stratégie d'étude des populations a été adoptée. Avec cette stratégie, il a pu être établi que des phénomènes de diversification phénotypique menant à la présence de sous-populations de type tricheuses (*cheaters*) étaient responsables de l'hétérogénéité de la production enzymatique de *T. xylanilyticus*. Cette hétérogénéité allait jusqu'à faire baisser la production enzymatique de la bactérie au cours des générations. La seconde partie de la thèse a permis de mettre au point des stratégies de contrôle de la diversification phénotypique amenant à une meilleure production enzymatique globale lors des cultures de *T. xylanilyticus*. Ces stratégies ont reposé sur l'alternance de sources de carbone (entre glucose et xylane) et sur le changement de l'état de l'inoculum au cours de cultures successives en privilégiant les cellules se trouvant dans un état de croissance stationnaire. Ces stratégies se sont vues encouragées suite aux résultats obtenus, montrant une augmentation de la production enzymatique de xylanase mais également d'autres hémicellulases débranchantes. Dans la troisième partie de la thèse, une de ces stratégies, l'alternance de sources de carbone, a été extrapolée à des échelles de culture plus importantes (cultures continues en bioréacteur agité) après diverses étapes d'optimisation de la culture de la souche bactérienne dans ce type de bioréacteurs. L'optimisation de la culture devait tenir compte également de l'aspect dynamique des populations et devait rendre possible l'étude de celles-ci par cytométrie en flux. L'utilisation de cultures en ségrégostat a rendu possible cette stratégie d'alternance de sources de carbone à des échelles plus importantes tout en permettant le suivi des populations présentes chez *T. xylanilyticus*. La stratégie de culture en

ségrégostat s'est donc avérée prometteuse pour le contrôle des populations de *T. xylanilyticus* et l'optimisation de sa production enzymatique au niveau des enzymes hémicellulolytiques.

Les résultats ont pu confirmer l'hypothèse faite en début de thèse stipulant que la présence **de phénomènes de diversité phénotypique** serait responsable de la présence d'une **diversité de populations** et d'une **dérive** (hétérogénéité jusqu'à perte) **de la production enzymatique** par la bactérie. Les phénomènes de diversité de populations et la dérive de la production enzymatique ont pu alors être démontrés bien que les mécanismes exacts responsables de la diversité phénotypique n'ont pas encore été prouvés.

Cette thèse s'intègre dans les différentes améliorations à apporter au niveau du bioraffinage de la biomasse lignocellulosique. En effet, celui-ci requiert la production efficace d'enzymes et l'amélioration de l'efficacité de l'hydrolyse enzymatique des biomasses lignocellulosiques qui pourraient alors entraîner une production plus importante de bioéthanol et d'autres molécules plateformes (acide lactique, acide succinique, acide 3-hydroxypropionique, 3-hydroxypropionaldéhyde, sorbitol, ...) (Takkellapati, Li and Gonzalez, 2018; Singh *et al.*, 2019). Les enzymes sont l'un des produits biologiques à forte valeur ajoutée les plus intéressants actuellement (Rojas, Zapata and Ruiz-Tirado, 2022). Les xylanases ont beaucoup d'applications dans différents secteurs comme la production de biocarburants, l'industrie de la pâte à papier et du désencrage de papiers, l'industrie de la boulangerie et de la brasserie ainsi que l'industrie alimentaire humaine et animale (Alokika and Singh, 2019). Ce sont des enzymes clés pour libérer les pentoses des xylanes des biomasses lignocellulosiques (Juturu and Wu, 2012; Kumar *et al.*, 2017). À l'heure actuelle, les techniques de clonage et de génie génétique sont les méthodes de prédilection pour améliorer la production de xylanase au niveau commercial et de répondre à une viabilité économique et à des besoins industriels spécifiques (Alokika and Singh, 2019). Cependant, la production d'enzymes à grande échelle reste un défi technique. Les procédés de montée en échelle sont en effet compliqués du fait de la présence de phénomènes de diversification phénotypique donnant naissance à des sous-populations microbiennes isogéniques métaboliquement différentes (Delvigne & Noorman, 2017; Delvigne *et al.*, 2014). Cette thèse a alors proposé des stratégies de contrôle de la diversification phénotypique et de l'apparition des sous-populations microbiennes différentes qui se sont avérées efficaces jusqu'à l'échelle de culture en bioréacteurs submergés. Ces stratégies se sont avérées utiles pour améliorer la production enzymatique de la bactérie. Après extrapolation de ces stratégies à des échelles pilotes et industrielles de production, elles pourraient permettre

d'obtenir des meilleurs rendements en enzymes lignocellulolytiques et diminuer le coût des opérations.

Les approches sélectionnées au cours de la thèse et la discussion des résultats obtenus seront détaillées dans les points suivants.

.

2. Choix de l'étude des populations et études de l'impact des sous-populations

Le choix d'étudier les populations de *Thermobacillus xylanilyticus* a été consécutif à l'observation d'une hétérogénéité au niveau de la production enzymatique. La bactérie présente différentes activités enzymatiques (endo-xylanase, xylosidase et estérases) en fonction des substrats lignocellulosiques utilisés pour sa croissance (Rakotoarivonina *et al.*, 2012). Cependant elle présente également de l'hétérogénéité lors de cultures avec un même et unique substrat, ce qui amène à des productions différentes, encore inexplicables avant cette thèse, malgré des conditions de cultures similaires. Des phénomènes de sporulation ont également été observés avec cette bactérie. Or, la présence de phénomènes de sporulation peut amener à une chute de productivité de la part de bactéries productrices (Grage, McDermott and Rehm, 2017). La sporulation peut être également la preuve de dérive phénotypique comme chez *Bacillus subtilis*, où le régulateur de la sporulation, Spo0A, est activé par phosphorylation *via* trois boucles de rétroaction (Maamar, Raj and Dubnau, 2007; Chastanet *et al.*, 2010).

La stratégie choisie est basée sur le principe de cultures successives. Dans les études biologiques, les cultures successives sont souvent utilisées pour faire des cultures longues (augmentant le nombre de générations) et également pour mieux comprendre les mécanismes de base de l'évolution moléculaire et les changements adaptatifs qui s'accumulent dans les populations microbiennes au cours d'une sélection à long terme dans des conditions de croissance spécifiques (Portnoy, Bezdán and Zengler, 2011; Dragosits and Mattanovich, 2013; Yuan *et al.*, 2019). Cette dernière application est appelée évolution adaptative en laboratoire (*adaptive laboratory evolution* ou ALE) (Dragosits and Mattanovich, 2013). Le but des cultures successives pour l'étude de *T. xylanilyticus* a été plutôt de comprendre les changements populationnels au cours d'une sélection à long terme dans des conditions de croissance spécifiques utilisant des substrats tels que le xylane de hêtre, le son de blé et la paille de blé. Le son et la paille de blé ont été choisis pour leur importante teneur en xyloxygènes tout en ayant une composition en sucres différente. De plus, ces substrats ont déjà été utilisés pour prouver la diversité d'enzymes hémicellulolytiques produites par *T. xylanilyticus* (Rakotoarivonina *et al.*, 2012). Des études d'évolutions en laboratoire ont déjà prouvé que l'alternance de sources de carbone (tels que du glucose, xylose, glycérol et acétate) est une bonne stratégie pour étudier les changements génétiques et phénotypiques (impactant donc les populations en présence)

ayant lieu au cours des cultures (Sandberg *et al.*, 2019). Par exemple, l’ALE a déjà pu être utilisé pour orienter le métabolisme de *S. cerevisiae* vers l’utilisation de pentoses tels que le xylose (Sandberg *et al.*, 2019). Il a également été prouvé que l’utilisation de substrats plus complexes tels que la canne de maïs lors d’évolution dirigée pouvait accroître les activités enzymatiques produites (activités laccase et cellulase par exemple) par *Geobacillus sp* et par *Thermobifida fusca* (Deng and Fong, 2011; Govil *et al.*, 2020). Ces changements pouvaient alors être reliés à l’apparition de souches évoluées ayant bénéficié de certaines mutations telles que la souche adaptée, eWSUCF1, ayant une activité laccase 20-fois plus importante que la souche initiale, WSUCF1, de *Geobacillus sp* ou la souche adaptée muS de *Thermobifida fusca* présentant une activité cellulase environ 1,3-fois plus élevée que la souche sauvage (Deng and Fong, 2011; Govil *et al.*, 2020). Ces souches sont au départ des populations s’étant développées au cours des cultures successives dans les deux cas.

La cytométrie de flux a ensuite été utilisée pour étudier les changements populationnels lors des cultures successives qui permet une analyse rapide des populations à un débit important (Adan *et al.*, 2017). La combinaison de la cytométrie et des cultures successives permet le suivi des changements et fluctuations populationnels qui peuvent se dérouler au cours de cultures longues ou d’un nombre important de cultures. Cette analyse est très intéressante car elle permet de souligner de manière dynamique des phénomènes de dérive phénotypique (dont le résultat est observable par la présence de populations différentes) au cours des générations. Cependant, l’aspect dynamique de ces analyses est moins poussé que lors des cultures en microfluidiques avec analyses microscopiques permettant le suivi total de la croissance de cellules uniques dans un environnement totalement défini et homogène (Ladner *et al.*, 2017). Néanmoins, ce type de culture nécessite des moyens beaucoup plus spécifiques tels que des bioréacteurs à l’échelle du picolitre intégrés dans une matrice en polydiméthylsiloxane et des systèmes microscopiques avancés (Grünberger *et al.*, 2012; Ladner *et al.*, 2017). À l’opposé, la combinaison de cultures successives et d’analyses cytométriques nécessite seulement le matériel nécessaire à la croissance bactérienne (fioles ou bouteilles scellées) et un cytomètre. Cette combinaison d’approches a permis l’identification d’une diversité phénotypique présente lors de cultures importantes (de 80 à 108 générations en fonction de la source de carbone utilisée) de la souche sauvage de *Thermobacillus xylanilyticus*. Deux sous-populations ont pu être détectées et caractérisées après triage cellulaire. Une de ces sous-populations est une population tricheuse (*cheaters*). L’hétérogénéité microbienne et la présence de sous-populations peuvent affecter les bioprocédés industriels et diminuer la productivité de la production d’enzymes extracellulaires

(Schuster *et al.*, 2010; Delvigne and Goffin, 2014). Les populations tricheuses sont particulièrement susceptibles d'apparaître lorsque la croissance de la souche repose sur la production des enzymes extracellulaires ainsi elles peuvent coexister avec les populations productrices au sein de la même culture et entrent en compétition pour l'acquisition du substrat mobilisable comme prouvé par différents modèles (Allison, 2005; Schuster *et al.*, 2010). Cela a été prouvé au cours de cultures comme celles de *Pseudomonas fluorescens* sur des milieux contenant de la caséine. La bactérie nécessitait alors la production d'une métalloprotéase extracellulaire pour croître et était également sujette à la présence de populations tricheuses. Celles-ci venaient impacter directement la production enzymatique globale car elles se développaient sans payer le coût de production d'enzymes tout en ayant un accès aux produits de l'hydrolyse de la caséine (Allison *et al.*, 2014). Dans le cas de *T. xylanilyticus*, la sous-population tricheuse bénéficierait de l'action hydrolytique de la xylanase extracellulaire produite par la sous-population productrice et aurait ainsi accès à des xylo-oligosaccharides utilisables en tant que sources de carbone.

En plus de mesurer une dérive phénotypique entraînant 2 sous-populations distinctes en termes de signaux FSC-A, il était nécessaire de mieux caractériser ces sous-populations en termes de croissance et d'activité enzymatique. Cela a été fait pour confirmer l'hypothèse qu'une des sous-populations est une population tricheuse. L'utilisation du triage cellulaire a été choisi pour obtenir les sous-populations et les caractériser indépendamment. Ce triage a directement été basé sur des caractéristiques morphologiques des cellules, et plus particulièrement de la taille cellulaire mesurée par les signaux FSC. Les autres études de l'utilisation du triage cellulaire dans le milieu de l'hydrolyse enzymatique des biomasses lignocellulosiques reprennent également des triages de cellules de bactéries filamenteuses et des champignons mais plutôt basés sur la fluorescence pour la détection d'activité cellulase (Thronset *et al.*, 2010; Ostafe *et al.*, 2013; Bleichrodt and Read, 2019). Dans notre étude, l'utilisation de marqueurs fluorescents n'a pas été directement nécessaire et la bactérie n'a pas dû être modifiée génétiquement afin d'obtenir une souche rapporteuse. Par contre, dans le cas de *T. xylanilyticus*, les phénomènes de sporulation ont pu être utilisés pour l'identification des deux sous-populations et pour leur triage, ce qui avait préalablement mené à l'hypothèse qu'une des sous-populations était productrice mais était sujette à des phénomènes de sporulation précoces entraînant la sélection de la sous-population tricheuse au cours des générations et la chute de production. Ce triage a donc permis de récupérer ces sous-populations et de les étudier indépendamment. Avec cette caractérisation, la différence de croissance et d'activité, surtout

au niveau du temps de latence beaucoup plus important pour la *low* population (suspectée comme sous-population tricheuse) a permis de confirmer l'hypothèse faite.

Les travaux ont donc prouvé que *Thermobacillus xylanilyticus* (souche sauvage) est sujette à des phénomènes de diversification phénotypique qui influencent sa production enzymatique sur le long terme suite à une sélection des populations tricheuses au détriment des populations productrices. La sous-population tricheuse n'étant pas productrice, la production globale d'enzymes hémicellulolytiques de *T. xylanilyticus* a alors chuté avec l'apparition et la sélection de cette sous-population tricheuse au cours des générations.

Ces études de populations de *T. xylanilyticus*, qui n'avaient jamais été faites avant, n'ont cependant pas permis de trouver l'origine des changements phénotypiques de la bactérie entre les populations productrices et les populations tricheuses. Ces analyses sont en effet restées au niveau populationnel et aucune approche moléculaire n'a pu encore être envisagée. L'hypothèse principale est que ces phénomènes sont directement liés à la concentration de substrats mobilisables (particulièrement les sources de carbone) pour la croissance globale de la bactérie (xylose, glucose, ...). En effet, la concentration en carbone mobilisable est une composante environnementale essentielle au développement de phénomène d'hétérogénéité (dérive phénotypique) au sein de souches microbiennes reposant sur la production enzymatique extracellulaire pour dégrader les substrats libérant les nutriments essentiels à la croissance (Allison, 2005; Schuster *et al.*, 2010; Allison *et al.*, 2014). De plus, la stratégie d'alternance des sources de carbone (entre une source directement mobilisable : le glucose et une source à hydrolyser : les xylanes) a permis de mettre en évidence une possible régulation des sous-populations à l'échelle des bouteilles scellées et des cultures en bioréacteurs (culture ségrégestat). Cela a permis de démontrer l'implication des sources de carbone dans les phénomènes de diversification phénotypique rencontrés chez *T. xylanilyticus*.

Lors de cette étude et la mise en place de la stratégie d'alternance des sources de carbone, le xylose aurait pu être utilisé à la place du glucose car il s'agit également d'une source de carbone ne nécessitant pas de fractionnement enzymatique. Cependant, le glucose a été sélectionné car déjà utilisé pour les précultures de *T. xylanilyticus*. De plus, la croissance de la bactérie avait déjà été caractérisée en présence de glucose dans le milieu de culture (Touzel *et al.*, 2000; Rakotoarivonina *et al.*, 2012).

3. Contrôle de la diversification phénotypique

Le contrôle de la diversification phénotypique afin d'enclencher la production de certains métabolites d'intérêts (tels que des enzymes extracellulaires dans le cas des bactéries lignocellulolytiques) a été longtemps considéré comme un objectif inatteignable avant le développement des techniques de biologie synthétique et d'ingénierie génétique (Delvigne *et al.*, 2017). Actuellement, il est possible de contrôler le degré d'hétérogénéité d'une population microbienne afin d'obtenir des sous-populations d'intérêts au cours de certains processus biologiques par exemple (Delvigne *et al.*, 2017). Ce contrôle permet d'avoir des bioprocédés plus robustes et une meilleure productivité au niveau microbien (Delvigne *et al.*, 2017).

Les stratégies actuelles de contrôle de la diversification phénotypique reposent principalement sur deux catégories. Premièrement, il s'agit des modifications générales du système incluant les modifications de souche par génie génétique par exemple. La plupart des modifications générales du système est focalisée sur ces modifications de souche (promoteurs, plasmides ou systèmes de transport) par ingénierie métabolique afin de tendre vers une homogénéité des populations (Binder *et al.*, 2017). Ces modifications sont le plus souvent réalisées directement au niveau des gènes et de l'expression de ceux-ci et permettent par exemple la création de voies métaboliques synthétiques s'adaptant aux changements environnementaux et physiologiques des cellules (Delvigne *et al.*, 2017). La seconde catégorie correspond aux manipulations générales de la physiologie en jouant sur différents paramètres comme l'inoculum (âge, taille), la composition du milieu (comprenant les sources de carbone) et divers autres facteurs (Binder *et al.*, 2017). Dans le cadre de cette thèse, une stratégie adoptée a été basée sur des changements diauxiques de la source de carbone (glucose et xylane) afin de modifier les niveaux de substrats mobilisables. Lors de cultures successives avec uniquement du xylane comme source de carbone, l'activité xylanase a chuté de 88,86 % après seulement 23,5 générations suite à la sélection des cellules appartenant à une sous-population de tricheurs (*cheaters*). L'utilisation de cultures successives avec du glucose suivies de changements diauxiques vers l'utilisation de xylane a permis de stabiliser les sous-populations (productrice et tricheuse) résultant en une évolution de l'activité xylanase (amélioration d'environ 1,5-fois à 15-fois en fonction des générations par rapport aux cultures successives avec uniquement du xylane). Cette stratégie se rapproche donc plutôt des stratégies de modification de la physiologie des cellules en modifiant les conditions de culture pour éviter la sélection des cellules de type tricheuse. La composition du milieu (particulièrement les sources de carbone et d'azote)

influence les équilibres entre les populations présentes (Jøers, Kaldalu and Tenson, 2010). Le phénomène de diauxie, découvert par Jacques Monod en 1941, décrit par exemple la croissance d'une bactérie en présence de deux sources de carbone. La bactérie va utiliser la première source de carbone et va migrer vers l'utilisation de la seconde source de carbone quand la première est épuisée après une courte phase de latence. Cette phase de latence correspond à une étape permettant à la bactérie de s'adapter à l'utilisation de la seconde source de carbone (Solopova *et al.*, 2014). Or il a été découvert récemment lors d'études de *Lactobacillus lactis* que cette phase de latence, initialement pensée comme nécessaire à une transition métabolique de l'entièreté de la population, était seulement nécessaire à une sous-population de la bactérie. Seule une partie de la population arrête effectivement sa croissance après la consommation de la première source de carbone et le temps de latence est donc associé à cette sous-population ne se développant plus (Solopova *et al.*, 2014). Ce phénomène est dans une moindre mesure proche de ce qui a pu être hypothétisé et prouvé pour *T. xylanilyticus*. En effet, dans le cas de cette bactérie, il y a également un arrêt de la croissance de la population productrice et seule les cellules tricheuses vont continuer à se développer en utilisant les oses libérés lors du fractionnement des biomasses. Il s'agirait alors dans les deux cas d'une stratégie de minimisation des risques (ou *bet-hedging*). Il s'agit d'une stratégie de survie au cours de laquelle des individus d'une population isogénique vont développer un phénotype avec un *fitness* réduit mais qui peut être adapté à de futurs environnements (Grimbergen *et al.*, 2015). Dans le cas de *T. xylanilyticus*, la sporulation de la population productrice pourrait alors être une stratégie de minimisation des risques comme décrite chez *Bacillus subtilis* (Veening *et al.*, 2008).

