



**HAL**  
open science

# Compréhension et contrôle de la morphologie des champignons filamenteux en culture liquide

Marion Drougard

► **To cite this version:**

Marion Drougard. Compréhension et contrôle de la morphologie des champignons filamenteux en culture liquide. Génie des procédés. Institut agronomique, vétérinaire et forestier de France, 2018. Français. NNT : 2018IAVF0019 . tel-03510230

**HAL Id: tel-03510230**

**<https://pastel.hal.science/tel-03510230>**

Submitted on 4 Jan 2022

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

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

# THESE DE DOCTORAT

préparée à l'Institut des sciences et industries du vivant et de l'environnement (AgroParisTech)

pour obtenir le grade de

**Docteur de l'Institut agronomique vétérinaire et forestier de France**

**Spécialité : Sciences de la vie et de la santé**

École doctorale n° 581

Agriculture, alimentation, biologie, environnement et santé (ABIES)

*par*

**Marion Drougard**

## **Compréhension et contrôle de la morphologie des champignons filamenteux en milieu liquide**

Directeur de thèse : **Fadhel Ben Chaabane**  
Co-encadrement de la thèse : **Etienne Jourdier**

Thèse présentée et soutenue à IFP Energies nouvelles le 8 novembre 2018

### **Composition du jury :**

M. Stéphane DELAUNAY, Professeur, Université de Lorraine - ENSAIA	<i>Président(e)</i>
M. Jean-Claude SIGOILLOT, Professeur émérite, Université d'Aix-Marseille	Rapporteur
M. Stéphane GUILLOUET, Professeur, INSA Toulouse - LISBP	Rapporteur
Mme Aurore THORIGNE, Manager R&D, Groupe Soufflet	Examinatrice
Mme Catherine BEAL, Professeure, AgroParisTech	Examinatrice
M. Stéphane DELAUNAY, Professeur, Université de Lorraine - ENSAIA	Examinateur
M. Etienne JOURDIER, Ingénieur de recherche, IFP Energies nouvelles	Co-encadrant
M. Fadhel BEN CHAABANE, Ingénieur de recherche, IFP Energies nouvelles	Directeur de thèse



# Remerciements

Pour ces trois belles années de thèse passées au sein du département biotechnologie de l'IFPEN Rueil Malmaison, je souhaite remercier sincèrement toutes les personnes ayant contribué de près ou de loin au bon déroulement de mes différents projets.

Particulièrement, merci à Frédéric et Antoine, deux chefs de département à l'écoute et disponibles, que j'ai eu la chance de côtoyer pendant ma thèse.

Fadhel, merci d'avoir été un directeur de thèse toujours optimiste et plein de ressources ! Merci de m'avoir poussé à valoriser tous mes travaux et surtout de ta bonne humeur légendaire ! Etienne, ton encadrement a été au top ! Ton aide et ta confiance en moi m'ont été indispensables tout au long de ces trois ans. Je te remercie de ta patience et de tes encouragements. J'ai eu beaucoup de chance et de plaisir à travailler sous la direction de deux scientifiques passionnants, source d'apprentissages, de réflexions et d'évolution personnelle au quotidien.

Aussi, merci à tous les ingénieurs et techniciens du département et de l'IFP pour m'avoir conseillée et assistée chaque fois que j'en ai eu besoin. Un grand merci notamment à Véronique, Céline et Sandra pour leur précieuse expertise en HPLC et bioréacteurs. Frédérique, merci pour ton soutien, tes conseils et ton écoute qui m'ont été d'une grande aide. Aziz, merci pour l'intérêt que tu as porté à mon projet et pour avoir réussi à me faire manipuler les statistiques malgré ma phobie des mathématiques ! Éric, merci pour avoir passé du temps avec moi à mettre au point mes méthodes d'observation de conidies au microscope électronique. Toutes ces collaborations ont été extrêmement enrichissantes pour moi.

En tant que collègues et amis, j'aimerais également remercier :

Nicolas H, pour avoir pris du temps à me former dès mon arrivée et pour m'avoir rassurée à mes débuts, dans les moments de doutes ;

Laetitia, car tu as été une vraie confidente et que nos débats philosophiques sur la vie m'ont terriblement manquées dès ton départ ;

Gwladys, pour tes agréables visites dans le bureau qui m'ont permis de me changer les idées et pour toutes tes petites attentions qui ont clairement contribué à ma bonne humeur ;

Tamiris, pour m'avoir accompagnée en fin de thèse lorsque j'en avais le plus besoin, je sais que tu réussiras brillamment tes recherches, je crois en toi ;

Vincent, pour nos longues discussions tardives, sur absolument tous les sujets qui pouvaient me tracasser, encore merci de ta capacité d'écoute !

Et enfin Estelle, pour m'avoir tout appris en microfluidique, pour ces journées interminables à lutter contre la « guigne », mais toujours dans la bonne humeur, et surtout pour ton optimisme et ta persévérance que j'admire énormément !

A tous mes amis rencontrés à l'IFP :

Julie, tu as été la première personne en qui j'ai pu faire confiance en arrivant à l'IFP, merci d'avoir pris soin de la toulousaine perdue à Paris ! Ces trois années n'auraient pas été les mêmes sans toi ;

Mona Jaber ! Je suis vraiment contente de t'avoir rencontrée et que nous ayons pu partager des moments si drôles et improbables,

Claire, Ariane, Emilie, Arthur et tous les autres doctorants, merci pour la super ambiance qui a régné durant ces trois années.

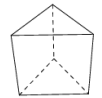
A l'extérieur de l'IFP, merci à mes mimies, Annabel et Aurélie, d'avoir toujours cru en moi et de m'avoir motivée dans les moments durs (et aussi de m'avoir fait découvrir Lyon... !). Merci à Solène pour toutes nos colocs (quand est-ce qu'on arrêtera ?!), notre génial road trip aux Etats-Unis et nos soirées à refaire le monde et surtout à se plaindre !

Pour terminer, je voudrais aussi remercier toutes les personnes qui ont été présentes le jour de mon oral et je pense particulièrement à Doriane et Nicolas N, merci d'avoir pris du temps pour moi.

Enfin, ma famille, Anne, Nicolas et mes parents, merci pour vos conseils, votre soutien inconditionnel, votre capacité à me supporter et votre bienveillance !

Un jour on m'a dit, pour réussir il faut apprendre à jouer avec les cartes que la vie nous a données. Durant ces trois années mes cartes c'était vous tous, et mon jeu ne pouvait pas être meilleur.

Au pentaèdre,



# Table des matières

---

<b>INDEX DES FIGURES</b>	<b>5</b>
<b>INDEX DES TABLEAUX</b>	<b>8</b>
<b>INTRODUCTION</b>	<b>9</b>
<b>ETAT DE L'ART</b>	<b>11</b>
<b>1 LES BIOTECHNOLOGIES</b>	<b>11</b>
1.1 CONTEXTE ENVIRONNEMENTAL ET ECONOMIQUE	11
1.2 HISTOIRE, EVOLUTION ET DEFIS ACTUELS	12
1.3 PRODUITS ET APPLICATIONS DES CHAMPIGNONS FILAMENTEUX	14
1.3.1 ACIDES ORGANIQUES POUR LA CHIMIE BIOSOURCEE	14
1.3.2 ENZYMES, ETHANOL, LIPIDES POUR LES BIOCARBURANTS	18
1.3.3 ANTIBIOTIQUES ET AUTRES COMPOSES POUR LA SANTE ET LA COSMETIQUE	24
<b>2 COMPREHENSION DES CHAMPIGNONS FILAMENTEUX</b>	<b>27</b>
2.1 CLASSIFICATION	27
2.2 MECANISMES DE CROISSANCE	28
2.2.1 GERMINATION ET EXTENSION DES HYPHES	28
2.2.2 BRANCHEMENT	30
2.3 COMPOSITION BIOCHIMIQUE	33
2.3.1 MYCELIUM	33
2.3.2 CONIDIES	34
2.4 MORPHOLOGIE EN MILIEU LIQUIDE	35
2.4.1 MACROMORPHOLOGIES	35
2.4.2 MORPHOGENESE	36
<b>3 CONTROLE DE LA MORPHOLOGIE</b>	<b>40</b>
3.1 IMPACT DES MORPHOLOGIES SUR LES BIOPROCEDES	40
3.2 LES TECHNIQUES DE CONTROLES CONVENTIONNELLES	41
3.2.1 MODIFICATION DE LA COMPOSITION DU MILIEU DE CULTURE	41
3.2.2 pH	43
3.2.3 TAUX D'ENSEMENCEMENT	44
3.2.4 FORCES MECANQUES - PUISSANCE DISSIPEE	45
3.3 LES NOUVELLES TECHNIQUES DE CONTROLE	47

---

3.3.1	MICROPARTICULES ENHANCED CULTIVATION : MEC	47
3.3.2	MICROFLUIDIQUE	48
3.3.3	OSMOLARITE ET FORCE IONIQUE	49
<b><u>ENJEUX DE CETTE ETUDE</u></b>		<b>51</b>
<b><u>1 OBJECTIFS</u></b>		<b>51</b>
<b><u>2 STRATEGIES</u></b>		<b>52</b>
2.1	INVESTIGATION DE DIFFERENTES ESPECES	52
2.2	OPTIMISATION ET DEVELOPPEMENT DE NOUVELLES TECHNIQUES	52
2.3	PROPAGATION / SCALE-UP	54
<b><u>MATERIELS ET METHODES</u></b>		<b>55</b>
<b><u>1 MICRO-ORGANISMES</u></b>		<b>55</b>
1.1	SOUCHES SELECTIONNEES	55
1.2	BANQUES DE CONIDIES	56
<b><u>2 CULTURES</u></b>		<b>56</b>
2.1	MILIEUX DE CULTURE	56
2.1.1	MILIEUX RICHES	56
2.1.2	MILIEU SALIN MINIMUM (MSM)	57
2.2	PROTOCOLES DE CULTURES	59
2.2.1	PRE-CULTURES EN FIOLES ERLNMEYER	59
2.2.2	PROPAGATIONS EN BIOREACTEURS DASGIP	61
<b><u>3 ANALYSES</u></b>		<b>62</b>
3.1	SUIVI DU METABOLISME	62
3.1.1	PH	62
3.1.2	BIOMASSE	62
3.1.3	GLUCOSE	62
3.1.4	IONS	63
3.1.5	ACIDE FUMARIQUE	63
3.1.6	ETHANOL	63
3.2	SUIVI DE LA MORPHOLOGIE	63
3.2.1	MACROMORPHOLOGIE	63
3.2.2	MICROSCOPE ÉLECTRONIQUE A BALAYAGE (MEB)	64



<b>3.3</b>	<b>TRAITEMENTS STATISTIQUES</b>	<b>64</b>
3.3.1	PCA : PRINCIPAL COMPOSANT ANALYSIS	64
3.3.2	LDA : LINEAR DISCRIMINANT ANALYSIS	65
<b>4</b>	<b>BANC MICROFLUIDIQUE</b>	<b>66</b>
<b>4.1</b>	<b>PRINCIPE</b>	<b>66</b>
<b>4.2</b>	<b>MATERIELS</b>	<b>67</b>
	<b>RESULTATS</b>	<b>69</b>
<b>1</b>	<b>CRIBLAGE INITIAL</b>	<b>69</b>
<b>1.1</b>	<b>MACROMORPHOLOGIE</b>	<b>69</b>
1.1.1	MILIEU DE CULTURE	69
1.1.2	TAUX D'ENSEMENCEMENT	73
1.1.3	PUISSANCE DISSIPEE	75
1.1.4	pH	77
1.1.5	MICROPARTICULES DE TALC	78
1.1.6	OSMOLARITE / FORCE IONIQUE : DOPAGE EN SELS MINERAUX	80
1.1.7	CONCLUSIONS DU CRIBLAGE MACROMORPHOLOGIQUE	82
<b>1.2</b>	<b>MICROMORPHOLOGIES</b>	<b>83</b>
1.2.1	<i>A. ORYZAE</i> ET <i>R. ORYZAE</i>	83
1.2.2	<i>A. TERREUS</i> ET <i>A. NIGER</i>	84
1.2.3	CONCLUSION DU CRIBLAGE MICROMORPHOLOGIQUE	85
<b>1.3</b>	<b>CONCLUSION</b>	<b>85</b>
<b>2</b>	<b>MICROPARTICULES (MEC) ET MICROFLUIDIQUE (EGM)</b>	<b>89</b>
<b>2.1</b>	<b>OPTIMISATION DE LA METHODE MEC « MICROPARTICULES ENHANCED CULTIVATION »</b>	<b>89</b>
2.1.1	PROPAGATION EN FIOLE	89
2.1.2	PROPAGATION EN BIOREACTEUR	91
2.1.3	DISCUSSION ET CONCLUSION	93
<b>2.2</b>	<b>DEVELOPPEMENT DE L'EGM : « ENCAPSULATED GERMINATION METHOD »</b>	<b>95</b>
2.2.1	MISE AU POINT DE LA METHODE	95
2.2.2	EFFET DE LA GERMINATION ENCAPSULEE SUR LA MORPHOLOGIE	97
2.2.3	APPLICATION DE L'EGM POUR LA PROPAGATION EN BIOREACTEUR DE <i>A. ORYZAE</i>	102
2.2.4	CONCLUSION	104
<b>2.3</b>	<b>COMPARAISON DES TECHNIQUES MEC ET EGM</b>	<b>104</b>

<b><u>3</u></b>	<b><u>OSMOLARITE : SELS DE CALCIUM ET MAGNESIUM</u></b>	<b><u>107</u></b>
<b>3.1</b>	<b>CRIBLAGE EN PRE-CULTURES</b>	<b>107</b>
3.1.1	DONNEES BRUTES	108
3.1.2	ANALYSE STATISTIQUE DESCRIPTIVE	113
<b>3.2</b>	<b>ACP ET MODELISATION LDA</b>	<b>117</b>
3.2.1	ACP	118
3.2.2	LDA	119
<b>3.3</b>	<b>PROPAGATION EN BIOREACTEURS</b>	<b>121</b>
<b>3.4</b>	<b>CONCLUSION</b>	<b>124</b>
<b><u>CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES</u></b>		<b><u>127</u></b>
<b><u>RÉFÉRENCES</u></b>		<b><u>131</u></b>
<b><u>ANNEXES</u></b>		<b><u>145</u></b>
<b><u>1</u></b>	<b><u>DONNÉES COMPLÉMENTAIRES</u></b>	<b><u>145</u></b>
<b><u>2</u></b>	<b><u>DESCRIPTIONS D'INVENTIONS</u></b>	<b><u>149</u></b>
2.1	CONTROLE DE LA MORPHOLOGIE D'ASPERGILLUS ORYZAE PAR UTILISATION DURANT LA PRECULTURE DE MICROPARTICULES DE TALC	149
2.2	PROCEDE DE MODIFICATION DE LA MORPHOLOGIE DE CHAMPIGNONS FILAMENTEUX AGREGES DE TYPE COAGULANT	159

# Index des figures

---

Figure 1 : Cycle de Krebs : place des acides organiques d'intérêt dans cette étude. ....	15
Figure 2 : Place potentielle des métabolites d'origine fongique dans les procédés de production de biocarburants de 2ème et 3ème génération.....	20
Figure 3 : Classification des champignons (Adapté du JGI).....	28
Figure 4 : Principales étapes de développement du mycélium. ....	29
Figure 5 : Schéma détaillé d'un « tip » ou « pointe » d'hyphe fongique (Jones et Sudbery 2010). .....	30
Figure 6 : Branchements apical et latéral d'une hyphe. ....	31
Figure 7 : Observation à la loupe binoculaire des principales morphologies en milieu liquide. .....	35
Figure 8 : Schéma simplifié des mécanismes de formation de mycélium agrégé des espèces coagulantes et non-coagulantes. ....	37
Figure 9 : Schéma de principe des bioréacteurs DASGIP. ....	61
Figure 10 : Schématisation simplifiée du principe de l'Analyse en Composante Principale. .	65
Figure 11 : Représentation schématique des axes fournis par l'ACP et la LDA pour un ensemble de données séparées en deux classes. ....	66
Figure 12 : Plan de travail microfluidique pour l'encapsulation de conidies.....	68
Figure 13 : Exemple de suivi de la concentration en glucose et de l'acidification des milieux Potatoes Dextrose (PD), Yeast Extract Potatoes Dextrose Peptone (YPDP) et Sabouraud des souches du panel initial. ....	70
Figure 14 : Exemple du criblage morphologique des souches du panel initial en milieux riches Potatoes Dextrose (PD), Yeast Extract Potatoes Dextrose Peptone (YPDP) et Sabouraud.....	71
Figure 15 : Effets d'additifs de croissance ajoutés en milieu salin minimum (MSM) sur la morphologie des souches <i>A. terreus</i> , <i>A. oryzae</i> , <i>R. oryzae</i> et <i>P. chrysogenum</i> . ....	73
Figure 16 : Effet du taux d'ensemencement sur la morphologie d' <i>A.niger</i> , <i>A. oryzae</i> (coagulantes), <i>P. chrysogenum</i> , <i>R. oryzae</i> (non-coagulantes) et <i>A. terreus</i> (type inconnu). ...	74
Figure 17 : Effet de la puissance dissipée sur la morphologie d' <i>A. terreus</i> et <i>A. oryzae</i> .....	76
Figure 18 : Effet du pH initial sur la morphologie des espèces <i>A. terreus</i> , <i>P. chrysogenum</i> et <i>A. niger</i> en milieu riche YPDP. ....	78
Figure 19 : Morphologies de <i>A.oryzae</i> , <i>A. niger</i> , <i>A.terreus</i> , <i>P.chrysogenum</i> , et <i>R.oryzae</i> en culture additionnée de talc.....	79
Figure 20 : Influence des sels minéraux testés sur l'osmolarité et la force ionique du milieu salin minimum (MSM). ....	80
Figure 21 : Effets des sels KCl, MgSO <sub>4</sub> et K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> sur la morphologie d' <i>A. terreus</i> , <i>A. oryzae</i> et <i>R. oryzae</i> en milieu salin minimum (MSM). ....	81
Figure 22 : Bilan morphologique de <i>R. oryzae</i> par ajout de CaCl <sub>2</sub> et MgSO <sub>4</sub> en milieu salin minimum (MSM). ....	82
Figure 23 : Observation au MEB des espèces <i>A. oryzae</i> et <i>R. oryzae</i> . ....	84
Figure 24 : Observation au MEB des espèces <i>A. terreus</i> et <i>A. niger</i> . ....	85
Figure 25 : MEC transfert en fioles : morphologies des souches <i>A. terreus</i> , <i>A. oryzae</i> et <i>A. niger</i> après 24 h de croissance. ....	90

Figure 26 : Morphologies d'A. oryzae en bioréacteurs a) Ensemencé par conidies b) Ensemencé par pré-culture YPDP c) Ensemencé par pré-culture YPDP+talc.....	92
Figure 27: Suivi du métabolisme d'A. oryzae en bioréacteur ensemencé par conidies, par pré-culture YPDP et par pré-culture YPDP+talc.....	93
Figure 28 : Principe de la méthode de germination encapsulée (EGM). .....	97
Figure 29 : Culture liquide de R. oryzae après 24 heures de croissance pour différents modes de germination.....	98
Figure 30 : Culture liquide d'A. oryzae après 24h de croissance, pour différents modes de germination.....	99
Figure 31 : Cultures liquides d'A. niger après de 24h de croissance pour différents modes de germination.....	99
Figure 32 : Culture liquide d'A. terreus après 24 heures de croissance, pour différents modes de germination.....	100
Figure 33 : EGM transfert en fioles : Cultures liquides après 24h de croissance d'A. oryzae selon différents ensemencements. ....	103
Figure 34 : Suivi de la concentration en glucose durant les 24h de croissance en Erlenmeyer après les trois conditions de germination, et leur biomasse finale respective. ....	104
Figure 35 : Principe du criblage réalisé en pré-cultures et types de données recueillies pour chacune des 44 fioles.....	108
Figure 36 : Données morphologiques du criblage en pré-cultures.....	109
Figure 37 : Exemples de cinétiques avec réassimilations des produits lors de l'épuisement du milieu en glucose.....	111
Figure 38 : Exemples de cinétique des ions non-constants.....	112
Figure 39 : Exemples de cinétiques des ions constants.....	113
Figure 40 : Corrélations entre biomasse formée et consommations d'azote et de phosphore, production d'éthanol et production d'acide fumarique. ....	114
Figure 41 : Box-plot des données relatives à la croissance et à la production de R. oryzae en pré-cultures.....	116
Figure 42 : Exemple de box-plot des données relatives aux concentrations en ions dans les fioles de pré-cultures de R. oryzae. ....	116
Figure 43 : Position de l'objectif de prédiction par LDA. ....	117
Figure 44 : ACP des données de pré-cultures et projection des expériences en fonction de la modalité de morphologie.....	118
Figure 45 : Résultats des prédictions par LDA à partir des données acide fumarique et éthanol. ....	119
Figure 46 : Résultats des prédictions par LDA à partir des concentrations finales en ions. ..	120
Figure 47 : Résultats des prédictions par LDA à partir des concentrations initiales en ions. ....	121
Figure 48 : Morphologies de R.oryzae en bioréacteurs : scale-up d'expériences en fioles fortement prédites par la méthode LDA.....	122
Figure 49 : Vitesse de production de CO <sub>2</sub> et concentrations finales en acide fumarique et en éthanol lors des cultures de R. oryzae en bioréacteur. ....	123
Figure 50 : Exemples de suivis de la consommation en glucose en milieu talc .....	145
Figure 51 : Exemples de suivis du pH en milieu talc.....	146
Figure 52 : Exemple de détermination du diamètre des pellets des souches étudiées .....	147

Figure 53 : Propagation *A. oryzae* par pré-culture EGM en bioréacteur DASGIP ..... 148

---

# **Index des tableaux**

---

Tableau 1 : Exemple d'études portant sur la modification du milieu de culture impactant la morphologie des champignons. ....	43
Tableau 2 : Exemple d'études portant sur la modification de paramètres physico-chimique (pH, taux d'inoculation et puissance dissipée) impactant la morphologie des champignons. ....	46
Tableau 3 : Souches du panel d'étude initial. ....	55
Tableau 4 : Composition des fioles de cultures pour criblage en sels de calcium et magnésium (volumes en mL de chaque solution stock, complément à 50mL par eau milliQ). ....	60
Tableau 5 : Critères pour le choix des souches d'intérêt dans cette étude. ....	87

# Introduction

---

Les biotechnologies industrielles exploitent les propriétés des micro-organismes ainsi que leur diversité, leur efficacité et leur spécificité, pour fabriquer des produits dans des secteurs aussi vastes que la chimie, l'alimentation humaine et animale, la pharmaceutique et de plus en plus, l'énergie. En intervenant à de faibles niveaux de température et de pression, en consommant moins d'énergie et en émettant moins de gaz à effet de serre, les procédés biologiques sont plus respectueux de l'environnement que les procédés chimiques industriels.

Dans ce domaine, les champignons filamenteux représentent une importante collection de micro-organismes industriels. Ils sont utilisés pour la production d'une grande variété de produits allant des enzymes aux antibiotiques, et ils auront certainement un grand rôle à jouer dans l'essor des bioraffineries grâce à leurs capacités de dégradation de la biomasse.

La production industrielle de molécules d'intérêt par des microorganismes est réalisée en général en milieu liquide, permettant un meilleur contrôle des conditions opératoires en plus grand volume. Ce mode de culture engendre cependant différentes morphologies des champignons filamenteux, dépendantes des caractéristiques intrinsèques de chaque espèce mais aussi des conditions physico-chimiques au sein de leur environnement. Ces morphologies varient entre des formes librement dispersées dans le milieu et des formes distinctes de biomasse agrégée qui conditionnent bien souvent leur mise en œuvre industrielle et la productivité. En effet, il existe des relations complexes entre la morphologie de ces micro-organismes, les phénomènes de transport, la viscosité du milieu de culture et donc la productivité associée.

C'est pourquoi la morphologie fongique en milieu liquide est souvent considérée comme l'un des challenges clés dans la mise en place ou dans l'optimisation de productions industrielles.