Une autre stratégie mise en œuvre pour le contrôle de la diversification phénotypique chez *T. xylanilyticus* est la modification de l'âge des inocula utilisés lors des cultures successives. Lors de la mesure de la chute d'activité xylanase au cours des cultures successives avec uniquement du xylane comme source de carbone, les cellules étaient transférées dans du milieu frais toutes les 5 heures, ce qui correspondait à la phase exponentielle de croissance de la souche. Les caractérisations des populations, faites après triage cellulaire, ont montré que l'activité xylanase était semblable pour les 2 sous-populations (productrice et tricheuse) en phase stationnaire au cours de croissances indépendantes avec du xylane comme source de carbone. De plus, en phase stationnaire, les cellules ont toutes tendance à sporuler chez *T. xylanilyticus*. Or la sélection de la sous-population de type tricheuse a été prouvée comme due à la sporulation précoce de la sous-population productrice. Il a été entrepris de transférer les

deux sous-populations sous forme sporulées (en phase stationnaire), afin de voir si la sélection des cellules tricheuses pouvait être réduite. Les résultats obtenus ont montré que l'activité xylanase a pu être augmentée d'un facteur 7,15-fois après seulement 4 cultures successives avec du xylane de hêtre comme source de carbone et avec transfert des cellules en phase stationnaire. Les résultats obtenus ont donc permis de prouver que l'utilisation de modifications de la physiologie des cellules (par changement du milieu ou des inocula utilisés) permettent de contrôler les phénomènes de diversification phénotypique. Ces changements (au niveau du milieu et de l'âge des inocula) au niveau de l'hétérogénéité phénotypique de *T. xylanilyticus* ont permis d'optimiser la production et l'activité enzymatique de la souche sans passer par l'utilisation de souches mutantes telle que la souche D3 de *T. xylanilyticus* (Samain, Debeire and Touzel, 1997). Cette souche mutante est également sujette à des pertes d'activité xylanase. En effet, si au départ la souche pouvait présenter une activité xylanase proches des 1000 UI/mL (Samain, Debeire and Touzel, 1997), elle atteint désormais environ 100 UI/mL (données non publiées). Des études populationnelles étaient donc nécessaires.

Les stratégies adoptées durant cette thèse pourraient être envisageables pour d'autres bactéries reposant sur l'utilisation de biomasses complexes pour leur croissance nécessitant une production enzymatique extracellulaire. Comme présenté, ce genre de bactéries est fortement sujet à des phénomènes de diversification phénotypique et, plus particulièrement, à la présence de sous-populations de type tricheuses (Velicer, 2003; Allison, 2005).

4. Optimisation de la culture en bioréacteurs, montée en échelle et culture ségrégestat

Les tentatives d'optimisation de production d'enzyme en contrôlant les populations par des paramètres physiologiques (basées sur l'alternance des sources de carbone et sur l'âge des inocula) ont fonctionné mais à l'échelle de bouteilles scellées comme prouvés par les différents résultats obtenus.

Cependant ces stratégies doivent être extrapolables à des échelles de culture en bioréacteurs et à plus grande échelle afin d'ouvrir la possibilité d'utilisation de ces stratégies pour optimiser les rendements de production enzymatique. La production industrielle d'enzymes lignocellulolytiques est principalement réalisée par fermentation à l'état solide avec des champignons ou par fermentation submergée. C'est cette dernière qui est actuellement privilégiée parce qu'il est plus facile de contrôler le processus et qu'il y a plus de bioréacteurs industriels pour ce type de fermentation (Leite *et al.*, 2021). La fermentation submergée est réalisée en bioréacteurs agités qui permettent un contrôle des paramètres de cultures (aération, agitation, température, pH, ...). La plupart des expérimentations menées avec *T. xylanilyticus* durant cette thèse ont été faites en bouteilles scellées dans des conditions microaérophiles (présence de 10 % de CO₂ dans l'espace de tête et pas d'apport en oxygène suite au seuil des bouteilles). Des cultures en bioréacteurs avaient déjà été réalisées avec la bactérie et la souche mutante D3 (Samain, Debeire and Touzel, 1997). Cependant, les paramètres de culture en bioréacteurs n'avaient pas encore été tous bien maîtrisés, particulièrement au niveau de l'apport en oxygène, de la présence de CO₂ et de la composition du milieu. Plusieurs études de la littérature se sont penchées sur les difficultés de montée en échelle et sur le développement d'approches informatiques ou par simulations à échelle réduite (*scale-down*) afin de permettre des montées en échelle plus rapide et une amélioration de l'introduction des bioprocédés et bioinnovations sur les marchés (Delvigne and Noorman, 2017). Par exemple, le système décrit par l'équipe de Takors prouve que la prédiction des réponses physiologiques de bactéries à des fluctuations environnementales est toujours un défi actuellement nécessitant des analyses omiques (Delvigne and Noorman, 2017; Simen *et al.*, 2017). Ce système, imitant les fluctuations environnementales dans les bioréacteurs à volume important, a prouvé la difficulté à contrôler l'hétérogénéité (et la diversification phénotypique) aux échelles importantes de cultures et dans les bioprocédés requérant l'utilisation de microorganismes (Delvigne and

Noorman, 2017; Simen *et al.*, 2017). Dans ces approches en bioréacteurs, il faut donc tenir compte à la fois des directives physiques de montée en échelle (*scale-up*) et des différentes fluctuations et gradients (de température, oxygène, substrat, pH, ...) rencontrés. En effet, l'écart entre l'environnement des cellules à l'échelle du laboratoire et celui rencontré à des échelles de production plus importantes peut constituer un frein à la montée en échelle de certains bioprocédés (Delvigne and Noorman, 2017; Delvigne *et al.*, 2018).

L'optimisation des paramètres de culture de *T. xylanilyticus* en bioréacteurs a donc été envisagée pour ensuite tenter d'extrapoler les techniques de contrôle de la diversification phénotypique à cette échelle de culture. Ces phases d'optimisation se sont focalisées sur le besoin en CO₂ de la bactérie, son impact sur le pH et l'aération mais également sur la présence d'insolubles dans le milieu. La présence de ces derniers est à prévenir lors d'analyses cytométriques (nécessaire aux études populationnelles de la bactérie).

T. xylanilyticus requiert du dioxyde de carbone pour le démarrage de sa croissance même si cette bactérie est aérobie (Samain *et al.*, 1992; Touzel *et al.*, 2000). Le CO₂ ajouté lors des cultures réalisées en bouteilles scellées est nécessaire à l'équilibre CO₂ /HCO₃⁻ rendu possible par l'ajout du bicarbonate de potassium (KHCO₃) dans le milieu de culture. Cet équilibre a pour but de maintenir le pH optimal de croissance de *T. xylanilyticus* (soit 7,75) dans les bouteilles scellées, ce qui a pour effet de diminuer la phase de latence de croissance de la bactérie (Samain *et al.*, 1992; Touzel *et al.*, 2000). Cependant, bien que de nombreuses bactéries dépendent de la présence de dioxyde de carbone, celui-ci peut également être néfaste à la croissance et c'est à cet effet que des niveaux importants de pression partielle en dioxyde de carbone (pCO₂) sont souvent utilisés pour la stérilisation d'aliments (Blombach and Takors, 2015). Or le CO₂ peut impacter les processus de production, de lysine par exemple comme cela a déjà pu être prouvé pour *Corynebacterium glutamicum* (Blombach and Takors, 2015). Il peut également impacter le pH interne, la fluidité et la perméabilité des membranes, et les propriétés physico-chimiques des protéines (Blombach and Takors, 2015). *Thermobacillus xylanilyticus* étant une bactérie aérobie, il a été considéré comme pertinent d'essayer de se passer de la présence de CO₂ pour la croissance de la bactérie. En effet, il s'agirait de coût supplémentaire pour la croissance de celle-ci à des échelles plus importantes (notamment avec un besoin constant de CO₂). Des tests de culture sans CO₂ ont été effectués et ont permis de mettre en évidence que la bactérie était totalement capable de croître sans la présence d'un apport en CO₂ tout en maîtrisant de manière automatisée la régulation du pH. Cette régulation a été faite par ajout automatisé de KOH (base)

et de H_3PO_4 (acide) pour conserver un pH de 7,75 tout au long des cultures. Il a donc été conclu que le CO_2 y était uniquement nécessaire à la formation d'un tampon avec l'ion HCO_3^- du bicarbonate de potassium afin d'atteindre le pH optimal de croissance de la bactérie (pH de 7,75). Cependant, une étude plus poussée de l'impact du CO_2 sur la croissance et le métabolisme de *T. xylanilyticus* pourrait être nécessaire. En effet, l'étude du génome a permis d'identifier différents gènes qui peuvent être impliqués dans les voies de fixation et d'utilisation du dioxyde de carbone. Ceux-ci comprennent par exemple des gènes impliqués dans la production de phosphoglycérate kinase, de triose-phosphate isomérase et de glyceraldehyde-3-phosphate déshydrogénase impliquées dans la voie de fixation autotrophique de Calvin-Benson (Berg, 2011). Ce cycle est souvent associé à des organismes autotrophes, mais certaines bactéries hétérotrophes comme celles des genres *Rhodobacter*, *Rhodospirillum* ou *Rhodopseudomonas* l'utilisent comme source d'électrons pour leur croissance (Berg, 2011). La bactérie possède aussi des gènes codant une phosphoénolpyruvate (PEP) carboxylase, des acétyl-CoA carboxylases, une formate déshydrogénase, une pyruvate synthase et d'autres enzymes toutes impliquées dans des voies alternatives de fixation du CO_2 (la voie de Arnon-Buchanan, la voie de Wood-Ljungdahl ou la voie du 3-hydroxypropionate) (Berg, 2011; Fuchs, 2011b).

En parallèle, l'élimination du CO_2 , en utilisant une régulation automatique de pH et éliminant par ce fait le bicarbonate de potassium du milieu a permis d'éliminer la présence d'insolubles dans le milieu de culture. Ces derniers étaient fortement à éviter car ils ont tendance à venir colmater le système fluide composant le cytomètre de flux lors des approches en ségrégostat (Adan *et al.*, 2017). Il a déjà été prouvé que des précipités de phosphate de calcium (qui peuvent ressembler à des microparticules au niveau de la diffusion de la lumière) conduisent à la présence de faux positifs en cytométrie (Larson *et al.*, 2012).

Une approche par ségrégostat a été mise en place durant la thèse. Elle a récemment été développée par l'équipe de Delvigne à Gembloux Agro-Bio Tech et elle s'est montrée efficace pour le contrôle de la diversification phénotypique à des échelles plus importantes de culture comme présenté dans l'étude bibliographique (Sassi *et al.*, 2019; Nguyen *et al.*, 2021). Les cultures en ségrégostat reposent sur l'étude des cellules uniques par cytométrie en flux en ligne et l'insertion de fluctuations environnementales directement liées aux mesures cytométriques. Ce système de cultures s'est déjà avéré intéressant pour le contrôle de la diversification de *Escherichia coli* et *Pseudomonas putida* (Sassi *et al.*, 2019; Nguyen *et al.*, 2021). Il n'avait

cependant pas encore été appliqué à des bactéries hémicellulolytiques et plus globalement à des bactéries dont les croissances vont dépendre de la production d'enzymes extracellulaires et donc sujettes à des sous-populations tricheuses (Allison, 2005; Schuster *et al.*, 2010).

Après l'optimisation de l'ensemble des paramètres de culture en bioréacteurs (étape importante également pour réaliser des cultures en ségrégostat), la présence des sous-populations détectées lors des expériences de cultures successives a pu être vérifiée en bioréacteurs lors de cultures avec du xylane comme source de carbone. Cette vérification était nécessaire pour effectuer la stratégie de contrôle de cette diversification phénotypique par culture en ségrégostat. Lors de ces cultures en ségrégostat, l'alternance entre le glucose et le xylane (transition diauxique) directement régulée par l'équilibre entre la sous-population productrice et la sous-population tricheuse, a permis de conserver un équilibre entre les sous-populations de *T. xylanilyticus* de façon oscillatoire. Dans le cas de *T. xylanilytius*, cet équilibre n'a pas pu être conservé au-delà de 46 heures de cultures. Sur le long-terme, il était attendu que cet équilibre se conserve comme pour les études précédentes en ségrégostat réalisées avec *E. coli* et *Pseudomonas putida* (Sassi *et al.*, 2019; Nguyen *et al.*, 2021). Ceci est probablement dû à une dérive du système par la formation d'aggrégats de cellules (voir de biofilms).

Cette culture en ségrégostat a permis de confirmer le fait que les sous-populations de *T. xylanilyticus* pouvaient être régulées par des modifications de la physiologie des cellules. Cette modification a pu être faite directement en changeant les conditions environnementales des cellules par des fluctuations faites par l'ajout d'une source de carbone (ici glucose par pulse en bioréacteurs). Cela a résulté en une activité xylanase plus importante (facteur d'amélioration de 11,94-fois) lors d'une période séparant deux pulses de glucose. C'est en effet à ce moment que le pourcentage de cellules productrices en sporulation a baissé à des valeurs minimales. Ces résultats de culture semblent donc confirmer l'hypothèse faite concernant l'influence de la concentration en substrats mobilisables sur l'apparition d'une sous-population tricheuse. Néanmoins, les mécanismes précis d'apparition de cette sous-population et la transition des cellules vers ce comportement métabolique ne sont pas encore connus et mériteraient des études approfondies (études métabolomiques par exemple). Ainsi, des approches d'analyses omiques à l'échelle de la cellule unique pourraient apporter des réponses à ces interrogations concernant les processus biomoléculaires tels que l'induction par des sources précises de carbonerresponsables des phénomènes de diversification phénotypique. Dans le cas d'*E. coli*, ce type d'analyse a permis de montrer que ces phénomènes étaient directement liés à l'opéron

arabinose qui est influencé par une carence en glucose et influençant le métabolisme de la bactérie vers l'utilisation d'arabinose permettant de définir la stratégie de culture en ségrégostat (Nguyen *et al.*, 2021). Ce type d'analyse sera détaillé dans les perspectives de la thèse.

5. Perspectives

5.1. Amélioration de l'étude en ségrégostat et études de la formation de biofilms de *T. xylanilyticus*

L'utilisation de la culture en ségrégostat pour la production des xylanases est une perspective intéressante de cette thèse. Cependant, une optimisation de la culture en ségrégostat reste à effectuer pour limiter la formation d'agrégats cellulaires et biofilms venant dérégler l'entièreté du système. Pour cela une diminution du taux de dilution pourrait permettre de diminuer la formation de biofilms car limitant la disponibilité des nutriments de *T. xylanilyticus*. Cependant, ce genre de corrélation est encore difficile à prévoir et mériterait des études plus poussées sur la relation entre le taux de dilution et la disponibilité des nutriments pour le développement des biofilms (Kundra *et al.*, 2019) principalement pour cette bactérie thermophile où la formation de biofilms n'a encore jamais été étudiée mais a pu être observée à l'interface air-milieu lors de cultures en ségrégostat.

Avec une étude plus importante et sans dérèglement de l'entièreté du système, une amélioration plus conséquente de la production enzymatique pourrait alors être obtenue. En effet, en alternant plusieurs fois les phases de stress (sporulation) et les phases de production de la sous-population productrice, il serait théoriquement possible de la rendre plus productrice ou au moins de stabiliser sa production. Ce genre de cycles a pu être prouvé comme utile pour la production de protéines chez *S. cerevisiae* pendant des cultures continues avec des périodes de fluctuations au niveau de l'apport en glucose (périodes de festin et de famine) (Wright *et al.*, 2020). L'utilisation de ces cycles est semblable à ce qui est fait lors des cultures en ségrégostat. En effet, lors de ces cultures, l'utilisation de fluctuations environnementales en fonction des dynamiques populationnelles mesurées peut aider à stabiliser les productions microbiennes afin de rendre leur production plus stable (Nguyen *et al.*, 2021). Dans le cadre de cette thèse, trop peu d'alternances entre les phases de stress et phase de production ont été faites, ce qui pourrait être amélioré en limitant la dérive obtenue par la présence d'agrégats cellulaires.

5.2. Utilisation des stratégies de diversification phénotypique pour la production de cocktails enzymatiques pour la déconstruction des biomasses lignocellulosiques

Dans l'optique d'une amélioration de la production des différentes enzymes de *T. xylanilyticus*, il serait intéressant d'utiliser les stratégies de contrôle de la diversification des populations avec différents substrats lignocellulosiques. Par exemple, l'alternance entre le xylane et la paille de blé afin d'obtenir des cocktails enzymatiques (après fractionnement des cellules) comprenant différentes enzymes impliquées dans l'hydrolyse des hémicelluloses pourrait être envisagée (Rakotoarivonina *et al.*, 2016). Le contrôle de la diversification phénotypique pourrait alors effectivement orienter le métabolisme de la souche vers la production d'enzymes spécifiques à intégrer dans ces cocktails enzymatiques en profitant de la capacité de la bactérie à adapter sa production enzymatique au substrat utilisé pour sa croissance (Rakotoarivonina *et al.*, 2012). L'utilisation des cultures en ségrégostat permettraient alors d'extrapoler ces stratégies dans des bioréacteurs en intégrant un système de filtration qui préviendrait des systèmes de colmatage du cytomètre en flux par les résidus non solubles des substrats lignocellulosiques ainsi que l'influence de ces particules insolubles sur les résultats d'analyses cytométriques. En effet, il a déjà été prouvé que des précipités de phosphate de calcium peuvent être détectés comme des microparticules au niveau de la diffusion de la lumière conduisant à la présence de faux positifs en cytométrie lors d'études d'états pathologiques par exemple (Larson *et al.*, 2012).

5.3. Identification des mécanismes moléculaires impliqués dans la diversification phénotypique

Comme précisé, la thèse s'est principalement focalisée sur la dynamique des populations de *T. xylanilyticus* mais les mécanismes moléculaires exacts causant l'hétérogénéité phénotypique à la base de la présence de sous-populations ne sont pas encore connus. Pour cela des études transcriptomiques, protéomiques, génomiques et métabolomiques (analyses omiques) à l'échelle des cellules uniques pourraient être d'intérêt (Lencastre Fernandes *et al.*, 2011; Heins and Weuster-Botz, 2018).

Au sein de celles-ci, les études métabolomiques sont particulièrement intéressantes. En effet, le métabolome est défini comme l'ensemble des métabolites à petites molécules présents dans une cellule et est donc un indicateur direct de la diversité phénotypique des cellules individuelles car elle peut représenter comment les cellules réagissent aux influences environnementales (Zenobi, 2013). Or, les progrès de la spectrométrie de masse (MS), de l'imagerie MS, de l'électrophorèse capillaire, de la spectroscopie optique et le développement de biocapteurs à fluorescence peuvent permettre la détermination simultanée de centaines de métabolites dans une seule cellule (Zenobi, 2013). La spectroscopie RAMAN s'intègre également dans les analyses de type métabolomique car il s'agit d'une méthode non destructive fournissant des informations détaillées sur la composition biochimique de chaque cellule (García-timmermans *et al.*, 2020).

5.4. Cultures en microfluidiques

Dans un premier temps, l'approche par cultures de la souche en microfluidiques avait été envisagée pour l'étude de la diversification phénotypique. En effet, cette approche est plus dynamique que la cytométrie en flux et permet le suivi continu des phénomènes de diversification phénotypique (Ladner *et al.*, 2017). Cependant, les cultures en microfluidiques sont difficiles à réaliser avec les conditions de culture de *T. xylanilyticus*. Une température de 50°C et du CO₂ sont en effet nécessaire lors des cultures de la souche non réalisée en bioréacteurs (avec un contrôle continu du pH). Avec le système mis en place à Gembloux Agro-Bio Tech au cours de la thèse, qui était semblable aux bioréacteurs microfluidiques de l'ordre du picolitre de Gruenberger *et al.* (Gruenberger *et al.*, 2013), la régulation automatique du pH était impossible. La température importante de culture de *T. xylanilyticus* était régulée par un système de chauffage par effet Peltier placé en dessous des bioréacteurs encapsulés dans du polydiméthylsiloxane (ou PDMS). Avec ce système de cultures en microfluidiques, le suivi de la croissance et de la diversité phénotypique se fait par observation microscopique continue (Grünberger *et al.*, 2012; Gruenberger *et al.*, 2013). Cependant, ce système, bien que très adapté pour de nombreuses bactéries telles que *Corynebacterium glutamicum* (Grünberger *et al.*, 2012, 2015), s'est avéré peu utile pour l'étude de *T. xylanilyticus* principalement dû à la perméabilité gazeuse du polydiméthylsiloxane utilisé pour ce système précis de cultures en microfluidiques (Grünberger *et al.*, 2012). Cette propriété empêchait la formation d'un tampon entre le bicarbonate de potassium et le CO₂ ajouté dans le milieu ou produit par la bactérie afin d'obtenir

un pH de 7,75 soit le pH optimal de croissance de la bactérie (Samain *et al.*, 1992; Touzel *et al.*, 2000).

Les cultures en microfluidiques n'étaient donc pas pertinentes dans ce cas précis malgré leur développement ainsi que l'optimisation au niveau des inoculations, méthodes de suivi et méthodes de comptage au sein des laboratoires de Gembloux Agro-Bio Tech au cours de la thèse. Cependant, avec les études d'optimisation de culture en bioréacteurs de *T. xylanilyticus*, il serait intéressant de réitérer les tentatives de culture en microfluidiques effectuées avec la bactérie avec un système légèrement différent permettant un meilleur contrôle du pH et de la température. Ce genre de système existe déjà dans certains laboratoires (Ladner *et al.*, 2017). Pour cela, il serait nécessaire d'effectuer une étude poussée de l'impact du CO₂ et de l'équilibre CO₂/HCO₃⁻ sur la croissance et la production enzymatique de *T. xylanilyticus*. Dans l'objectif d'étudier ces paramètres en microfluidiques, il serait nécessaire d'adopter des systèmes plus perméables au gaz et permettant le mélange d'oxygène et de dioxyde de carbone dans des proportions précises (Ladner *et al.*, 2017). Une autre possibilité serait l'utilisation d'autres tampons que le système CO₂/HCO₃⁻. Des alternatives seraient alors le tampon HEPES (acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique) ou le tampon MOPS (acide 3-morpholino-1-propanesulfonique) qui ont déjà été testés au cours de la thèse. Ils se sont avérés utilisables pour la croissance de *T. xylanilyticus* sans dioxyde de carbone en fioles. Ils pourraient donc être utilisés en microfluidiques.

Le suivi de croissance de *T. xylanilyticus* par microscopie (par des cultures en microfluidiques) permettrait alors de répondre aux interrogations restantes concernant les sources de diversification phénotypique chez la bactérie. En effet, comme expliqué, ce genre d'études est complémentaire à la cytométrie en flux (Ladner *et al.*, 2017; Bleichrodt and Read, 2019). De plus, avec le suivi microscopique, si plusieurs cellules s'agrègent ou se développent ensemble en microcolonie, les cellules individuelles de la structure multicellulaire peuvent être distinguées et suivies au cours du temps (Bleichrodt and Read, 2019). Enfin, les cultures en microfluidiques permettraient d'obtenir des pistes d'explications pour les phénomènes causant la diversité phénotypique à la base de la présence des sous-populations.

5.5. Stratégies alternatives pour l'amélioration de la production enzymatique et des propriétés des enzymes

Toutes les stratégies développées au cours de la thèse se placent en parallèles à celles de l'identification de souches d'intérêts (bactériennes ou fongiques) et à la modification de souches par ingénierie génétique. Avec les analyses récentes des gènes impliqués dans la production d'enzymes lignocellulolytiques chez *T. xylanilyticus* (Rakotoarivonina *et al.*, 2022), il pourrait être envisageable d'intégrer ces gènes d'intérêt chez des individus microbiens (par génie génétique) plus facilement cultivables afin de produire les enzymes d'intérêts. Les inducteurs de la production enzymatique devraient alors être étudiés pour faciliter la production enzymatique.

5.6. Cultures de *T. xylanilyticus* avec des modalités différentes

Avec les nouvelles mises en évidence des facteurs influençant la productivité enzymatique de *T. xylanilyticus* lors de cultures en bouteilles scellées et un bioréacteur agité pour la fermentation submergée, il est intéressant de se poser la question des méthodes de culture alternative telles que des cultures en biofilm et des fermentations à l'état solide.

5.6.1. Cultures en biofilm

L'utilisation de biofilms de *T. xylanilyticus* pourrait être d'intérêt pour l'hydrolyse des substrats lignocellulosiques. En effet, les biofilms se sont avérés comme prometteurs pour la déconstruction des biomasses lignocellulolytiques particulièrement pour la dégradation des celluloses (Brethauer, Shahab and Studer, 2020). Les biofilms sont des accumulations de cellules microbiennes enfermées dans une matrice de substances polymériques extracellulaires dont la formation peut se faire sur toute surface naturelle ou artificielle (Vlamakis *et al.*, 2013). Ce type d'agrégats microbiens comporte donc également des phénomènes de diversification phénotypique et différentes sous-populations. Cette diversification est principalement due à divers microenvironnements au sein du biofilm et à des phénomènes de division du travail (Figure 49) (Mielich-Süss and Lopez, 2015). Ces sous-populations de cellules spécialisées vont alors produire différents composés ou répondre à différents signaux et donc être utiles à

différentes fins pour l'ensemble de la communauté microbienne présente dans le biofilm. Il s'agit donc d'une répartition stratégique du travail afin de minimiser les coûts énergétiques (Mielich-Süss and Lopez, 2015).

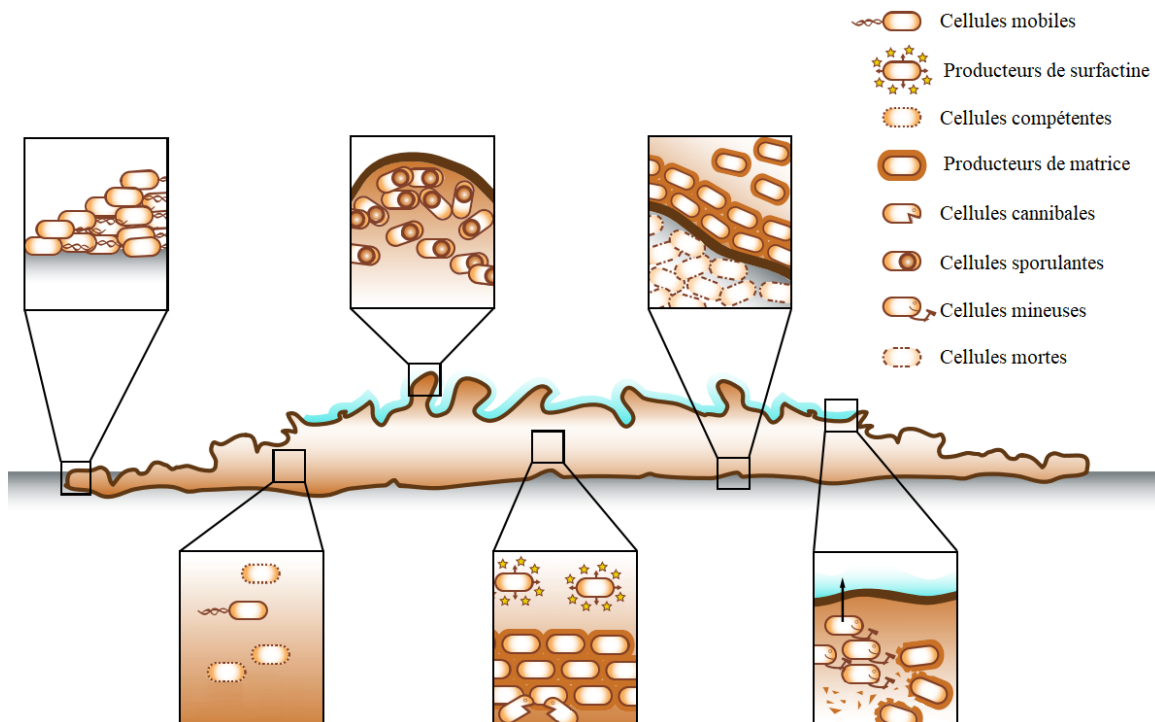


Figure 49 : Exemple de sous-populations rencontrées dans un biofilm de *B. subtilis* illustrant la diversification phénotypique ayant lieu au sein des biofilms en fonction de la localisation des cellules au sein de celui-ci (tiré de Mielich-Süss & Lopez, 2015).

C'est également ce genre de stratégie de minimisation des coûts énergétiques qui pourrait être la cause d'apparition de sous-population phénotypiquement différente chez *T. xylanilyticus*. Les mécanismes de diversification phénotypique en biofilms sont assez difficiles à étudier et les systèmes de régulation qui vont contrôler ceux-ci sont tout aussi complexes. Par exemple, chez *B. subtilis*, cela implique trois régulateurs principaux qui vont tous influencer les processus de diversification phénotypique au sein des biofilms de cette espèce : DegU, ComA et Spo0A. Ces régulateurs activent des cascades d'expressions géniques spécifiques qui conduisent à la diversification phénotypique des cellules en toutes sous-populations

phénotypiquement différentes coexistantes dans les biofilms de *B. subtilis* (Mielich-Süss and Lopez, 2015).

Dans la biosphère, des systèmes de dégradation aérobie et anaérobie en biofilms se sont développés pour surmonter la récalcitrance des biomasses lignocellulosiques à la dégradation enzymatique microbienne (Brethauer, Shahab and Studer, 2020). L'étude de la formation de biofilms de *T. xylanilyticus* pourrait donc permettre d'atteindre des niveaux plus importants d'activité hémicellulolytique à l'interface entre le biofilm et le substrat.

5.6.2. Fermentation en milieu solide

La fermentation en milieu solide (SSF) est définie comme la culture de microorganismes sur des supports solides humides, des supports inertes ou des substrats insolubles qui peuvent alors être utilisés comme source de carbone et d'énergie (Hölker, Höfer and Lenz, 2004). La production d'enzymes lignocellulolytiques a souvent été étudiée en fermentation à l'état solide en plus des fermentations submergées (Alokika and Singh, 2019). La plupart des microorganismes utilisés pour la fermentation à l'état solide sont des champignons car ils requièrent généralement une plus faible teneur en humidité pour leur croissance et leur production d'enzymes (Iram, Cekmecelioglu and Demirci, 2021). Cependant des bactéries ont également déjà pu être utilisées à cet effet telles que les bactéries (appartenant au genre *Bacillus* principalement) isolées d'intestin de termites de l'espèce *Bulbitermes* ou des bactéries filamenteuses provenant des genres *Actinomycetes* et *Streptomyces* (résistantes aux conditions extrêmes et pouvant coloniser le substrat en abondance) (Kamsani *et al.*, 2015; Šelo *et al.*, 2021). Les biomasses utilisées pour ce type de fermentation comprennent alors le son de riz, le son de blé, le marc de raisin, les drêches de brasserie, les graines oléagineuses, les coques de café, les copeaux de bois et les grignons d'olive (Leite *et al.*, 2021). Parmi les plus étudiés, le son de blé est efficace pour la production de xylanase et de cellulase par fermentation solide (Leite *et al.*, 2021). Or, le son de blé est un des substrats lignocellulosiques qui a déjà été utilisé pour la production enzymatique de *T. xylanilyticus* (Rakotoarivonina *et al.*, 2012). Il serait alors intéressant de réaliser des cultures de la bactérie en fermentation solide avec ce type de substrats. Il est possible que les phénomènes de diversification phénotypique soient moins présents dans ce type de cultures. En effet, ces systèmes de culture sont par exemple moins sensibles au phénomène de répression catabolique comme démontré chez *Aspergillus sp.*

(Hölker, Höfer and Lenz, 2004). De par la nature des cultures, se faisant sur des supports solides, l'apparition d'une sous-population de type tricheuse chez *T. xylanilyticus* serait moins attendue. En effet, cette sous-population apparaît suite à la présence de substrats mobilisables dans le milieu extracellulaire (suite au fractionnement enzymatique possible grâce à la présence de cellules productrices). Au cours de cultures en milieu solide, les cellules productrices seraient en contact direct avec les biomasses à fractionner et auraient donc également un accès direct aux substrats résultants de l'hydrolyse enzymatique. Ce type de culture est cependant plus difficilement extrapolable à des échelles plus importantes de production (montée en échelle) malgré une production enzymatique souvent améliorée et particulièrement pour les individus fongiques (Hölker, Höfer and Lenz, 2004). De plus, l'ensemble des paramètres de culture optimisés au cours de cette thèse pour les bioréacteurs agités (fermentation submergée) ne seraient plus applicables ici. Les paramètres de culture seraient entièrement à redéfinir même si une étude comparative de la production enzymatique de *T. xylanilyticus* entre la fermentation submergée et la fermentation à l'état solide serait intéressante.

PARTIE VI : CONCLUSIONS

Cette thèse s'inscrit dans le contexte de la valorisation des biomasses lignocellulosiques par des enzymes lignocellulolytiques et plus particulièrement elle a été focalisée sur la bioproduction d'hémicellulases par la bactérie *T. xylanilyticus* et sur l'étude des impacts de la diversification phénotypique au niveau de la production d'hémicellulases. L'ensemble des résultats ont prouvé la nécessité d'étudier les populations à l'échelle de cellules uniques afin de comprendre les problèmes affectant les bioprocédés tels que de faibles rendements de production enzymatique au cours des processus de montée en échelle.

Au niveau des études de population, les travaux effectués au cours de cette thèse ont pu prouver pour la première fois l'existence de sous-populations lors des cultures de la bactérie *Thermobacillus xylanilyticus*. Ces sous-populations et les phénomènes de diversification phénotypique causant leur apparition ont été caractérisés comme responsables des pertes d'activité de production d'enzymes hémicellulolytiques. Plus précisément, la sélection d'une sous-population de type tricheuse a été prouvée au cours des générations lors de cultures successives avec du xylane et lorsque la baisse d'activité xylanase a été obtenue (baisse de 88,86 % après 23,5 générations). La différence entre les 2 sous-populations a pu être détectée *via* les phénomènes de sporulation précoces et l'utilisation des signaux FSC mesurés par cytométrie en flux. Leur caractérisation n'a cependant pu être réalisée que par cultures indépendantes avec du xylane après triage cellulaire basé sur les signaux FSC. C'est avec cette caractérisation que l'une des sous-populations a pu être qualifiée de tricheuse car peu productrice de xylanase excepté à des phases avancées de culture (phase stationnaire de croissance). Au cours des cultures, la sous-population productrice va donc avoir tendance à sporuler suite au coût métabolique de la production et à la compétition avec la sous-population tricheuse pour les formes de substrats mobilisables (les produits de l'hydrolyse du xylane). Suite à cette sporulation précoce de la sous-population productrice, la sous-population tricheuse a un meilleur *fitness* que la sous-population productrice et est donc sélectionnée au cours des cultures et des générations. Cette sélection explique donc la perte d'activité xylanase rapide au cours des générations. En plus de prouver ce phénomène pour *T. xylanilyticus*, cette thèse ouvre des perspectives pour l'étude des populations et leurs implications dans les faibles rendements de production d'enzymes lignocellulolytiques.

Cette thèse a également démontré que certaines stratégies de contrôle de la diversification phénotypique peuvent être utilisées pour optimiser les rendements de production d'enzymes hémicellulolytiques de *T. xylanilyticus* mesurés par les différentes activités

enzymatiques associées (telles que l'activité xylanase, xylosidase ou estérase). Ces stratégies de contrôle se basent sur des manipulations générales de la physiologie. Plus précisément elles se sont focalisées sur l'alternance entre deux sources de carbone, une simple (le glucose) et une nécessitant une hydrolyse (le xylane) mais également sur l'âge de l'inocula des cellules à l'échelle des cultures en bouteilles scellées (échelle laboratoire). En effet, par l'alternance des souches de carbone, il a été prouvé que l'équilibre entre les 2 sous-populations (productrice et tricheuse) peut être conservée et mène à des activités xylanases plus importantes que sans alternance de ces sources de carbone. Cette activité a pu être mesurée comme 1,54 à 15-fois plus importante en fonction des générations par rapport à des cultures avec uniquement du xylane et sans contrôle de la diversification phénotypique.

L'autre méthode de contrôle de la diversification phénotypique, focalisée sur une modification de l'âge de l'inocula entre chaque culture, a également pu démontrer des résultats positifs pour une optimisation des activités hémicellulolytiques. En effet, en transférant les cellules de *T. xylanilyticus* en phase stationnaire, lorsque toutes les cellules sont sporulées, les activités xylanase, β -xylosidase et acétyle estérase ont pu être optimisées avec des cultures successives sur xylane, son de blé et paille de blé. Plus précisément l'activité xylanase a été optimisée d'un facteur 7,15-fois lors de cultures successives avec du xylane, l'activité β -xylosidase a été optimisée d'un facteur 5,88-fois et 2,77-fois avec paille et son de blé respectivement et l'activité acétyle estérase a été optimisée d'un facteur 57,2-fois et 3,34-fois avec paille et son de blé respectivement. Pour chaque source de carbone, les transferts des cellules ont été faits en phase stationnaire. La différence avec l'expérience qui a permis de notifier la perte d'activité xylanase au cours des générations lors de cultures successives a donc été l'état (ou l'âge) des inocula. En phase stationnaire, l'ensemble des cellules, appartenant donc aux 2 sous-populations, sont dans un état de sporulation plus avancé. Il n'y a donc aucun avantage d'une sous-population sur l'autre et la sous-population de type tricheuse n'est donc pas sélectionnée, ce qui permet de meilleur rendement de production enzymatique.

Finalement, la méthode de contrôle de la diversité phénotypique basé sur l'alternance des sources de carbone (modification des conditions environnementales) a également pu être établie pour des échelles de cultures plus importantes, soit des cultures en bioréacteurs (culture continue avec un niveau de milieu de culture conservé à 1 litre). En effet, après étude et optimisation des paramètres de culture en bioréacteurs, focalisés sur la présence (ou l'absence) de CO₂, l'agitation, l'aération, la régulation du pH et la présence d'insolubles dans le milieu,

l'étude continue des populations par cytométrie en flux en ligne et le contrôle des populations par culture en ségrégostat ont été rendus possibles. L'étude des populations en bioréacteurs ont démontré que les 2 sous-populations étaient toujours présentes (et détectées via les signaux FSC) en phase exponentielle de croissance lors des cultures avec du xylane comme source de carbone en bioréacteurs avec les conditions optimisées de culture. Par l'utilisation des cultures en ségrégostat permettant l'introduction de pulses de changements environnementaux, ici l'introduction de glucose dans le milieu de culture avec xylane, il a été possible de stabiliser les populations de façon oscillatoire et dépendant des pulses. Ceux-ci ont directement été dépendant des signaux cytométriques mesurés, lorsque plus de 50 % de cellules commençaient à présenter des signaux FSC importants, preuves de phénomène de sporulation précoce de la sous-population productrice, du glucose était introduit dans le milieu. Dans ces conditions, l'activité xylanase a été augmentée 1,85-fois en comparaison avec l'activité xylanase obtenue avant l'introduction des pulses, soit lorsque les phénomènes de dérives phénotypiques ont pu être détectées.

Cette thèse ouvre donc des perspectives dans le contrôle des processus de diversification phénotypique mais également dans le contrôle de la perte des rendements de production enzymatiques des souches d'intérêt pour l'hydrolyse des biomasses lignocellulosiques. Si les recherches actuelles se focalisent plutôt vers la découverte et l'isolement de nouvelles souches d'intérêt pour ces processus d'hydrolyse, les études des souches d'intérêts au niveau physiologique, métabolique et populationnel sont donc prouvées comme d'intérêt afin de définir des stratégies d'optimisation des rendements de production et d'hydrolyse enzymatiques. Les recherches et stratégies d'optimisation sont actuellement plutôt axées sur l'ingénierie génétique. Cette thèse prouve donc que les stratégies d'ingénierie génétique ne sont pas forcément nécessaires et que l'utilisation de stratégies de contrôle de la diversification phénotypique permet de conserver les souches sauvages et de prévenir l'utilisation d'outils ingénierie génétique parfois difficile à mettre en place ou de mutagenèse aléatoire. Afin d'affiner les connaissances de *T. xylanilyticus* et des bactéries hémicellulolytiques plus généralement, des suivis de culture en microfluidiques et des analyses omiques (protéomique ou génomique par exemple) pourraient permettre la compréhension des mécanismes responsables de la diversité phénotypique chez ce type de bactérie. De plus, des répliques de culture en ségrégostat de *T. xylanilyticus* permettraient également d'avoir une meilleure compréhension sur ces mécanismes mais également de prolonger le contrôle de la diversification phénotypique et de l'amélioration de l'activité enzymatique de la bactérie. A

cette fin, une optimisation des conditions de culture continue de la bactérie, en diminuant le taux de dilution par exemple, pourrait permettre de limiter la formation de biofilms afin de prolonger le temps de culture en ségrégostat. Cette méthode de culture pourrait alors être extrapolée à des échelles de culture plus importante ainsi qu'à d'autres substrats lignocellulosiques afin de produire des cocktails enzymatiques d'intérêt pour le bioraffinage des biomasses lignocellulosiques.