Depuis plusieurs dizaines d'années, les études visant à contrôler ces différentes morphologies se basent sur la variation de paramètres environnementaux au sein du milieu de culture du champignon, parmi lesquels les conditions chimiques (composition du milieu de culture, pH, force ionique, teneur en gaz dissous), physiques (température, cisaillement dû à l'agitation, viscosité), mise en œuvre (type et taux d'inoculation). Ces paramètres interdépendants, étudiés cas par cas, ont engendré une optimisation des processus de culture spécifique à chaque souche d'intérêt, pour obtenir des rendements élevés de produits. Il semble alors qu'une telle démarche ait entraîné d'une part une production finalement subie comme conséquence de la morphologie, et d'autre part une difficulté à identifier de façon précise les facteurs influents sur la morphologie ainsi qu'à comparer les résultats issus des études fondamentales.

Les travaux réalisés pendant cette thèse proposent une démarche différente afin de répondre au défi du contrôle et de la compréhension de la morphologie des champignons filamenteux en milieu liquide. Pour cela, nos recherches couplent des études fondamentales et appliquées. Notre but est d'identifier les paramètres de cultures et/ou les phénomènes sous-jacents qui influent sur la morphogénèse des champignons, afin de contrôler les morphologies

finale de plusieurs souches. Les résultats sont organisés dans ce rapport selon la stratégie que nous avons mise en place.

La première partie présente une étude des principaux paramètres physico-chimiques décrits en littérature comme influents sur la morphologie, réalisée sur un large panel de souches. Cette étude a abouti à différents choix : de souches, de conditions opératoires et de méthodes de contrôle morphologique.

La deuxième partie présente l'optimisation, le développement et la comparaison de deux méthodes basées sur un mécanisme particulier d'apparition des morphologies agrégées, par agrégation des conidies.

Enfin une troisième partie propose l'investigation d'un autre mécanisme d'agrégation morphologique, par agrégation des hyphes, par l'exploration d'une troisième méthode couplée à des analyses statistiques descriptives et prédictives.

Pour envisager une extrapolation des résultats vers un procédé industriel, cette étude propose également le suivi morphologique au cours de propagations, représentatives d'une application en industrie, pour chaque méthode investiguée.



# Etat de l'art

---

## 1 Les biotechnologies

### 1.1 Contexte environnemental et économique

Au cours du siècle dernier, la nature et l'ampleur des impacts de l'activité humaine sur l'environnement ont évolué au point que certains systèmes que nous bouleversons ne retrouveront jamais leur état initial ou dans des temps très longs, et cela même si nous arrêtons toutes activités humaines dès aujourd'hui (Petit 2016b). La connaissance croissante de notre environnement nous laisse présager des dommages graves et irréversibles en cas d'inaction (Baudot et al. 1997; Petit 2016a). Avec les découvertes scientifiques et technologiques récentes, l'importance accrue des aspects de compétitivité et le fait que certains gouvernements et agents privés anticipent la prochaine révolution industrielle, la prise en compte de l'environnement dans nos activités n'est plus un frein aujourd'hui à l'économie mondiale.

En réalité, au début du XXe siècle, l'industrie chimique comptait déjà sur le charbon et les ressources renouvelables, avant que le pétrole ait été découvert et utilisé comme une universelle source d'énergie et de matières premières. Jusqu'en 1930 les carburants (éthanol, butanol), les acides organiques (acide citrique, acide lactique) et d'autres produits chimiques de base étaient déjà produits à partir de la biomasse. L'ingénierie des procédés utilisait déjà la fermentation par des champignons ou des bactéries (Willke et Vorlop 2004). Avec le développement de l'industrie pétrolière, nombre de ces procédés biotechnologiques ont très vite été remplacés par des synthèses chimiques à base de pétrole qui étaient plus compétitives. De nouvelles possibilités de synthèse chimique ont donné naissance à de nouveaux produits de plus en plus innovants, en particulier dans les plastiques et les polymères.

La première crise pétrolière dans les années 1970 a provoqué une première prise de conscience. Il est devenu clair que les ressources pétrolières sont épuisables, nocives pour l'environnement et que notre indépendance énergétique était donc en danger. Il existe plusieurs pronostics concernant la quantité et l'étendue des réserves de pétrole dans le monde. La plupart des experts prévoient que le niveau maximum de production (peak oil) sera atteint dans les prochaines décennies, vers les années 2030 pour les plus optimistes (Miller et Sorrell 2014). Compte tenu de l'augmentation de la demande mondiale et de la diminution de la disponibilité du pétrole à moyen et à long terme, nous devons de toute façon compter sur la hausse des prix.

Aujourd'hui, même si les Etats-Unis, utilisent l'huile et le gaz de schiste comme solution énergétique de remplacement, l'avenir et le développement mondial de cette ressource est largement compromis par des questions de durabilité écologique et économique (Cooper, Stamford et Azapagic 2016). C'est pourquoi de grands efforts sont investis dans la recherche appropriée, les Etats-Unis envisageant une substitution de combustibles fossiles avec des ressources renouvelables de 25% d'ici 2030 (Willke et Vorlop 2004). Les recettes mondiales tirées en 2011 des biens issus des biotechnologies industrielles se situeraient entre 50 et 60 milliards d'euros. Il existe de nombreuses prévisions concernant l'évolution de ces marchés. Selon certaines, le marché mondial des biotechnologies industrielles pourrait atteindre quelques

300 milliards d'euros d'ici 2030 (OCDE 2011). Aujourd'hui une grande partie des activités se concentre sur les biocarburants, mais il existe également un solide marché des produits chimiques biosourcés.

## 1.2 Histoire, Evolution et Défis actuels

Historiquement on considère que les biotechnologies ou bioprocédés sont apparus d'abord pour répondre aux besoins fondamentaux de l'homme dès les premières formes de société, principalement pour des usages alimentaires (pain, fromages, boissons alcoolisées), puis rapidement pour des applications de plus en plus diverses et spécifiques. Pendant très longtemps, ces bioprocédés sont demeurés empiriques sans réel contrôle ni compréhension des mécanismes sous-jacents. Ce n'est que récemment que la démarche scientifique, appliquée à la microbiologie et symbolisée par les travaux de Louis Pasteur, a permis d'améliorer rationnellement leur maîtrise technologique.

L'industrie des biotechnologies blanches ou biotechnologies industrielles est maintenant dans sa 4<sup>ème</sup> génération technologique sur une période de plus de soixante-dix ans. Il y a 100 ans, James Currie brevetait pour la première fois une fermentation applicable à l'échelle industrielle pour la production d'acide citrique par le champignon *Aspergillus niger* (Currie 1917). Trois ans plus tard, la production d'acide citrique par cette voie biotechnologique était devenue plus compétitive que l'ancien procédé par extraction des agrumes. C'est ensuite lors de la seconde guerre mondiale aux Etats-Unis que la production de pénicilline par *Penicillium chrysogenum* a également été réalisée à l'échelle industrielle. A cette époque, le facteur coût de production était mineur au vu de la valeur d'usage de l'antibiotique, mais d'autres molécules d'intérêt, issues de diverses souches fongiques et bactériennes, ont commencé à attirer l'attention des industriels. C'est pourquoi les notions de productivité (gramme de produit par litre et par heure) et de rendement (gramme de produit par gramme de substrat consommé) sont entrées en jeu, permettant de juger de l'intérêt d'une mise à l'échelle industrielle pour un produit et/ou une souche donnée.

La deuxième génération a rapidement fait suite lors de l'apparition de la mutagenèse (chimique ou physique), technique qui a permis la sélection de souches hyper-productives et mieux adaptées aux conditions industrielles, principalement au Japon pour des usages alimentaires et pharmaceutiques (le groupe Ajinomoto est encore aujourd'hui leader mondial en production d'acides aminés à destination de l'alimentation humaine et animale). La mise au point de souches mutantes a entraîné une augmentation considérable des rendements et productivités avec en parallèle la mise au point de procédés de purification mieux adaptés aux grands volumes industriels. Rapidement, les sources nutritives nécessaires aux fermentations deviennent également un point clé dans l'amélioration des bioprocédés. L'Europe étant largement en avance dans le domaine de la production de matières sucrées et amidonnées, les biotechnologies européennes prennent l'avantage à la fin des années 1970, avec une diversification de plusieurs entreprises chimiques vers une production biotechnologique.

La 3<sup>ème</sup> génération est ensuite lancée grâce à l'application des techniques du génie génétique à l'industrie. L'insertion de gènes issus de plusieurs souches dans une seule souche microbienne a permis l'amélioration spectaculaire de la productivité dans le domaine des

biotechnologies. Mais la mise en pratique de ces techniques nées de la biologie fondamentale dans le monde industriel ainsi que les réglementations associées à l'utilisation d'OGM en industrie ont rapidement entraîné des coûts de production supplémentaires. On considère aujourd'hui que la 4<sup>ème</sup> génération des biotechnologies blanches fera apparaître la biologie de synthèse comme principale avancée technologique (Académie des technologies 2014). Avant l'intégration des toutes dernières avancées technologiques au monde industriel, le défi actuel posé à la biotechnologie blanche repose, entre autres, sur l'optimisation des procédés par une meilleure compréhension et utilisation des systèmes déjà exploités.

L'Europe est un leader mondial dans les applications industrielles des champignons filamenteux et la science sous-jacente. Cependant, bien que l'exploitation des champignons filamenteux pour la production de molécules d'intérêt industriel remonte à de très nombreuses années, nos connaissances actuelles et notre compréhension sont encore limitées sur de nombreux aspects. En 2016, le groupe de réflexion d'EUROFUNG<sup>1</sup> a notamment identifié plusieurs obstacles clés qui entravent l'utilisation optimale de ces microorganismes. Deux des trois axes, en rapport avec notre étude sont regroupés et résumés ci-dessous :

- Les limites scientifiques :
  - Une limitation d'outils de biologie moléculaire et synthétique et de techniques à haut-débit adaptés aux champignons filamenteux pour le criblage de produit et de souches,
  - Un manque d'intégration et de modélisation des données continuellement acquises qui permettrait un meilleur profilage des organismes fongiques.
- Les défauts communautaires :
  - L'important panel et la diversité métabolique de ces organismes entraînent des études larges mais fragmentées, les laboratoires étant généralement spécialisés sur une souche ou un produit particulier,
  - En conséquence les collaborations pour favoriser la comparaison et le rapprochement des résultats sont rares.

Enfin, les participants ont conclu que la prochaine décennie offrira de nombreuses opportunités et défis concernant la R&D des champignons filamenteux. Leur exploitation contribuera de manière significative à la réalisation d'un avenir sûr, durable et biosourcé.

---

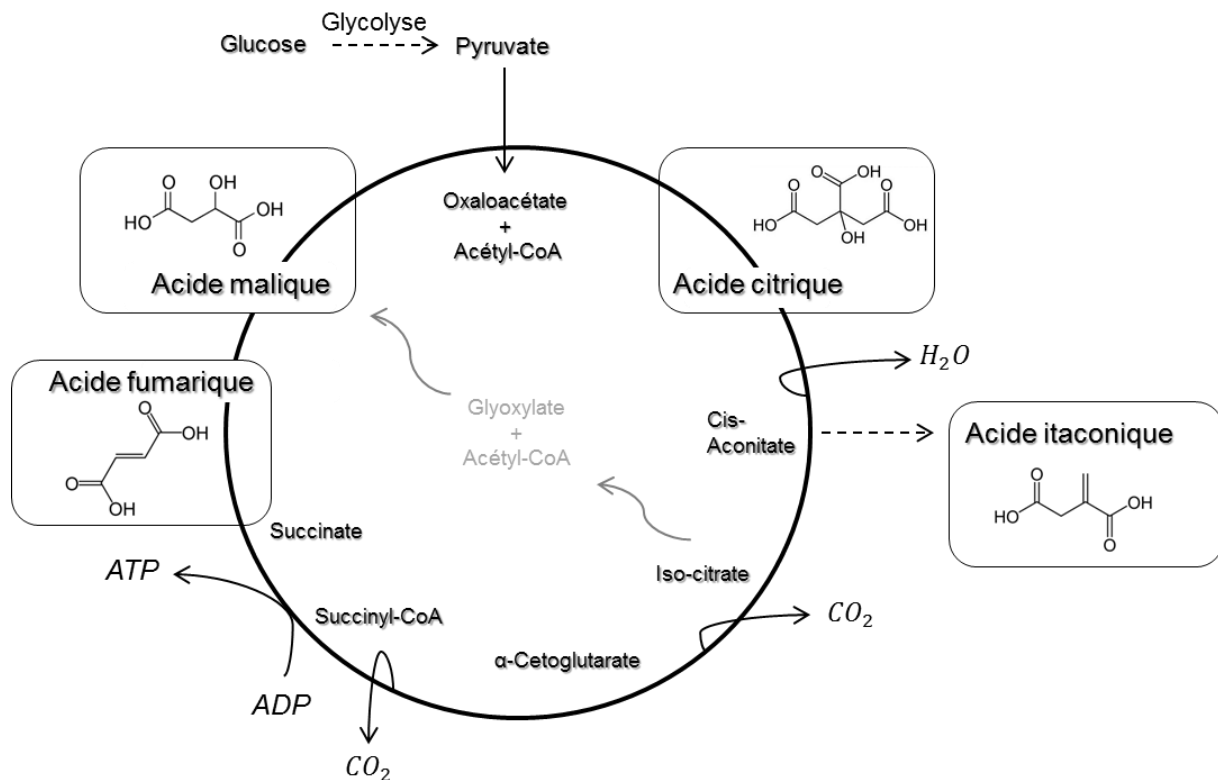
<sup>1</sup> Centre virtuel européen regroupant des experts mondialement reconnus et des collaborations industrielles / académiques à long terme dans le domaine de la biotechnologie blanche plus particulièrement liée à l'exploitation des champignons filamenteux.

## 1.3 Produits et applications des champignons filamenteux

En effet, dans le monde des biotechnologies blanches, les champignons filamenteux représentent bien souvent des « usines cellulaires » bien plus efficaces que les systèmes de production à base de bactéries et de levures, en termes de diversité métabolique, de robustesse et de capacité de sécrétion (Meyer et Schmidhalter 2014). Des procédés de fabrication à grande échelle ont été développés pour la production d'acides organiques, de protéines, d'enzymes et de médicaments, notamment des antibiotiques, des statines et des stéroïdes. La biotechnologie fongique joue donc un rôle central pour de nombreuses industries. Des sociétés européennes telles que AB Enzymes, BASF, Bayer, Chr. Hansen, DSM, Novozymes, Puratos et Roal Oy sont des leaders mondiaux dans l'utilisation de champignons pour la fabrication d'acides organiques, de protéines, d'enzymes et de métabolites secondaires (Meyer et al. 2016). Cependant dans ce domaine, les levures et bactéries sont des microorganismes très étudiés et facilement mis en œuvre dans les bioprocédés. Les parties suivantes détaillent donc l'utilisation concrète ou potentielle des champignons filamenteux, parfois en compétition avec les bactéries et levures, dans les domaines de la chimie biosourcée, des biocarburants et de la santé.

### 1.3.1 Acides organiques pour la chimie biosourcée

Les acides organiques, produits du vivant, font généralement partie intégrante du cycle de Krebs, ils sont synthétisés et accumulés en tant que produits finaux par de nombreux champignons filamenteux et en particulier ceux appartenant aux genres *Aspergillus* spp. et *Rhizopus* sp. Ce cycle implique les étapes finales de la conversion des hydrates de carbone, des protéines et des graisses en dioxyde de carbone et en eau avec une libération concomitante d'énergie pour la croissance. L'accumulation de ces acides organiques dans le cytoplasme est généralement due à un stress tel qu'une limitation en azote (Magnuson et Lasure 2004). Bien que certains acides organiques soient commercialisés à grande échelle par voie biotechnologique, la compréhension des mécanismes par lesquels ces acides sont produits, s'accumulent dans de telles proportions et traversent les membranes biologiques chez certains de ces microorganismes reste encore très incomplète (Goldberg, Rokem et Pines 2006). Mais ces acides présentent d'énormes avantages pour leur utilisation en tant que molécules plateformes, c'est à dire à partir desquelles, par de simples et peu coûteuses réactions, un grand nombre de molécules d'intérêts peuvent être obtenues. C'est pourquoi leur place est centrale dans le développement de la chimie biosourcée, ayant pour but d'assurer la production de grands intermédiaires chimiques à partir de biomasse tout en réduisant le risque industriel et les coûts. Les acides organiques d'intérêt dans cette étude, du fait de leur fort potentiel d'alternatives à la synthèse chimique et leurs productions avérées par les souches également étudiées dans cette étude, sont représentés dans la Figure 1 et plus précisément décrit dans les paragraphes suivants.



**Figure 1 :** Cycle de Krebs : place des acides organiques d'intérêt dans cette étude.

L'acide citrique est formé par condensation de l'oxaloacétate avec l'acétyl-CoA ; l'oxydation du succinate aboutit à l'acide fumarique, et ce dernier, par hydratation, forme l'acide malique. L'acide itaconique provient, en partie, de la décarboxylation de l'acide aconitique, par une réaction parallèle au cycle de Krebs.

### 1.3.1.1 Acide citrique

L'acide citrique est un acide tricarboxylique en C6 (à 6 atomes de carbone) à l'origine extrait des agrumes et notamment du citron, d'où provient son nom. Aujourd'hui, la production d'acide citrique est réalisée par le champignon filamenteux *Aspergillus niger* à hauteur d'environ 1,6 million de tonnes en 2007, un nombre qui dépasse de loin la production de tout autre acide organique produit par fermentation (Berovic et Legisa 2007). Entre 1950 et 1980, l'acide citrique était principalement utilisé dans les produits de consommation pharmaceutiques ou de santé. Au début des années 1980, les deux plus grands fabricants qui contrôlaient la majorité du marché étaient Pfizer et Miles/Bayer, fournisseurs de médicaments sur ordonnance et de médicaments en vente libre. Depuis, 70% du marché de l'acide citrique correspond aux aliments et boissons, la taille du marché continuant de croître (Magnuson et Lasure 2004). Chez le champignon *A. niger*, dans des conditions environnementales spécifiques définies de manière empirique (concentration élevée en glucides, faible concentrations en manganèse, oxygène dissous élevé, agitation constante et pH faible aux alentours de 3), l'acide citrique est produit en grande quantité par le cycle de Krebs, entre 130 et 140 g·L<sup>-1</sup> (Goldberg, Rokem et Pines 2006; Grimm et al. 2005). Des études sur le contenu enzymatique d'*A. niger* lors de l'accumulation d'acide citrique ont montré que sa formation biologique était purement enzymatique, dépendant de la régulation de la synthèse de chacune des enzymes impliquées

dans ce cycle, sous divers mécanismes de contrôle tels que les oligo-éléments agissant comme cofacteurs (Angumeenal et Venkappayya 2013). Il a été proposé que l'accumulation d'acide citrique nécessite la désactivation des enzymes du cycle de Krebs responsables de sa dégradation, l'aconitase et/ou l'isocitrate déshydrogénase (Goldberg, Rokem et Pines 2006).

Même si en 2003, certains auteurs sont arrivés à la conclusion que «seules des pièces du puzzle sont comprises» dans le phénomène de l'accumulation d'acide citrique (Karaffa et Kubicek 2003), il existe depuis des hypothèses associées à l'activité de transporteur de tricarboxylate, qui entre en compétition avec l'aconitase pour l'acide citrique. Dans des conditions où son affinité pour l'acide citrique est supérieure à celle de l'aconitase, cette enzyme éjecte l'acide citrique hors des mitochondries, sans inhibition ou régulation particulière des enzymes du cycle (Max et al. 2010).

### 1.3.1.2 Acide fumarique

L'acide fumarique, acide dicarboxylique en C4, est largement utilisé dans les industries des polymères en raison de sa structure en double liaison. Sa production par voie chimique s'élevait en 2009 à environ 100 000 tonnes par an, basée sur la transformation de l'anhydride maléique provenant lui-même du butane (Meussen et al. 2012; Ring et deGuzman 2017). L'acide fumarique est une molécule plateforme pour la production d'autres acides tels que l'acide succinique et l'acide maléique et son utilisation dans les domaines des plastiques, des résines et des additifs alimentaires s'élevait respectivement à 4500, 50400, 19800 tonnes par an en 2007 (Roa Engel et al. 2008). La structure en double liaison de l'acide fumarique permet la réalisation de nombreuses réactions de polymérisations et d'estérifications. Contrairement à l'anhydride maléique, il est non toxique et procure généralement une meilleure résistance aux produits obtenus. Son utilisation a également été prouvée bénéfique dans le traitement de maladie de peau telle que le psoriasis (Reich et al. 2009), ou encore comme additif à l'alimentation du bétail pour réduire leur production de méthane (plus de 70% de réduction) (McGinn et al. 2004). L'acide fumarique a été classifié en 2004 parmi les 10 composés chimiques les plus intéressants et prometteurs par le département des Energies des Etats-Unis (Bozell et Petersen 2010).

Cependant son mode de production actuel est polluant avec des coûts élevés ; l'anhydride maléique étant un produit très toxique. C'est pourquoi la fermentation à partir de ressources renouvelables représente un fort intérêt industriel et est décrite comme « opérationnelle » depuis 1940 (Goldberg, Rokem et Pines 2006). De plus, l'acide fumarique présente une faible solubilité comparée aux autres acides dicarboxyliques et de faibles valeurs de pKa, des propriétés avantageuses pour la récupération du produit en réacteur. Le mécanisme d'accumulation de cet acide au sein des cellules de champignons appartenant au genre *Rhizopus* est de ce fait un peu plus renseigné. Il a été montré que sa formation pouvait provenir du cycle de Krebs mais aussi d'un autre phénomène de condensation impliquant la fixation de CO<sub>2</sub> catalysée par une pyruvate carboxylase entraînant la formation d'acide oxaloacétique, les acides en C4 intermédiaires peuvent être retirés pour la biosynthèse pendant la phase de croissance en condition aérobie. Quand l'azote devient limitant, la phase de croissance s'arrête mais le métabolisme du glucose et la fixation de CO<sub>2</sub> continuent entraînant une accumulation des acides en C4 (Overman et Romano 1969). Le mécanisme de transport de l'acide fumarique hors de la

cellule de champignon reste en revanche très peu étudié, il semble proche de celui des levures avec l'acide malique, c'est-à-dire via un symport ou par simple diffusion liée au pH.

*Rhizopus arrhizus* et *Rhizopus oryzae* ont été décrites parmi 41 souches comme étant les espèces produisant le plus d'acide fumarique (Willke et Vorlop 2004). La principale difficulté dans la culture des souches *Rhizopus* est leur morphologie. Le mycélium étant souvent agrégé le long du matériel dans les bioréacteurs, la culture peut alors souffrir d'un mauvais apport en oxygène et en nutriments, encore plus lorsque du fumarate de calcium se forme (du carbonate de calcium est ajouté au milieu afin de neutraliser la formation d'acide au cours de la fermentation, de ramener le pH à des valeurs optimale de croissance et de générer du CO<sub>2</sub>, substrat de la pyruvate carboxylase) (Roa Engel et al. 2008; Goldberg, Rokem et Pines 2006).

### 1.3.1.3 Acide malique

L'acide malique est un acide dicarboxylique en C4 présents dans de nombreux fruits. Il était obtenu traditionnellement par extraction du jus de pomme (0,4-0,7% d'acide malique). Aujourd'hui, l'acide malique est produit par deux procédés :

- Une synthèse chimique par hydratation de l'acide maléique ou fumarique à haute température et à haute pression, donnant le mélange racémique ;
- Une synthèse enzymatique, par laquelle l'acide fumarique est transformé en acide L-malique.