BIBLIOGRAPHIE

Abas, N., Kalair, A. and Khan, N. (2015) 'Review of fossil fuels and future energy technologies', *Futures*. Pergamon, 69, pp. 31–49. doi: 10.1016/J.FUTURES.2015.03.003.

Adan, A. *et al.* (2017) 'Flow cytometry: basic principles and applications', *Critical Reviews in Biotechnology*, 37(2), pp. 163–176. doi: 10.3109/07388551.2015.1128876.

Aditiya, H. B. *et al.* (2016) 'Second generation bioethanol production: A critical review', *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. Elsevier, 66, pp. 631–653. doi: 10.1016/j.rser.2016.07.015.

Al-ghussain, L. (2018) 'Global Warming: Review on Driving Forces and Mitigation', *Environmental Progress & Sustainable Energy*, 38(1), pp. 13–21. doi: 10.1002/ep.13041.

Allison, S. D. (2005) 'Cheaters, diffusion and nutrients constrain decomposition by microbial enzymes in spatially structured environments', *Ecology Letters*, 8(6), pp. 626–635. doi: 10.1111/j.1461-0248.2005.00756.x.

Allison, S. D. *et al.* (2014) 'Extracellular enzyme production and cheating in *Pseudomonas fluorescens* depend on diffusion rates', *Frontiers in Microbiology*, 5(APR), pp. 1–8. doi: 10.3389/fmicb.2014.00169.

Alokika and Singh, B. (2019) 'Production, characteristics, and biotechnological applications of microbial xylanases', *Applied Microbiology and Biotechnology*. Applied Microbiology and Biotechnology, 103(21–22), pp. 8763–8784. doi: 10.1007/s00253-019-10108-6.

Alokika and Singh, B. (2020) 'Enhanced production of bacterial xylanase and its utility in saccharification of sugarcane bagasse', *Bioprocess and Biosystems Engineering*. Springer Berlin Heidelberg, 43(6), pp. 1081–1091. doi: 10.1007/s00449-020-02306-8.

Amore, A., Giacobbe, S. and Faraco, V. (2013) 'Regulation of Cellulase and Hemicellulase Gene Expression in Fungi', *Current Genomics*, 14, pp. 230–249. Available at: <http://genome.jgi>.

Angelidaki, I. *et al.* (2011) *Biomethanation and its potential*. 1st edn, *Methods in Enzymology*. 1st edn. Elsevier Inc. doi: 10.1016/B978-0-12-385112-3.00016-0.

Arora, N. K. and Panosyan, H. (2019) 'Extremophiles: applications and roles in environmental

sustainability’, *Environmental Sustainability*. Springer Singapore, 2(3), pp. 217–218. doi: 10.1007/s42398-019-00082-0.

Atmodjo, M. A., Hao, Z. and Mohnen, D. (2013) ‘Evolving views of pectin biosynthesis’, *Annual Review of Plant Biology*, 64, pp. 747–779. doi: 10.1146/annurev-arplant-042811-105534.

Auer, L. *et al.* (2017) ‘Uncovering the potential of termite gut microbiome for lignocellulose bioconversion in anaerobic batch bioreactors’, *Frontiers in Microbiology*, 8(DEC), pp. 1–14. doi: 10.3389/fmicb.2017.02623.

Baert, J. *et al.* (2016) ‘Microbial population heterogeneity versus bioreactor heterogeneity: Evaluation of Redox Sensor Green as an exogenous metabolic biosensor’, *Engineering in Life Sciences*. doi: 10.1002/elsc.201500149.

Bailey, James Edwin, Ollis, D. F. (1986) *Biochemical engineering fundamentals*. 2nd ed. Edited by McGraw-Hill. New York. Available at: <http://lib.ugent.be/catalog/rug01:001652694>.

Barrick, J. E. *et al.* (2009) ‘Genome evolution and adaptation in a long-term experiment with *Escherichia coli*’, 461(October). doi: 10.1038/nature08480.

Basit, A. *et al.* (2018) ‘Thermophilic xylanases: from bench to bottle’, *Critical Reviews in Biotechnology*. Informa Healthcare USA, Inc, 38(7), pp. 989–1002. doi: 10.1080/07388551.2018.1425662.

Battan, B. *et al.* (2012) ‘Application of Thermostable Xylanase of *Bacillus pumilus* in Textile Processing’, *Indian Journal of Microbiology*, 52(2), pp. 222–229. doi: 10.1007/s12088-011-0118-1.

Beaugrand, J. *et al.* (2004) ‘Impact and efficiency of GH10 and GH11 thermostable endoxylanases on wheat bran and alkali-extractable arabinoxylans’, *Carbohydrate Research*. Elsevier, 339(15), pp. 2529–2540. doi: 10.1016/J.CARRES.2004.08.012.

Beguin, P., Cornet, P. and Aubert, J. P. (1985) ‘Sequence of a cellulase gene of the thermophilic bacterium *Clostridium thermocellum*’, *Journal of Bacteriology*, 162(1), pp. 102–105. doi: 10.1128/jb.162.1.102-105.1985.

Beladhadi, R. V. *et al.* (2022) ‘Production of Cocktail of Lignolytic, Cellulolytic and Hemicellulolytic Enzymes by the Novel Bacterium *Burkholderia* sp SMB1 Utilizing Rice Bran

and Straw: Application in the Saccharification of Untreated Agro-wastes for Bioethanol Production', *Waste and Biomass Valorization*. Springer Netherlands, 13(3), pp. 1565–1577. doi: 10.1007/s12649-021-01607-7.

Berg, I. A. (2011) 'Ecological aspects of the distribution of different autotrophic CO₂ fixation pathways', *Applied and Environmental Microbiology*. doi: 10.1128/AEM.02473-10.

Bergdale, T. E., Hughes, S. R. and Bang, S. S. (2014) 'Thermostable hemicellulases of a bacterium, *Geobacillus* sp. DC3, isolated from the former homestake gold mine in Lead, South Dakota', *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172(7), pp. 3488–3501. doi: 10.1007/s12010-014-0784-7.

Bhalla, A. *et al.* (2013) 'Improved lignocellulose conversion to biofuels with thermophilic bacteria and thermostable enzymes', *Bioresource Technology*. Elsevier Ltd, 128, pp. 751–759. doi: 10.1016/j.biortech.2012.10.145.

Bhardwaj, N., Kumar, B. and Verma, P. (2019) 'A detailed overview of xylanases: an emerging biomolecule for current and future prospective', *Bioresources and Bioprocessing*. Springer Singapore, 6(1). doi: 10.1186/s40643-019-0276-2.

Bhat, M. K. (2000) 'Cellulases and related enzymes in biotechnology', *Biotechnology Advances*, 18(5), pp. 355–383. doi: 10.1016/S0734-9750(00)00041-0.

Bhattacharya, A. S. (2015) 'Synergism of fungal and bacterial cellulases and hemicellulases : a novel perspective for enhanced bio-ethanol production', *Biotechnology Letters*. Springer Netherlands, pp. 1117–1129. doi: 10.1007/s10529-015-1779-3.

Biely, P. *et al.* (1997) 'Endo- β -1,4-xylanase families: Differences in catalytic properties', *Journal of Biotechnology*, 57(1–3), pp. 151–166. doi: 10.1016/S0168-1656(97)00096-5.

Biely, P., Singh, S. and Puchart, V. (2016) 'Towards enzymatic breakdown of complex plant xylan structures: State of the art', *Biotechnology Advances*. Elsevier Inc., 34(7), pp. 1260–1274. doi: 10.1016/j.biotechadv.2016.09.001.

Binder, D. *et al.* (2017) 'Homogenizing bacterial cell factories: Analysis and engineering of phenotypic heterogeneity', *Metabolic Engineering*. Elsevier Inc., 42, pp. 145–156. doi: 10.1016/j.ymben.2017.06.009.

Binod, P. *et al.* (2019) 'Enzymes for second generation biofuels: Recent developments and

future perspectives’, *Bioresource Technology Reports*. Elsevier, 5(July 2018), pp. 317–325. doi: 10.1016/j.biteb.2018.06.005.

Bleichrodt, R. J. and Read, N. D. (2019) ‘Flow cytometry and FACS applied to filamentous fungi’, *Fungal Biology Reviews*. Elsevier Ltd, 33(1), pp. 1–15. doi: 10.1016/j.fbr.2018.06.001.

Blombach, B. and Takors, R. (2015) ‘CO₂ – Intrinsic Product, Essential Substrate, and Regulatory Trigger of Microbial and Mammalian Production Processes’, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. doi: 10.3389/fbioe.2015.00108.

Bornscheuer, U., Buchholz, K. and Seibel, J. (2014) ‘Enzymatic degradation of (ligno)cellulose’, *Angewandte Chemie - International Edition*, 53(41), pp. 10876–10893. doi: 10.1002/anie.201309953.

Bouchat, R. *et al.* (2022) ‘Xylanase production by *Thermobacillus xylanilyticus* is impaired by population diversification but can be mitigated based on the management of cheating behavior’, *Microbial Cell Factories*. BioMed Central, pp. 1–17. doi: 10.1186/s12934-022-01762-z.

Bouchedja, D. N. *et al.* (2018) ‘PH level has a strong impact on population dynamics of the yeast *Yarrowia lipolytica* and oil micro-droplets in multiphasic bioreactor’, *FEMS Microbiology Letters*, 365(16), pp. 1–10. doi: 10.1093/femsle/fny173.

Boz, H. (2015) ‘p-Coumaric acid in cereals: Presence, antioxidant and antimicrobial effects’, *International Journal of Food Science and Technology*, 50(11), pp. 2323–2328. doi: 10.1111/ijfs.12898.

Brandt, A. *et al.* (2013) ‘Deconstruction of lignocellulosic biomass with ionic liquids’, *Green Chemistry*, 15(3), pp. 550–583. doi: 10.1039/c2gc36364j.

Brethauer, S., Shahab, R. L. and Studer, M. H. (2020) ‘Impacts of biofilms on the conversion of cellulose’, *Applied Microbiology and Biotechnology*. Applied Microbiology and Biotechnology, 104(12), pp. 5201–5212. doi: 10.1007/s00253-020-10595-y.

Brown, N. A., Ries, L. N. A. and Goldman, G. H. (2014) ‘How nutritional status signalling coordinates metabolism and lignocellulolytic enzyme secretion’, *Fungal Genetics and Biology*. Elsevier Inc., 72, pp. 48–63. doi: 10.1016/j.fgb.2014.06.012.

Burbulys, D., Trach, K. A. and Hoch, J. A. (1991) ‘Initiation of Sporulation in *B. subtilis* Is Controlled by a Multicomponent Phosphorelay’, 64, pp. 545–552.

- Van den Burg, B. (2003) 'Extremophiles as a source for novel enzymes', *Current Opinion in Microbiology*, 6(3), pp. 213–218. doi: 10.1016/S1369-5274(03)00060-2.
- Butt, M. S. *et al.* (2008) 'Xylanases and their applications in baking industry', *Food Technology and Biotechnology*, 46(1), pp. 22–31.
- Buysschaert, B. *et al.* (2016) 'Reevaluating multicolor flow cytometry to assess microbial viability', *Applied Microbiology and Biotechnology*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(21), pp. 9037–9051. doi: 10.1007/s00253-016-7837-5.
- Cantarel, B. I. *et al.* (2009) 'The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): An expert resource for glycogenomics', *Nucleic Acids Research*, 37(SUPPL. 1), pp. 233–238. doi: 10.1093/nar/gkn663.
- Capetti, C. C. de M. *et al.* (2021) 'Recent advances in the enzymatic production and applications of xylooligosaccharides', *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. Springer Netherlands, 37(10), pp. 1–12. doi: 10.1007/s11274-021-03139-7.
- Casadesús, J. and D'Ari, R. (2002) 'Memory in bacteria and phage', *BioEssays*, 24(6), pp. 512–518. doi: 10.1002/bies.10102.
- Casadesús, J. and Low, D. A. (2013) 'Programmed heterogeneity: Epigenetic mechanisms in bacteria', *Journal of Biological Chemistry*, 288(20), pp. 13929–13935. doi: 10.1074/jbc.R113.472274.
- Chadha, B. S. *et al.* (2019) 'Thermostable xylanases from thermophilic fungi and bacteria: Current perspective', *Bioresource Technology*. Elsevier Ltd, 277, pp. 195–203. doi: 10.1016/j.biortech.2019.01.044.
- Chakdar, H. *et al.* (2016) 'Bacterial xylanases: biology to biotechnology', *3 Biotech*. Springer Berlin Heidelberg, 6(2), pp. 1–15. doi: 10.1007/s13205-016-0457-z.
- Chandel, A. K. *et al.* (2018) 'The path forward for lignocellulose biorefineries: Bottlenecks, solutions, and perspective on commercialization', *Bioresource Technology*. Elsevier, 264(April), pp. 370–381. doi: 10.1016/j.biortech.2018.06.004.
- Chastanet, A. *et al.* (2010) 'Broadly heterogeneous activation of the master regulator for sporulation in *Bacillus subtilis*', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(18), pp. 8486–8491. doi: 10.1073/pnas.1002499107.

Chen, X. *et al.* (2010) 'Microbial and Bioconversion Production of D-xylitol and Its Detection and Application', *6*(7), pp. 834–844.

Chen, Z. *et al.* (2019) 'Purification and characterization of a new xylanase with excellent stability from *Aspergillus flavus* and its application in hydrolyzing pretreated corncobs', *Protein Expression and Purification*. Elsevier, 154(11), pp. 91–97. doi: 10.1016/j.pep.2018.10.006.

Cheng, Y. S. *et al.* (2014) 'Structural analysis of a glycoside hydrolase family 11 xylanase from *Neocallimastix patriciarum*: Insights into the molecular basis of a thermophilic enzyme', *Journal of Biological Chemistry*. © 2014 ASBMB. Currently published by Elsevier Inc; originally published by American Society for Biochemistry and Molecular Biology., 289(16), pp. 11020–11028. doi: 10.1074/jbc.M114.550905.

Chukwuma, O. B. *et al.* (2020) 'Lignocellulolytic enzymes in biotechnological and industrial processes: A review', *Sustainability (Switzerland)*, 12(18), pp. 1–31. doi: 10.3390/su12187282.

Chylenski, P. *et al.* (2019) 'Lytic Polysaccharide Monooxygenases in Enzymatic Processing of Lignocellulosic Biomass', *ACS Catalysis*, 9(6), pp. 4970–4991. doi: 10.1021/acscatal.9b00246.

Collins, T., Gerday, C. and Feller, G. (2005) 'Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases', *FEMS Microbiology Reviews*, 29(1), pp. 3–23. doi: 10.1016/j.femsre.2004.06.005.

Connerton, I. *et al.* (1999) 'A single domain thermophilic xylanase can bind insoluble xylan: Evidence for surface aromatic clusters', *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1433(1–2), pp. 110–121. doi: 10.1016/S0167-4838(99)00151-X.

Conrad, T. M., Lewis, N. E. and Palsson, B. O. (2011) 'Microbial laboratory evolution in the era of genome-scale science', *Molecular Systems Biology*, 7(509). doi: 10.1038/msb.2011.42.

Cordova, L. T. *et al.* (2016) 'Co-utilization of glucose and xylose by evolved *Thermus thermophilus* LC113 strain elucidated by ¹³C metabolic flux analysis and whole genome sequencing', *Metabolic Engineering*, 37, pp. 63–71. doi: 10.1016/j.ymben.2016.05.001.Co-utilization.

Cortes-Tolalpa, L., Salles, J. F. and van Elsas, J. D. (2017) 'Bacterial synergism in lignocellulose biomass degradation - complementary roles of degraders as influenced by complexity of the carbon source', *Frontiers in Microbiology*, 8(OCT), pp. 1–14. doi: 10.3389/fmicb.2017.01628.

- Cosgrove, D. J. (2005) 'Growth of the plant cell wall', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(11), pp. 850–861. doi: 10.1038/nrm1746.
- Cosgrove, D. J. and Jarvis, M. C. (2012) 'Comparative structure and biomechanics of plant primary and secondary cell walls', *Frontiers in Plant Science*, 3(AUG), pp. 1–6. doi: 10.3389/fpls.2012.00204.
- Coutinho, P. M. *et al.* (2009) 'Post-genomic insights into the plant polysaccharide degradation potential of *Aspergillus nidulans* and comparison to *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae*.', *Fungal genetics and biology: FG & B*. Elsevier Inc., 46 Suppl 1(1), pp. S161–S169. doi: 10.1016/j.fgb.2008.07.020.
- Daas, M. J. A. *et al.* (2016) 'Isolation of a genetically accessible thermophilic xylan degrading bacterium from compost', *Biotechnology for Biofuels*. BioMed Central, 9(1), pp. 1–13. doi: 10.1186/s13068-016-0618-7.
- Daas, M. J. A. *et al.* (2018) 'Complete Genome Sequence of *Geobacillus thermodenitrificans* T12, A Potential Host for Biotechnological Applications', *Current Microbiology*. Springer US, 75(1), pp. 49–56. doi: 10.1007/s00284-017-1349-0.
- Dalmau, E. *et al.* (2000) 'Effect of different carbon sources on lipase production by *Candida rugosa*', *Enzyme and Microbial Technology*, 26(9–10), pp. 657–663. doi: 10.1016/S0141-0229(00)00156-3.
- Das, P. and Gundimeda, H. (2022) 'Is biofuel expansion in developing countries reasonable? A review of empirical evidence of food and land use impacts', *Journal of Cleaner Production*. Elsevier Ltd, 372(August), p. 133501. doi: 10.1016/j.jclepro.2022.133501.
- Davey, H. M. and Hexley, P. (2011) 'Red but not dead? Membranes of stressed *Saccharomyces cerevisiae* are permeable to propidium iodide', *Environmental Microbiology*, 13(1), pp. 163–171. doi: 10.1111/j.1462-2920.2010.02317.x.
- Debeche, T. *et al.* (2000) 'Genetic and biochemical characterization of a highly thermostable ??-L- arabinofuranosidase from *Thermobacillus xylanilyticus*', *Applied and Environmental Microbiology*. doi: 10.1128/AEM.66.4.1734-1736.2000.
- Debeire-Gosselin, M. *et al.* (1991) 'Purification and properties of a 22kDa endoxylanase excreted by a new strain of thermophilic *Bacillus*', *Progress in biotechnology*.

- Delafosse, A. *et al.* (2015) ‘Euler-Lagrange approach to model heterogeneities in stirred tank bioreactors - Comparison to experimental flow characterization and particle tracking’, *Chemical Engineering Science*. Elsevier, 134, pp. 457–466. doi: 10.1016/j.ces.2015.05.045.
- Delvigne, F. *et al.* (2014) ‘Metabolic variability in bioprocessing: Implications of microbial phenotypic heterogeneity’, *Trends in Biotechnology*. doi: 10.1016/j.tibtech.2014.10.002.
- Delvigne, F. *et al.* (2017) ‘Taking control over microbial populations: Current approaches for exploiting biological noise in bioprocesses’, *Biotechnology Journal*, 12(7). doi: 10.1002/biot.201600549.
- Delvigne, F. *et al.* (2018) ‘Improving control in microbial cell factories: from single-cell to large-scale bioproduction’, *FEMS microbiology letters*, 365(22), pp. 1–11. doi: 10.1093/femsle/fny236.
- Delvigne, F. and Goffin, P. (2014) ‘Microbial heterogeneity affects bioprocess robustness: Dynamic single-cell analysis contributes to understanding of microbial populations’, *Biotechnology Journal*. doi: 10.1002/biot.201300119.
- Delvigne, F. and Lecomte, J. (2010) ‘Foam Formation and Control in Bioreactors’, *Encyclopedia of Industrial Biotechnology*, pp. 1–13. doi: 10.1002/9780470054581.eib326.
- Delvigne, F. and Noorman, H. (2017) ‘Scale-up/Scale-down of microbial bioprocesses: a modern light on an old issue’, *Microbial Biotechnology*, 10(4), pp. 685–687. doi: 10.1111/1751-7915.12732.
- Demarty, M., Morvan, C. and Thellier, M. (1984) ‘Calcium and the cell wall’, *Plant, Cell & Environment*, 7(6), pp. 441–448. doi: 10.1111/j.1365-3040.1984.tb01434.x.
- Deng, Y. and Fong, S. S. (2011) ‘Laboratory evolution and multi-platform genome re-sequencing of the cellulolytic actinobacterium *Thermobifida fusca*’, *Journal of Biological Chemistry*, 286(46), pp. 39958–39966. doi: 10.1074/jbc.M111.239616.
- Desai, D. I. and Iyer, B. D. (2016) ‘Biodeinking of old newspaper pulp using a cellulase-free xylanase preparation of *Aspergillus niger* DX-23’, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. Elsevier, 5, pp. 78–85. doi: 10.1016/j.bcab.2015.11.001.
- Dettman, J. R. *et al.* (2012) ‘Evolutionary insight from whole-genome sequencing of experimentally evolved microbes’, pp. 2058–2077. doi: 10.1111/j.1365-294X.2012.05484.x.