La production de l'acide malique en 2008 s'élevait à 10 000 tonnes. Mais les coûts de production par ces synthèses restent élevés (Sauer et al. 2008). Cet acide est communément utilisé comme acidifiant pour aliments et boissons et dans le traitement de certaines dysfonctions hépatiques. Au début des années 1960, l'intérêt industriel s'est accru pour la production de cet acide par fermentation avec le dépôt d'un brevet (Abe et al. 1960). Plusieurs *Aspergilli* ont été testés et *Aspergillus flavus* s'est avéré être le meilleur producteur lors d'un criblage initial, suivi d'*Aspergillus oryzae* qui montre aujourd'hui les meilleurs rendements. Quatre voies métaboliques majeures ont été décrites comme aboutissant à la formation d'acide malique chez ces souches. La première implique la carboxylation du pyruvate en oxaloacétate suivie immédiatement de la réduction en acide malique, ce qui conduit au rendement théorique le plus élevé (2 moles par mole de glucose). La deuxième route implique le cycle de Krebs classique. La troisième voie possible utilise les réactions de la route glyoxylate (shunt glyoxylate), dérivée du cycle de Krebs, pouvant être cyclique ou non (4<sup>ème</sup> route) (Figure 1). Contrairement aux procédés commerciaux développés pour la production d'acide citrique et fumarique, où les glucides sont transformés en acides intermédiaires du cycle de Krebs en grandes quantités, l'acide malique est présent chez les champignons filamenteux à de plus faibles concentrations. Par conséquent, cette fermentation n'est pas effectuée à l'échelle commerciale. Les raisons de la faible efficacité de la production d'acide malique ne sont pas encore bien cernées et la possibilité d'atteindre des productivités similaires aux acides citrique et fumarique dépend de la recherche approfondie des facteurs qui limitent son accumulation (Battat et al. 1991).

#### 1.3.1.4 Acide itaconique

L'acide itaconique est un acide organique dicarboxylique en C5 qui n'est pas directement impliqué dans le cycle de Krebs mais qui proviendrait chez les microorganismes de la décarboxylation d'un des intermédiaire, l'acide aconitique, dans des conditions encore peu définies (Restino 2012). L'acide itaconique a été découvert, en 1837 par Baup, comme produit de décomposition de l'acide citrique puis en 1932 Kinoshita décrit la production de cet acide par *Aspergillus itaconicus* à partir de glucose ou de saccharose (Kuenz et al. 2012). Quelques années après, *Aspergillus terreus* est décrit comme producteur d'acide itaconique en grande quantité (Calam, Oxford et Raistrick 1939). L'utilisation de ce champignon pour la production de cet acide est breveté en 1995 (Jarry et Seraudie 1995). Il y a environ 10 ans, plus de 80 000 tonnes d'acide itaconique étaient produites chaque année dans le monde (Okabe et al. 2009) dont 15000 tonnes d'origine fongique. Le processus de production par fermentation des hydrates de carbone par les champignons permet d'atteindre une production d'environ 80 g·L<sup>-1</sup> (Willke et Vorlop 2001). L'acide itaconique est utilisé par l'industrie chimique pour la production de résines synthétiques, de fibres, de plastiques, de caoutchoucs, de tensioactifs et d'additifs pétroliers, ce qui a entraîné une augmentation de la demande pour ce produit (Meyer et al. 2016). Il y a en effet un intérêt continu dans le développement de méthodes biologiques pour produire des composés insaturés qui conviennent à la fabrication de divers polymères (Ferraboschi et al. 1994). De nouvelles innovations biotechnologiques aideraient à contrôler la production, tels que de nouveaux procédés innovants d'immobilisation ou d'amélioration des souches. L'utilisation de substrats alternatifs pourrait également réduire les coûts et ainsi ouvrir le marché à de nouvelles applications.

#### 1.3.2 Enzymes, éthanol, lipides pour les biocarburants

Les biocarburants sont produits à partir de la biomasse et peuvent être utilisés sous forme de carburants purs ou d'additifs ajoutés dans des proportions variables aux carburants fossiles, afin de favoriser une mobilité durable. À eux seuls, les transports représentent un quart de la consommation d'énergie et un quart des émissions de gaz à effet de serre en France (Lévy 2009). Plusieurs hypothèses existent mais il a par exemple été montré que le bilan des biocarburants issus de la biomasse permettrait une réduction des émissions d'environ 120 gCO<sub>2</sub>eq./L<sup>2</sup> [ $\pm 25$  %] par rapport à l'essence sans plomb. C'est-à-dire que pour une consommation de 3,5 millions de tonnes par année (exemple de la Suisse), les économies en émissions de dioxyde de carbone associées à l'utilisation d'un biocarburant contenant 5 % de bioéthanol sont estimées à environ un demi-million de tonnes CO<sub>2</sub> par année. Ce chiffre correspond à environ 1.8 kg [ $\pm 25$  %] de CO<sub>2</sub> «économisés» par litre d'essence substitué par du bioéthanol (Fromentin et al. 2000).

Trois générations de biocarburants sont définies actuellement selon l'origine de la biomasse utilisée et les procédés de transformation associés.

La première génération, distribuée à la pompe, est produite à partir de végétaux alimentaires. La France utilise un peu moins de 6 % de sa surface agricole pour ces

---

2 «Équivalent CO<sub>2</sub>» consiste à attribuer pour une période de temps donnée un «potentiel de réchauffement global» (PRG) différent pour chaque gaz par rapport au CO<sub>2</sub> qui sert d'étalon (et dont le PRG est donc fixé à 1)

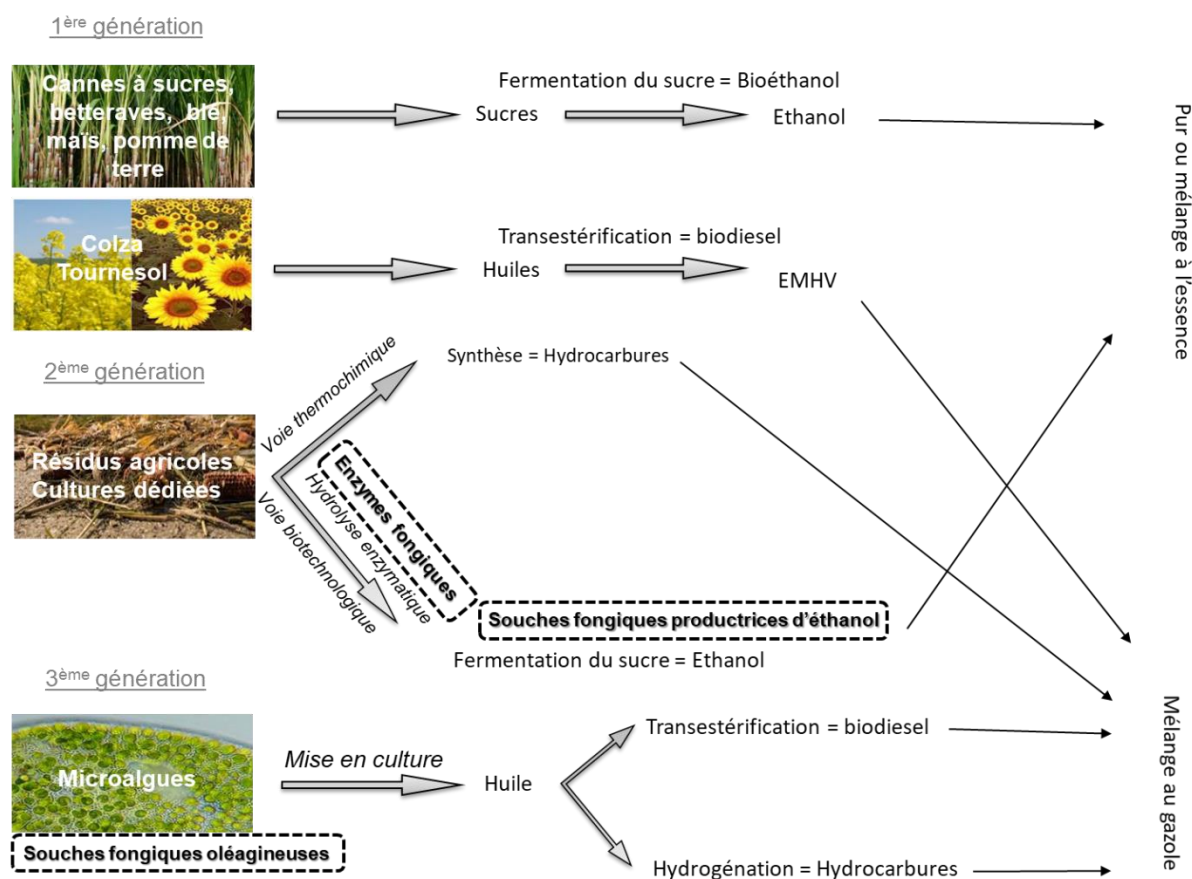


biocarburants, soit 1,7 million d'hectares (Lévy 2009). D'une part le biodiesel est obtenu par transestérification à partir de l'huile extraite du colza et du tournesol pour former un ester méthylique d'huile végétale, EMHV, mélangé réglementairement au gazole jusqu'à 7%. D'autre part le bioéthanol est produit par le mélange des produits de fermentation du sucre de betterave ou de l'hydrolyse enzymatique de l'amidon du blé, du maïs ou de la pomme de terre, et est incorporé à l'essence à hauteur de 10% (SP95E10) maximum, selon la réglementation, pour constituer l'essence sans plomb que l'on trouve aujourd'hui à la pompe.

La deuxième génération de biocarburant utilise la lignocellulose de la plante, cette ressource n'entre pas en concurrence directe avec les cultures vivrières. Tous les déchets verts (résidus agricoles ou forestiers) peuvent être utilisés mais nécessitent obligatoirement un prétraitement physicochimique ou biologique suivi d'une hydrolyse enzymatique. Dans cette démarche, en France, le projet FUTUROL visant à mettre sur le marché des enzymes et levures pour assurer la production de bioéthanol de 2<sup>ème</sup> génération, a disposé d'un budget de plus de 76,4 millions d'euros depuis 2008. Les partenaires du projet (11 leaders des secteurs de la R&D, de l'industrie et de la finance, dont IFP Energies nouvelles) se sont associés dans une structure nommée PROCETHOL 2G qui porte plus spécifiquement ce projet. Aujourd'hui, le procédé développé est commercialisé par Axens, filiale d'IFPEN.

Enfin, la troisième génération cherche à utiliser le potentiel des micro-algues à synthétiser des huiles, des sucres et de l'hydrogène pouvant servir à la production de biocarburants, ces micro-organismes marins présentant une productivité élevée et des besoins limités à la lumière, au CO<sub>2</sub> et à de l'azote ou autres additifs peu coûteux

Aujourd'hui, la première génération a donc atteint le stade industriel, la seconde génération est en phase de développement et la 3<sup>ème</sup> nécessite encore des recherches plus avancées (Ministère de la Transition écologique et solidaire 2016). Bien que les enzymes, l'éthanol et les lipides soient des molécules aux potentiels très variés dans l'immense domaine des biotechnologies, nous détaillons ici brièvement leur intérêt général mais plus particulièrement leur place dans la recherche et l'optimisation des processus liés au développement des biocarburants, résumés en Figure 2.



**Figure 2 :** Place potentielle des métabolites d'origine fongique dans les procédés de production de biocarburants de 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> génération.

### 1.3.2.1 Enzymes

Les champignons filamenteux sont capables de produire un large panel de protéines spécifiques, des enzymes aux protéines structurales. Les enzymes sont libérées de la surface de la membrane plasmique dans l'espace périplasmique, où elles peuvent être incorporées dans la paroi cellulaire ou, dans de nombreux cas, peuvent être sécrétées à travers la paroi cellulaire dans le milieu externe (Peberdy 1994). Leur spectre de sécrétion est très large, bien que la plupart soient de nature hydrolytique et jouent un rôle important dans leur nutrition, en permettant la libération du carbone et de l'azote emprisonnés dans des macromolécules insolubles. Plusieurs de ces enzymes ont été développées pour diverses utilisations commerciales, produites directement par des champignons filamenteux ou d'origine bactérienne produites par recombinaison chez des champignons. Dans les années 90, la production mondiale annuelle d'enzymes était de 10 kt/an (Theilleux et Baduel 1992). En 2016, le marché mondial des enzymes industrielles a été estimé à 4,6 milliards de dollars, et devrait atteindre 6,3 milliards de dollars d'ici 2022 (marketsandmarkets 2016). En effet, les enzymes produites par les champignons filamenteux font partie de notre quotidien. On les retrouve tout d'abord dans le domaine de l'alimentation avec des amylases, des protéases, ou encore des invertases, utilisées pour la transformation des ressources amylacées et sucrières. Une autre application au service des industries agro-alimentaire consiste à utiliser les pectinases pour

clarifier les jus de fruit. En application chimique on retrouve principalement les lipases et les cellulases dans les détergents et autres nettoyants ménagers, mais aussi dans la transformation des textiles et dans la fabrication de papier. Leur production représente toujours aujourd'hui un secteur important et en pleine croissance de l'industrie de la fermentation. Certaines des souches fongiques utilisées pour produire des enzymes destinées à être utilisées dans des procédés industriels sont censées sécréter des quantités importantes de leur produits respectifs. Par exemple, il est revendiqué qu'*A. niger* peut sécréter l'enzyme glucoamylase jusqu'à 20 g·L<sup>-1</sup> et *Trichoderma reesei* a prouvé une capacité de production de cellulases de plus de 100 g·L<sup>-1</sup> (Ben Chaabane et Chaussepied 2016). Il est d'ailleurs considéré que les principaux genres producteurs sont *Aspergillus* (Bennett 2010) et *Trichoderma* (Reczey et al. 1996; Peterson et Nevalainen 2012).

Les cellulases présentent un intérêt particulier pour la dégradation de la lignocellulose provenant des déchets agricoles en sucres fermentescibles, afin d'obtenir l'éthanol pour les biocarburants de 2<sup>nd</sup>e génération (Figure 2). Le système enzymatique le plus étudié et caractérisé pour la production industrielle de cellulases destinées aux biocarburants est celui du champignon filamenteux *T. reesei* (Reczey et al. 1996; Peterson et Nevalainen 2012). Son hydrolyse de la lignocellulose résulte majoritairement de l'action combinée de plusieurs enzymes : les endoglucanases, les exoglucanases et les β-glucosidases.

### 1.3.2.2 Ethanol

Actuellement l'éthanol commercialisé est produit principalement par fermentation employant la levure. Parmi ses diverses applications en alimentaire et produits pharmaceutiques, l'éthanol est également aujourd'hui le biocarburant le plus consommé au monde. C'est le Brésil qui a introduit en premier ce carburant renouvelable, utilisé depuis le début du XXe siècle à des fins énergétiques. Les premières utilisations en tant que carburant pour les véhicules (Programme national de l'Alcool dit ProAlcool<sup>3</sup>) ont été menées à des taux proches de 5 % (v/v) additionné à l'essence. Aujourd'hui et depuis les années 80 le bioéthanol peut être incorporé à des taux bien plus élevés (E85 ; jusqu'à 85% d'éthanol) ou même comme carburant pur. Pendant des décennies, le Brésil a été le principal producteur, mais a été dépassé depuis plusieurs années par les États-Unis. En 2009 les productions s'élevaient à 27,7 milliards de litres pour le Brésil contre 51,8 milliards de litres pour les Etats-Unis, loin devant l'Europe avec 6,7 milliards de litres (Gauder, Graeff-Hönninger et Claupein 2011; Droulers et Carrizo 2010).

Le procédé actuel de première génération (1G) fonctionne en fed-batch (75% des distilleries) ou en mode continu, tous deux utilisant le recyclage des cellules de levure. Dans les deux processus, après la fin de la fermentation, les cellules sont recueillies par centrifugation et réutilisées (jusqu'à 90-95%) dans un cycle de fermentation suivant. L'éthanol 1G est produit à partir de matières premières renouvelables, contenant des quantités considérables de sucres facilement fermentescibles (canne à sucre, betterave à sucre, sorgho sucré), ou d'amidon et de fructosanes (maïs, pommes de terre, riz, blé, agave). Ces matières végétales peuvent être facilement fermentées par les levures (soit directement dans le cas des plantes saccharifères,

---

3 Le gouvernement Geisel décida, en 1975, de produire à grande échelle l'alcool de canne à sucre ou de manioc pour remplacer l'essence.

soit après hydrolyse enzymatique avec des amylases dans le cas des plantes amylacées) mais sont également destinées à l'alimentation et posent donc des problèmes éthiques liés à la compétition alimentation/carburant .

L'éthanol de deuxième génération (2G) vise donc aujourd'hui à produire l'éthanol à base de matière première lignocellulosiques (très abondantes et non compétitives avec les ressources alimentaires), entraînant quelques difficultés supplémentaires dans les procédés. En effet, pour produire de l'éthanol de manière rentable par fermentation de la biomasse lignocellulosique, celle-ci est préalablement décomposée en sucres fermentescibles en C5 et C6 qui sont ensuite transformés par des microorganismes devant répondre aux exigences suivantes (Dien et Bothast 2009):

- Utilisation de tous les sucres (pentoses et hexoses) présents dans la biomasse lignocellulosique ;
- Stabilité et tolérance envers des constituants présents dans la biomasse prétraitée (généralement inhibiteurs de fermentation) et par conséquent éviter le prix d'élimination de ces derniers ;
- Pouvoir de fermentation à bas pH (éviter les contaminations bactériennes) ;
- Tolérance aux concentrations d'éthanol très élevées.

Les souches de levures industrielles rencontrent donc plusieurs conditions de stress, augmentées par le système de recyclage. De plus, même si les hexoses sont facilement fermentés en éthanol par la levure *Saccharomyces cerevisiae*, cette levure ne peut pas naturellement fermenter la fraction des sucres à cinq carbones (xylose et arabinose). Aujourd'hui les recherches portent sur plusieurs stratégies pour répondre à ces problématiques. Puisque déjà utilisée à grande échelle pour la production d'éthanol 1G, *S. cerevisiae* est la principale candidate pour la production d'éthanol 2G. Cette levure est facile à manipuler génétiquement, sa physiologie, son métabolisme et sa génétique ont été étudiés intensivement et sa robustesse lui permet de supporter ces conditions industrielles difficiles. L'introduction de nouvelles voies hétérologues et l'optimisation de ses processus cellulaires naturels par l'ingénierie métabolique ont permis d'obtenir des productions d'éthanol à partir de pentoses et notamment du xylose, à des taux plus faibles que ceux obtenus avec le glucose (jusqu'à 21,5% v/v d'éthanol soit environ 170 g·L<sup>-1</sup> (Straathof 2014)) mais suffisant par rapport aux productions actuelles d'éthanol 2G. Récemment des résultats brevetés par Lesaffre montrent l'obtention d'une souche apte à fermenter le xylose à de haut taux de conversion, avec un titre moyen de 55 g·L<sup>-1</sup> d'éthanol dépendant des différents mélanges de substrats utilisés (Desfougeres et Pignede 2015). D'autres approches visent à optimiser de nouvelles souches de levures ou de bactéries capables d'utiliser naturellement ces sucres. C'est le cas de la levure *Pichia stipitis*, pouvant produire 41 g·L<sup>-1</sup> d'éthanol sur xylose, et présentant des exigences nutritionnelles simples ainsi qu'une grande résistance à la contamination. Mais sa consommation de sucres est plus lente par rapport à *S. cerevisiae* et nécessite des conditions microaérophiles difficilement applicable en industrie (Agbogbo et Coward-Kelly 2008; van Vleet et Jeffries 2009). Dans la mise en œuvre des bactéries *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, et *Zymomonas mobilis* sont largement étudiées. *E. coli* et *K. oxytoca* sont naturellement capables d'utiliser les sucres en C5, les travaux ont principalement porté sur leur production sélective d'éthanol. La souche *Z. mobilis* produit de l'éthanol à rendements élevés, mais fermente seulement le glucose et le

fructose. Le travail sur cet organisme s'est donc concentré sur l'introduction de nouvelles voies métaboliques pour la fermentation du xylose (Dien, Cotta et Jeffries 2003).

D'autre part, les champignons filamenteux appartenant aux genres *Fusarium*, *Monilia* et *Neurospora* ont été identifiés au cours des dernières années comme des organismes efficaces dans la conversion de la cellulose directement en éthanol. Certaines espèces appartenant au genre *Mucor* ont également été décrites comme candidates pour la production d'éthanol à partir de xylose et de glucose avec des rendements élevés, ainsi que le champignon *Rhizopus oryzae* (Skory, Freer et Bothast 1997). L'intérêt de ces champignons est le couplage de leur activité enzymatique pour la dégradation de la lignocellulose avec leur pouvoir de fermentation des sucres en C5, ce qui les rend candidats au développement d'organismes CBP<sup>4</sup>. Cependant, le principal inconvénient réside encore une fois dans leur faible productivité par rapport à celle de la levure ainsi qu'à des conditions de culture plus difficiles à mettre en œuvre à l'échelle industrielle. Afin d'améliorer cette production, les chercheurs du domaine tentent de caractériser au mieux des milieux de cultures favorisant la production d'éthanol par ses souches (sources de carbone, d'azote ou encore de minéraux), de contrôler la production des coproduits comme les acides organiques (Singh, Kumar et Schügerl 1992).

### 1.3.2.3 Lipides

Les lipides sont des composants importants tant en termes de structure que de stockage d'énergie chez les micro-organismes. De nombreuses études ont démontré l'importance des lipides pour le développement des micro-organismes et leur implication dans divers processus physiologiques dont la sporulation et la germination. Cependant, peu de micro-organismes accumulent des lipides à de forte concentration. Les espèces capables de le faire, décrites comme oléagineuses, présentent des taux d'accumulation de plus de 20% de leur biomasse, beaucoup plus représentés chez les levures et les champignons que chez les bactéries. Chez ces micro-organismes oléagineux, les principaux facteurs qui influencent la production de lipides sont la nature et la proportion de carbone et d'azote comme sources nutritives dans le milieu. Les lipides peuvent par la suite s'accumuler par deux voies différentes: via une synthèse de novo, impliquant la production des précurseurs d'acides gras, tels que l'acétyl et la malonyl-coenzyme A et leur intégration dans la voie de biosynthèse des lipides de stockage et/ou via la voie d'accumulation ex novo, impliquant l'absorption d'acides gras, d'huiles et de triacylglycérols (TAG) du milieu de culture et leur accumulation dans leur forme naturelle ou modifiée au sein de la cellule, nécessitant tout une machinerie enzymatique complexe (Bowman et Free 2006).

Les levures oléagineuses les plus décrites comprennent les genres *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Trichosporon* et *Yarrowia*. En moyenne, certains de ces micro-organismes accumulent des lipides à un niveau correspondant à 40 % de leur biomasse. Cependant, dans des conditions de limitation en éléments nutritifs, ils peuvent accumuler des lipides à des niveaux dépassant 70 % de leur biomasse (Kamel et Kakuda 2012). La teneur et le profil lipidique diffèrent d'une espèce à l'autre. Par exemple, *Cryptococcus curvatus*

---

4 Consolidated bioprocessing : schéma de procédé où un seul organisme est employé pour l'hydrolyse de la biomasse lignocellulosique et la fermentation des sucres libérés, permettant potentiellement de réduire le coût total du procédé.

accumule de grandes quantités d'acide palmitique, tandis que l'acide oléique est l'acide gras principal extrait chez *Cryptococcus albidus*. Chez les espèces de *Rhodotorula*, c'est la teneur en lipides qui diverge significativement (*Rhodotorula glutinis* et *Rhodotorula graminis* accumulent des lipides à des niveaux correspondant respectivement à 72 % et 36 % de leur biomasse), alors que la composition en acides gras reste similaire. *Yarrowia lipolytica* accumule des lipides à des niveaux plus bas que certaines autres espèces oléagineuses, mais c'est la seule levure connue pour être capable d'accumuler l'acide linoléique à de fortes concentrations (plus de 50 % des résidus d'acides gras) (Beopoulos et al. 2009).

D'autre part, au cours des dernières années, l'intérêt pour la production de biocarburants à partir de micro-algues (3<sup>ème</sup> génération) a considérablement augmenté. C'est le cas, par exemple, de l'algue *Dunaliella tertiolecta* (Tang et al. 2011) dont l'utilisation présenterait un maximum d'avantages : haute concentration en lipides, croissance rapide (temps de doublement de quelques heures), capacité à séquestrer le dioxyde de carbone et de croître dans des milieux aqueux très salins (Saber, Nakhshiniev et Yoshikawa 2016). Une première approche pour produire des carburants à partir d'algues consiste à extraire les lipides puis à les convertir en biodiesel via des réactions d'estérification/transestérification. L'autre approche met en œuvre des procédés de conversions thermochimiques. Actuellement, deux techniques thermochimiques sont utilisées pour la production d'huile à partir d'algues : la pyrolyse et la liquéfaction hydrothermale (HTL). La pyrolyse nécessitant un séchage des matières premières, augmente la consommation d'énergie de l'ensemble du processus. D'autre part, la pression élevée nécessaire en HTL entraîne des coûts bien trop élevés qui constituent le principal obstacle à sa commercialisation. De nombreux aspects de la culture des micro-algues tels que la demande en lumière, en CO<sub>2</sub> ou encore le besoin d'espace pour leur croissance et les coûts de séparations, entraîne également un frein au changement d'échelle et à l'industrialisation des résultats obtenus jusqu'ici.

Les champignons filamenteux dont la croissance peut être réalisée en bioréacteurs classiques, comme par exemple les champignons filamenteux *Mortierella isabellina* déjà mis en œuvre industriellement pour la production d'huiles en alimentation infantile (Gao et al. 2014; Meeuwse, Tramper et Rinzema 2011) et *Mucor circinelloides* (Vicente et al. 2009) sont également de bons candidats à la production industrielle de lipides pour les biocarburants. Ces champignons présentent de nombreuses caractéristiques pertinentes favorisant leur utilisation pour la production de biodiesel : un taux élevé de lipides dans l'appareil végétatif (mycélium), une bonne production de biomasse pendant la culture et des huiles riches en acide linoléique (Ratledge 2004). Compte tenu de son utilisation potentielle dans la production de biocarburants, le ministère de l'Énergie des États-Unis a d'ailleurs choisi le champignon filamenteux *M. circinelloides* comme candidat pour le séquençage de génome au sein du programme de bioénergie du Joint Genome Institute.

### 1.3.3 Antibiotiques et autres composés pour la santé et la cosmétique

#### 1.3.3.1 Antibiotiques

La production industrielle d'antibiotiques  $\beta$ -lactamines par fermentation au cours des 50 dernières années est l'un des exemples les plus connus de la biotechnologie. Aujourd'hui, les antibiotiques  $\beta$ -lactamines, en particulier les pénicillines et les céphalosporines, représentent

les principaux produits biotechnologiques du monde avec une production mondiale en 2014 de 50 kt/an (Straathof 2014). Au cours des cinq dernières décennies, des améliorations majeures de la productivité de *Penicillium chrysogenum* et *Acremonium chrysogenum* ainsi qu'une optimisation des technologies de fermentations ont abouti à une productivité accrue et à une réduction des coûts. On estimait déjà en 2003 que les principaux procédés de fermentation enregistraient des titres de 40-50 g·L<sup>-1</sup> pour la pénicilline et de 20-25 g·L<sup>-1</sup> pour la céphalosporine C (Elander 2003). Cependant, les grandes sociétés pharmaceutiques relatent encore aujourd'hui de difficultés associées aux changements morphologiques de ces champignons au cours des cultures en bioréacteurs, peu maîtrisés et compris bien que décrits depuis plusieurs dizaines d'années (Makagiansar et al. 1993). De plus, il devient de plus en plus urgent de découvrir de nouvelles molécules en raison de l'émergence toujours croissante de bactéries résistantes pathogènes et les métabolites secondaires d'autres champignons filamenteux restent finalement une ressource encore peu exploitée.

### 1.3.3.2 Autres composés organiques

En réalité les antibiotiques ne représentent que quelques-uns des nombreux métabolites secondaires d'intérêt médical produits par les champignons filamenteux. Les sociétés pharmaceutiques ont mis en place de vastes programmes de criblages dès 1950, un immense panel de produits microbiens à usage pharmaceutique avait été découvert. La recherche de métabolites secondaires bioactifs s'est poursuivie, et des milliers de composés inhibant la croissance des bactéries, des champignons, des protozoaires, des parasites, des insectes, des virus et même des cellules tumorales humaines ont été découverts. De nombreuses autres molécules ayant des effets cytotoxiques, mutagènes, carcino-géniques, tératogènes, immunosuppresseurs, inhibiteurs d'enzymes, et d'autres effets biologiques ont également été trouvées (Keller, Turner et Bennett 2005). Aujourd'hui, par exemple, le champignon *A. terreus* est utilisé cliniquement pour sa capacité à produire la lovastatine, molécule utile dans le traitement du cholestérol sanguin (Bizukojc et Ledakowicz 2010). Ainsi, la production à grande échelle de composants essentiels pour plusieurs principes actifs pharmaceutiques a été établie avec succès dans les champignons filamenteux (Meyer et al. 2016).

Les champignons synthétisent également des molécules volatiles responsables de leur odeur caractéristique. Les molécules identifiées sont très diverses et présentent des structures chimiques que l'on peut classer en trois grands groupes : les dérivés lipidiques (issus d'acides gras), les dérivés aromatiques et les dérivés terpéniques. La plupart de ces métabolites secondaires sont impliqués dans les interactions des organismes fongiques avec leur environnement ainsi que dans leurs processus de reproduction et de développement. Certains de ces COV (composés organiques volatiles) ont des applications possibles dans l'industrie du parfum, en cosmétologie et dans les produits d'hygiène. Environ 250 COV ont été identifiés à partir de champignons se présentant sous forme de mélanges d'hydrocarbures simples, hétérocycles, aldéhydes, cétones, alcools, phénols, thioalcools, thioesters et leurs dérivés, y compris, entre autres, des dérivés du benzène et des cyclohexanes (Morath, Hung et Bennett 2012).

Une autre utilisation est également à citer en dehors de la santé, dans l'agriculture, où les COV fongiques ont été utilisés dans le cadre de stratégies de lutte biologique pour prévenir la croissance des agents pathogènes des plantes. L'étude des effets favorisant la croissance des

plantes de ces mélanges de COV présente un intérêt croissant. Dans l'industrie alimentaire, les mêmes propriétés de contrôle biologique sont utilisées pour empêcher la croissance des champignons après la récolte, dans ce qu'on appelle la « mycofumigation ». Enfin plus récemment, les COV fongiques ont été étudiés pour leur rôle potentiel en tant que sources de carburant, populairement appelé « mycodiesel » (Muller et al. 2013).

*L'utilisation des champignons filamenteux en biotechnologies blanches est avérée. L'alimentaire et la pharmaceutique représentent les secteurs initialement les plus concernés. Mais leur potentiel est également établi pour leur exploitation dans bon nombres d'autres procédés en chimie biosourcée ou en biocarburant. Un des challenges à leur optimisation et leurs nouvelles applications repose sur une meilleure compréhension du métabolisme et de la morphologie complexe de ces organismes pour une meilleure maîtrise des bioprocédés.*



## **2 Compréhension des champignons filamenteux**

*Les champignons filamenteux sont hétérotrophes, et plus particulièrement absorbotrophes puisqu'ils absorbent les éléments, digérés de manière extracellulaire, au travers de leur paroi cellulaire. Formant leur propre règne au sein de la nature, ce sont des microorganismes complexes, présentant différentes formes structurelles tout au long de leur cycle de vie.*

### **2.1 Classification**

C'est à partir de 1969 que les scientifiques ont commencé à parler de règne pour qualifier le monde des champignons. Les champignons représentent donc un règne à part au sein des eucaryotes, bien distinct du règne des protistes<sup>5</sup>, des végétaux ou de celui des animaux. La classification traditionnelle des champignons filamenteux a été initialement fondée sur des critères phénotypiques. Avec le développement des méthodes de biologie moléculaire la classification phylogénétique se base aujourd'hui de plus en plus sur des critères génotypiques, et est donc en constante évolution.

Aujourd'hui, les champignons filamenteux sont classés parmi les Opisthokontes constituant un groupe particulier d'eucaryotes (Adl et al. 2005). La nomenclature utilisée pour déterminer le nom scientifique des espèces est binomiale, (elle suit les règles énoncées par le naturaliste Carl Von Linne en 1753), c'est-à-dire faisant référence au genre puis à l'espèce. La nomenclature des différents taxons présente une terminologie codifiée, le suffixe permettant de définir chaque rang taxonomique dans la classification hiérarchique. Le règne Fungi comprend actuellement un sous-règne (Dikarya) et six divisions (Hibbett et al. 2007). De manière plus simplifiée, ce règne peut être divisé en deux groupes informels (Figure 3).

Les champignons « inférieurs » (dont l'ancienne division des Zygomycètes<sup>6</sup>) représentent des organismes de biologie très variée mais incapables de différencier des structures de dispersions pluricellulaires. La dispersion s'effectue grâce à des zoospores (spores flagellés et mobiles). La forme végétative de ces organismes peut varier d'une cellule à un mycélium simple, parfois mais rarement cloisonné. Par exemple les *microsporidies* sont des parasites intracellulaires obligatoires ne possédant pas la plupart des organites de la cellule eucaryote alors que les *mucoromycotina* sont des saprophytes très abondants dans les sols et dont la croissance en filament est très rapide.

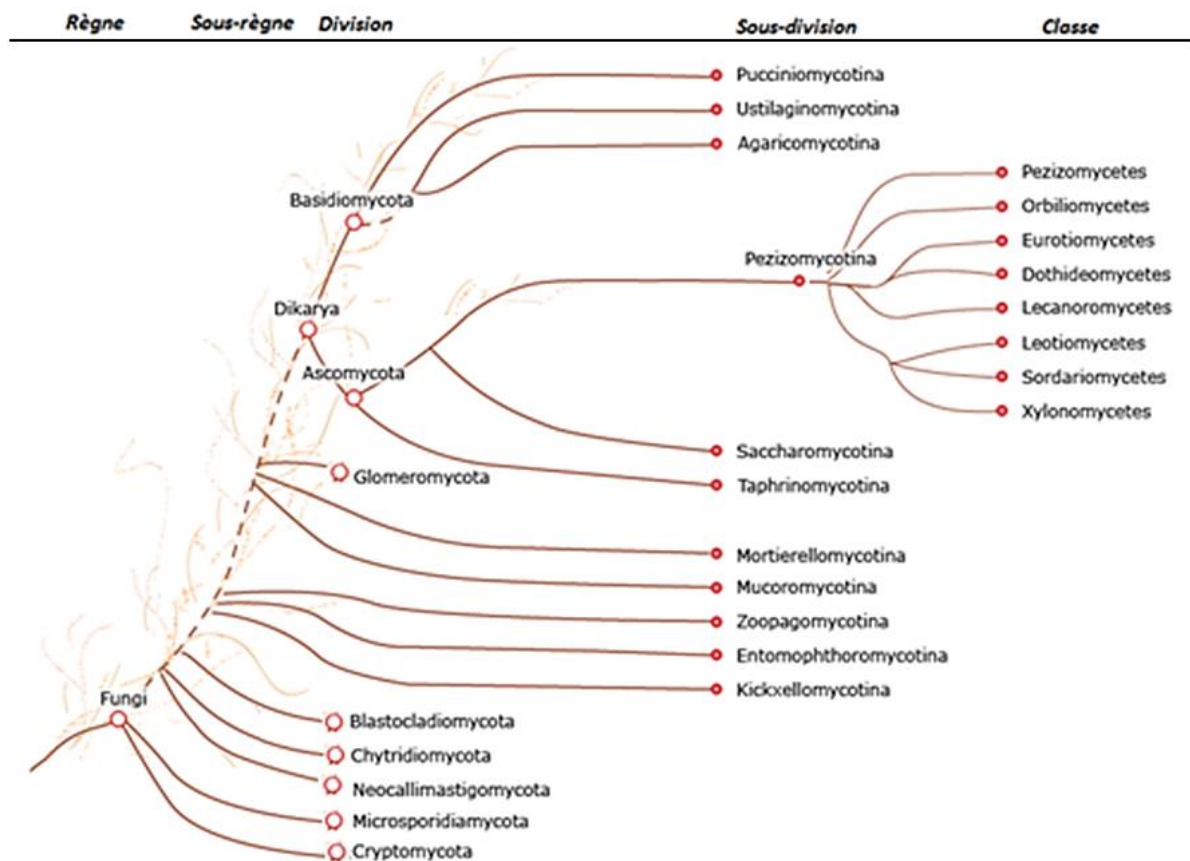
Les champignons « supérieurs » (Basidiomycètes et Ascomycètes) semblent tous dériver d'un même ancêtre commun ayant acquis la capacité à avoir une cellule à deux noyaux (« Dikarya »). Si l'intérêt de la cellule à deux noyaux n'est pas encore très bien cerné, d'autres caractéristiques avantageuses de ce groupe résident dans leur capacité à différencier des filaments (hyphes) à cloisons percées d'un pore central (hyphes septés) ou encore la possibilité d'effectuer des fusions entre deux cellules, ce que l'on appelle l'anastomose (Silar 2016). Les échanges de nutriments et d'organites sont ainsi facilités chez les champignons supérieurs, ainsi

---

<sup>5</sup> Organismes vivants unicellulaires caractérisés par la présence d'un ou plusieurs noyaux (eucaryotes).

<sup>6</sup> En 2007, le groupe de travail qui a formalisé la classification phylogénétique du règne Fungi (Hibbett et al. 2007) n'a pas retenu les *Zygomycota* comme une division, mais nous l'utilisons dans ce rapport par souci de simplicité.

que les évènements de fusions entre hyphes pour former un réseau complexe filamentueux (Pazouki et Panda 2000) selon un mécanisme de croissance bien particulier, détaillé par la suite. Ce groupe comprend également la sous-division des *Saccharomycotina* dans laquelle sont classées l'essentiel des levures (champignons unicellulaires). Pour le moment, 100 000 espèces ont été décrites, mais les chercheurs estiment qu'il en existe plus d'un million et demi au total.



**Figure 3 :** Classification des champignons (Adapté du JGI).

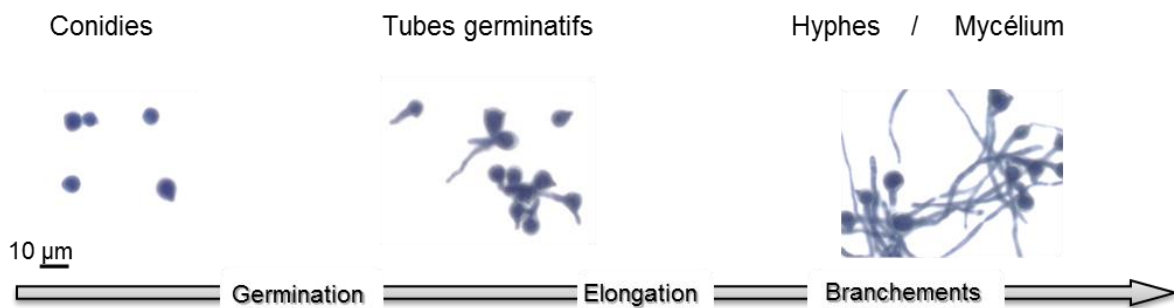
Les Dikarya (Basidiomycètes et Ascomycètes) sont traditionnellement appelés champignons supérieurs, les autres, regroupés auparavant dans la division Zygomycètes, sont dits champignons inférieurs.

## 2.2 Mécanismes de croissance

### 2.2.1 Germination et Extension des hyphes

Les champignons filamenteux se développent sous forme de mycélium végétatif, capable de produire des spores sexuées ou asexuées (conidies), selon les espèces et les conditions, pour leur reproduction. Le cycle de vie des champignons filamenteux débute et se termine sous forme de spores, l'état dormant du microorganisme, assurant la dispersion ou la survie de l'espèce. Puisque notre étude repose exclusivement sur la reproduction asexuée des

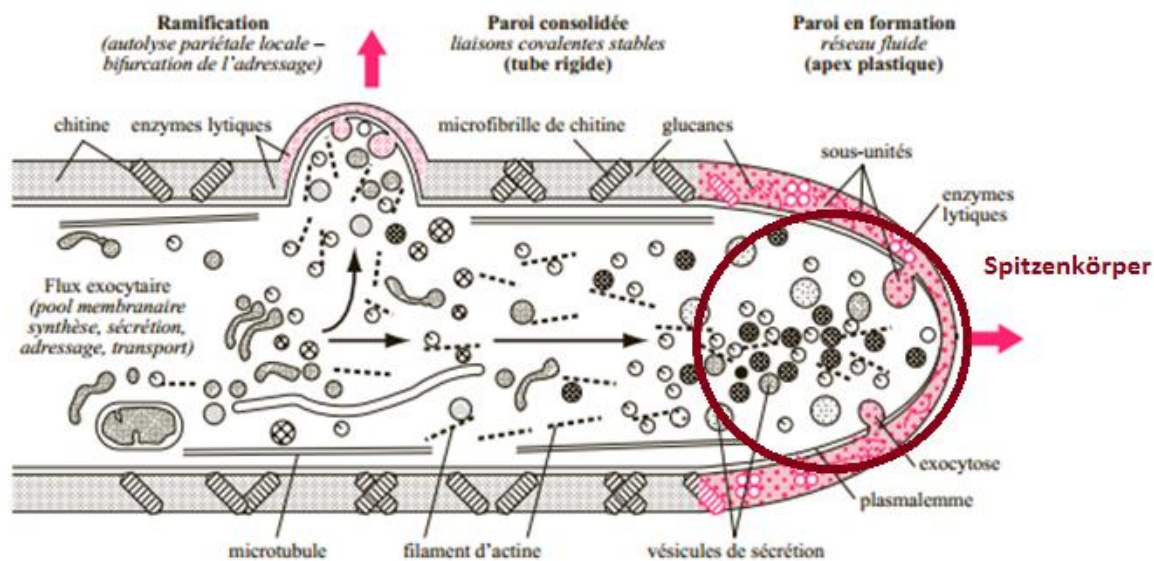
souches étudiées, nous parlerons dans ce manuscrit de conidies plutôt que de spores. En conditions physiques et chimiques requises (qui dépendent de chaque espèce), la germination des conidies est déclenchée, et commence par un gonflement isotropique (identique dans toutes les directions) en raison de la formation et de l'accumulation intensive de nouveau matériau et vésicules. Après une période spécifique, la polarisation de la croissance se produit, ce qui entraîne la formation du tube germinatif. Ensuite, les noyaux se divisent jusqu'à ce que ce tube germinatif contienne 8 à 16 noyaux. Enfin, celui-ci s'étend en hyphe par un système de flux cytoplasmique hautement polarisé appelé élongation des pointes ou élongation de l'apex (« tip extension ») (Wuchterpfennig et al. 2010), (Figure 4).



**Figure 4 :** Principales étapes de développement du mycélium.  
Exemple *Rhizopus oryzae*.

Le cytoplasme de la pointe des hyphes en croissance est occupé presque exclusivement par des vésicules sécrétoires et des microvésicules contenant des précurseurs de paroi. Chez les mycètes supérieurs, ces vésicules s'arrangent en coquille sphérique qui constituent le *spitzenkörper*, ou « corps apical » (de l'allemand Spitzzen signifiant « pointe » et Körper désignant ici un « organe », détaillé en Figure 5). Les champignons inférieurs et notamment les zygomycètes ne contiennent pas de *spitzenkörper* identifiable, et les vésicules sont au contraire réparties de manière diffuse dans le dôme apical.

Le phénomène de *tip extension*, est sensible à divers facteurs, principalement influencés par des variations de  $Ca^{2+}$  intracellulaire. En effet, plusieurs études indiquent un rôle central du calcium cytoplasmique dans la croissance de l'apex (Hyde et Heath 1997; Grinberg et Heath 1997; Silverman-Gavrila et Lew 2000; Riquelme et al. 2011). Il n'est pas surprenant que les ions  $Ca^{2+}$  soient impliqués dans ce phénomène, étant donné leurs fonctions omniprésentes comme seconds messagers dans les cellules eucaryotes. Expérimentalement, la régulation de la formation et de l'extension du cytosquelette ainsi que du taux de fusion des vésicules par le  $Ca^{2+}$  est bien identifiée mais peu expliquée.



**Figure 5 :** Schéma détaillé d'un « tip » ou « pointe » d'hyphe fongique (Jones et Sudbery 2010).

En effet, chez certains champignons notamment *Neurospora crassa*, il a été montré qu'un gradient élevé de  $\text{Ca}^{2+}$  à l'extrémité des hyphes est nécessaire pour la croissance et l'élongation de la pointe des hyphes. La création de ce gradient peut être médiée par des canaux perméables au  $\text{Ca}^{2+}$  localisés à ces extrémités (Riquelme et al. 2011). Une différence de concentration minimale entre le sommet et la région subapicale de 30 nM est nécessaire pour que la croissance se produise (Silverman-Gavrila et Lew 2003). Cette dépendance de la croissance à la concentration en calcium peut être directement liée aux fonctions biochimiques du calcium, comme la fusion des vésicules et l'activation des enzymes au cours de l'expansion cellulaire. L'initiation de la croissance de la pointe peut reposer sur des mouvements aléatoires de  $\text{Ca}^{2+}$  provoquant des régions localisées élevées en calcium. Ces régions en expansion pourraient ainsi activer une phospholipase C qui augmenterait l'inositol 1,4,5-trisphosphate localisé aux pointes des hyphes (IP3) et impliqué dans l'expansion des hyphes.

Il y a beaucoup d'observations sur le mécanisme impliquant ce gradient de  $\text{Ca}^{2+}$  mais également de questions ouvertes concernant son rôle dans la morphogénèse et la croissance polarisée des champignons filamenteux. Par exemple, comment l'alimentation et la demande en  $\text{Ca}^{2+}$  des extrémités sont réellement régulées ou encore quelle est la relation entre le gradient cytoplasmique  $\text{Ca}^{2+}$  et la séquestration des organites tels que le réticulum endoplasmique, les vacuoles et les mitochondries (Nelson et al., 2004).

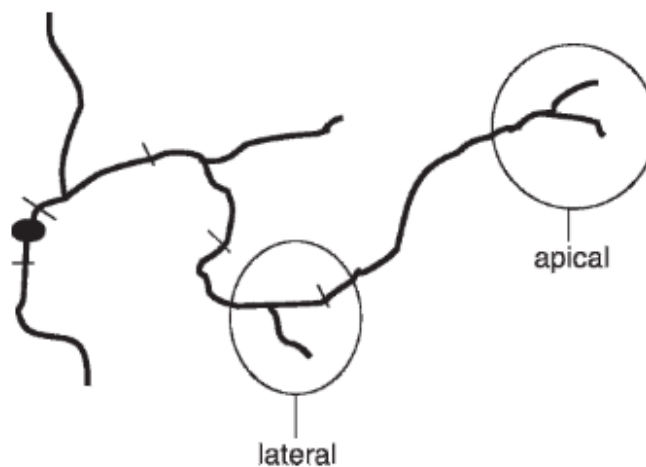
### 2.2.2 Branchement

Une fois les hyphes formés, le phénomène de branchement intervient, et forme un réseau d'hyphes que l'on appelle le mycélium (Figure 4). L'organisation de ce mycélium en trois dimensions est un point très important dans la compréhension et le contrôle de la morphologie des champignons filamenteux. La ramification des hyphes semble avoir deux objectifs

généraux. Tout d'abord, il augmente la surface de la colonie, ce qui améliore probablement l'assimilation des nutriments. Deuxièmement, les branchements semblent moduler les événements de fusion des hyphes impliqués dans les échanges de nutriments et de signaux entre différentes hyphes au sein d'une même colonie mais aussi dans l'interaction avec d'autres organismes.

Peu de choses sont connues sur les phénomènes moléculaires impliqués dans la ramification des hyphes. Le modèle caractéristique de l'organisation mycélienne implique que les hyphes fongiques individuelles présentent un phénomène connu sous le nom de dominance apicale, par lequel la pointe des hyphes en croissance est dominante et supprime la formation de branches latérales dans son voisinage (Saunders et Trinci 1979b). Ce phénomène reflète probablement le ciblage exclusif des vésicules exocytaires chargées de composants nécessaires à l'expansion de la surface cellulaire à la pointe de l'hyphe (comme expliqué précédemment), au détriment des sites de ramification potentiels. Ces sites ne deviennent vraisemblablement actifs que lorsqu'ils sont suffisamment éloignés de la pointe des hyphes. Il semble intuitif que l'absence de dominance apicale entraînerait un modèle de croissance chaotique qui compromettrait le développement des colonies (Semighini et Harris 2008). En conséquence, l'existence d'une dominance apicale suggère que la ramification des hyphes est soumise à des mécanismes de régulation temporelle et spatiale qui assurent des schémas normaux d'organisation mycélienne (Harris 2008).

Principalement deux types de ramifications sont en réalité discernables au sein d'une structure mycélienne, présenté en Figure 6.