- Deutschmann, R. and Dekker, R. F. H. (2012) 'From plant biomass to bio-based chemicals: Latest developments in xylan research', *Biotechnology Advances*. Elsevier B.V., 30(6), pp. 1627–1640. doi: 10.1016/j.biotechadv.2012.07.001.
- Dhiman, S. S. *et al.* (2011) 'Characterization of statistically produced xylanase for enrichment of fruit juice clarification process', *New Biotechnology*, 28(6), pp. 746–755. doi: 10.1016/j.nbt.2010.11.004.
- Doblin, M. S., Pettolino, F. and Bacic, A. (2010) 'Plant cell walls: The skeleton of the plant world', *Functional Plant Biology*, 37(5), pp. 357–381. doi: 10.1071/FP09279.
- Dodd, D. and Cann, I. K. O. (2009) 'Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production', *GCB Bioenergy*, 1(1), pp. 2–17. doi: 10.1111/j.1757-1707.2009.01004.x.
- Donohoe, B. S. and Resch, M. G. (2015) 'Mechanisms employed by cellulase systems to gain access through the complex architecture of lignocellulosic substrates', *Current Opinion in Chemical Biology*. Elsevier Ltd, 29, pp. 100–107. doi: 10.1016/j.cbpa.2015.08.014.
- Dragosits, M. and Mattanovich, D. (2013) 'Adaptive laboratory evolution - principles and applications for biotechnology', *Microbial Cell Factories*, 12(1), pp. 1–18. doi: 10.1186/1475-2859-12-64.
- Drula, E. *et al.* (2022) 'The carbohydrate-active enzyme database: Functions and literature', *Nucleic Acids Research*. Oxford University Press, 50(D1), pp. D571–D577. doi: 10.1093/nar/gkab1045.
- Dupoiron, S. *et al.* (2017) 'A novel and integrative process: From enzymatic fractionation of wheat bran with a hemicellulasic cocktail to the recovery of ferulic acid by weak anion exchange resin', *Industrial Crops and Products*. Elsevier, 105(April), pp. 148–155. doi: 10.1016/j.indcrop.2017.05.004.
- Dupoiron, S. *et al.* (2018) 'Recovering ferulic acid from wheat bran enzymatic hydrolysate by a novel and non-thermal process associating weak anion-exchange and electrodialysis', *Separation and Purification Technology*. Elsevier, 200(October 2017), pp. 75–83. doi: 10.1016/j.seppur.2018.02.031.
- Dürre, P. (2014) 'Physiology and sporulation in clostridium', *Microbiology Spectrum*, pp. 313–329. doi: 10.1128/9781555819323.ch15.

Dusny, C. and Schmid, A. (2015) 'Microfluidic single-cell analysis links boundary environments and individual microbial phenotypes', *Environmental Microbiology*. doi: 10.1111/1462-2920.12667.

Van Dyk, J. S. and Pletschke, B. I. (2012) 'A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes-Factors affecting enzymes, conversion and synergy', *Biotechnology Advances*. Elsevier Inc., 30(6), pp. 1458–1480. doi: 10.1016/j.biotechadv.2012.03.002.

Ebringerová, A. (2005) 'Structural diversity and application potential of hemicelluloses', *Macromolecular Symposia*, 232(333), pp. 1–12. doi: 10.1002/masy.200551401.

Ebringerová, A. and Heinze, T. (2000) 'Xylan and xylan derivatives - Biopolymers with valuable properties, 1: Naturally occurring xylans structures, isolation procedures and properties', *Macromolecular Rapid Communications*, 21(9), pp. 542–556. doi: 10.1002/1521-3927(20000601)21:9<542::AID-MARC542>3.0.CO;2-7.

Eseyin, E. A. and Steele, H. P. (2015) 'An overview of the applications of furfural and its derivatives', *International Journal of Advanced Chemistry*, 3(2). doi: 10.14419/ijac.v3i2.5048.

Fang, X. *et al.* (2009) 'Strain improvement of *Acremonium cellulolyticus* for cellulase production by mutation', *JBIOSC*. The Society for Biotechnology, Japan, 107(3), pp. 256–261. doi: 10.1016/j.jbiosc.2008.11.022.

Feng, X. *et al.* (2019) 'Dynamics of cheater invasion in a cooperating population of *Pseudomonas aeruginosa*', *Scientific Reports*. Springer US, 9(1), pp. 1–9. doi: 10.1038/s41598-019-46651-5.

Fernando, S. *et al.* (2006) 'Biorefineries: Current status, challenges, and future direction', *Energy and Fuels*, 20(4), pp. 1727–1737. doi: 10.1021/ef060097w.

Fuchs, G. (2011a) *Alternative Pathways of Carbon Dioxide Fixation: Insights into the Early Evolution of Life?*, *Annual Review of Microbiology*. doi: 10.1146/annurev-micro-090110-102801.

Fuchs, G. (2011b) 'Alternative Pathways of Carbon Dioxide Fixation: Insights into the Early Evolution of Life?', *Annual Review of Microbiology*. doi: 10.1146/annurev-micro-090110-102801.

- Galkin, M. V. and Samec, J. S. M. (2016) ‘Lignin Valorization through Catalytic Lignocellulose Fractionation: A Fundamental Platform for the Future Biorefinery’, *ChemSusChem*, 9(13), pp. 1544–1558. doi: 10.1002/cssc.201600237.
- García-Contreras, R. and Loarca, D. (2021) ‘The bright side of social cheaters: Potential beneficial roles of “social cheaters” in microbial communities’, *FEMS Microbiology Ecology*, 97(1), pp. 1–6. doi: 10.1093/femsec/fiaa239.
- García-timmermans, C. *et al.* (2020) ‘Raman Spectroscopy-Based Measurements of Single-Cell Phenotypic Diversity in Microbial Populations’, *Applied and En*, 5(5), pp. 1–14.
- Garron, M. L. and Henrissat, B. (2019) ‘The continuing expansion of CAZymes and their families’, *Current Opinion in Chemical Biology*. Elsevier, 53, pp. 82–87. doi: 10.1016/j.cbpa.2019.08.004.
- Gärtner, D., Geissendörfer, M. and Hillen, W. (1988) ‘Expression of the *Bacillus subtilis* xyl operon is repressed at the level of transcription and is induced by xylose.’, *Journal of bacteriology*, 170(7), pp. 3102–3109. doi: 10.1128/jb.170.7.3102-3109.1988.
- Gibson, L. J. (2012) ‘The hierarchical structure and mechanics of plant materials’, (August), pp. 2749–2766.
- Gírio, F. M. *et al.* (2010) ‘Hemicelluloses for fuel ethanol: A review’, *Bioresource Technology*. Elsevier Ltd, 101(13), pp. 4775–4800. doi: 10.1016/j.biortech.2010.01.088.
- Govil, T. *et al.* (2020) ‘Adaptive enrichment of a thermophilic bacterial isolate for enhanced enzymatic activity’, *Microorganisms*, 8(6), pp. 1–16. doi: 10.3390/microorganisms8060871.
- Grage, K., McDermott, P. and Rehm, B. H. A. (2017) ‘Engineering *Bacillus megaterium* for production of functional intracellular materials’, *Microbial Cell Factories*. BioMed Central, 16(1), pp. 1–12. doi: 10.1186/s12934-017-0823-5.
- Gravius, B. *et al.* (1993) ‘Genetic Instability and Strain Degeneration in *Streptomyces rimosus*’, 59(7), pp. 2220–2228.
- Gressel, J. (2008) ‘Transgenics are imperative for biofuel crops’, *Plant Science*, 174(3), pp. 246–263. doi: 10.1016/j.plantsci.2007.11.009.
- Grimbergen, A. J. *et al.* (2015) ‘Microbial bet-hedging: The power of being different’, *Current Opinion in Microbiology*. Elsevier Ltd, 25, pp. 67–72. doi: 10.1016/j.mib.2015.04.008.

- Gruenberger, A. *et al.* (2013) ‘Microfluidic Picoliter Bioreactor for Microbial Single-cell Analysis: Fabrication, System Setup, and Operation’, *Journal of Visualized Experiments*, (82), pp. 1–11. doi: 10.3791/50560.
- Grünberger, A. *et al.* (2012) ‘A disposable picolitre bioreactor for cultivation and investigation of industrially relevant bacteria on the single cell level’, *Lab on a Chip*, 12(11), pp. 2060–2068. doi: 10.1039/c2lc40156h.
- Grünberger, A. *et al.* (2015) ‘Spatiotemporal microbial single-cell analysis using a high-throughput microfluidics cultivation platform’, *Cytometry Part A*, 87(12), pp. 1101–1115. doi: 10.1002/cyto.a.22779.
- Gusakov, A. V. (2011) ‘Alternatives to *Trichoderma reesei* in biofuel production’, *Trends in Biotechnology*. Elsevier Ltd, 29(9), pp. 419–425. doi: 10.1016/j.tibtech.2011.04.004.
- Häkkinen, M. *et al.* (2014) ‘Screening of candidate regulators for cellulase and hemicellulase production in *Trichoderma reesei* and identification of a factor essential for cellulase production’, *Biotechnology for Biofuels*, 7(1). doi: 10.1186/1754-6834-7-14.
- Harholt, J., Suttangkakul, A. and Scheller, H. V. (2010) ‘Biosynthesis of pectin’, *Plant Physiology*, 153(2), pp. 384–395. doi: 10.1104/pp.110.156588.
- Harris, G. W. *et al.* (1997) ‘Structural basis of the properties of an industrially relevant thermophilic xylanase.’, *Proteins*. United States, 29(1), pp. 77–86.
- Hartley, R. D. *et al.* (1990) *CROSS-LINKING OF CELL WALL PHENOLIC ARABINOXYLANS IN GRAMINACEOUS PLANTS*, *Phytochemistry*. doi: 10.1016/0031-9422(90)85317-9.
- Hatfield, R. D. (1993) ‘Cell wall polysaccharide interactions and degradability’, *Forage Cell Wall Structure and Digestibility*, pp. 285–313. doi: 10.2134/1993.foragecellwall.c12.
- Hays, S. G. *et al.* (2015) ‘Better together: Engineering and application of microbial symbioses’, *Current Opinion in Biotechnology*. Elsevier Ltd, 36, pp. 40–49. doi: 10.1016/j.copbio.2015.08.008.
- Heins, A. L. and Weuster-Botz, D. (2018) ‘Population heterogeneity in microbial bioprocesses: origin, analysis, mechanisms, and future perspectives’, *Bioprocess and Biosystems Engineering*. Springer Berlin Heidelberg, 41(7), pp. 889–916. doi: 10.1007/s00449-018-1922-3.

Henrissat, B. (1991) 'A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities', *Biochemical Journal*, 280(2), pp. 309–316. doi: 10.1042/bj2800309.

Henrissat, B. and Coutinho, P. M. (2001) 'Classification of glycoside hydrolases and glycosyltransferases from hyperthermophiles', *Methods in Enzymology*, 330(1997), pp. 183–201. doi: 10.1016/S0076-6879(01)30375-0.

Hepler, P. K. (2005) 'Calcium: A central regulator of plant growth and development', *Plant Cell*, 17(8), pp. 2142–2155. doi: 10.1105/tpc.105.032508.

Van Hoeck, V. *et al.* (2021) 'Xylanase impact beyond performance: a prebiotic approach in broiler chickens', *Journal of Applied Poultry Research*. Elsevier, 30(4), p. 100193. doi: 10.1016/J.JAPR.2021.100193.

Hölker, U., Höfer, M. and Lenz, J. (2004) 'Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64(2), pp. 175–186. doi: 10.1007/s00253-003-1504-3.

Horn, S. J. *et al.* (2012) 'Novel enzymes for the degradation of cellulose. Biotechnol Biofuels', *Biotechnology for Biofuels*, 5, p. 45.

Hu, J., Arantes, V. and Saddler, J. N. (2011) 'The enhancement of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates by the addition of accessory enzymes such as xylanase: Is it an additive or synergistic effect?', *Biotechnology for Biofuels*, 4(October). doi: 10.1186/1754-6834-4-36.

Hua, Q. *et al.* (2007) 'Metabolic Characterization of Escherichia coli Strains Adapted to Growth on Lactate', 73(14), pp. 4639–4647. doi: 10.1128/AEM.00527-07.

Iram, A., Cekmecelioglu, D. and Demirci, A. (2021) 'Ideal feedstock and fermentation process improvements for the production of lignocellulolytic enzymes', *Processes*, 9(1), pp. 1–26. doi: 10.3390/pr9010038.

Jalak, J. *et al.* (2012) 'Endo-exo synergism in cellulose hydrolysis revisited', *Journal of Biological Chemistry*, 287(34), pp. 28802–28815. doi: 10.1074/jbc.M112.381624.

Jarboe, L. R. *et al.* (2012) 'Optimization of enzyme parameters for fermentative production of biorenewable fuels and chemicals', *Computational and Structural Biotechnology*. Research Network of Computational and Structural Biotechnology, 3(4), pp. 1–8. doi:

10.5936/csbj.201210005.

Jöers, A., Kaldalu, N. and Tenson, T. (2010) 'The frequency of persisters in *Escherichia coli* reflects the kinetics of awakening from dormancy', *Journal of Bacteriology*, 192(13), pp. 3379–3384. doi: 10.1128/JB.00056-10.

Johansen, K. S. (2016) 'Lytic Polysaccharide Monooxygenases: The Microbial Power Tool for Lignocellulose Degradation', *Trends in Plant Science*. Elsevier Ltd, 21(11), pp. 926–936. doi: 10.1016/j.tplants.2016.07.012.

Jones, D. T., Van Der Westhuizen, A. and Long, S. (1982) 'Solvent production and morphological changes in *Clostridium acetobutylicum*', *Applied and Environmental Microbiology*, 43(6), pp. 1434–1439. doi: 10.1128/aem.43.6.1434-1439.1982.

Jørgensen, H. *et al.* (2005) 'Production of cellulases and hemicellulases by three *Penicillium* species: Effect of substrate and evaluation of cellulase adsorption by capillary electrophoresis', *Enzyme and Microbial Technology*, 36(1), pp. 42–48. doi: 10.1016/j.enzmictec.2004.03.023.

Jørgensen, U. (2011) 'Benefits versus risks of growing biofuel crops: The case of *Miscanthus*', *Current Opinion in Environmental Sustainability*, 3(1–2), pp. 24–30. doi: 10.1016/j.cosust.2010.12.003.

Juturu, V. and Wu, J. C. (2012) 'Microbial xylanases: Engineering, production and industrial applications', *Biotechnology Advances*. Elsevier Inc., 30(6), pp. 1219–1227. doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.11.006.

Kamm, B. and Kamm, M. (2004) 'Principles of biorefineries', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64(2), pp. 137–145. doi: 10.1007/s00253-003-1537-7.

Kang, S. W. *et al.* (2004) 'Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass', *Bioresource Technology*, 91(2), pp. 153–156. doi: 10.1016/S0960-8524(03)00172-X.

Kar, S. *et al.* (2006) 'Production of cellulase-free xylanase by *Trichoderma reesei* SAF3', *Brazilian Journal of Microbiology*, 37(4), pp. 462–464. doi: 10.1590/S1517-83822006000400011.

Kashket, E. R. and Zhi-Yi Cao (1995) 'Clostridial strain degeneration', *FEMS Microbiology Reviews*, 17(3), pp. 307–315. doi: 10.1111/j.1574-6976.1995.tb00214.x.

- Kato, S. *et al.* (2004) 'Clostridium straminisolvans sp. nov., a moderately thermophilic, aerotolerant and cellulolytic bacterium isolated from a cellulose-degrading bacterial community', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(6), pp. 2043–2047. doi: 10.1099/ijms.0.63148-0.
- Kidby, D. K. and Davidson, D. J. (1973) 'Ferricyanide Estimation of Sugars in the Nanomole Range', *Analytical biochemistry*, 55, pp. 321–325.
- Kim, J. O. *et al.* (2000) 'Cloning and characterization of thermostable endoglucanase (Cel8Y) from the hyperthermophilic Aquifex aeolicus VF5', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 279(2), pp. 420–426. doi: 10.1006/bbrc.2000.3956.
- Klaubauf, S. *et al.* (2014) 'Similar is not the same: Differences in the function of the (hemi-)cellulolytic regulator XlnR (Xlr1/Xyr1) in filamentous fungi', *Fungal Genetics and Biology*. Elsevier Inc., 72, pp. 73–81. doi: 10.1016/j.fgb.2014.07.007.
- Konopka, M. C. *et al.* (2011) 'Respiration response imaging for real-time detection of microbial function at the single-cell level', *Applied and Environmental Microbiology*, 77(1), pp. 67–72. doi: 10.1128/AEM.01166-10.
- Krzyszowska, M. (2011) 'The cell wall in plant cell response to trace metals: Polysaccharide remodeling and its role in defense strategy', *Acta Physiologiae Plantarum*, 33(1), pp. 35–51. doi: 10.1007/s11738-010-0581-z.
- Kubicek, C. P. (2013) 'Systems biological approaches towards understanding cellulase production by *Trichoderma reesei*', *Journal of Biotechnology*. Elsevier B.V., 163(2), pp. 133–142. doi: 10.1016/j.jbiotec.2012.05.020.
- Kulkarni, N., Shendye, A. and Rao, M. (1999) 'Molecular and biotechnological aspects of xylanases', *FEMS Microbiology Reviews*, 23(4), pp. 411–456. doi: 10.1016/S0168-6445(99)00006-6.
- Kumar, D. *et al.* (2017) 'Xylanases and their industrial applications: A review', *Biochemical and Cellular Archives*, 17(1), pp. 353–360.
- Kumar, J. and Reetu, S. (2015) 'Lignocellulosic agriculture wastes as biomass feedstocks for second-generation bioethanol production : concepts and recent developments', pp. 337–353. doi: 10.1007/s13205-014-0246-5.

- Kumar, L. *et al.* (2014) ‘Immobilization of xylanase purified from *Bacillus pumilus* VLK-1 and its application in enrichment of orange and grape juices’, *J Food Sci Technol*, 51(9), pp. 1737–1749. doi: 10.1007/s13197-014-1268-z.
- Kumar, M., Campbell, L. and Turner, S. (2016) ‘Secondary cell walls: Biosynthesis and manipulation’, *Journal of Experimental Botany*, 67(2), pp. 515–531. doi: 10.1093/jxb/erv533.
- Kumar, N. and Pruthi, V. (2014) ‘Potential applications of ferulic acid from natural sources’, *Biotechnology Reports*. Elsevier B.V., 4(1), pp. 86–93. doi: 10.1016/j.btre.2014.09.002.
- Kumar, R., Singh, S. and Singh, O. V. (2008) ‘Bioconversion of lignocellulosic biomass: Biochemical and molecular perspectives’, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35(5), pp. 377–391. doi: 10.1007/s10295-008-0327-8.
- Kumar, V. and Shukla, P. (2018) ‘Extracellular xylanase production from *T. lanuginosus* VAPS24 at pilot scale and thermostability enhancement by immobilization’, *Process Biochemistry*. Elsevier, 71, pp. 53–60. doi: 10.1016/J.PROCBIO.2018.05.019.
- Kundra, S. *et al.* (2019) ‘Role of Dilution Rate and Nutrient Availability in the Formation of Microbial Biofilms’. doi: 10.3389/fmicb.2019.00916.
- Ladeira, S. A. *et al.* (2015) ‘Cellulase production by thermophilic *Bacillus* sp. SMIA-2 and its detergent compatibility’, *Electronic Journal of Biotechnology*. Elsevier B.V., 18(2), pp. 110–115. doi: 10.1016/j.ejbt.2014.12.008.
- Ladner, T. *et al.* (2017) *Application of Mini- and Micro-Bioreactors for Microbial Bioprocesses, Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Bioprocesses, Bioreactors and Controls*. Elsevier B.V. doi: 10.1016/B978-0-444-63663-8.00015-X.
- Lambert, G. and Kussel, E. (2014) ‘Memory and Fitness Optimization of Bacteria under Fluctuating Environments’, *PLoS Genetics*, 10(9). doi: 10.1371/journal.pgen.1004556.
- Larson, M. C. *et al.* (2012) ‘Calcium-Phosphate Microprecipitates Mimic Microparticles When Examined with Flow Cytometry’. doi: 10.1002/cyto.a.22222.
- Lawoko, M., Henriksson, G. and Gellerstedt, G. (2006) ‘Characterisation of lignin-carbohydrate complexes (LCCs) of spruce wood (*Picea abies* L.) isolated with two methods’, *Holzforschung*, 60(2), pp. 156–161. doi: 10.1515/HF.2006.025.
- Lee, D. H. *et al.* (2011) ‘Cumulative number of cell divisions as a meaningful timescale for

adaptive laboratory evolution of escherichia coli', *PLoS ONE*, 6(10), pp. 1–8. doi: 10.1371/journal.pone.0026172.

Leite, P. *et al.* (2021) 'Recent advances in production of lignocellulolytic enzymes by solid-state fermentation of agro-industrial wastes', *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*. Elsevier B.V., 27, p. 100407. doi: 10.1016/j.cogsc.2020.100407.

Lencastre Fernandes, R. *et al.* (2011) 'Experimental methods and modeling techniques for description of cell population heterogeneity', *Biotechnology Advances*. Elsevier Inc., 29(6), pp. 575–599. doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.03.007.

Leung, H. T. C. *et al.* (2016) 'Long-term effects of timber harvesting on hemicellulolytic microbial populations in coniferous forest soils', *ISME Journal*. Nature Publishing Group, 10(2), pp. 363–375. doi: 10.1038/ismej.2015.118.

Li, C. *et al.* (2015) 'Catalytic Transformation of Lignin for the Production of Chemicals and Fuels', *Chemical Reviews*, 115(21), pp. 11559–11624. doi: 10.1021/acs.chemrev.5b00155.

Liang, J. *et al.* (2021) 'Effect of substrate load on anaerobic fermentation of rice straw with rumen liquid as inoculum: Hydrolysis and acidogenesis efficiency, enzymatic activities and rumen bacterial community structure', *Waste Management*. Elsevier Ltd, 124, pp. 235–243. doi: 10.1016/j.wasman.2021.02.017.

Liem, L. K. *et al.* (1995) 'The patch clamp technique', *Neurosurgery*, 36(2), pp. 382–392. doi: 10.1227/00006123-199502000-00020.

Liu, G. *et al.* (2013) 'Development of highly efficient, low-cost lignocellulolytic enzyme systems in the post-genomic era', *Biotechnology Advances*. Elsevier Inc., 31(6), pp. 962–975. doi: 10.1016/j.biotechadv.2013.03.001.

Liu, G. and Qu, Y. (2019) 'Engineering of filamentous fungi for efficient conversion of lignocellulose: Tools, recent advances and prospects', *Biotechnology Advances*. Elsevier, 37(4), pp. 519–529. doi: 10.1016/j.biotechadv.2018.12.004.

Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. (2001) 'Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method', *Methods*, 25(4), pp. 402–408. doi: 10.1006/meth.2001.1262.

Loix, C. *et al.* (2017) 'Reciprocal Interactions between Cadmium-Induced Cell Wall Responses

and Oxidative Stress in Plants'. doi: 10.3389/fpls.2017.01867.

López-Mondéjar, R., Zühlke, D., Becher, D., *et al.* (2016) 'Cellulose and hemicellulose decomposition by forest soil bacteria proceeds by the action of structurally variable enzymatic systems', *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 6(February), pp. 1–12. doi: 10.1038/srep25279.

López-Mondéjar, R., Zühlke, D., Větrovský, T., *et al.* (2016) 'Decoding the complete arsenal for cellulose and hemicellulose deconstruction in the highly efficient cellulose decomposer *Paenibacillus* O199', *Biotechnology for Biofuels*. BioMed Central Ltd., 9(1). doi: 10.1186/S13068-016-0518-X.

Luidalepp, H. *et al.* (2011) 'Age of inoculum strongly influences persister frequency and can mask effects of mutations implicated in altered persistence', *Journal of Bacteriology*, 193(14), pp. 3598–3605. doi: 10.1128/JB.00085-11.

Maamar, H., Raj, A. and Dubnau, D. (2007) 'Noise in Gene Expression Determines Cell Fate in *Bacillus subtilis*', *Science*, 317(5837), pp. 526–529. doi: 10.1126/science.1140818.Noise.

De Maayer, P. *et al.* (2014) 'Comparative analysis of the *Geobacillus* hemicellulose utilization locus reveals a highly variable target for improved hemicellulolysis', *BMC Genomics*, 15(1), pp. 1–17. doi: 10.1186/1471-2164-15-836.

Maity, C. *et al.* (2012) 'Xylanase isozymes from the newly isolated bacillus sp. CKBx1D and optimization of its deinking potentiality', *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 167(5), pp. 1208–1219. doi: 10.1007/s12010-012-9556-4.

Malgas, S. *et al.* (2019) 'A mini review of xylanolytic enzymes with regards to their synergistic interactions during hetero - xylan degradation', *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. Springer Netherlands, 35(12), pp. 1–13. doi: 10.1007/s11274-019-2765-z.

Marion M. Bradford (1976) 'A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding', *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), pp. 248–254. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.

Martzy, R. *et al.* (2021) 'The phenomenon of degeneration of industrial *Trichoderma reesei* strains', *Biotechnology for Biofuels*. BioMed Central, 14(1), pp. 1–14. doi: 10.1186/s13068-021-02043-4.

- McCann, M. C. and Carpita, N. C. (2015) 'Biomass recalcitrance: A multi-scale, multi-factor, and conversion-specific property', *Journal of Experimental Botany*, 66(14), pp. 4109–4118. doi: 10.1093/jxb/erv267.
- Mielich-Süss, B. and Lopez, D. (2015) 'Molecular mechanisms involved in *Bacillus subtilis* biofilm formation', *Environmental Microbiology*, 17(3), p. 555-. doi: 10.1111/1462-2920.12527.
- Mohnen, D. (2008) 'Pectin structure and biosynthesis', *Current Opinion in Plant Biology*, 11(3), pp. 266–277. doi: 10.1016/j.pbi.2008.03.006.
- Moreau, C. *et al.* (2019) 'Lytic polysaccharide monooxygenases (LPMOs) facilitate cellulose nanofibrils production', *Biotechnology for Biofuels*. BioMed Central, 12(1), pp. 13–17. doi: 10.1186/s13068-019-1501-0.
- Motta, F. L., Andrade, C. C. P. and Santana, M. H. A. (2013) 'A Review of Xylanase Production by the Fermentation of Xylan: Classification, Characterization and Applications', *Sustainable Degradation of lignocellulosic Biomass Techniques Applications and Commercialization*, i(tourism), pp. 251–275.
- Müller, S. and Nebe-Von-Caron, G. (2010) 'Functional single-cell analyses: Flow cytometry and cell sorting of microbial populations and communities', *FEMS Microbiology Reviews*, 34(4), pp. 554–587. doi: 10.1111/j.1574-6976.2010.00214.x.
- Naik, S. N. *et al.* (2010) 'Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review', *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. doi: 10.1016/j.rser.2009.10.003.
- Narbel, P. A. and Hansen, J. P. (2014) 'Estimating the cost of future global energy supply', *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 34(March), pp. 91–97. doi: 10.1016/j.rser.2014.03.011.
- Nguyen, S. T. C. *et al.* (2018) 'Function, distribution, and annotation of characterized cellulases, xylanases, and chitinases from CAZy', *Applied Microbiology and Biotechnology*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(4), pp. 1629–1637. doi: 10.1007/s00253-018-8778-y.
- Nguyen, T. M. *et al.* (2021) 'Reducing phenotypic instabilities of a microbial population during continuous cultivation based on cell switching dynamics', *Biotechnology and Bioengineering*, 118(10), pp. 3847–3859. doi: 10.1002/bit.27860.

- Nishiyama, Y. *et al.* (2003) ‘Crystal Structure and Hydrogen Bonding System in Cellulose Ia from Synchrotron X-ray and Neutron Fiber Diffraction’, *Journal of the American Chemical Society*, 125(47), pp. 14300–14306. doi: 10.1021/ja037055w.
- Nusairat, B. and Wang, J. J. (2021) ‘The Effect of a Modified GH11 Xylanase on Live Performance, Gut Health, and *Clostridium perfringens* Excretion of Broilers Fed Corn-Soy Diets’, *Frontiers in Veterinary Science*, 8(June), pp. 1–7. doi: 10.3389/fvets.2021.678536.
- Ostafe, R. *et al.* (2013) ‘Flow cytometry-based ultra-high-throughput screening assay for cellulase activity’, *Analytical Biochemistry*, 435(1), pp. 93–98. doi: 10.1016/j.ab.2012.10.043.
- Paës, G. and O’Donohue, M. J. (2006) ‘Engineering increased thermostability in the thermostable GH-11 xylanase from *Thermobacillus xylanilyticus*’, *Journal of Biotechnology*, 125(3), pp. 338–350. doi: 10.1016/j.jbiotec.2006.03.025.
- Palin, R. and Geitmann, A. (2012) ‘The role of pectin in plant morphogenesis’, *BioSystems*. Elsevier Ireland Ltd, 109(3), pp. 397–402. doi: 10.1016/j.biosystems.2012.04.006.
- Pan, X., Gilkes, N. and Saddler, J. N. (2006) ‘Effect of acetyl groups on enzymatic hydrolysis of cellulosic substrates’, *Holzforschung*, 60(4), pp. 398–401. doi: 10.1515/HF.2006.062.
- Pandya, J. J. and Gupte, A. (2012) ‘Production of xylanase under solid-state fermentation by *Aspergillus tubingensis* JP-1 and its application’, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 35(5), pp. 769–779. doi: 10.1007/s00449-011-0657-1.
- Patyshakuliyeva, A. *et al.* (2016) ‘Improving cellulase production by *Aspergillus niger* using adaptive evolution’, *Biotechnology Letters*. Springer Netherlands, 38(6), pp. 969–974. doi: 10.1007/s10529-016-2060-0.
- Pawar, P. M. A. *et al.* (2013) ‘Acetylation of woody lignocellulose: Significance and regulation’, *Frontiers in Plant Science*, 4(MAY), pp. 1–8. doi: 10.3389/fpls.2013.00118.
- Peng, F. *et al.* (2011) ‘Chemicals from hemicelluloses: A review’, *ACS Symposium Series*, 1067, pp. 219–259. doi: 10.1021/bk-2011-1067.ch009.
- Peng, M. and Liang, Z. (2020) ‘Degeneration of industrial bacteria caused by genetic instability’, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. Springer Netherlands, 36(8), pp. 1–16. doi: 10.1007/s11274-020-02901-7.
- Pereira, C. S. *et al.* (2017) ‘Effects of Xylan Side-Chain Substitutions on Xylan-Cellulose

Interactions and Implications for Thermal Pretreatment of Cellulosic Biomass’, *Biomacromolecules*, 18(4), pp. 1311–1321. doi: 10.1021/acs.biomac.7b00067.

Pérez, J. *et al.* (2002) ‘Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: An overview’, *International Microbiology*, 5(2), pp. 53–63. doi: 10.1007/s10123-002-0062-3.

Perkins, T. J. and Swain, P. S. (2009) ‘Strategies for cellular decision-making’, *Molecular Systems Biology*. Nature Publishing Group, 5(326), pp. 1–15. doi: 10.1038/msb.2009.83.

Portnoy, V. A., Bezdan, D. and Zengler, K. (2011) ‘Adaptive laboratory evolution-harnessing the power of biology for metabolic engineering’, *Current Opinion in Biotechnology*. Elsevier Ltd, 22, pp. 590–594. doi: 10.1016/j.copbio.2011.03.007.

Qaseem, M. F., Shaheen, H. and Wu, A. M. (2021) ‘Cell wall hemicellulose for sustainable industrial utilization’, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. Elsevier Ltd, 144(March), p. 110996. doi: 10.1016/j.rser.2021.110996.

Qeshmi, F. I. *et al.* (2020) ‘Xylanases from marine microorganisms: A brief overview on scope, sources, features and potential applications’, *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*. Elsevier B.V, 1868(2), p. 140312. doi: 10.1016/j.bbapap.2019.140312.

Quan, S. *et al.* (2012) ‘Adaptive evolution of the lactose utilization network in experimentally evolved populations of *Escherichia coli*’, *PLoS Genetics*, 8(1), pp. 17–22. doi: 10.1371/journal.pgen.1002444.

Rafieenia, R., Atkinson, E. and Ledesma-Amaro, R. (2022) ‘Division of labor for substrate utilization in natural and synthetic microbial communities’, *Current Opinion in Biotechnology*. Elsevier Ltd, 75, p. 102706. doi: 10.1016/j.copbio.2022.102706.

Rakotoarivonina, H. *et al.* (2011) ‘A thermostable feruloyl-esterase from the hemicellulolytic bacterium *Thermobacillus xylanilyticus* releases phenolic acids from non-pretreated plant cell walls’, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90(2), pp. 541–552. doi: 10.1007/s00253-011-3103-z.

Rakotoarivonina, H. *et al.* (2012) ‘The hemicellulolytic enzyme arsenal of *Thermobacillus xylanilyticus* depends on the composition of biomass used for growth’, *Microbial Cell Factories*, 11, pp. 1–12. doi: 10.1186/1475-2859-11-159.

- Rakotoarivonina, H. *et al.* (2014) ‘Dynamic study of how the bacterial breakdown of plant cell walls allows the reconstitution of efficient hemicellulasic cocktails’, *Bioresource Technology*. Elsevier Ltd, 170, pp. 331–341. doi: 10.1016/j.biortech.2014.07.097.
- Rakotoarivonina, H. *et al.* (2016) ‘The use of thermostable bacterial hemicellulases improves the conversion of lignocellulosic biomass to valuable molecules’, *Applied microbiology and biotechnology*. doi: 10.1007/s00253-016-7562-0.
- Rakotoarivonina, H. *et al.* (2022) ‘Draft Genome Sequence of the Lignocellulolytic and Thermophilic Bacterium *Thermobacillus xylanilyticus* XE’, *Microbiology Resource Announcements*. American Society for Microbiology.
- Ralph, J. *et al.* (2004) ‘Lignins: Natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenylpropanoids’, *Phytochemistry Reviews*, 3(1–2), pp. 29–60. doi: 10.1023/B:PHYT.0000047809.65444.a4.
- Ralph, J., Brunow, G. and Boerjan, W. (2007) ‘Lignins’, *Encyclopedia of Life Sciences*, pp. 1–10. doi: 10.1002/9780470015902.a0020104.
- Ralph, J., Grabber, J. H. and Hatfield, R. D. (1995) ‘Lignin-ferulate cross-links in grasses: active incorporation of ferulate polysaccharide esters into ryegrass lignins’, *Carbohydrate Research*, 275(1), pp. 167–178. doi: 10.1016/0008-6215(95)00237-N.
- Ramanjaneyulu, A. S. G. and Devi, P. S. (2017) ‘Biobleaching of paper pulp with xylanase produced by *Trichoderma asperellum*’, *3 Biotech*. Springer Berlin Heidelberg, 7(4), pp. 1–9. doi: 10.1007/s13205-017-0898-z.
- Raud, M. *et al.* (2019) ‘Potentials and challenges in lignocellulosic biofuel production technology’, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. Elsevier Ltd, 111(July 2018), pp. 44–56. doi: 10.1016/j.rser.2019.05.020.
- Raveendran, S. *et al.* (2018) ‘Applications of microbial enzymes in food industry’, *Food Technology and Biotechnology*, 56(1), pp. 16–30. doi: 10.17113/ftb.56.01.18.5491.
- Reggeti, F. and Bienzle, D. (2011) ‘Flow cytometry in veterinary oncology’, *Veterinary Pathology*, 48(1), pp. 223–235. doi: 10.1177/0300985810379435.
- Rémond, C. *et al.* (2010) ‘Combination of ammonia and xylanase pretreatments: Impact on enzymatic xylan and cellulose recovery from wheat straw’, *Bioresource Technology*. Elsevier,

101(17), pp. 6712–6717. doi: 10.1016/J.BIORTECH.2010.03.115.

Rennie, E. A. and Scheller, H. V. (2014) ‘Xylan biosynthesis’, *Current Opinion in Biotechnology*. Elsevier Ltd, 26, pp. 100–107. doi: 10.1016/j.copbio.2013.11.013.

Reusser, F. (1963) ‘Stability and Degeneration of Microbial Cultures on Repeated Transfer’, *Advances in Applied Microbiology*. Academic Press, 5(C), pp. 189–215. doi: 10.1016/S0065-2164(08)70011-X.

Ríos-Ríos, K. L. *et al.* (2021) ‘Enzymatic Production of Xylo-oligosaccharides from Destarched Wheat Bran and the Impact of Their Degree of Polymerization and Substituents on Their Utilization as a Carbon Source by Probiotic Bacteria’, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(44), pp. 13217–13226. doi: 10.1021/acs.jafc.1c02888.

Rodionova, M. V. *et al.* (2022) ‘A comprehensive review on lignocellulosic biomass biorefinery for sustainable biofuel production’, *International Journal of Hydrogen Energy*. Hydrogen Energy Publications LLC, 47(3), pp. 1481–1498. doi: 10.1016/j.ijhydene.2021.10.122.

Roell, G. W. *et al.* (2019) ‘Engineering microbial consortia by division of labor’, *Microbial Cell Factories*. BioMed Central, 18(1), pp. 1–11. doi: 10.1186/s12934-019-1083-3.

Rojas, L. F., Zapata, P. and Ruiz-Tirado, L. (2022) ‘Agro-industrial waste enzymes: Perspectives in circular economy’, *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*. Elsevier B.V., 34, p. 100585. doi: 10.1016/j.cogsc.2021.100585.

Romero, J. *et al.* (2016) ‘Improving the performance of dairy cattle with a xylanase-rich exogenous enzyme preparation’, *Journal of Dairy Science*. doi: 10.3168/jds.2015-10082.

Saini, S. and Sharma, K. K. (2021) ‘Fungal lignocellulolytic enzymes and lignocellulose: A critical review on their contribution to multiproduct biorefinery and global biofuel research’, *International Journal of Biological Macromolecules*. Elsevier B.V., 193(PB), pp. 2304–2319. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.11.063.

Samain, E. *et al.* (1992) ‘Isolation of a thermophilic bacterium producing high levels of xylanase’, in *Xylans and Xylanases, Progress in Biotechnology*. Elsevier, pp. 467–470.

Samain, E., Debeire, P. and Touzel, J. P. (1997) ‘High level production of a cellulase-free xylanase in glucose-limited fed batch cultures of a thermophilic *Bacillus* strain’, *Journal of*

Biotechnology. doi: 10.1016/S0168-1656(97)00140-5.

Sampaio, N. M. V. and Dunlop, M. J. (2020) 'Functional roles of microbial cell-to-cell heterogeneity and emerging technologies for analysis and control', *Current Opinion in Microbiology*. Elsevier Ltd, 57, pp. 87–94. doi: 10.1016/j.mib.2020.08.002.

Sánchez, Ó. J. and Cardona, C. A. (2008) 'Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks', *Bioresource Technology*, 99(13), pp. 5270–5295. doi: 10.1016/j.biortech.2007.11.013.

Sandberg, T. E. *et al.* (2019) 'The emergence of adaptive laboratory evolution as an efficient tool for biological discovery and industrial biotechnology', *Metabolic Engineering*. International Metabolic Engineering Society, 56, pp. 1–16. doi: 10.1016/j.ymben.2019.08.004.

Sandra, M. and Laura, L. (2015) 'Production of lignocellulolytic enzymes from three white-rot fungi by solid-state fermentation and mathematical modeling', *African Journal of Biotechnology*, 14(15), pp. 1304–1317. doi: 10.5897/ajb2014.14331.