**Figure 6 :** Branchements apical et latéral d'une hyphe.  
(Riquelme et Bartnicki-Garcia 2004).

### 2.2.2.1 Branchement apical

L'émergence d'une branche au niveau de la pointe de l'hyphe est appelée ramification apicale. Ce type de ramification a été observé chez un grand nombre de champignons. En général, la ramification apicale se produit en réponse à une trop grande accumulation (dite anormale) de vésicules exocytaires à l'extrémité de l'hyphe. Ceci pourrait être provoqué par des perturbations qui ralentissent l'extension des pointes d'hyphes sans interrompre le flux de vésicules à travers le cytoplasme. Lorsque l'apport de vésicules dépasse leur capacité à être

incorporée dans la pointe existante, elles s'accumulent conduisant à la formation d'une nouvelle pointe. Des observations rapportent que les hyphes exposées à des stress environnementaux aussi bien qu'à des stress physiologiques internes induits par des mutations répondent communément par une ramification apicale. Ce mécanisme semble donc sensible aux perturbations qu'elles soient internes ou externes (Riquelme et Bartnicki-Garcia 2004). De plus, il existe peu de preuves que la ramification apicale partage des mécanismes de contrôle communs avec le modèle de ramification plus répandu, la ramification latérale (Watters et Griffiths 2001). Il semble donc probable que la ramification apicale soit une réponse générale qui permette une croissance continue lorsque les conditions environnementales du champignon compromettent l'organisation des pointes d'hyphes suivant le schéma classique de dominance apicale.

### 2.2.2.2 Branchement latéral

La ramification latérale est l'émergence de nouvelles branches à distance de l'extrémité de l'hyphe, qui semble être le modèle de ramification prédominant chez les champignons filamenteux. Plusieurs traits distinguent la formation des branches latérales de la ramification apicale (Riquelme et Bartnicki-Garcia 2004). En particulier, contrairement à la ramification apicale, la formation d'une branche latérale n'a pas d'impact apparent sur le taux d'extension d'une hyphe en croissance ou sur la forme de sa pointe. En outre, la ramification latérale semble être associée à la formation *de novo* d'un *Spitzenkorper* près du site de la branche naissante, tandis que la ramification apicale est déclenchée par la perte temporaire du *Spitzenkorper* à la pointe. Il est important de souligner cependant que ces observations ont été faites sur des hyphes à croissance rapide chez *N. crassa*, elles peuvent ne pas s'appliquer à toutes les hyphes fongiques (Semighini et Harris 2008). La ramification latérale ne se produirait que lorsqu'un site potentiel est suffisamment éloigné de la pointe pour échapper aux effets de ces facteurs. En conséquence, la nature de ces facteurs et leur mode d'action sont d'un grand intérêt. Il semble de plus y avoir deux grands schémas de ramification latérale : les branches associées aux septums et la ramification aléatoire.

Dans le premier modèle, de nouvelles branches apparaissent adjacentes aux septums, et il semble probable que certaines composantes du septum fournissent une indication spatiale qui spécifie la position de la branche. Plusieurs champignons présentent ce modèle, y compris des membres du phylum *Saccharomycotina*, ainsi que des zygomycètes et des basidiomycètes. Dans la plupart des cas de ramification latérale, la branche émerge juste derrière le septum, ce qui semblerait logique si on considère que le septum sert de barrière empêchant le flux ponctué de vésicules exocytaires et donc conduirait à leur accumulation locale et à l'émergence de la nouvelle branche. Cependant, certaines études suggèrent que cette interprétation peut être trop simple. En 2003, il est décrit, chez certaines espèces, que la délocalisation des anneaux d'actine aux sites de septation, entraînent l'accumulation d'agrégats de chitine aberrants au lieu des cloisons normales (Walther et Wendland 2003). Néanmoins, des branches émergent encore de ces sites. Les auteurs supposent alors qu'une composante impliquée dans une étape précoce de la formation de septum peut fournir une indication spatiale pour la formation de branches.

Le modèle aléatoire de ramification latérale est observé principalement dans les ascomycètes appartenant à la sous-division des *Pezizomycotina* et se caractérise par l'absence apparente d'association entre la septation et la ramification. Plusieurs études révèlent que les

branches tendent à émerger du centre des cellules sous-apicales de *N. crassa*, mais plutôt vers le septum apical chez *A. nidulans* (Saunders et Trinci 1979a; Walther et Wendland 2003). Une caractéristique commune de ces champignons est la formation de cloisons incomplètes qui pourraient être des barrières moins efficaces à l'écoulement vésiculaire que les septums complets. Il a alors été proposé que ces sites de branchements aléatoires, observés chez *N. crassa* ou *A. nidulans*, pourraient également provenir de l'accumulation aléatoire de vésicules au niveau d'un site particulier, mais non défini, qui déclencherait la formation d'une branche (Prosser et Trinci 1978). D'autre part, il existe peu de preuves que des pointes localisées de calcium ou de ROS<sup>7</sup> puissent déterminer des sites de branche potentiels (Harris 2008). Enfin, il semble probable que la division nucléaire localisée pourrait également jouer un rôle critique dans la détermination de l'endroit et du moment où une branche se forme, mais peu de détails sont apportés à ce sujet.

## 2.3 Composition biochimique

### 2.3.1 Mycélium

La paroi du mycélium des champignons filamenteux est constituée essentiellement de polysaccharides, de glycoprotéines et de mannoprotéines. Les polysaccharides sont majoritairement la chitine, polymère de molécules de N-acétylglucosamine, et les glucanes, polymères de molécules de D-glucose. Ces deux polysaccharides assurent la protection des champignons vis-à-vis des agressions du milieu extérieur. La chitine joue un rôle dans la rigidité de la paroi cellulaire, les glycoprotéines jouent un rôle dans l'adhérence et les mannoprotéines forment une matrice autour de la paroi. Les composants de paroi cellulaire, y compris la chitine, le glucane et les glycoprotéines, sont tout d'abord intégrés à la paroi cellulaire, puis réticulés pour ensuite former une matrice.

Le *spitzenkörper* fonctionne comme un centre de tri des vésicules prenant en charge la délivrance de la chitine synthase et de la glucane synthase auprès de la membrane plasmique. Les substrats pour la synthèse de glucane et de chitine, l'UDP-glucose (Uridine Di-Phosphate) et l'UDP-N-acétyl-glucosamine sont présents dans le cytosol et probablement délivrés directement sans transport vésiculaire. La chitine et les glucanes nouvellement synthétisés sont amenés dans l'espace de la paroi cellulaire pendant la synthèse. En plus des glucanes et de la chitine, il a été montré que les parois cellulaires de *N. crassa* possèdent des glycoprotéines contenant du galactomannane.

Entre 80 % et 90 % de la masse de la paroi cellulaire se trouve dans les polymères de glucane et de chitine tandis que les glycoprotéines représentent les 10 % à 20 % restants de la paroi. Les protéines de la paroi cellulaire comprennent celles qui sont réticulées dans la matrice de glucane/chitine et celles qui ne sont pas fixées par covalence à la paroi mais qui sont étroitement associées à celle-ci. Ces protéines incluent des « protéines structurales » qui n'ont

---

<sup>7</sup> « Reactive Oxygen Species » : Espèces réactives de l'oxygène, (radicaux libres, ions oxygénés, peroxydes), rendus chimiquement très réactifs par la présence d'électrons de valence non appariés. D'origine exogène (produits par des rayonnements ionisants par exemple) ou bien endogène, apparaissant comme sous-produits du métabolisme normal de l'oxygène et jouant alors un rôle important dans la communication entre les cellules.

pas d'activité enzymatique connue et un certain nombre de glycosylhydrolases et de glycosyltransférases, qui sont supposées participer à la réticulation des polymères de paroi et des protéines d'assemblage. Toutes les protéines de la paroi cellulaire intégrale de *N. crassa* ont des homologues proches dans les génomes séquencés provenant d'autres champignons et de la levure (Maddi, Bowman et Free 2009), ce qui suggère que ces protéines ont été évolutivement conservées et qu'elles jouent un rôle important dans la formation de la paroi cellulaire. Pourtant, des invalidations de gènes codant pour la plupart de ces protéines n'ont pas entraîné de changements majeurs dans la morphologie (Riquelme et al. 2011). Cela peut être dû à une grande quantité de « redondances fonctionnelles » entre les différentes protéines de la paroi cellulaire. Cela peut également refléter le fait que les champignons ont une « réponse au stress de la paroi cellulaire », qui est activée lorsque la paroi est sous contrainte et qui dirigerait la synthèse de protéines de paroi supplémentaires compensant ainsi l'absence de protéine chez les mutants (Klis FM, Boorsma A et De Groot PW 2006).

Plus de la moitié des principales protéines de la paroi cellulaire de *N. crassa* sont synthétisées sous forme de protéines à ancrage GPI (GlycosylPhosphatidyInositol) (Maddi, Bowman et Free 2009). Lorsque les protéines de la paroi cellulaire passent par la voie sécrétoire, elles sont considérablement modifiées par addition d'ancrages GPI mais aussi de O-galactomannanes par addition de galactomannane sur les N-glycosylations déjà présentes. Ces modifications post-traductionnelles sont essentielles pour la formation de la paroi des cellules hyphales. Les cellules ayant des mutations affectant la biosynthèse de l'ancre GPI se développent d'une manière coloniale serrée et se caractérisent par l'affaiblissement des parois cellulaires (Bowman et Free 2006).

L'une des questions les plus étudiées actuellement concernant la formation de la paroi cellulaire est de savoir comment et quand les chitines, glucanes et glycoprotéines sont communément réticulées et comment ce processus est régulé pour permettre à la paroi cellulaire des hyphes de présenter une telle structure dynamique. Bien qu'il y ait quelques informations de base sur la composition des glucides et des protéines chez *N. crassa*, certaines questions subsistent. Par exemple, comment la paroi cellulaire est générée à la pointe des hyphes en croissance et de quelle manière est-elle remodelée pour produire des tissus morphologiquement différents en fonction de l'environnement, qui entraîneront des différences de comportement notamment en milieux aqueux (Riquelme et al. 2011).

### 2.3.2 Conidies

Même si, en général, les composants majeurs des parois de conidies sont identiques à ceux retrouvés dans la paroi des hyphes, des différences résident dans la teneur en hydrates de carbone, en protéines et à la présence de mélanine à la surface des conidies. La teneur en hydrates de carbone de la paroi des conidies est de seulement 2,5 % contre 64,5 % dans la paroi des hyphes. A l'inverse, la teneur en protéines dans la paroi des conidies est de 63,4 % contre 6,6 % dans les hyphes (Zhang et Zhang 2016). Cette différence est notamment due à la présence en grande quantité d'hydrophobines à la surface des conidies qui disparaissent ensuite lors de la germination, de la même manière que la mélanine. Au bout d'un certain stade d'avancement de la germination, ce sont les polysaccharides qui se retrouvent en majorité à la surface des conidies (*cf* Etat de l'art, partie 2.4.2.2, p37).

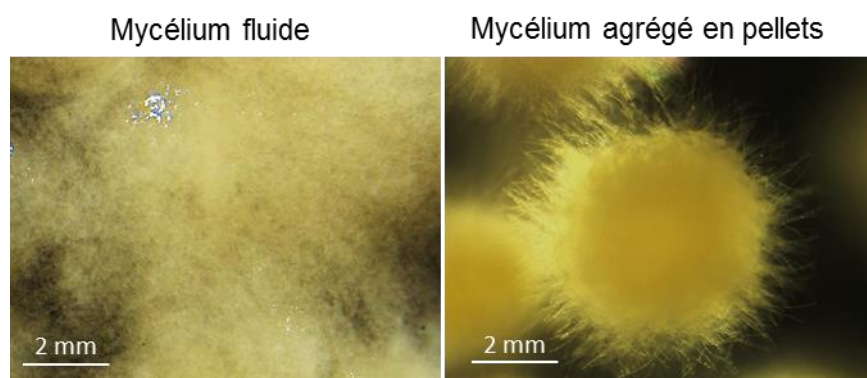


## 2.4 Morphologie en milieu liquide

### 2.4.1 Macromorphologies

La principale caractéristique commune des champignons filamenteux est donc leur modèle de croissance polarisée sous la forme d'hyphes. Comme expliqué précédemment, l'hyphe fongique typique se développe à partir d'une seule cellule (la spore ou la conidie) sous forme de tube multi-nucléaire contenant le cytoplasme qui se déplace au sein de l'hyphe vers la pointe, où s'effectue principalement la croissance. Puis de nouvelles branches sont produites à partir des hyphes principales qui se traduisent par un réseau d'hyphes, appelé mycélium. Les bioprocédés industriels utilisent principalement les processus de culture submergée (en milieu liquide), où il existe une relation dynamique entre les conditions environnementales et le modèle de croissance de ces microorganismes. Des conditions distinctes de culture entraînent des organisations tridimensionnelles différentes des hyphes fongiques.

Ainsi, au niveau macroscopique, on distingue principalement la forme de croissance filamenteuse, où les hyphes sont librement dispersées dans le milieu et la forme « pellets », où le mycélium développe des agrégats sphériques, constitués d'hyphes fortement enchevêtrées. De plus, certaines formes intermédiaires sont distinguables, telles que la croissance floconneuse ou granulaire, tandis que le terme « clump » est utilisé soit pour la description de petits agrégats mycéliens en vrac, soit pour des grandes masses de mycélium agrégé (Paul et Thomas 1998). D'un point de vue typiquement descriptif, en milieu liquide, il a été observé que la longueur moyenne des hyphes principales d'un filament de mycélium libre se trouve environ entre 100-400  $\mu\text{m}$  alors que le rayon d'une pellet peut être compris entre 1 et 5 mm, selon les conditions environnementales de culture et les propriétés intrinsèques du champignon (Wucherpennig et al. 2010).



**Figure 7 :** Observation à la loupe binoculaire des principales morphologies en milieu liquide.

Exemple : *Aspergillus oryzae*.

D'un point de vue structural une pellet typique se compose de trois régions : la région de croissance la plus externe, la région non croissante de la biomasse mycélienne et le centre creux. La différenciation de la biomasse se traduit par différentes compositions biochimiques des cellules fongiques et de leurs parois. De nombreux modèles mathématiques concernant cette

croissance sous forme de pellets ont été proposés pour décrire l'interaction complexe entre la croissance des hyphes et la consommation de substrat, y compris le problème de limitation diffusionnelle au centre des pellets, mais en réalité toutes ces descriptions sont très théoriques et il est rare d'aboutir à des modèles vraiment généralisables.

Avec des mycéliums libres, des concentrations élevées de biomasse donnent des milieux de fermentation très visqueux, ce qui entraîne des problèmes de transfert de masse gaz-liquide et de mélange de liquides. Dans les pellets fongiques, des problèmes de transport interne des substrats et des produits peuvent survenir, en fonction de la taille et de la compacité des pellets (Dynesen et Nielsen 2003). Ce dernier point est détaillé en partie 3.1 (p40).

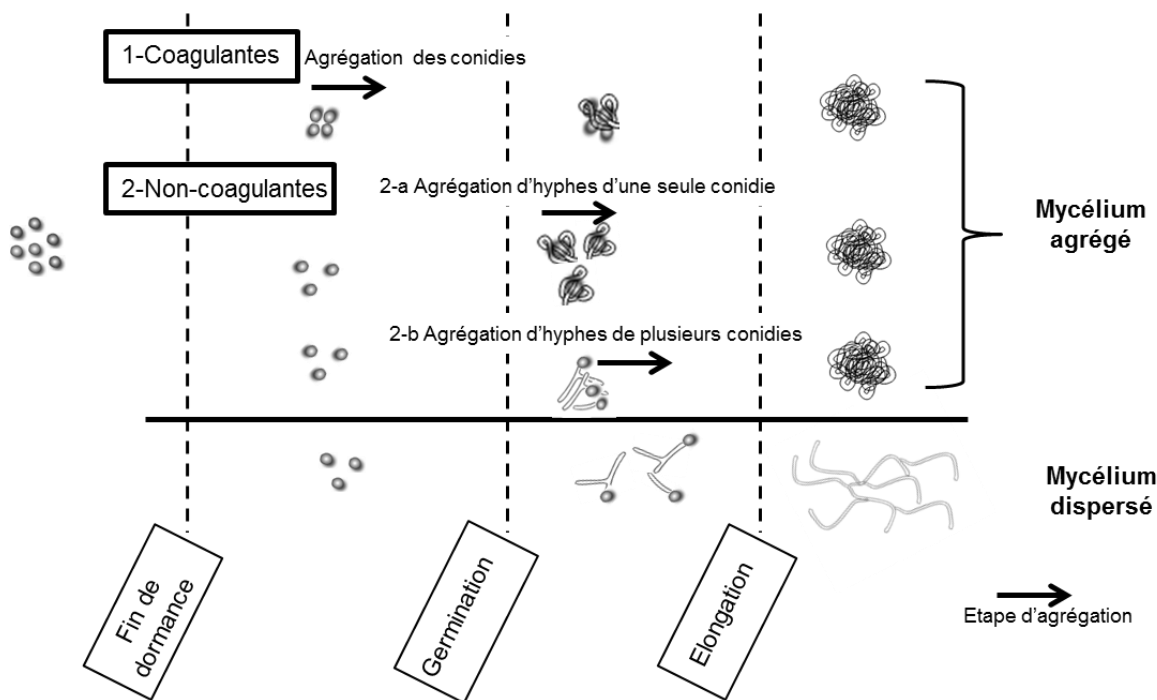
## 2.4.2 Morphogénèse

### 2.4.2.1 Mécanisme de formation des pellets

C'est en 1959 qu'un mécanisme de formation des pellets a été proposé. Deux principaux mécanismes de formation des pellets (ou des agrégats mycéliens en général) sont alors décrits, dépendant principalement de la nature intrinsèque de chaque espèce et les regroupant en type « coagulants » ou au contraire « non coagulants » (Takahashi et Yamada 1959). En étudiant les espèces *A. niger* et *P. chrysogenum*, ayant tendance à former des pellets en milieu liquide, l'équipe a montré deux comportements différents aboutissant à ces morphologies agrégées (Figure 8). En dispersant les conidies de chaque souche dans le milieu de culture, *A. niger* a rapidement montré plusieurs agrégats de conidies avant et pendant la germination. Dans ce cas, le nombre de conidies initialement ensemencé ne semble pas intervenir dans la formation proprement dite de pellets, mais plus le taux d'ensemencement est élevé plus le nombre de conidies par pellets est important, entraînant alors des différences de tailles ou de formes des pellets. Dans le cas de *P. chrysogenum* les conidies dispersées dans le milieu germent séparément sans coagulation et atteignent le stade de tubes germinatifs et de petites hyphes. C'est en grandissant que les hyphes devenant mycélium sont amenées à entrer en contact et fusionner. Ce dernier cas pouvant se décliner sous deux comportements différents, des pellets issues des hyphes d'une seule conidie ou de plusieurs conidies. Dans ce cas, plus le nombre de spores ensemencé est élevé, plus les hyphes montrent une tendance à se rencontrer et donc à former des structures de mycélium agrégé. Pourtant il a également été observé qu'à des taux d'ensemencement particulièrement élevé, le mycélium devient plus résistant aux contraintes appliquées au milieu liquide (agitation) et ne forme pas de pellets mais un réseau fluide et dense. Les expériences de Galbraith et Smith, 10 ans plus tard, soutiennent l'existence de ces mécanismes, montrant que les pellets d'*A. niger* sont bien formées à partir d'agglomérats pouvant contenir jusqu'à 500 conidies (Galbraith et Smith 1969). L'étude de Nielsen en 1995 confirme également que la formation de pellets chez *P. chrysogenum* est sensible au taux d'ensemencement, montrant que l'augmentation du nombre de conidies dans le milieu entraîne une augmentation de la taille des pellets jusqu'à un certain point où le mycélium devient fluide et sans agrégats, faisant donc penser à un mécanisme non-coagulant (Nielsen et al. 1995).

Parmi les types coagulants on peut également citer *Aspergillus nidulans* et *A. oryzae* alors que le type non-coagulant est souvent caractéristique des champignons appartenant à *Rhizopus* et *Mucor* (Metz et Kossen 1977).

Plus tard, des inoculations de conidies d'*A. niger* ont été caractérisées pour évaluer le processus d'agrégation par examen direct avec un analyseur de taille de particules (Grimm et al. 2004). La formation de pellets à partir de conidies coagulantes est décrite comme un mécanisme plus complexe, à deux étapes, étendu sur les 16 h premières heures de culture et qui dépendrait fortement de la valeur du pH et des conditions dynamiques des fluides dans le milieu de culture. En effet, au début de la culture, juste après l'inoculation, les conidies semblent s'agglomérer jusqu'à l'obtention d'une condition d'état stationnaire entre l'agrégation et la désintégration des amas de conidies. L'état d'équilibre est perturbé lorsque la germination débute, à 8 h après ensemencement. La croissance des tubes germinatifs permet aux conidies non germées de se fixer sur les hyphes en croissance lors d'une seconde étape d'agrégation pendant 8 h supplémentaires. Cela conduit à une diminution globale de la concentration en particules, qui dépendrait également de la valeur du pH ainsi que de la puissance induite par l'agitation et l'aération (Amanullah et al. 2001). Dans la deuxième étape d'agrégation, d'autres conidies s'attachent aux conidies en germination et aux hyphes déjà agrégées, qui forment enfin des pellets dans des stades ultérieurs de culture (Lin, Scholz et Krull 2010; Grimm et al. 2004; Krull et al. 2013, 2013, 2013).



**Figure 8 :** Schéma simplifié des mécanismes de formation de mycélium agrégé des espèces coagulantes et non-coagulantes.

1- Coagulation des conidies avant germination, 2- Fusion d'hyphes issues d'une conidie, 3- Fusion d'hyphes issues de plusieurs conidies.

#### 2.4.2.2 Explications physico-chimiques

Déjà en 1969, lors d'une étude des phénomènes d'agrégation chez *A.niger*, il a été suggéré que les propriétés physico-chimiques de surface des conidies semblaient responsables de la coagulation en milieu liquide (Galbraith et Smith 1969). Les particules biologiques en

suspension dans les milieux aqueux acquièrent une charge due à l'ionisation de leurs groupes de surface et à l'adsorption des ions. En général, les cellules microbiennes, y compris les conidies, sont négativement chargées (pour des pH supérieurs à 5,5) mais leur charges de surface et leurs points isoélectriques diffèrent (Fisher 1973). Ces charges négatives sont représentées par le potentiel zêta<sup>8</sup>, mesuré par la microscopie à force atomique (AFM) et modélisées suivant la théorie DLVO qui considère que la principale cause de l'agrégation de particules également chargées avec une surface lisse réside dans les forces de van der Waal et, dans certains cas, dans les forces d'attractions hydrophobes. C'est dans ce contexte que la charge électrique et l'hydrophobicité des parois des conidies ont été observées et étudiées.

Il a été établi que les groupes carboxyles présents à la surface des conidies contribuaient largement à la charge négative, toujours étudié chez *A. niger* (Wargenau et al. 2011). Il a également été observé que la majeure partie de ces groupes carboxyles provenait de la mélanine, formant des liaisons avec les ions métalliques présents dans le milieu, majoritairement avec les ions  $Mg^{2+}$  et  $Zn^{2+}$  ou encore  $Ca^{2+}$ , qui compensent la répulsion entre les charges similaires. Ce rôle de la mélanine dans la coagulation a été confirmé par l'invalidation du gène de synthèse de ce pigment (*alb1*) chez *A. niger* diminuant considérablement l'agrégation des conidies (Priegnitz et al. 2012).

L'hydrophobicité reposeraient principalement sur deux petites protéines hydrophobes, les hydrophobines DewA et RodA, situées dans les parois des conidies (de Vries et al. 1993; Stringer et Timberlake 1995). En 2003, il a été montré que la formation de pellets par des mutants de *A. nidulans* a été perturbée lors de la suppression d'un ou des deux gènes *dewA* et *rodA*, pour toutes les valeurs de pH testées (Dynesén et Nielsen 2003).