Sassi, H. *et al.* (2019) 'Segregostat: a novel concept to control phenotypic diversification dynamics on the example of Gram-negative bacteria', *Microbial Biotechnology*, 12(5), pp. 1064–1075. doi: 10.1111/1751-7915.13442.

Scheller, H. V. and Ulvskov, P. (2010) 'Hemicelluloses', *Annual Review of Plant Biology*, 61, pp. 263–289. doi: 10.1146/annurev-arplant-042809-112315.

Schoumans, J. *et al.* (2010) 'Whole Genome Sequencing', *Methods in Molecular Biology*, 628(1), pp. 53–73. doi: 10.1007/978-1-60327-367-1.

Schroeder, J. W. *et al.* (2018) 'Sources of spontaneous mutagenesis in bacteria', *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. Informa Healthcare USA, Inc, 53(1), pp. 29–48. doi: 10.1080/10409238.2017.1394262.

Schuster, K. C., Urlaub, E. and Gapes, J. R. (2000) 'Single-cell analysis of bacteria by Raman microscopy: Spectral information on the chemical composition of cells and on the heterogeneity in a culture', *Journal of Microbiological Methods*, 42(1), pp. 29–38. doi: 10.1016/S0167-7012(00)00169-X.

Schuster, S. *et al.* (2010) 'Cooperation and cheating in microbial exoenzyme production - Theoretical analysis for biotechnological applications', *Biotechnology Journal*, 5(7), pp. 751–

758. doi: 10.1002/biot.200900303.

Schwenk, K. and Wagner, G. P. (2001) 'Function and the evolution of phenotypic stability: Connecting pattern to process', *American Zoologist*, 41(3), pp. 552–563. doi: 10.1093/icb/41.3.552.

Sethi, S. *et al.* (2013) 'Optimization of Cellulase Production from Bacteria Isolated from Soil', *ISRN Biotechnology*, 2013, pp. 1–7. doi: 10.5402/2013/985685.

Sharma, A., Adhikari, S. and Satyanarayana, T. (2007) 'Alkali-thermostable and cellulase-free xylanase production by an extreme thermophile *Geobacillus thermoleovorans*', *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(4), pp. 483–490. doi: 10.1007/s11274-006-9250-1.

Shi, J. *et al.* (2015) 'Enzymatic conversion of carbon dioxide', *Chem. Soc. Rev.* doi: 10.1039/C5CS00182J.

Shi, L. *et al.* (2007) 'Limits of propidium iodide as a cell viability indicator for environmental bacteria', *Cytometry Part A*, 71(8), pp. 592–598. doi: 10.1002/cyto.a.20402.

Showalter, A. M. (1993) 'Structure and function of plant cell wall proteins', *Plant Cell*, 5(1), pp. 9–23. doi: 10.1105/tpc.5.1.9.

Shulami, S. *et al.* (2007) 'A two-component system regulates the expression of an ABC transporter for xylo-oligosaccharides in *Geobacillus stearothermophilus*', *Applied and Environmental Microbiology*, 73(3), pp. 874–884. doi: 10.1128/AEM.02367-06.

da Silva, R. N., Melo, L. F. de A. and Luna Finkler, C. L. (2021) 'Optimization of the cultivation conditions of *Bacillus licheniformis* BCLLNf-01 for cellulase production', *Biotechnology Reports*, 29. doi: 10.1016/j.btre.2021.e00599.

Simen, J. D. *et al.* (2017) 'Transcriptional response of *Escherichia coli* to ammonia and glucose fluctuations', *Microbial Biotechnology*, 10(4), pp. 858–872. doi: 10.1111/1751-7915.12713.

Singh, A. *et al.* (2019) 'The enzyme biorefinery platform for advanced biofuels production', *Bioresource Technology Reports*. Elsevier, 7(June), p. 100257. doi: 10.1016/j.biteb.2019.100257.

Smith, P. and Schuster, M. (2019) 'Public goods and cheating in microbes', *Current Biology*. Elsevier, 29(11), pp. R442–R447. doi: 10.1016/j.cub.2019.03.001.

- Smits, W. K., Kuipers, O. P. and Veening, J. W. (2006) 'Phenotypic variation in bacteria: The role of feedback regulation', *Nature Reviews Microbiology*, 4(4), pp. 259–271. doi: 10.1038/nrmicro1381.
- Solopova, A. *et al.* (2014) 'Bet-hedging during bacterial diauxic shift', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(20), pp. 7427–7432. doi: 10.1073/pnas.1320063111.
- Somerville, C. *et al.* (2004) 'Toward a systems approach to understanding plant cell walls', *Science*, 306(5705), pp. 2206–2211. doi: 10.1126/science.1102765.
- Srivastava, N. *et al.* (2018) 'Applications of fungal cellulases in biofuel production: Advances and limitations', *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. Elsevier Ltd, 82(August 2017), pp. 2379–2386. doi: 10.1016/j.rser.2017.08.074.
- Strassmann, J. E. and Queller, D. C. (2011) 'Evolution of cooperation and control of cheating in a social microbe', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(SUPPL. 2), pp. 10855–10862. doi: 10.1073/pnas.1102451108.
- Subramanian, S. and Prema, P. (2000) 'Cellulase-free xylanases from *Bacillus* and other microorganisms', *FEMS Microbiology Letters*, 183(1), pp. 1–7. doi: 10.1016/S0378-1097(99)00620-5.
- Subramanian, S. and Prema, P. (2002) 'Biotechnology of microbial xylanases: Enzymology, molecular biology, and application', *Critical Reviews in Biotechnology*, 22(1), pp. 33–64. doi: 10.1080/07388550290789450.
- Sunna, A. and Antranikian, G. (1997) 'Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria', *Critical Reviews in Biotechnology*, 17(1), pp. 39–67. doi: 10.3109/07388559709146606.
- Swain, P. S., Elowitz, M. B. and Siggia, E. D. (2002) 'Intrinsic and extrinsic contributions to stochasticity in gene expression', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(20), pp. 12795–12800. doi: 10.1073/pnas.162041399.
- Takkellapati, S., Li, T. and Gonzalez, M. A. (2018) 'An overview of biorefinery-derived platform chemicals from a cellulose and hemicellulose biorefinery', *Clean Technologies and Environmental Policy*. Springer Berlin Heidelberg, 20(7), pp. 1615–1630. doi: 10.1007/s10098-018-1568-5.

- Täuber, S. *et al.* (2020) 'DMSCC: A microfluidic platform for microbial single-cell cultivation of: *Corynebacterium glutamicum* under dynamic environmental medium conditions', *Lab on a Chip*. Royal Society of Chemistry, 20(23), pp. 4442–4455. doi: 10.1039/d0lc00711k.
- Thapa, S. *et al.* (2020) 'Microbial cellulolytic enzymes: diversity and biotechnology with reference to lignocellulosic biomass degradation', *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*. Springer Netherlands, 19(3), pp. 621–648. doi: 10.1007/s11157-020-09536-y.
- Thronsdet, W. *et al.* (2010) 'Flow cytometric sorting of the filamentous fungus *Trichoderma reesei* for improved strains', *Enzyme and Microbial Technology*. Elsevier Inc., 47(7), pp. 335–341. doi: 10.1016/j.enzmictec.2010.09.003.
- Timell, T. E. (1967) 'Recent progress in the chemistry of wood hemicelluloses', *Wood Science and Technology*, 1, pp. 45–70.
- Tobimatsu, Y. and Schuetz, M. (2019) 'Lignin polymerization: how do plants manage the chemistry so well?', *Current Opinion in Biotechnology*. Elsevier Ltd, 56, pp. 75–81. doi: 10.1016/j.copbio.2018.10.001.
- Touzel, J. P. *et al.* (2000) 'Thermobacillus xylanilyticus gen. nov., sp. nov., a new aerobic thermophilic xylan-degrading bacterium isolated from farm soil', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. doi: 10.1099/00207713-50-1-315.
- Tracy, B. P., Gaida, S. M. and Papoutsakis, E. T. (2008) 'Development and application of flow-cytometric techniques for analyzing and sorting endospore-forming clostridia', *Applied and Environmental Microbiology*, 74(24), pp. 7497–7506. doi: 10.1128/AEM.01626-08.
- Tremblay, P. L. *et al.* (2011) 'A c-type cytochrome and a transcriptional regulator responsible for enhanced extracellular electron transfer in *Geobacter sulfurreducens* revealed by adaptive evolution', *Environmental Microbiology*, 13(1), pp. 13–23. doi: 10.1111/j.1462-2920.2010.02302.x.
- Turner, P., Mamo, G. and Karlsson, E. N. (2007) 'Potential and utilization of thermophiles and thermostable enzymes in biorefining', *Microbial Cell Factories*, 6, pp. 1–23. doi: 10.1186/1475-2859-6-9.
- Ubando, A. T., Felix, C. B. and Chen, W. H. (2020) 'Biorefineries in circular bioeconomy: A comprehensive review', *Bioresource Technology*. Elsevier Ltd, 299, p. 122585. doi: 10.1016/j.biortech.2019.122585.

- Ulber, R., Frerichs, J. G. and Beutel, S. (2003) 'Optical sensor systems for bioprocess monitoring', *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 376(3), pp. 342–348. doi: 10.1007/s00216-003-1930-1.
- Vanholme, R. *et al.* (2010) 'Lignin biosynthesis and structure', *Plant Physiology*, 153(3), pp. 895–905. doi: 10.1104/pp.110.155119.
- Vanholme, R. *et al.* (2012) 'Metabolic engineering of novel lignin in biomass crops', *New Phytologist*, 196(4), pp. 978–1000. doi: 10.1111/j.1469-8137.2012.04337.x.
- Veening, J. W. *et al.* (2008) 'Bet-hedging and epigenetic inheritance in bacterial cell development', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(11), pp. 4393–4398. doi: 10.1073/pnas.0700463105.
- Velicer, G. J. (2003) 'Social strife in the microbial world', *Trends in Microbiology*, 11(7), pp. 330–337. doi: 10.1016/S0966-842X(03)00152-5.
- Ventorino, V. *et al.* (2015) 'Exploring the microbiota dynamics related to vegetable biomasses degradation and study of lignocellulose-degrading bacteria for industrial biotechnological application', *Scientific Reports*, 5(8161), pp. 1–13. doi: 10.1038/srep08161.
- Viikari, L. *et al.* (2007) 'Thermostable Enzymes in Lignocellulose Hydrolysis', *Adv Biochem Engin/Biotechnol*, 108, pp. 121–145. doi: 10.1007/10_2007_065.
- Vlamakis, H. *et al.* (2013) 'Sticking together: building a biofilm the *Bacillus subtilis* way', *Nature Reviews Microbiology*. Nature Publishing Group, 11(3), pp. 157–168. doi: 10.1038/nrmicro2960.
- Vulić, M. and Kolter, R. (2001) 'Evolutionary cheating in *Escherichia coli* stationary phase cultures', *Genetics*, 158(2), pp. 519–526. doi: 10.1093/genetics/158.2.519.
- Waeonukul, R. *et al.* (2008) 'Effect of Carbon Sources on the Induction of Xylanolytic-Cellulolytic Multienzyme Complexes in *Paenibacillus curdlanolyticus* Strain B-6', *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. doi: 10.1271/bbb.70333.
- Wan, C. and Li, Y. (2012) 'Fungal pretreatment of lignocellulosic biomass', *Biotechnology Advances*. Elsevier, 30(6), pp. 1447–1457. doi: 10.1016/J.BIOTECHADV.2012.03.003.
- Watanabe, K. *et al.* (2007) 'Thermobacillus composti sp. nov., a moderately thermophilic bacterium isolated from a composting reactor', *International Journal of Systematic and*

Evolutionary Microbiology. doi: 10.1099/ijs.0.64672-0.

Wechsler, T., Kümmerli, R. and Dobay, A. (2019) 'Understanding policing as a mechanism of cheater control in cooperating bacteria', *Journal of Evolutionary Biology*, 32(5), pp. 412–424. doi: 10.1111/jeb.13423.

Wehr, J. B., Menzies, N. W. and Blamey, F. P. C. (2004) 'Inhibition of cell-wall autolysis and pectin degradation by cations', *Plant Physiology and Biochemistry*, 42(6), pp. 485–492. doi: 10.1016/j.plaphy.2004.05.006.

Whitesides, G. M. (2006) 'The origins and the future of microfluidics', *Nature*, 442(7101), pp. 368–373. doi: 10.1038/nature05058.

Wilhelm, R. C. *et al.* (2019) 'Bacterial contributions to delignification and lignocellulose degradation in forest soils with metagenomic and quantitative stable isotope probing', *ISME Journal*. Springer US, 13(2), pp. 413–429. doi: 10.1038/s41396-018-0279-6.

Wolf, D. M. *et al.* (2008) 'Memory in microbes: Quantifying history-dependent behavior in a bacterium', *PLoS ONE*. doi: 10.1371/journal.pone.0001700.

Woo, H. L. *et al.* (2014) 'Enzyme activities of aerobic lignocellulolytic bacteria isolated from wet tropical forest soils', *Systematic and Applied Microbiology*. Elsevier GmbH., 37(1), pp. 60–67. doi: 10.1016/j.syapm.2013.10.001.

Wright, N. R. *et al.* (2020) 'Fluctuations in glucose availability prevent global proteome changes and physiological transition during prolonged chemostat cultivations of *Saccharomyces cerevisiae*', *Biotechnology and Bioengineering*, 117(7), pp. 2074–2088. doi: 10.1002/bit.27353.

Yeoman, C. J. *et al.* (2010) 'Thermostable Enzymes as Biocatalysts in the Biofuel Industry', *Advances in Applied Microbiology*. Academic Press Inc., 70, pp. 1–55. doi: 10.1016/S0065-2164(10)70001-0.

Yin, H. and Marshall, D. (2012) 'Microfluidics for single cell analysis', *Current Opinion in Biotechnology*, 23(1), pp. 110–119. doi: 10.1016/j.copbio.2011.11.002.

York, W. S. and O'Neill, M. A. (2008) 'Biochemical control of xylan biosynthesis - which end is up?', *Current Opinion in Plant Biology*, 11(3), pp. 258–265. doi: 10.1016/j.pbi.2008.02.007.

Yuan, K. *et al.* (2019) 'Combining metabolic flux analysis and adaptive evolution to enhance

lipase production in *Bacillus subtilis*', *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. Springer International Publishing, 46(8), pp. 1091–1101. doi: 10.1007/s10295-019-02205-2.

Zamil, M. S. and Geitmann, A. (2017) 'The middle lamella - More than a glue', *Physical Biology*. IOP Publishing, 14(1). doi: 10.1088/1478-3975/aa5ba5.

Zenobi, R. (2013) 'Single-cell metabolomics: Analytical and biological perspectives', *Science*. doi: 10.1126/science.1243259.

Zhang, L. *et al.* (2014) 'Effects of xylanase supplementation on growth performance, nutrient digestibility and non-starch polysaccharide degradation in different sections of the gastrointestinal tract of broilers fed wheat-Based diets', *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 27(6), pp. 855–861. doi: 10.5713/ajas.2014.14006.

Zhang, X., Yang, W. and Blasiak, W. (2011) 'Modeling study of woody biomass: Interactions of cellulose, hemicellulose, and lignin', *Energy and Fuels*, 25(10), pp. 4786–4795. doi: 10.1021/ef201097d.

Zheng, Y. *et al.* (2014) 'Pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biogas production', *Progress in Energy and Combustion Science*. Elsevier Ltd, 42(1), pp. 35–53. doi: 10.1016/j.peccs.2014.01.001.

Zhong, R., Cui, D. and Ye, Z. H. (2019) 'Secondary cell wall biosynthesis', *New Phytologist*, 221(4), pp. 1703–1723. doi: 10.1111/nph.15537.

Zhong, R. and Ye, Z. H. (2015) 'Secondary cell walls: Biosynthesis, patterned deposition and transcriptional regulation', *Plant and Cell Physiology*, 56(2), pp. 195–214. doi: 10.1093/pcp/pcu140.

Znameroski, E. A. and Glass, N. L. (2013) 'Using a model filamentous fungus to unravel mechanisms of lignocellulose deconstruction', *Biotechnology for Biofuels*, 6(1). doi: 10.1186/1754-6834-6-6.

Zoghalmi, A. and Paës, G. (2019) 'Lignocellulosic Biomass: Understanding Recalcitrance and Predicting Hydrolysis', *Frontiers in Chemistry*, 7(December). doi: 10.3389/fchem.2019.00874.

ANNEXES

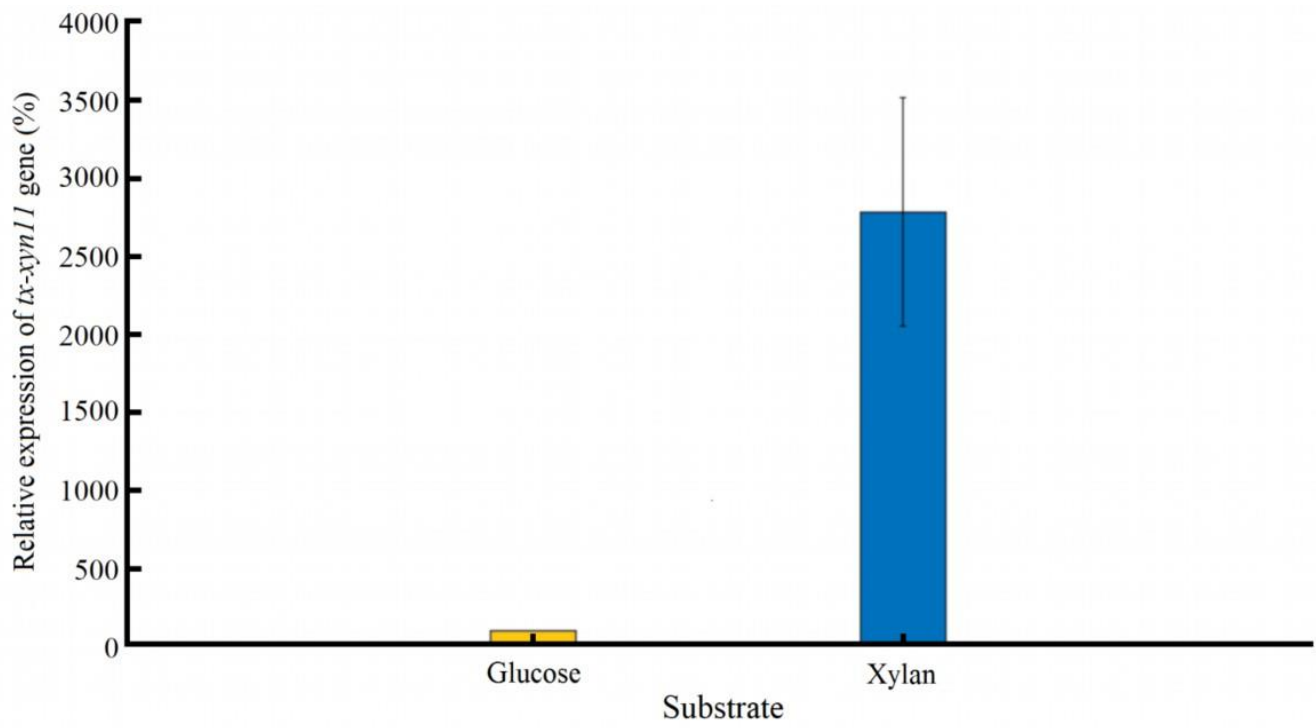
TABLE DES ANNEXES

Annexe 1 : Figure S1 – Comparaison des niveaux d’expression du gène *tx-xyn11* entre des cultures réalisées avec du glucose et du xylane..... 243

Annexe 2 : Table S1 – Evolution de la croissance relative et de l’activité xylanase relative au cours des générations lors de cultures successives avec du xylane comme source de carbone..... 244

Annexe 3 : Table S2 – Evolution de la croissance relative et de l’activité xylanase relative au cours des générations lors de cultures successives avec du glucose comme source de carbone et une transition vers le xylane lors de la mesure d’activité enzymatique..... 245

Annexe 1 : Figure S1 – Comparaison des niveaux d'expression du gène *tx-xyn11* entre des cultures réalisées avec du glucose et du xylane



Annexe 2 : Table S1 – Evolution de la croissance relative et de l'activité xylanase relative au cours des générations lors de cultures successives avec du xylane comme source de carbone.