Ainsi, si l'agglomération des conidies est due uniquement aux propriétés physicochimiques de surface des particules, considérées comme des particules lisses, la tendance des conidies à coaguler devrait uniquement dépendre de la fréquence de leur rencontre. Il semble évident que cette fréquence est fortement liée au taux d'inoculum de départ et aux forces externes (cisaillement) appliquées au milieu de culture liquide. Ces paramètres de cultures ont déjà fait l'objet d'études dans le contrôle de la morphologie des champignons filamenteux, détaillées en partie 3.2 (p41).

Il a été rapporté qu'en réalité les conidies subissent des changements continus dans les composants de leur paroi après l'inoculation. En 2016, une étude propose alors une description de cette évolution lors de l'ensemencement de conidies en milieu liquide (Zhang et Zhang 2016). Au point de départ de l'inoculation, la paroi des conidies présente des couches d'hydrophobines, de mélanine, de polysaccharides et de lipides. La mélanine a une structure granulaire, se réticulant aux polysaccharides elle procure aux conidies une surface complexe rugueuse et poreuse et également dynamique (Eisenman et Casadevall 2012; Gadd et Rome 1988). C'est ensuite pendant le gonflement que les hydrophobines et la mélanine disparaissent partiellement. Par conséquent, les polysaccharides sont exposés directement à la surface, en contact avec le liquide. La totalité de la couche d'hydrophobines et de mélanine est ensuite éliminée, et les composants de surface deviennent majoritairement les polysaccharides, qui

---

8 Représente la double couche électrique (une couche d'ions accrochés à la particule et une autre diffuse autour de la particule) d'une particule chargée migrant dans un champ électrique, très utilisé dans l'étude de la stabilité de particules en suspension.

semblent alors participer à la formation d'agrégats entre les conidies en germination. Certaines études ont déjà attribué le phénomène d'agrégation au pontage de sels entre ces polysaccharides, autant pour les conidies que pour les hyphes, plus qu'à une modification de l'hydrophobicité globale ou des propriétés électriques de surface (Gerin et al. 1993).

Le mécanisme de formation des agrégats de conidies n'est toujours pas clair. Il est possible de résumer ce phénomène par les interactions électrostatiques et l'hydrophobicité, forces apparemment majeures et plus largement décrites, mais également par des interactions spécifiques entre les composants de la paroi des conidies qui semblent se produire lorsque la mélanine modifie leur texture ou encore lorsque les polysaccharides forment des structures tridimensionnelles dans les milieux liquides. Les deux principaux types de formation des pellets, coagulant et non-coagulant, se produiraient donc en raison de ces forces motrices qui varient non seulement en fonction des conditions de cultures mais aussi en fonction de chaque souche et de leurs conditions physiologiques variables dès les premières heures d'inoculation jusqu'à la fin de la culture.

*Les différentes morphologies des champignons sont largement décrites et plusieurs mécanismes ont été avancés jusqu'à aujourd'hui pour tenter de classer et/ou de comprendre l'origine de ces morphologies et leur caractère dynamique. Les mécanismes « coagulant et non-coagulant » semblent représenter le support d'investigation le plus apte à diriger notre étude des morphologies agrégées. Mais principalement établis par observations, ces mécanismes n'expliquent pas systématiquement les phénomènes rencontrés. Ce sont cependant ces débuts de descriptions qui ont permis d'orienter les études et l'application de méthodes de contrôle de la morphologie. Maîtriser ces morphologies est un des enjeux majeurs dans l'optimisation des bioprocédés fongiques.*

## **3 Contrôle de la morphologie**

### **3.1 Impact des morphologies sur les bioprocédés**

Si les deux principales morphologies, fluides et agrégées, font l'objet de tant d'études visant à mieux cerner leur mécanisme, c'est qu'elles présentent des avantages et des inconvénients pour les bioprocédés. En effet, les pellets entraînent en général une faible viscosité du milieu de culture comparé à la forme mycélium libre, mais aboutirait aussi à une baisse de la productivité spécifique des microorganismes en raison d'un mauvais transfert de l'oxygène et des nutriments au centre des agrégats (Gibbs, Seviour et Schmid 2000). Ainsi une partie de la biomasse produite ne participe pas à la production. L'énergie nécessaire à l'agitation du milieu de culture est donc amoindrie mais la vitesse de production est impactée. Au contraire, la forme mycélium libre augmente généralement la viscosité du milieu mais permettrait de maximiser la productivité spécifique des microorganismes avec un transfert homogène au sein du mycélium (Krull, Cordes, Horn, Kampen, Kwade, Neu et Nortemann 2010; Hille et al. 2009). Ainsi on retrouve dans la littérature que selon le produit souhaité, la morphologie optimale varie et qu'il est donc difficile de généraliser les avantages et les inconvénients d'une morphologie spécifique (Gibbs, Seviour et Schmid 2000). Effectivement, même si très souvent la productivité volumique optimale est liée à une forme morphologique, peu de corrélations précises sont établies et des différences sont décrites en fonction des systèmes biologiques étudiés (Grimm et al. 2005). Par exemple, la croissance des pellets semble favorable pour la production d'acide citrique, de glucose oxydase ou de glucoamylase chez *A. niger*. Dans ces cultures, la séparation ultérieure des pellets est souvent plus simple que dans les cultures de mycélium, aussi l'agitation et l'aération plus faciles assurent des coûts de fonctionnement plus faibles. Mais il est également décrit qu'au contraire, la morphologie fluide est largement préférable pour la production d'acide fumarique par *Rhizopus arrhizus* ou encore d'antibiotiques chez *P. chrysogenum* (Papagianni 2004; Pazouki et Panda 2000; Braun et Vecht-Lifshitz 1991; Znidarsic, Komel et Pavko 2000),

En réalité, dans la mise au point et l'optimisation d'un procédé de production il est nécessaire de tenir compte de différents critères :

- La productivité exprimée en  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ : rapport entre la quantité de produit obtenu et le volume et temps de culture ;
- Les rendements de production exprimés en  $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ : rapport entre la quantité de produit obtenu et la quantité de substrat consommé ;
- La concentration finale exprimée en  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  qui a souvent un impact sur les coûts de séparation ;
- La facilité à extrapoler le procédé : la possibilité de maintenir des performances les plus identiques possibles entre l'échelle laboratoire et l'échelle industrielle ;
- La limitation voir la suppression des co-produits qui augmentent le coût de séparation et diminuent le rendement du produit d'intérêt.

Le type morphologique et la physiologie associée des systèmes fongiques sont au centre de ces critères. Ils dépendent fortement des conditions environnementales dans le bioréacteur, que l'on appelle « l'environome ». Entre autres facteurs, cet « environome » comprend la

composition du milieu de culture, la concentration en inoculum, la valeur du pH, la température, la concentration en oxygène dissous et le stress mécanique (Krull et al. 2013).

## 3.2 Les techniques de contrôles conventionnelles

### 3.2.1 Modification de la composition du milieu de culture

#### 3.2.1.1 Source de carbone

Les sources de carbone couramment utilisées pour la croissance car très bien assimilées par les champignons sont généralement les sucres simples tels que le glucose ou le saccharose. Mais des polysaccharides, des acides aminés ou encore des hydrocarbures peuvent également être absorbés facilement. Chez plusieurs espèces de champignons filamenteux, la morphologie a été modifiée en faisant varier la source de carbone et sa concentration. En effet il a déjà été observé que la morphologie pouvait être impactée par des variations du taux de croissance du champignon, lui-même dépendant de la concentration ou du type de source de carbone. Différentes vitesses de développement du mycélium engendrerait des différences dans sa formation, sa longueur et ses embranchements (Wiebe et Trinci 1991).

C'est pourquoi le rôle de la concentration en source simple de carbone sur la mitose et l'extension de l'hyphes chez *A. niger* et *A. oryzae* cultivées en milieu liquide a fait l'objet d'investigations qui ont révélé pour ces deux espèces d'*Aspergillus* que la longueur du compartiment apical, le nombre de noyaux dans ce compartiment et le diamètre des hyphes en extension semblaient avoir été régulés en réponse à la concentration de glucose dans le milieu (Müller, Spohr et Nielsen 2000). Lors d'une augmentation de la concentration en glucose, le compartiment apical est plus long, plus large et présente de nombreux noyaux, alors qu'une diminution de la concentration en glucose entraîne des effets inverses. D'autres études en culture liquide ont confirmé que la concentration de glucose initialement présente dans le milieu et/ou ajoutée en cours de fermentation affectait à la fois la vitesse de production de l'acide citrique par *A. niger* et sa morphologie (Papagianni, Mattey et Kristiansen 1999b). Il a en effet été constaté que de faible taux de glucose entraînent une réduction de la longueur moyenne des filaments mais une augmentation de la fréquence de ramification, la croissance étant augmentée au détriment de la production d'acide citrique. Il semblerait que la carence en source de carbone contribue grandement au processus de vieillissement cellulaire et d'autolyse dans les cultures fongiques, entraînant généralement une augmentation de courtes ramifications tout au long du mycélium mais aussi une baisse de la productivité.

Il a été montré, par ailleurs, des différences de morphologies lors de l'utilisation de différentes natures de source de carbone. Par exemple, *P. chrysogenum* se développe sous forme de pellets creuses et lâches lorsqu'il est cultivé à partir de n-hexadécane et sous forme de pellets plus denses et solides sur de la peptone (hydrolysats de protéines) (Cundell, Mueller et Traxler 1976).

#### 3.2.1.2 Azote et phosphate

L'azote peut être assimilé par les champignons lorsqu'il est fourni sous forme d'ammonium, de nitrate ou de composés organiques, tels que des acides aminés ou des protéines. On le retrouve généralement en fermentation sous forme de peptone, de liqueur ou

de farines de maïs ou de soja, ou d'extrait de levure. Cet élément joue un rôle important dans la surproduction de certains métabolites, comme expliqué en 1.3.1 (p14), et peut également affecter la morphologie fongique de la même manière que la source de carbone généralement expliqué par une variation du taux spécifique de croissance. Il a été affirmé que l'azote serait l'un des principaux facteurs induisant la formation de pellets lorsque sa concentration est limitée dans le milieu de culture, mais de manière générale le manque de tout autre élément nutritif ou d'oxygène favoriserait la forme agrégée des champignons selon les auteurs (Braun et Vecht-Lifshitz 1991). Cependant, des contradictions existent, certains travaux ont montré que des concentrations élevées en azote ont conduit à la formation de pellets plus grandes et plus denses de *Rhizopus nigricans*, alors que de faibles concentrations d'azote ont engendré des pellets plus petites et plus lâches (Znidarsic, Komel et Pavko 2000). L'effet de la nature de la source d'azote sur la morphologie et la production d'antibiotiques a été étudié lors de la culture de *Rhizopus chinesis*. Dans les milieux contenant différents composés azotés, la longueur des hyphes et leur degré de ramification semblent effectivement varier. Une croissance en pellet a été obtenue dans un milieu contenant de la liqueur de maïs avec une augmentation de la production d'antibiotique. En utilisant du sulfate d'ammonium les pellets obtenues sont à la fois plus grosses, plus compactes et avec une surface lisse, entraînant une baisse de la production d'antibiotique. La peptone a finalement entraîné les changements morphologiques les plus importants avec une croissance du champignon en mycélium dispersé (Du, Jia et Lu 2003). Lors de l'étude de la croissance de *R. oryzae* sur plusieurs sources d'azote (Tari et al. 2011), c'est cette fois-ci l'extrait de levure qui a entraîné la formation des plus grosses pellets mais aucune transition morphologique drastique n'a été obtenue. Mais ces deux derniers auteurs précisent qu'ils ont observé une corrélation entre la concentration, le type de sucres (hexose ou pentose) et la source d'azote dans ces transitions morphologiques et que ces deux éléments peuvent difficilement être étudiés séparément.

Le phosphate joue également un rôle important dans la production de métabolites, apporté sous forme inorganique ou organique dans les milieux de fermentations. De la même manière que pour l'azote, il a été rapporté des relations entre les concentrations de phosphate dans le milieu de culture d'*A. niger* et la production d'acide citrique en bioréacteur. Une faible augmentation de la concentration de phosphate dans le milieu a entraîné une chute brutale de la productivité de l'acide citrique alors que la concentration de biomasse a été doublée. Les changements de morphologie, qui ont été suivis par analyse d'image, ont montré des différences au niveau du périmètre des pellets, devenu plus étendu, donnant une apparence lâche aux agrégats mycéliens. La fréquence de ramification et la longueur des filaments augmenterait à l'inverse avec l'augmentation de la concentration de phosphate (Papagianni et al. 1999a).

Le Tableau 1 ci-dessous résume les exemples d'études portant sur l'impact des sources de nutriments (carbone, azote et phosphate) sur la morphologie de différents champignons décrits précédemment. Ce tableau met en évidence les contradictions souvent observées, probablement dues aux conditions opératoires très variables entre ces études pour l'investigation d'un même phénomène.



Paramètres	Effets étudiés	Espèces	Morphologies / Evolution	Références	Conditions opératoires
Source de carbone	Augmentation de la concentration en glucose	<i>A. niger</i> <i>A. oryzae</i>	Hyphes Elargissement et allongement du compartiment apical Faible degrés de ramification	Wiebe et Trinci (1991)  Müller et al. (2000)	Fermenteurs 1 L Ensemencement par conidies $10^6$ conidies·mL <sup>-1</sup> pH = 5,8 T = 25 °C Agitation = 1400 tr·min <sup>-1</sup>
					Fermenteurs 2 L Ensemencement par conidies $2 \cdot 10^6$ conidies·mL <sup>-1</sup> pH = 6 T = 30 °C Agitation = 100 tr·min <sup>-1</sup>
	Diminution de la concentration en glucose	<i>A. niger</i>	Clumps et filaments Réduction de la longueur des hyphes Augmentation du degré de ramification	Papagianni et al. (1999b)	Fermenteurs 5-10 L Précultures $10^7$ conidies·mL <sup>-1</sup> pH = 2,1 Température = 28 °C Agitation = 400 tr·min <sup>-1</sup>
	Utilisation de n-hexadecane ou peptone	<i>P. chrysogenum</i>	Pellets n-hexadecane : creuses et lâches Peptone : denses et solides	Cundell et al. (1976)	Fioles Erlenmeyer Autres conditions non renseignées
Source d'azote et phosphate   + source de carbone	Augmentation de la concentration en azote	<i>R. nigricans</i>	Pellets Plus petites, plus lâches et plus touffues	Braun and Vecht-Lifshitz (1991)	Fioles Erlenmeyer (100 mL) $8 \cdot 10^4$ conidies·mL <sup>-1</sup> pH = 5 Température = 19 °C Agitation = 225 tr·min <sup>-1</sup>
	Utilisation de Peptone (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> Extrait de levure Liqueur de maïs	<i>R. chinesis</i>	Peptone : Mycélium dispersé (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> : Pellets compacts Extrait de levure : Filaments serrés Liqueur de maïs : Pellets lâches	Du et al. (2003)	Fioles Erlenmeyer (50 mL ou 100 mL) Inoculation et pH non renseignés Température = 29 - 30°C Agitation = 160 – 170 tr·min <sup>-1</sup>
	Utilisation de Peptone (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> Extrait de levure Liqueur de maïs	<i>R. oryzae</i>	Pellets (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + 25 g·L <sup>-1</sup> glucose : Plus petites (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + 50 g·L <sup>-1</sup> glucose : Plus lâches Extrait de levure : Plus grosses Liqueur de maïs + 50 g·L <sup>-1</sup> xylose : Plus lâches	Tari et al. (2011)	Fioles Erlenmeyer (100 mL) $7 \cdot 10^5$ conidies·mL <sup>-1</sup> Agitation = 170 tr·min <sup>-1</sup> pH = 5 Température = 30 °C
	Augmentation de la concentration en phosphate	<i>A. niger</i>	Pellets Plus lâches, hyphes plus ramifiés	Papagianni et al. (1999a)	Fermenteurs 6 L Précultures $10^7$ conidies·mL <sup>-1</sup> pH = 2,1 Température = 28 °C Agitation = 400 tr·min <sup>-1</sup>

**Tableau 1 : Exemple d'études portant sur la modification du milieu de culture impactant la morphologie des champignons.**

### 3.2.2 pH

Etant donné les mécanismes d'agrégation des conidies (cf Etat de l'art, partie 2.4.2.1, p36), il semble logique qu'il y ait un effet de la modification du pH sur l'agrégation des conidies au début de la culture, qui pourrait dicter la morphologie finale de la souche (Grimm et al.

2005). En effet, les changements de valeurs de pH entraînent une modification des charges partielles des composants présents à la surface des conidies. C'est l'étude de (Galbraith et Smith 1969) sur le champignon *A. niger* qui a montré l'importance du pH du milieu de croissance dans le processus de formation des pellets, et plus particulièrement dans la coagulation des conidies. Ils décrivent qu'à pH 5,0 la coagulation des conidies a été beaucoup plus importante qu'à pH 2,0 concluant ainsi que les propriétés de surface des conidies étaient influencées par le pH. Mais aussi, (Pirt et Callow 1960) ont observé que pour un pH supérieur à 6,0, *P. chrysogenum* montre une diminution de la longueur des hyphes, atteignant des valeurs minimales pour des pH situés entre 7,0-7,4. Au-delà de ces valeurs, les cellules fongiques ont montré des gonflements entraînant une mauvaise croissance du mycélium. Il est possible d'interpréter ces résultats par un changement dans la structure de la paroi hyphale, ce qui entraînerait une diminution de la résistance des hyphes au cisaillement du mobile d'agitation en bioréacteur. En général, il est observé que la tendance du mycélium à former des pellets augmente à mesure que le pH de la culture augmente. (Carlsen et al. 1996), ont confirmé ces observations en réalisant des cultures d'*A. oryzae* dans des réacteurs à différents pH. Pour des valeurs de pH inférieures à 2,5, le mycélium était là aussi sous forme de cellules gonflées entraînant une croissance beaucoup trop faible ; pour un pH compris entre 3,0 et 3,5, les éléments hyphaux étaient librement dispersés ; et entre 4,0 et 5,0, la culture consistait à la fois en pellets et en hyphes librement dispersés. Enfin, pour des valeurs supérieures à 6,0, seules des pellets ont été observées et leur taille a augmenté en même temps que la valeur du pH.

### 3.2.3 Taux d'ensemencement

Il s'agit certainement du paramètre, avec l'agitation, le plus étudié pour son impact sur la morphologie des champignons. En effet, de nombreuses recherches ont tenté de corrélérer la morphologie à la concentration des conidies lors de l'ensemencement initial d'une culture (Bizukojc et Ledakowicz 2010; Grimm et al. 2004; Liu, Liao et Chen 2008). Le rôle de l'inoculum dans le développement de la morphologie fongique de *P. chrysogenum* pendant la fermentation et sa relation avec la production de métabolites a été montré dans le travail de (Nielsen et al. 1995). Pour cette souche non-coagulante (pas de coagulation des conidies lors de la germination), des concentrations initiales faibles en conidies entraîneraient la formation de petits pellets alors qu'à des concentrations de conidies plus élevées, l'agglomération semble être favorisée et des pellets plus larges se forment, jusqu'à l'obtention d'une morphologie fluide pour des taux d'ensemencement très élevés. Déjà en 1992, dans des travaux portant également sur *P. chrysogenum*, il est décrit que très peu de pellets se forment à des concentrations supérieures à  $5 \cdot 10^5$  conidies·mL<sup>-1</sup> (Tucker et Thomas 1992). Encore une fois, il semble donc que l'agglomération conduisant à la formation de pellets n'est pas simplement déterminée par la probabilité de contact physique entre les conidies ou les éléments hyphaux. Cependant ces observations sont différentes chez les microorganismes coagulants (agglomération des conidies avant et pendant la germination). (Xu et al. 2000), ont montré une diminution de la taille des pellets de la souche coagulante *A. niger* lors de l'augmentation de la concentration initiale en conidies, sans pour autant atteindre de morphologie fluide.

### 3.2.4 Forces mécaniques - Puissance dissipée

La détermination de l'influence de la puissance dissipée, via la variation de l'agitation et de l'aération, sur la morphologie et la productivité est un domaine largement discuté dans la littérature. L'agitation appliquée pendant la fermentation crée des forces de cisaillement qui peuvent affecter les micro-organismes de plusieurs manières, par exemple en causant des dommages à la structure cellulaire ou en induisant des changements morphologiques et donc bien souvent des variations du taux de croissance et de la formation du produit. Puisque déjà mis en œuvre dans les procédés industriels, *P. chrysogenum* a fait l'objet de nombreuses études sur ce paramètre. Il a été décrit que la longueur des hyphes constituant le mycélium de *P. chrysogenum* diminuait avec l'augmentation de la puissance d'agitation dans le réacteur, en insistant sur le fait qu'une forte agitation entraînait des hyphes plus courts, plus épais et plus ramifiés. Ainsi, il semble que des puissances dissipées élevées réduisent l'agglomération des hyphes (Smith, Lilly et Fox 1990). Il est aussi précisé dans cette étude comparant deux volumes de culture (10 et 100 L) que les théories et les expériences antérieures réalisées à échelle unique comparent la morphologie (principalement les dommages causés aux hyphes) et l'agitation corrélée à la vitesse en bout de pale. Dans ce travail comparatif à deux échelles, aucune validité n'a été admise pour ce concept car des vitesses en bout de pales plus importantes nuisibles à une échelle de 10 litres n'ont pas causé de dommages à la culture à une échelle de 100 litres. Ces mêmes observations ont été constatées dans une étude à trois volumes de culture de *P. chrysogenum*, confirmant que l'augmentation de l'agitation a bien entraîné une diminution du taux spécifique de production de pénicilline et de la longueur moyenne des hyphes, mais que ces résultats sont corrélés à la zone de dissipation d'énergie, à proximité des turbines plutôt qu'à la vitesse en bout de pale (Makagiansar et al. 1993). Ainsi ces études suggèrent que plus la fréquence des mycéliums traversant la zone de forte dissipation d'énergie est élevée, plus les dommages seront importants.

En 2010, l'impact d'une puissance volumétrique constante induite par combinaison de différents taux d'aération et d'agitation est étudiée sur les développements morphologiques de pellets d'*A. niger* (Lin, Scholz et Krull 2010). Ainsi, les résultats des mesures de  $k_{La}$  (coefficient de transfert d'oxygène) ont montré qu'il n'existait que de légères différences dans l'efficacité du transfert d'oxygène du gaz au sein de la phase liquide entre les différentes combinaisons et que la principale limitation de l'oxygène pour le champignon résidait dans sa morphologie en pellet. D'autre part, les résultats liés aux changements de taille et de nombre de pellets ont montré qu'une diminution de la part d'aération a conduit à des contraintes mécaniques plus importantes et donc à des pellets plus petites avec des régions périphériques peu structurées, irrégulières, moins compactes et en plus grand nombre, ce qui engendrerait une amélioration de la formation du produit comme suggéré par les auteurs. La puissance volumétrique induite par aération ou par agitation a donc un impact différent sur la morphologie du champignon.

Le Tableau 2 résume les exemples d'études décrites précédemment sur l'impact de paramètres physico-chimiques (pH, taux d'inoculation et puissance dissipée) sur la morphologie de différents champignons. Une fois encore il est à noter les conditions opératoires très variables entre ces études.

Paramètres	Effets étudiés	Espèces	Morphologies / Evolution	Références	Conditions opératoires
pH	Variation du pH entre 2 et 5	<i>A. niger</i>	2 - 3 : Mycélium fluide mais croissance très faible 3 - 5 : Augmentation de l'agrégation des conidies Formation de pellets	Galbraith & Smith (1969)	Fioles Erlenmeyer (volume non renseigné) 8·10 <sup>6</sup> conidies/fioles Agitation : 150 tr·min <sup>-1</sup> pH : 2 - 5, par ajout de HCL ou NaOH Température : 27 °C
	Augmentation du pH supérieur à 7	<i>P. chrysogenum</i>	Pellets > 7 : Croissance faible et physiologie perturbée	Pirt & Callow (1960)	Fermenteur 2L Ensemencement par conidies Taux non renseigné Agitation : 500-1000 tr·min <sup>-1</sup> pH : 7,4 par ajout de NaOH Température : 25 °C
	Variation du pH entre 2,5 et 8	<i>A. oryzae</i>	1) < 2,5 : Croissance faible 3,5 - 4 : Mycélium fluide 4 - 5 : Mycélium fluide et pellets > 6 : Pellets  2) Mycélium fluide	Carlsen et al. (1996)	1) Fermenteur 15 L Ensemencement par conidies entre 3·10 <sup>5</sup> et 6·10 <sup>5</sup> conidies·mL <sup>-1</sup> Agitation : 300-800 tr·min <sup>-1</sup> pH : 2,5 - 8, par ajout de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ou NaOH Température : 32 °C 2) Fermenteur 15 L Préculture fluide (pH = 3,5) Agitation : 300-800 tr·min <sup>-1</sup> Température : 32 °C
Taux d'inoculation	5 taux d'inoculation : 2,4·10 <sup>4</sup> ; 3,5·10 <sup>4</sup> ; 3,7·10 <sup>4</sup> ; 4; 6·10 <sup>4</sup> ; 8,6·10 <sup>4</sup> conidies·mL <sup>-1</sup>	<i>P. chrysogenum</i>	2,4·10 <sup>4</sup> ; 3,5·10 <sup>4</sup> ; 3,7·10 <sup>4</sup> conidies·mL <sup>-1</sup> : Pellets 6·10 <sup>4</sup> ; 8,6·10 <sup>4</sup> conidies·mL <sup>-1</sup> : Mycélium fluide et pellets lâches	Nielsen et al. (1995)	Fermenteur 41 L Ensemencement par conidies Agitation : 500 tr·min <sup>-1</sup> pH non renseigné Température 25 °C
	5 taux d'inoculation : 2·10 <sup>5</sup> ; 2,5·10 <sup>5</sup> ; 5·10 <sup>5</sup> ; 7,5·10 <sup>5</sup> et 1·10 <sup>6</sup> conidies·mL <sup>-1</sup>	<i>P. chrysogenum</i>	Mycélium fluide et pellets lâches à partir de 5·10 <sup>5</sup> conidies·mL <sup>-1</sup>	Tucker & Thomas (1992)	Fioles Erlenmeyer (200 mL) Agitation : 200 tr·min <sup>-1</sup> pH non renseigné Température : 26 °C
	5 taux d'inoculation : 10 <sup>3</sup> ; 10 <sup>4</sup> ; 10 <sup>5</sup> ; 10 <sup>6</sup> ; 10 <sup>7</sup> conidies·mL <sup>-1</sup>	<i>A. niger</i>	Pellets : Diminution de la taille progressive	Xu et al. (2000)	Fioles Erlenmeyer (100 mL) Agitation : 200 tr·min <sup>-1</sup> pH non renseigné Température : 24 °C
Puissance dissipée	12 taux d'agitation entre 350 et 1200 tr·min <sup>-1</sup>	<i>P. Chrysogenum</i>	Longueur des hyphes réduite à forte agitation (Mycélium fluide ou agrégé non précisé)	Smith et al. (1990)	Fermenteurs 10 et 100 L Précultures pH : 7 Température : 27 °C
	3 taux d'agitation : 700, 850 et 1300 tr·min <sup>-1</sup>	<i>P. Chrysogenum</i>	Fragmentation et diminution de la longueur des hyphes à forte agitation (Mycélium fluide ou agrégé non précisé)	Makagiansar et al. (1993)	Fermenteurs 5, 100 et 1000 L Ensemencement par conidies 8·10 <sup>6</sup> conidies·mL <sup>-1</sup> pH : 6,7 Température : 26 °C
	Puissance dissipée constante: 143 W·m <sup>-3</sup> 3 combinaisons aération / agitation	<i>A. niger</i>	Pellets Diminution de l'aération / augmentation de l'agitation : pellets plus petites, de formes moins homogènes	Lin et al. (2010)	Fermenteur 28 L Ensemencement par conidies 10 <sup>6</sup> conidies·mL <sup>-1</sup> pH : 5,5 Température : 30 °C

**Tableau 2 : Exemple d'études portant sur la modification de paramètres physico-chimique (pH, taux d'inoculation et puissance dissipée) impactant la morphologie des champignons.**

## 3.3 Les nouvelles techniques de contrôle

### 3.3.1 Microparticules Enhanced Cultivation : MEC

Une contribution récente remarquable au contrôle de la morphologie filamenteuse a été l'ajout de microparticules insolubles dans le milieu de culture, technique appelée MEC pour *Microparticules Enhanced Cultivation*. Avec *Caldariomyces fumago* comme organisme modèle, (Kaup et al. 2008), ont montré que les microparticules d'oxyde d'alumine ou de talc ajoutées au début de la culture ont favorisé le développement du champignon sous une forme dispersée plutôt qu'agrégée. La présence de microparticules dans le milieu a donc empêché les conidies et/ou hyphes de s'agréger. Les auteurs tentent alors d'expliquer cet effet par les collisions cellule-particule qui entravent simplement les interactions directes entre les éléments fongiques. Cela semble cohérent lorsque les particules d'un diamètre approximatif de 500  $\mu\text{m}$  ne montrent pas ce caractère dispersif, certainement trop larges pour s'immiscer entre les conidies contrairement aux particules de 42  $\mu\text{m}$ . Il est de plus souligné dans cette étude que les particules utilisées sont trop petites pour servir de support solide à l'immobilisation cellulaire, faisant de la nature microscopique des particules le facteur clé dans l'obtention d'un mycélium dispersé, mais peut-être pas le seul. Enfin, une augmentation de la biomasse et de la production d'enzymes ont également été mises en évidence, lors de l'utilisation spécifique de particules de talc à une concentration de 10  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Par la suite en 2010, (Driouch, Sommer et Wittmann 2010) ont montré que la morphologie d'*A. niger*, dans des cultures ensemencées à partir de conidies, peut être ajustée avec précision, selon différentes formes morphologiques distinctes, par addition de microparticules de silicate. Effectivement, plusieurs tailles de pellets, du mycélium dispersé libre, et même de courts fragments d'hyphes, ont été obtenus en faisant varier la taille et la concentration des microparticules. Leurs travaux offrent alors de nouvelles perspectives de contrôle plus fin et de conception sur-mesure des morphologies fongiques dans les bioprocédés. Ici encore, selon les auteurs, la principale explication de ce mécanisme résiderait dans l'interférence des particules avec les conidies, empêchant leur coagulation dès la mise en culture. Mais même si les propriétés chimiques des particules ne semblent pas avoir d'importance majeure contrairement au phénomène physique qui implique la déstabilisation et la rupture d'agrégats, les auteurs précisent qu'à ce stade, les interactions chimiques ne peuvent toutefois pas être complètement exclues. En effet, l'augmentation de la productivité associée est peut-être la preuve d'effets stimulants des microparticules, rendant la biomasse plus accessible par des morphologies plus lâches, mais peut-être aussi plus active et plus efficace par une amélioration de l'absorption des nutriments ou l'augmentation des activités enzymatiques.

Depuis, plusieurs études ont mis en œuvre les microparticules pour le contrôle morphologique d'autres espèces et l'augmentation de leur productivité associée. L'influence de l'addition de microparticules de talc dans les cultures d'*A. terreus* sur la formation de pellets et la biosynthèse de lovastatine a notamment été étudiée (Gonciarz et Bizukojc 2014). Il a été conclu que même si 1  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de microparticules de talc permettait d'obtenir une diminution flagrante de la taille des pellets, 12  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  était cependant nécessaire à une augmentation significative du titre en lovastatine. Encore une fois dans cette étude les auteurs tendent à

expliquer les effets positifs liés à l'addition de microparticules par une meilleure disponibilité de l'oxygène pour les cellules fongiques en augmentant la diffusivité effective et la diminution de la zone non oxygénée au centre du mycélium moins agrégé. Mais puisque l'augmentation de la concentration en microparticules de talc n'affecte pas forcément la morphologie mais surtout la productivité, d'autres effets biochimiques sont certainement en jeu, mais très mal cernés. Enfin, un autre exemple a été apporté par une supplémentation en microparticules pour contrôler avec précision la morphologie du champignon oléagineux *M. isabellina* ainsi que sa production de lipides (Gao et al. 2014). Les auteurs ont une fois de plus finement maîtrisé la morphologie du champignon mais ont également montré qu'un mycélium dispersé était la forme souhaitable pour obtenir une amélioration significative de la productivité en lipides et que la production de malate, sous-produit indésirable, était de plus réprimée. Cette étude est un exemple concret de la maîtrise morphologique d'un champignon pour le contrôle de sa productivité.

### 3.3.2 Microfluidique

De manière générale, on peut définir la microfluidique comme une discipline portant sur les écoulements de fluides simples ou complexes, mono ou multiphasiques, dans des microsystèmes artificiels dont la dimension des canaux ne dépasse pas quelques dizaines de micromètres. Ce domaine a notamment permis l'étude de fluide à l'échelle microscopique, avec la possibilité de contrôler avec précision les géométries, les écoulements et les gradients chimiques (Mashaghi et al. 2016).

En biologie, un des aspects de la microfluidique de plus en plus attrayant est la possibilité de créer des émulsions de types eau dans l'huile permettant d'isoler des objets biologiques de la taille du micron au sein de gouttes de milieu de culture dispersées dans une phase huileuse continue. Ces émulsions permettent alors de traiter des millions d'objets, individuellement, à haut débit. Pour ces applications, l'huile fluorée est choisie comme phase continue car ces huiles sont hydrophobes et lipophobes. De ce fait, l'échange de molécules entre l'huile et la phase aqueuse est réduit (et donc l'échange de molécules entre deux compartiments aqueux). De plus, les huiles fluorées sont inertes et constituent le seul cas pour lequel une prolifération cellulaire avec incubation à long terme d'organismes a été démontrée (Clausell-Tormos et al. 2008). Effectivement, l'échange de gaz est crucial dans ce type d'application et le perfluorocarbure permet un très bon transfert d'oxygène (Ju, Lee et Armiger 1991). Enfin, il a également été démontré que les surfactants fluorés de PFPE produisent des gouttes eau-dans-huile monodispersées et stables dans des dispositifs microfluidiques (Holtze et al. 2008).

Cette approche a été utilisée en 2008, par une compartimentation (encapsulation) de cellules humaines et même d'un organisme multicellulaire (*Caenorhabditis elegans*) au sein de gouttes, qui ont survécu et même proliféré pendant plusieurs jours (Clausell-Tormos et al. 2008). L'équipe a mis au point une encapsulation à une vitesse de 300 objets par seconde pour une ségrégation efficace, mais qui peut atteindre 500 objets par seconde si l'isolation stricte n'est pas nécessaire. Le but était de mettre en évidence la possibilité de cultures de systèmes biologiques en émulsion suivie par des analyses de dépistages. L'expérience a été réalisée avec succès, permettant un criblage par lecture de fluorescence post-incubation des micro-compartiments (gouttes) à 500 Hz, ainsi que des procédures supplémentaires de manipulation des gouttes restées stables (telles que la fusion, la division et le tri). Les auteurs ont insisté sur

le potentiel de cette technique, avec laquelle il serait envisageable de réaliser des dosages et autres analyses à des débits 500 fois supérieurs à celui des technologies conventionnelles basées sur des plaques de microtitration en diminuant par la même occasion le coût des réactifs.

Plus tard, l'utilisation d'un système microfluidique a permis le criblage de plus de 100 000 bactéries en moins de 20 min (Najah et al. 2014). Les bactéries étant isolées dans des gouttes d'un volume de 20  $\mu$ L, sans culture préalable, la consommation de réactif s'est limitée à 20 mL. Contenant un substrat fluorogène de l'enzyme cellobiohydrolase, les gouttes contenant les bactéries ont été triées sur la base de l'activité cellobiohydrolase détectée par cytométrie en flux. Ainsi l'utilisation de la microfluidique pour la création d'émulsions dans lesquelles les bactéries sont individuellement compartimentées, a permis, en comparaison à un système de criblage robotisé en plaques de microtitration, un débit 240 fois supérieur et 250 000 \$ d'économie de réactifs.

Enfin, l'utilisation de la microfluidique a été mise en œuvre pour l'encapsulation de conidies d'*A. niger* (Beneyton et al. 2016). Le but était également la mise au point d'un criblage haut débit d'une banque de souches mutantes sur des critères d'activités enzymatiques. Une fois encore l'étude a montré des avantages dans la réduction de temps et de coût par rapport aux systèmes de criblages utilisés actuellement. Cependant il apparaît clair dans cette étude que la manipulation de champignon filamenteux en microfluidique est un peu plus délicate que toute autre cellule, car la germination des conidies aboutit à la formation des hyphes capables d'une part d'entraver les canaux du microsystème mais aussi de déstabiliser l'émulsion en traversant les gouttes. Cette difficulté est notamment surmontée par l'adaptation de la taille des gouttes (plus importante), et un suivi rigoureux de la germination.

### 3.3.3 Osmolarité et force ionique

Un moyen plus récemment mis en œuvre (bien que plus proche des méthodes classiques) pour la maîtrise de la morphologie, et qui s'est avéré parfois très efficace et reproductible, consiste en la manipulation de l'osmolarité et de la force ionique dans le milieu de culture des champignons filamenteux. En effet, il a été montré que pour des concentrations accrues de NaCl une transition morphologique importante était observée, d'une croissance en pellet à une croissance mycélienne fluide, accompagnée d'une augmentation de la productivité de fructofuranodisase et de glucoamylase pour deux souches d'*A. niger* (Wucherpfnig, Hestler et Krull 2011). La morphologie et la productivité des deux souches seraient largement influencées par l'augmentation de la pression osmotique. Au cours de cette étude, les pellets fongiques sont devenues plus allongées et ont montré une augmentation de leur surface avec l'augmentation de l'osmolarité dans le milieu. De plus, associée à une nouvelle méthode de détermination du temps de germination dans les cultures liquide par diffraction laser, cette étude a révélé un processus de germination apparemment ralenti avec une osmolarité croissante. Une telle réponse morphologique avait été précédemment décrite dans la littérature (Tresner et Hayes 1971) et il est donc peu probable qu'elle se limite aux souches *Aspergillus*. Park et al. (1994) ont également montré une influence des concentrations élevées de sel sur la morphologie de *A. niger*, le chlorure de sodium provoquant le gonflement de la pointe des hyphes et la formation de branches dans la région gonflée. Dans tous les cas, l'augmentation de l'osmolarité semble conduire à une croissance plus mycélienne et une augmentation de la productivité des souches étudiées.

Enfin, l'étude de la composition biochimique des hyphes et des conidies et l'environnement physico-chimique qui en découle (cf Etat de l'art, partie 2.3, p33) apporte des preuves sur le rôle que peuvent jouer les ions dans l'agrégation ou la répulsion des structures fongiques. Il a en effet été montré que le zinc, le manganèse, le cuivre, le fer, les métaux lourds et les métaux alcalins affectaient la morphologie fongique et la production d'acide citrique encore une fois chez le champignon *A. niger*. Les ions cuivre par exemple ont induit une forme morphologique plus libre, une réduction de la production de biomasse mais une augmentation de la productivité volumique de l'acide citrique (Papagianni, Mattey et Kristiansen 1999b). En 2007, il est également montré que présence d'ions métalliques (calcium, magnésium, sodium et potassium) naturellement présents dans les eaux minérales utilisées pour des milieux de culture de *R. oryzae* ont largement perturbé la formation de pellets (Papagianni, Mattey et Kristiansen 1999b; Liao et al. 2007). Le manganèse est également souvent cité comme facteur influençant les productions d'acides organiques. Il a été montré que l'acide itaconique pouvait être produit par *A. terreus* avec les mêmes rendements que l'acide citrique par *A. niger* si la concentration en manganèse était maintenue dans le milieu en dessous de  $5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Mais la décationisation d'un milieu de culture n'étant pas réalisable à des niveaux industriels, d'autres études ont montré qu'un effet similaire est observé cette fois par ajout de cuivre supérieur à  $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (Kuenz et al. 2012).

*Depuis plusieurs années, le contrôle de la morphologie des champignons via la modification de certains paramètres physico-chimiques, techniques conventionnelles, a montré des résultats satisfaisants mais également des limites, particulièrement dans leur extrapolation, mettant en évidence des questions supplémentaires sur les mécanismes à la base de la morphologie. Plus récemment, de « nouvelles » techniques sont donc apparues, qui offrent la perspective de mieux cerner les comportements fongiques. Moins étudiées ces dernières nécessitent encore un travail d'optimisation.*



# Enjeux de cette étude

---

## 1 Objectifs

De nombreuses études ont été réalisées au sujet des champignons filamenteux et la problématique posée par leur morphologie en industrie est aussi clairement établie. Classiquement la bibliographie amène à penser que les états physiologiques et morphologiques sont intimement liés : la morphologie définirait le métabolisme (et donc la productivité) d'une souche. Nous pensons au contraire que les deux peuvent être dissociés, et que le métabolisme obtenu en conséquence d'une morphologie agrégée pourrait tout aussi bien être obtenu avec une morphologie dispersée et un protocole de culture adapté. Or les souches formant des agrégats sont difficiles à transférer et le contrôle des fermentations avec des champignons ayant une morphologie de type pellets est plus compliqué. En effet, il est décrit dans la littérature, que les morphologies agrégées engendrent une limitation diffusionnelle de l'oxygène et des nutriments au sein du mycélium (une partie de la biomasse produite ne prend alors plus part à la production). **Notre approche principale consiste donc à faire l'hypothèse qu'une morphologie de type dispersée permettra plus facilement i) de réaliser la propagation des souches jusqu'à une échelle industrielle et ii) de contrôler le métabolisme pour une étape de production optimale.**

Comme décrit précédemment, de nombreux facteurs ont un impact sur la morphologie : des facteurs biologiques (composition des membranes, comportement des conidies avant la germination ou des hyphes pendant la croissance), chimiques (composition du milieu de culture, pH), physiques (puissance dissipée), mise en œuvre (taux d'inoculation). De plus, ces facteurs sont dépendants les uns des autres. Comprendre l'influence de chaque facteur sur la morphologie est donc complexe, et pour une même espèce il est possible de trouver des résultats contradictoires dans la littérature car le changement d'une variable opératoire peut modifier plusieurs de ces facteurs. Par exemple, l'augmentation de l'agitation augmente également le transfert d'oxygène mais augmente aussi le cisaillement qui peut endommager le champignon et alors diminuer sa productivité. Notons que les champignons filamenteux sont étudiés en général individuellement par souche ou par produit d'intérêt, selon des conditions opératoires qui diffèrent. **Ces études séparées rendent finalement difficile l'établissement de liens entre les différentes souches et la généralisation des résultats observés.**

D'autre part, de nombreuses études dans la littérature sont effectuées à l'échelle de la fiole de culture sans prise en compte de l'impact du changement d'échelle ou des contraintes industrielles. Il semble aussi que la productivité soit parfois subie comme conséquence de la morphologie, plutôt que contrôlée par le protocole de culture. Ces deux constats rendent compliquée l'extrapolation des résultats vers une production industrielle, puisqu'on ne sait pas si la morphologie obtenue au laboratoire à l'échelle du litre pourrait être maintenue lors de la propagation jusqu'à des réacteurs de plusieurs centaines de m<sup>3</sup>.

Enfin, les mécanismes à l'origine de la formation de ces agrégats sont décrits pour certaines espèces mais ne permettent pas toujours d'expliquer leur comportement dans certaines conditions de culture et sont rarement exploités dans le contrôle de la morphologie.

**Notre étude se focalise donc sur la morphologie des espèces agrégées, notre but étant de mettre au point des techniques basées sur ces mécanismes d'agrégation qui permettront d'une part de contrôler ces morphologies en les faisant évoluer d'une morphologie agrégée vers une morphologie dispersée (ou fluide) et d'autre part d'apporter des indices supplémentaires qui pourront contribuer à la compréhension de ce phénomène.**

## **2 Stratégies**

Notre stratégie d'étude se décline en 3 points. Un premier criblage des paramètres influents sur la morphologie, décrits dans la littérature (techniques de contrôle conventionnelles), est réalisé sur un large panel de souches pour la sélection de plusieurs espèces d'intérêt. Le développement et la mise au point de nouvelles méthodes d'investigation et de contrôle morphologique sont ensuite appliquées aux espèces retenues. Enfin, l'étude de ces méthodes pour réaliser des propagations en bioréacteurs est également abordée.

### **2.1 Investigation de différentes espèces**

Cette étude propose l'investigation de **plusieurs espèces** en parallèle dans des conditions de cultures et d'**expérimentations strictement identiques**, le but de départ étant d'envisager des solutions communes adaptées à un ensemble de souches, mais qui permettra en tout cas une comparaison directe des résultats. Ces espèces sont choisies parmi un panel initial composé de 12 espèces appartenant à la division des *Ascomycota* et 6 espèces appartenant à la division des *Zygomycota*. Le choix des souches composant le panel initial a été effectué de manière à couvrir différentes branches phylogénétiques, et différentes familles de produits. Ces champignons présentent également un intérêt industriel, et sont peu ou au contraire fortement étudiés dans la littérature.

Un criblage sur ce panel, présenté en partie 1, permet :

- De sélectionner les morphologies agrégées, de tester l'impact de variations physico-chimiques sur ces morphologies et d'établir les conditions de cultures qui nous sembleront adéquates à l'application de notre stratégie ;
- De réduire le panel à un échantillon d'espèces d'intérêt, représentatif des mécanismes d'agrégation décrits dans la littérature.

### **2.2 Optimisation et développement de nouvelles techniques**

Notre synthèse bibliographique des techniques conventionnelles révèle différents aspects qui nous semblent constituer un frein à l'investigation de la morphologie fongique.

Tout d'abord les différences morphologiques observées montrent très rarement des transitions radicales entre une forme fluide et agrégée ou inversement. Les modifications se font majoritairement au sein d'une même forme morphologique, faisant varier des critères tels que la taille des pellets ou la longueur des hyphes. De plus, il semble compliqué de modifier

certaines de ces paramètres de façon indépendante les uns des autres et sans altérer de façon trop drastique la croissance et la physiologie du champignon de manière générale. Par exemple, les modifications des sources nutritives impactent le taux de croissance et engendrent des états physiologiques altérés. Aussi, les changements de pH dans les milieux de cultures nécessitent des ajouts d'acides ou de bases dont la nature n'est souvent pas sans conséquence sur la croissance ou sur la stabilité du produit, limitant donc la mise en œuvre de cette méthode pour la compréhension des mécanismes sous-jacents et/ou pour une application industrielle.

Certaines techniques montrent des résultats intéressants comme la modification du taux d'ensemencement pour les souches dites non-coagulantes. Il faut cependant prévoir une augmentation de la production de conidies en amont, pouvant être difficilement réalisable pour certaines espèces. Aussi, bien qu'une agitation accrue montre éventuellement l'obtention de morphologies plus fluides, cette méthode demande également une augmentation des coûts énergétiques du procédé et ne sont parfois pas extrapolables à l'échelle industrielle (puissances dissipées trop importantes).

C'est pourquoi notre stratégie s'est portée sur les techniques « nouvelles » de contrôle morphologique. Les techniques d'ingénierie morphologique utilisant les microparticules semblent prometteuses, montrant des **transitions morphologiques radicales** comme des modifications plus fines dans la taille des éléments fongiques (pellets ou hyphes). De plus, elles semblent pouvoir s'appliquer à une **recherche de compréhension des comportements d'agrégation**. Cependant leur application dans la biosynthèse à grande échelle de métabolites nécessite encore la résolution de problèmes liés, par exemple, à la gestion de microparticules dans les grands volumes industriels. C'est la problématique que nous abordons en partie 2.1 (p89) de cette étude.

Les récentes études de microfluidique couplées à la biologie qui permettent d'encapsuler une conidie (ou un microorganisme) par goutte, ont permis de réaliser avec succès des criblages haut-débit. Cependant, aucune étude n'a encore expérimenté le contrôle de la morphologie filamenteuse par cette technique. Nous pensons que l'encapsulation des conidies durant leur germination pourrait théoriquement affecter l'agrégation des souches dites « coagulantes » car elle empêche, par séparation physique (une conidie par goutte) leur agrégation lors de la germination. Comparée à l'utilisation des microparticules, la microfluidique pourrait également fournir des explications supplémentaires au mode d'action des microparticules. C'est donc l'investigation de ce nouvel aspect de la microfluidique que nous avons étudié par la mise au point d'une méthode de germination encapsulée (EGM : *Encapsulated Germination Method*, partie 2.2, p95).