Nombre de générations	Activité enzymatique xylanase (UI/mg) –	Activité xylanase relative* (%)	Taux maximal de croissance (h ⁻¹) –	Taux de croissance relatif* (%)
	Moyenne ± écarts-types		Moyenne ± écarts-types	
0	141,36 ± 7,77	100	0,72 ± 0,12	100
23,5	19,99 ± 4,60	14	0,95 ± 0,08	132
50,8	35,40 ± 10,92	25	1,02 ± 0,05	142
80,3	38,51 ± 11,78	27	0,97 ± 0,03	134
107,7	18,51 ± 4,54	13	0,96 ± 0,06	133

* Les valeurs relatives ont été calculées en rapportant les valeurs moyennes d'une génération spécifique par les valeurs moyennes au début des cultures et exprimées en pourcentage d'activité ou de taux de croissance.

Annexe 3 : Table S2 – Evolution de la croissance relative et de l'activité xylanase relative au cours des générations lors de cultures successives avec du glucose comme source de carbone et une transition vers le xylane lors de la mesure d'activité enzymatique.

Nombre de générations	Activité enzymatique xylanase (UI/mg) – Moyenne ± écarts-types	Activité xylanase relative* (%)	Taux maximal de croissance (h ⁻¹) – Moyenne ± écarts-types	Taux de croissance relatif* (%)
	0	217,07 ± 84,20	100	0,87 ± 0,05
23,9	196,48 ± 38,31	91	0,63 ± 0,05	72
42,7	346,99 ± 47,07	160	0,68 ± 0,11	78
62,9	260,62 ± 56,87	120	0,61 ± 0,14	69
79,9	288,55 ± 10,70	133	0,80 ± 0,14	91

* Les valeurs relatives ont été calculées en rapportant les valeurs moyennes d'une génération spécifique par les valeurs moyennes au début des cultures et exprimées en pourcentage d'activité ou de taux de croissance.

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Organisation de la paroi cellulaire végétale. A : Arrangement spatial schématisé des différentes couches de la paroi végétale cellulaire ; B : Composition et arrangement des différents polymères dans les parois végétales (tiré de Loix et al., 2017).....	18
Figure 2 : Structure de certaines hémicelluloses avec les différents oses constitutifs (tirée de Scheller & Ulvskov, 2010).....	21
Figure 3 : Structure et composition généralisées des xylanes chez les dicotylédones et les graminées (tirée de Rennie & Scheller, 2014).....	23
Figure 4 : Structure des pectines (tirée de Harholt et al., 2010).	24
Figure 5 : Chaînes de cellulose adjacentes présentant des liaisons H intra et intermoléculaires (tiré de Hatfield, 1993).	26
Figure 6 : Différents enzymes nécessaires à l'hydrolyse des xylanes (et familles de GH auxquelles elles appartiennent) ainsi que leurs actions au niveau de différents sites des xylanes (adapté de Dodd and Cann, 2009 avec les familles d'enzymes mis à jour avec le site http://www.cazy.org/ consulté en mai 2022).	33
Figure 7 : Mécanismes d'hydrolyse des xylanes par rétention (A) et inversion (B) (tiré de Collins et al., 2005).	34
Figure 8 : Valorisation du xylose en différents produits à valeur ajoutée et microorganismes (bactéries, levures et champignons) nécessaires à la conversion vers ces produits (tiré de Qaseem, Shaheen, & Wu, 2021).	38
Figure 9 : Niches écologiques des bactéries lignocellulolytiques et espèces trouvées dans ces différentes niches (Adapté de Thapa et al., 2020).....	43
Figure 10 : Morphologie de <i>Thermobacillus xylanilyticus</i> observée par microscopie optique et électronique à balayage (Barre = 10 µm pour les images de microscopie optique et 1 µm pour les images de microscopie électronique à balayage). A : Cellules à l'état végétatif ; B : Cellules en cours de sporulation ; C : Cellules en	

phase de croissance exponentielle tardive affichant des sporanges gonflés. (Tiré de Touzel et al., 2000).	51
Figure 11: Lien entre le nombre de mutations et la notion de <i>fitness</i> . A : Évolution du <i>fitness</i> et du nombre de mutations en fonction du nombre de générations ; B : Différents types de mutations rencontrées en optimisation de souches par cultures successives (tiré de Dragosits & Mattanovich, 2013). ..	57
Figure 12 : Illustration des sources d'hétérogénéité extrinsèque et intrinsèque et des facteurs les influençant (tiré de Heins & Weuster-Botz, 2018).	63
Figure 13 : Gradients présents dans les bioréacteurs agités (tiré de Delvigne et al., 2018).	64
Figure 14 : Composants principaux d'un cytomètre en flux (tiré de Adan et al., 2017).	65
Figure 15 : Principe des signaux mesurés aux petits angles (<i>FSC signal</i>) et des signaux mesurés à 90° (<i>SSC signal</i>) après passage d'une cellule à travers le laser d'un cytomètre en flux permettant de mesurer respectivement la taille cellulaire et la granularité (tiré de Adan et al., 2017).	66
Figure 16 : Schématisation du principe du triage cellulaire par cytométrie en flux (tiré de Adan et al., 2017).	68
Figure 17 : Différence entre l'analyse statique (A) et l'analyse dynamique (B) de cellules uniques (tiré de Ladner et al., 2017). L'analyse statique est conventionnellement faite à haut débit par cytométrie en flux alors que l'analyse dynamique est plutôt réalisée par cultures de cellules uniques en microfluidiques et par microscopie <i>time-lapse</i>	71
Figure 18 : Représentation des microstructures permettant la culture de cellules uniques. A : Représentation schématique du système vue du dessus ; B : Représentation schématique d'une chambre de croissance monocouche en 3D. Ici l'ensemble du système de canaux et de chambres de cultures sont directement faits en polydiméthylsiloxane (PDMS). La hauteur des chambres de culture est de 1 µm contre 10 µm pour les canaux d'approvisionnement (tiré de Grünberger et al., 2015).....	72

Figure 19 : Principe de la culture avec le dispositif ségréostat. A : Schéma avec les différents composants pour la plateforme de cytométrie en ligne ; B : Utilisation de la plateforme de cytométrie en ligne lors d'une	
--	--

culture continue (*chemostat*) ; C : Utilisation de la plateforme de cytométrie en ligne lors d'une culture en ségrégostat avec pulse de glucose en fonction des données de population enregistrées. Dans ce cas de figure, le taux de croissance (μ) n'est plus égal au taux de dilution (D) à l'inverse de la culture de type *chemostat* (tiré de Sassi et al., 2019).74

Figure 20 : Schéma global de la stratégie de la thèse ainsi que les approches méthodologiques utilisées. 81

Figure 21 : Schéma de la méthodologie utilisée pour réaliser des cultures successives avec du xylane comme source de carbone. Ces cultures successives étaient complémentées avec un suivi de la croissance (*growth kinetic*), une mesure de l'expression du gène *tx-xyn11* (*transcriptomic analyses*), un dosage de l'activité xylanase extracellulaire et des analyses de population (*cytometric analyses*).85

Figure 22 : Programme des cycles de T° pour l'amplification par PCR quantitative du gène *tx-xyn11*. 91

Figure 23 : Exemples de courbes d'amplification (gauche) et de fusion (droite) des gènes *tx-xyn11* et 16S obtenues avec les amorces spécifiques décrites (Table 5)92

Figure 24 : Schéma du protocole appliqué aux cultures successives avec alternance de la source de carbone avant mesure de l'activité xylanase.97

Figure 25: Test de cultures de *Thermobacillus xylanilyticus* en bioréacteurs avec et sans CO₂.99

Figure 26 : Test d'aération lors de cultures de *Thermobacillus xylanilyticus* en bioréacteurs.100

Figure 27 : Evolutions of growth rate and xylanase production characteristics of *Thermobacillus xylanilyticus* over generations.113

Figure 28 : Subpopulations of *Thermobacillus xylanilyticus* analyzed by flow cytometry during successive cultivations on xylan. The subpopulations were resolved based on the FSC-A values. The segregation between the two subpopulations was done by considering a gating value of 30,000 in FSC-A (orange line). The figures represent the SSC-A values (on the left), the FL1-A values (on the middle) and the FL3-A values (on the right) in function of the FSC-A values. Generations 0 (A); 23.5 (B) and 107.7 (C) respectively....115

Figure 29 : Evolution of each subpopulation cell percentage and xylanase activity upon successive xylan cultivations.....	116
Figure 30 : Physiological changes of <i>T. xylanilyticus</i> detected by flow cytometry on different substrates. The substrates considered are either xylan (A), glucose (B) and wheat bran (C).....	117
Figure 31 : Morphological changes along the generations. Cells were observed by SEM at magnification 1500-fold (1), 5000-fold (2) and 15000-fold (3). Generation 0 not sorted (A), generation 0 sorted to obtain <i>high</i> subpopulation (B), generation 0 sorted to obtain <i>low</i> subpopulation (C), G50 not sorted (D) and G50 after cell sorting (E).	118
Figure 32 : Characterization of the two subpopulations of <i>T. xylanilyticus</i> . Growth and flow cytometry profiles of generation 0 cultivations before cell sorting (A). The red boxes on the	121
Figure 33 : <i>Thermobacillus xylanilyticus</i> subpopulations evolution during glucose successive cultivations with xylanase activity being recorded after xylan switching. Relative evolution of the growth rate (blue circles) and enzymatic activity after substrate switch (green squares) over generation (A); Evolution of cell subpopulations in percentage over generations after flow cytometry analyses (B). The xylanase activity was measured after a switch of carbon source from glucose to xylan at the same growth stage (green lines in A and B).	123
Figure 34 : Model for <i>T. xylanilyticus</i> diversification at the population (A) and single-cell level (B).	125
Figure 35 : Schematic representation of the successive cultivations experiment of <i>Thermobacillus xylanilyticus</i>	129
Figure 36 : Population dynamics during cultivation of <i>T. xylanilyticus</i> with the hypothesis of cheaters selection along the successive cultivations on exponential phase, which could be prevented by successive transfers during stationary phase (with advanced sporulating cells) adapted from (Bouchat <i>et al.</i> , 2022).	139
Figure 37 : Evolution of the xylanase activity over eleven successive cultivations during stationary phase on xylan or with different ratios of xylan and glucose. Xylanase activity is expressed in IU/mL.	145

Figure 38 : Strategy for the study of *T. xylanilyticus* strain stability for xylanase production with xylan as carbon source. The blue lines correspond to the starting of new cultivations from the conditioned strains C6 and C10 conserved at 4°C for 2 months.146

Figure 39 : Evolution of *T. xylanilyticus* metabolic activity and xylanase activity during successive cultivations in presence of xylans and with transfers in stationary phase. The cultivations were done with C6. The metabolic activities are represented by the green fluorescence collected at 525 nm ± 30 nm (FL1 detector). For each cultivation replicate, the mean fluorescence was collected and used to obtain the global mean fluorescence of the cultivation and the fluorescence standard deviations. The symbols * and § represent the significantly different group of xylanase activity between each cultivation (* = significantly lower of each other cultivation (p -value < 0.05); *' = significantly different of each other cultivation excepted cultivations 5 and 6 (p -value < 0.05); § = significantly higher from cultivations 1 and 2 (p -value < 0.05) but not significantly different from cultivations 3, 4, 5 and 6; §' = significantly higher from cultivations 1 (p -value < 0.05) but not significantly different from cultivations 2, 3, 4, 5 and 6). The alphabetical symbols represent the significantly different group of metabolic activity between each cultivation (a = significantly higher of each cultivations (p -value < 0.001) excepted cultivations 5 and 6; b = significantly lower of cultivations 1 and 4 (p -value < 0.01) but not significantly different from cultivations 2, 3, 5 and 6; c = significantly lower than cultivation 1 (p -value < 0.001), higher than cultivations 2 and 3 (p -value < 0.01) but not significantly different from cultivations 5 and 6; d = not significantly different of each cultivation).148

Figure 40 : Evolution of *T. xylanilyticus* metabolic activity and presence of subpopulations during cultivations in presence of xylans and with transfers in stationary phase. An example of cytograms corresponding to the six successive cultivations of one replicate from the “conditioned strain C6“. The green line corresponds to the gate of 50,000 in FL1-A for the detection of green fluorescence from RedoxSensor Green (between 490 and 520 nm).150

Figure 41 : Evolution of the extracellular xylanase activity (A) and intracellular enzymatic activities (B and C) changes during cultivations in presence of wheat bran and wheat straw. The intracellular activities correspond to acetyl esterase activity (B) and β-xylosidase activity (C). The asterisk represents the significantly different activity between wheat bran and wheat straw (* = (p -value < 0.05), ** = (p -value < 0.01) and *** = (p -value < 0.001).152

Figure 42 : Croissance de *T. xylanilyticus* dans des bioréacteurs parallèles DASGIP® avec différentes conditions de tampons et d'apports en CO₂ et comparaison avec la croissance en bouteilles scellées avec 10

% de CO₂ (v/v). A : Zoom sur les comparaisons de croissance en bioréacteurs parallèles DASGIP® avec différentes conditions de tampons. B : Zoom sur les comparaisons de croissance en bioréacteurs parallèles DASGIP® avec différents apports en CO₂. Les cultures en réacteurs n'ont été fait qu'en un seul réplica alors que la culture en bouteille scellée a été réalisée en 3 réplicas..162

Figure 43 : Consommation d'O₂ de *T. xylanilyticus* en bioréacteurs avec différents tampons (tampon potassium phosphate et tampon bicarbonate/CO₂) et différentes aérations (0,1 VVM et 0,5 VVM).....165

Figure 44 : Croissance et consommation d'O₂ de *T. xylanilyticus* obtenues en bioréacteurs en présence de glucose comme source de carbone et avec les paramètres d'agitation et d'aération suivants : 1000 RPM et 0,1 VVM. Le milieu basal de culture contenait du tampon potassium phosphate 0,05 M. La régulation du pH était également faite avec du KOH et de l'H₃PO₄.166

Figure 45 : Présence d'insolubles dans le milieu basal de culture de *T. xylanilyticus* lorsque du bicarbonate de potassium (5 g/L) était ajouté dans le milieu afin de réaliser un système tampon avec du dioxyde de carbone. La photo est prise à la sortie de la stérilisation des milieux par autoclavage.167

Figure 46 : Croissance et consommation d'O₂ de *T. xylanilyticus* obtenues en bioréacteurs obtenues avec du glucose comme source de carbone et les paramètres d'agitation et d'aération suivants : 1000 RPM et 0,1 VVM. Le milieu basal de culture ne contenait aucun tampon. La régulation du pH était faite avec du KOH et de l'H₃PO₄.169

Figure 47 : Croissance et consommation d'oxygène de *T. xylanilyticus* obtenues en bioréacteurs en présence de xylane comme source de carbone et avec les paramètres d'agitation et d'aération suivants : 1000 RPM et 0,1 VVM. Le milieu basal de culture contenait un tampon potassium phosphate (A) ou sans aucun tampon (B). Une régulation du pH était faite avec du KOH et de l'H₃PO₄..171

Figure 48 : Evolution des populations, de la densité optique et de l'activité xylanase en fonction des pulses de glucose lors de la culture en ségrégostat. A : Evolution du pourcentage de cellules appartenant à la high population en fonction des périodes de pulses de glucose lors de la culture en ségrégostat ; B : Evolution de l'activité xylanase (en UI/mg) et de la densité optique (mesurée à 600 nm) au cours de la culture en ségrégostat.).177

Figure 49 : Exemple de sous-populations rencontrées dans un biofilm de de *B. subtilis* illustrant la diversification phénotypique ayant lieu au sein des biofilms en fonction de la localisation des cellules au sein de celui-ci (tiré de Mielich-Süss & Lopez, 2015).....203

LISTE DES TABLES

Table 1 : Teneurs en cellulose, hémicelluloses et lignines des monocotylédones, dicotylédones et gymnospermes exprimées en pourcentage de matière sèche (d'après Galkin & Samec, 2016).	19
Table 2 : Teneurs en cellulose, hémicelluloses et lignines de diverses biomasses exprimées en pourcentage de matière sèche (Kumar and Reetu, 2015).	19
Table 3 : Présence des principales unités de lignine dans différents types de plantes exprimée en pourcentage (Li <i>et al.</i> , 2015).	25
Table 4 : Classification de certains extrêmophiles et productions enzymatiques associées (adapté de Van den Burg, 2003).	44
Table 5 : Amorces utilisées pour les mesures de l'expression du gène <i>tx-xyn11</i>	90
Table 6 : Chemical composition of destarched wheat bran and wheat straw (Rakotoarivonina <i>et al.</i> , 2012).	141

XYLANFACTORY - OPTIMISATION DE LA CULTURE D'UNE BACTERIE THERMOPHILE EN BIOREACTEURS POUR LA PRODUCTION D'HEMICELLULASES ET LA VALORISATION DES XYLANES DES BIOMASSES LIGNOCELLULOSIQUES

Le fractionnement pour la valorisation des hémicelluloses de la biomasse lignocellulosique est une étape clé du bioraffinage du végétal. L'utilisation d'enzymes lignocellulolytiques est une des voies utilisées pour l'hydrolyse des biomasses car elle est éco-responsable. Il est nécessaire de disposer d'enzymes efficaces et d'optimiser leur production. Cette thèse a pour objectif d'améliorer la production d'hémicellulases par une bactérie thermophile, *Thermobacillus xylanilyticus*. Cette bactérie hémicellulolytique sécrète une enzyme de la famille GH11 avec une forte activité xylanase mais cette activité a tendance à baisser au cours des cultures. La thèse s'est focalisée sur l'étude des facteurs populationnels impactant la chute de l'activité lors de cultures successives. Une dérive phénotypique menant à la présence d'une sous-population tricheuse a été identifiée comme responsable de la perte d'activité. Des stratégies de contrôle de la diversification phénotypique ont alors été établies. Elles ont été basées sur l'introduction de changements environnementaux (sources de carbone) ou en changeant l'état physiologique des cellules (âge des inocula) lors de cultures successives pour améliorer la production d'enzymes. A partir de ces approches, l'activité xylanase a pu être augmentée jusqu'à 15-fois en alternant la source de carbone. Les activités complémentaires β -xylosidase et acétyl estérase ont été augmentées en changeant l'âge de l'inocula (cellules en phase stationnaire). Dans la dernière partie de la thèse, la stratégie des changements environnementaux a été faite avec des cultures en ségréostat ce qui a permis de contrôler la diversification phénotypique de la souche en bioréacteurs.

Mots clés en français : biomasse lignocellulosique, xylanase, *Thermobacillus xylanilyticus*, diversité phénotypique, sous-population, bioréacteur, ségréostat

XYLANFACTORY - Optimization of the culture of a thermophilic bacterium in bioreactors for the production of hemicellulases and the valorization of xylans from lignocellulosic biomass

Fractionation for valorization of hemicelluloses from lignocellulosic biomass is a key step in the biorefinery of plants. The use of lignocellulolytic enzymes is one of the ways used for the hydrolysis of biomasses because it is more eco-responsible. It is then necessary to have efficient enzymes and to optimize their production. This thesis aims to improve the production of hemicellulases by a thermophilic bacterium, *Thermobacillus xylanilyticus*. This hemicellulolytic bacterium secretes an enzyme of the GH11 family with a strong xylanase activity but this activity tends to decrease during the cultivations. The thesis focused on the study of population factors impacting the fall of the activity during successive cultivations. A phenotypic diversification leading to the presence of a cheating subpopulation was identified as responsible for the loss of activity. Strategies to control phenotypic diversification were then established. They were based on the introduction of environmental changes (carbon sources) or by changing the physiological state of the cells (age of inocula) during successive cultivations to improve enzyme production. From these approaches, xylanase activity could be increased up to 15-fold by alternating the carbon source. The complementary activities β -xylosidase and acetyl esterase were increased by changing the age of the inocula (cells in stationary phase). In the last part of the thesis, the strategy of environmental changes was done with segregated cultures which allowed to control the phenotypic diversification of the strain in bioreactors.

Keywords: lignocellulosic biomass, xylanase, *Thermobacillus xylanilyticus*, phenotypic diversification, subpopulation, bioreactor, segregostat

Discipline : SCIENCES AGRONOMIQUES, BIOTECHNOLOGIES AGRO-ALIMENTAIRES

Spécialité : *Microbiologie*