Enfin, le domaine d'investigation de l'osmolarité des milieux de culture nous a également semblé prometteur d'autant plus que ces techniques peuvent être appliquées aux espèces non-coagulantes qui s'agrègent théoriquement par fusion des hyphes. C'est à dire que ces espèces formeraient des agrégats même si on arrivait à séparer physiquement les conidies au moment de leur germination. Cependant les effets observés sont encore très mal cernés, notamment lorsqu'il s'agit de déterminer quels ions sont réellement responsables de la modification morphologique, puisque ces ions sont apportés sous forme de sels dans les milieux de cultures. Nous avons donc mis en place un criblage de sels couplé à une démarche statistique dans le but d'apporter des réponses à ces questions. En partie 3 de cette étude nous présentons les résultats obtenus et les perspectives (p107).

## 2.3 Propagation / scale-up

Dans l'investigation de ces nouvelles techniques, nous avons également cherché à étudier leur « extrapolabilité », avec notamment le **maintien de la morphologie souhaitée lors de la propagation du mycélium en volume plus important**, principal défi dans l'application industrielle des champignons filamenteux. Pour cela, nos études en fiole de pré-cultures ont également été menées en bioréacteur.

La pré-culture s'effectue en volume restreint, dans des fioles Erlenmeyer ou Fernbach, dans lequel le champignon est ensemencé à partir de conidies. Outre l'objectif de croissance rapide et la production de biomasse, un des buts de la pré-culture est d'amener les cellules dans un état physiologique propice à une bonne production ainsi que dans un état morphologique techniquement favorable à son transfert. Notre but est donc de proposer des modes de culture qui permettent d'obtenir une morphologie dispersée.

Suite à la pré-culture, la propagation est réalisée en bioréacteur d'un volume plus conséquent et la culture est soumise à un contrôle plus fin des paramètres de culture. Les conditions étant parfaitement contrôlées, cela permet d'obtenir des résultats plus reproductibles. Cette étape permet de s'assurer du maintien de l'état physiologique de la souche, de sa morphologie, et donc de sa capacité à fournir une production idéale. L'étape de production est une perspective intéressante mais n'a pas été étudiée par la suite, notre objectif principal étant l'investigation et le contrôle de la morphologie, découplé de la production.

# Matériels et méthodes

## 1 Micro-organismes

La manipulation des champignons s'effectue sous Poste de Sécurité Microbiologique (PSM) dédié uniquement à ce projet.

### 1.1 Souches sélectionnées

Les souches du panel ont été sélectionnées de manière à couvrir différentes branches phylogénétiques, morphologies, et familles de produits, tout en étant des champignons d'intérêt industriel (Tableau 3).

Division	Classe	Espèce	Souche	Produits
Ascomycota	Eurotiomycetes	<i>Aspergillus terreus</i>	NRRL 1960	Acide itaconique Lovastatine
		<i>Aspergillus oryzae</i>	NRRL 3488	Acide malique
		<i>Aspergillus niger</i>	ATCC 1015	Acide citrique
		<i>Penicillium chrysogenum</i>	DSMZ 1075	Penicilline
		<i>Thermoascus aurantiacus</i>	DSMZ 1831	Xynalase
		<i>Talaromyces stipitatus</i>	NRRL1066	Feruloyl esterase
	Sordariomycetes	<i>Niesslia exilis</i>	CBS 358.70	Enzymes diverses
		<i>Myrothecium inundatum</i>	CBS 120646	COV
		<i>Neurospora crassa</i>	DSMZ 1257	Cellulases
		<i>Myceliophthora thermophila</i>	DSMZ 1799	Cellulases
		<i>Anthostoma avocetta</i>	NRRL 3190	Terpènes
Zygomycota	Mucoromycetes	<i>Mortierella isabellina</i>	NRRL 1757	Lipides
		<i>Mortierella vinacea</i>	DSMZ 3154	Lipides
		<i>Mucor circinelloides</i>	NRRL 3631	Lipides, carotènes
		<i>Rhizomucor miehei</i>	CBS 182.67	Lipases
		<i>Rhizopus oryzae</i>	NRRL 1526	Acide fumarique

**Tableau 3 : Souches du panel d'étude initial.**

## 1.2 Banques de conidies

Les souches ont été commandées sous forme déshydratées. Après remise en suspension elles ont étéensemencées en boîtes de Petri selon les recommandations des fournisseurs. En fonction des préconisations, plusieurs milieux riches ont été testés et une quinzaine de boîtes du milieu le plus favorable à la sporulation pour chaque souche ont étéensemencées. Le protocole suivant a été suivi par la suite :

- Récupération des conidies par ajout de 3-4 mL de glycérol 25 % dans les boîtes de Petri
- Répartition de la solution de conidies en tubes Eppendorf (200  $\mu$ L par tube, 50 à 60 tubes) et en cryotubes (1mL par tube, entre 5 et 10 tubes),
- Conservation à -80°C

Comptage des solutions banques :

Afin de disposer de la concentration en conidies viables de chaque banque réalisée, un comptage sur boîte de Pétri a été réalisé par dilution en cascade des solutions de spores, mise en culture, et dénombrement des colonies obtenues.

## 2 Cultures

### 2.1 Milieux de culture

#### 2.1.1 Milieux riches

Préparations en eau de ville

##### 2.1.1.1 Yeast Extract Potatoes Dextrose (YPD)

(Milieu banque)

PD (BD Difco, 213400) ..... 24 g·L<sup>-1</sup>

Yeast Extract (Merck, 1.03753.0500) .. 5 g·L<sup>-1</sup>

Dissoudre 24 g de poudre dans 1 L d'eau de ville

##### 2.1.1.2 Sabouraud

Sigma Aldrich, S3306

Glucose ..... 20 g·L<sup>-1</sup>

Peptone mycologique ..... 10 g·L<sup>-1</sup>

Dissoudre 30 g de poudre dans 1 L d'eau de ville

##### 2.1.1.3 Potatoes Dextrose (PD)

BD Difco, 213400

Amidon de pomme de terre ..... 4 g·L<sup>-1</sup>

Glucose ..... 20 g·L<sup>-1</sup>

Dissoudre 24 g dans 1 L d'eau de ville

##### 2.1.1.4 YPDP

PD (BD Difco, 213400) .....	24 g·L <sup>-1</sup>
Yeast Extract (Merck, 1.03753.0500) .....	5 g·L <sup>-1</sup>
Bacto Peptone (BD Difco, 211677) .....	5 g·L <sup>-1</sup>
2.1.1.4.1 YPDP talc	
PD (BD Difco, 213400) .....	24 g·L <sup>-1</sup>
Yeast Extract (Merck, 1.03753.0500) .....	5 g·L <sup>-1</sup>
Bacto Peptone (BD Difco, 211677) .....	5 g·L <sup>-1</sup>
Talc 10 µm H <sub>2</sub> Mg <sub>3</sub> O <sub>12</sub> Si <sub>4</sub> (Sigma-Aldrich, 243604) ..	10 g·L <sup>-1</sup>

## 2.1.2 Milieu salin minimum (MSM)

Préparations en eau milliQ afin d'éviter la variabilité de composition de l'eau de ville.

### 2.1.2.1 Solutions à volumes constants

#### Solution NSP concentrée 10 X

*Stockée en chambre froide (4 °C).*

*Utilisée diluée 10 fois (10 % v/v), donc 5 mL par fiole de 50 mL.*

NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	23 g·L <sup>-1</sup>
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	13,2 g·L <sup>-1</sup>
NaNO <sub>3</sub> .....	8,5 g·L <sup>-1</sup>

#### Solution d'oligo-éléments

*Stockée en chambre froide (4 °C).*

FeSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O .....	30 g·L <sup>-1</sup>
CO(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O .....	9 g·L <sup>-1</sup>
MnSO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O .....	1,6 g·L <sup>-1</sup>
ZnSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O .....	8,4 g·L <sup>-1</sup>
CuSO <sub>4</sub> , 5H <sub>2</sub> O .....	0,75 g·L <sup>-1</sup>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> .....	0,1 g·L <sup>-1</sup>
MoNa <sub>2</sub> O <sub>4</sub> , 2H <sub>2</sub> O .....	0,25 g·L <sup>-1</sup>

#### Solution peptone 25 X

*Préparée en début de chaque culture*

*Utilisée diluée 25 fois (4 % v/v), donc 2 mL par fiole de 50 mL.*

Bacto peptone .....	25 g·L <sup>-1</sup>
---------------------	----------------------

#### Solution tampon concentrée 10 X

*Utilisée diluée 10 fois (20 % v/v), donc 5 mL par fiole de 50 mL.*

KHphtalate .....	250 mM (51 g·L <sup>-1</sup> )
------------------	--------------------------------

#### Solution glucose concentrée 10 X

*Utilisée diluée 20 fois (5 % v/v), donc 2,5 mL par fiole de 50 mL pour une concentration finale de 20 g·L<sup>-1</sup> dans les Erlenmeyer de pré-cultures.*

*Solution stérilisée à part, 110 °C, 10 min*

Glucose anhydre ..... 400 g·L<sup>-1</sup>

### 2.1.2.2 Solution pour criblage initial (partie 1)

#### Solution de vitamines

*Concentrée 1000 X, utilisée diluée 1000 fois, donc 50 µL par fiole de 50 mL*

Dissoudre dans 900 mL d'eau MQ :

Pyridoxine hydrochloride ..... 100 mg

Thiamine-HCl ..... 50 mg

Riboflavin ..... 50 mg

Nicotinic acid ..... 50 mg

Calcium D-(+)-pantothenate ..... 50 mg

p-Aminobenzoic acid ..... 50 mg

Thioctic acid = lipoic acid ..... 50 mg

Biotin ..... 20 mg

Folic Acid ..... 20 mg

#### Solution extrait de levure

Yeast Extract (Merck, 1.03753.0500) .. 5 g·L<sup>-1</sup>

#### Solution peptone

Bacto Peptone (BD Difco, 211677) ..... 5 g·L<sup>-1</sup>

### 2.1.2.3 Solutions pour criblage en sels (partie 3)

#### Solution CaCl<sub>2</sub> 100 X

CaCl<sub>2</sub>, 2H<sub>2</sub>O ..... 7,35 g·L<sup>-1</sup> (50 mM)

#### Solution CaSO<sub>4</sub> 100 X

CaSO<sub>4</sub>, 2H<sub>2</sub>O ..... 8,6 g·L<sup>-1</sup> (50 mM)

#### Solution MgCl<sub>2</sub> 100 X

MgCl<sub>2</sub>, 6H<sub>2</sub>O ..... 20,3 g·L<sup>-1</sup> (100 mM)

#### Solution MgSO<sub>4</sub> 100 X

MgSO<sub>4</sub> anhydre..... 12 g·L<sup>-1</sup> (100 mM)



## 2.2 Protocoles de cultures

### 2.2.1 Pré-cultures en fioles Erlenmeyer

#### 2.2.1.1 Conditions opératoires

Les manipulations de pré-cultures ont été réalisées en fiole Erlenmeyer d'un volume total de 250 mL et d'un diamètre de 8 cm, contenant 50 mL de milieu de culture, etensemencées à partir des solutions banques de conidies, selon la concentration voulue. La croissance s'effectue à 24 °C, température moyenne des souches mésophiles, en incubateur rotatif INFORS à 175 tr·min<sup>-1</sup>.

Au cours de la culture, des prélèvements entre 3 et 5 mL sont effectués pour mesurer les concentrations résiduelles en sucres et le pH. La concentration en biomasse finale est déterminée à la fin de la culture. Le volume résiduel de la fiole entière est mesuré puis filtré à 1,2 µm, lavé et séché à 105 °C jusqu'à poids constant (selon le protocole de détermination du poids sec décrit en 3.1.2).

Lors du criblage en sel, les concentrations en ions dissous et en produits (acide fumarique et éthanol) sont également mesurés.

#### 2.2.1.2 Composition des fioles de criblage en sels

Le Tableau 4 présente la composition, en volume, des fioles de cultures réalisées pour le criblage en sels de la partie 3. Le volume final des fioles a été ajusté à 50 mL par de l'eau milliQ.

Volumes (mL)	NSP	Peptone	Tampon	Oligos-éléments	glucose	CaCl <sub>2</sub>	CaSO <sub>4</sub>	MgSO <sub>4</sub>	MgCl <sub>2</sub>
(Expériences)	10 X	25 X	10 X	1000 X	20 X	100 X	100 X	100 X	100 X
fiolle A (1)	5	2	5	0,05	2,5		0,5		0,5
fiolle B (2)	5	2	5	0,05	2,5		1,5		0,5
fiolle C (3)	5	2	5	0,05	2,5		1,5		1,5
fiolle D (4)	5	2	5	0,05	2,5		1,5		5
fiolle E (5)	5	2	5	0,05	2,5		5		0,5
fiolle F (6)	5	2	5	0,05	2,5		5		1,5
fiolle G (7)	5	2	5	0,05	2,5		5		5
fiolle H (8)	5	2	5	0,05	2,5		15		0,5
fiolle I (9)	5	2	5	0,05	2,5		15		1,5
fiolle J (10)	5	2	5	0,05	2,5		15		5
fiolle F <sub>bis</sub> (11)	5	2	5	0,05	2,5		5		1,5
fiolle A (12)	5	2	5	0,05	2,5	0,5		0,5	
fiolle B (13)	5	2	5	0,05	2,5	1,5		0,5	
fiolle C (14)	5	2	5	0,05	2,5	1,5		1,5	
fiolle D (15)	5	2	5	0,05	2,5	1,5		5	
fiolle E (16)	5	2	5	0,05	2,5	5		0,5	
fiolle F (17)	5	2	5	0,05	2,5	5		1,5	
fiolle G (18)	5	2	5	0,05	2,5	5		5	
fiolle H (19)	5	2	5	0,05	2,5	10		0,5	
fiolle I (20)	5	2	5	0,05	2,5	10		1,5	
fiolle J (21)	5	2	5	0,05	2,5	10		5	
fiolle F <sub>bis</sub> (22)	5	2	5	0,05	2,5	5		1,5	
fiolle A (23)	5	2	5	0,05	2,5		0,5	0,5	
fiolle B (24)	5	2	5	0,05	2,5		1,5	0,5	
fiolle C (25)	5	2	5	0,05	2,5		1,5	1,5	
fiolle D (26)	5	2	5	0,05	2,5		1,5	5	
fiolle E (27)	5	2	5	0,05	2,5		5	0,5	
fiolle F (28)	5	2	5	0,05	2,5		5	1,5	
fiolle G (29)	5	2	5	0,05	2,5		5	5	
fiolle H (30)	5	2	5	0,05	2,5		10	0,5	
fiolle I (31)	5	2	5	0,05	2,5		10	1,5	
fiolle J (32)	5	2	5	0,5	2,5		10	5	
fiolle B <sub>bis</sub> (33)	5	2	5	0,05	2,5		1,5	0,5	
fiolle A (34)	5	2	5	0,05	2,5	0,5			0,5
fiolle B (35)	5	2	5	0,05	2,5	0,5			0,5
fiolle C (36)	5	2	5	0,05	2,5	1,5			1,5
fiolle D (37)	5	2	5	0,05	2,5	5			5
fiolle E (38)	5	2	5	0,05	2,5	0,5			0,5
fiolle F (39)	5	2	5	0,05	2,5	1,5			1,5
fiolle G (40)	5	2	5	0,05	2,5	5			5
fiolle H (41)	5	2	5	0,05	2,5	0,5			0,5
fiolle I (42)	5	2	5	0,05	2,5	1,5			1,5
fiolle J (43)	5	2	5	0,05	2,5	5			5
fiolle H <sub>bis</sub> (44)	5	2	5	0,05	2,5	0,5			0,5

**Tableau 4 :** Composition des fioles de cultures pour criblage en sels de calcium et magnésium (volumes en mL de chaque solution stock, complément à 50mL par eau milliQ).

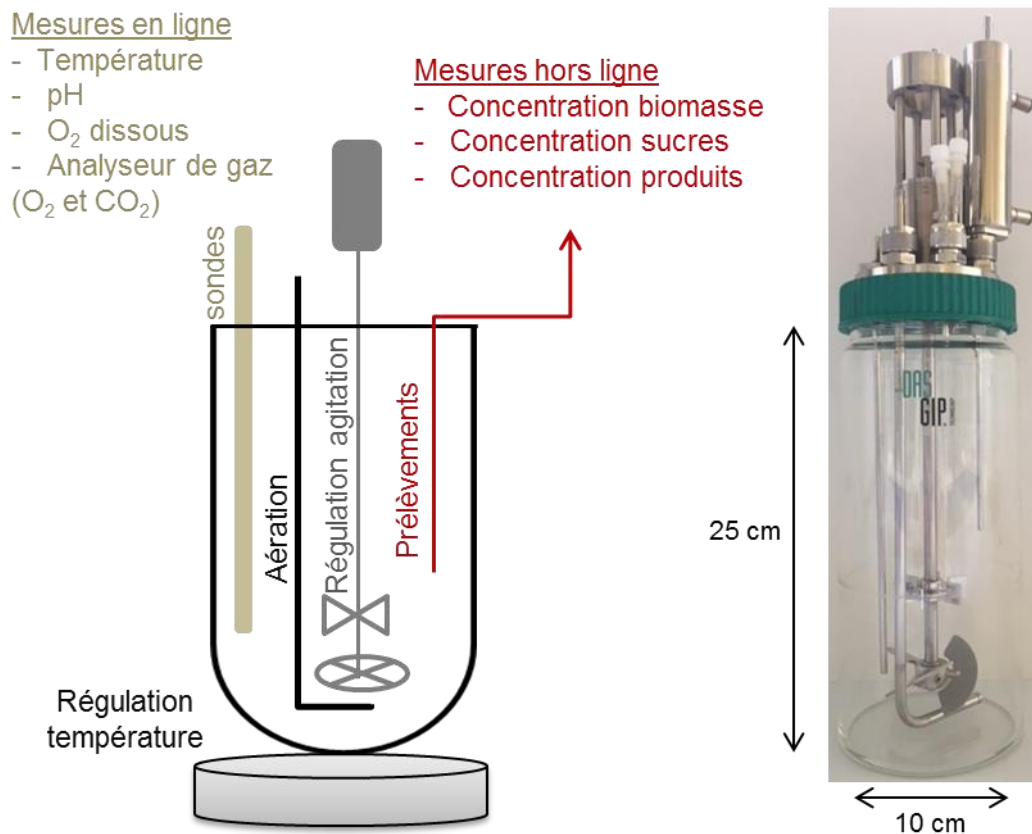
## 2.2.2 Propagations en bioréacteurs DASGIP

Les bioréacteurs DASGIP sont équipés de cuves de contenance maximale de 1500 mL et sont généralement remplis à hauteur de 1200 mL. Ces bioréacteurs permettent de réaliser quatre fermentations indépendantes en parallèle, reliées à un logiciel d'acquisition et de monitoring. La Figure 9 représente schématiquement les éléments d'un bioréacteur DASGIP :

- Une sonde pH ;
- Une sonde de mesure d'oxygène dissous ;
- Un analyseur de gaz ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{O}_2$ ) en sortie (GA4) ;
- Un système d'aération : entrée d'air filtrée à  $0,2 \mu\text{m}$  ;
- Une sonde de température reliée à un système de régulation ;
- Un système d'agitation par deux mobiles
  - à disque (Rushton)
  - à hélice

également reliée à un système de régulation ;

- Un système de soutirage pour prélèvement par seringue de 10 mL.



**Figure 9** : Schéma de principe des bioréacteurs DASGIP.

Les cultures en bioréacteurs ont été menées en milieux riches ou milieux minimum identiques aux fioles décrites précédemment, en batch. L'agitation a été maintenue si possible entre  $400$  et  $800 \text{ tr}\cdot\text{min}^{-1}$ , la température à  $24 \text{ }^\circ\text{C}$  et l'oxygène dissous à  $40 \%$  (par l'agitation avec aération fixe à environ  $30 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$ ). Les sondes de température, pH,  $\text{O}_2$  dissous et l'analyseur

de gaz permettent un suivi et des mesures en ligne. Des prélèvements entre 5 et 10 mL sont effectués au cours de la culture pour les mesures hors ligne de biomasse, sucres et produits.

## **3 Analyses**

### **3.1 Suivi du métabolisme**

#### **3.1.1 pH**

La variation de pH du milieu au cours de la culture est suivie par pH-mètre (Mettler Toledo), après étalonnage par trois solutions tampons (pH = 2, 4 et 7) et directement sur les échantillons prélevés.

#### **3.1.2 Biomasse**

Pour obtenir le poids sec des champignons après leur culture en milieu liquide, nous prélevons un échantillon entre 4 mL et 10 mL de culture. Cet échantillon est ensuite filtré à 1,2 µm (filtre Whatman G/C), lavé et séché jusqu'à poids constant (24 h). Il est ensuite rincé sur le filtre par un volume supérieur à celui du prélèvement.

La masse de poids sec du gâteau sur le filtre, rapportée au volume de prélèvement, donne la concentration en biomasse dans l'échantillon.

#### **3.1.3 Glucose**

##### **Glucostat GM10**

Il permet de mesurer rapidement la concentration en glucose d'un échantillon biologique. L'analyse du glucose est réalisée à l'aide d'une réaction enzymatique. La glucose oxydase catalyse la réaction entre le β-D glucose et le dioxygène pour former de l'acide gluconique. La gamme d'analyse du glucostat est comprise entre 0,5 et 10 g·L<sup>-1</sup>, les échantillons sont donc dilués en conséquence (généralement entre 1/5<sup>ème</sup> et 1/10<sup>ème</sup>).

##### **HPLC**

Pour un grand nombre d'échantillon, le dosage des sucres s'effectue à l'HPLC. Après dilution des échantillons à analyser en tube Eppendorf, ceux-ci sont chauffés au bain marie cinq minutes à ébullition afin de précipiter d'éventuelles protéines. Après refroidissement, les échantillons bouillis sont filtrés à 0,2 µm et recueillis dans les vials d'analyses.

La séparation est réalisée par une colonne Metacarb 87P (Varian) à 80°C, avec une phase mobile d'eau milliQ (débit 0,4 mL·min<sup>-1</sup>, pression 32 bar). La détection est réalisée par un réfractomètre Waters 2414.

L'intégration des pics de chromatogramme et le calcul des concentrations sont réalisés par le logiciel Breeze 2.0 (Waters), avec étalonnage par une gamme de quatre standards contenant respectivement 1, 2, 5 et 10 g·L<sup>-1</sup> des sucres suivants : cellobiose, lactose, glucose, galactose, mannose, arabinose et xylose.

### 3.1.4 Ions

Les mesures de concentrations en cations ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  et  $\text{NH}_4^+$ ) ont été effectuées par HPLC. La séparation est réalisée par une colonne IonPac CS12A (4x250 mm, Dionex réf. 046073), précédée d'une précolonne IonPac CG12A (4x250 mm, Dionex réf. 046074) à 30 °C. La phase mobile est de l'acide méthanesulfonique à 20 mM (débit 1 mL.min<sup>-1</sup>, pression 2000 psi).

Les mesures de concentrations en anions ( $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  et  $\text{NO}_3^-$ ) ont été effectuées par HPLC. La séparation est réalisée par une colonne AS9-HC (4x250 mm, Dionex réf. 051786), précédée d'une précolonne IonPac AG9-HC (4x250 mm, Dionex réf. 051791) à 30 °C. La phase mobile est du carbonate de sodium à 100 mM (débit 0,8 mL.min<sup>-1</sup>, pression 2000 psi).

Dans les deux cas, la détection est réalisée par conductimétrie (Dionex CD) à 35 °C. L'intégration des pics de chromatogramme et le calcul des concentrations sont réalisés par le logiciel Chromeleon 6.80 SP2 (Dionex). L'étalonnage est réalisé par gamme de calcium, magnésium, sodium, potassium, et ammonium à 5 ; 2,5 ; 1 ; 0,2 et 0,05 mM ou par gamme de sulfate, chlore, phosphate et nitrate à 5 ; 2,5 ; 1 ; 0,2 et 0,1 mM, par régression linéaire.

### 3.1.5 Acide fumarique

Les mesures de concentration en acide fumarique ont été réalisées par HPLC. La séparation est réalisée par une colonne HPX-87H (Biorad) à 60°C. La phase mobile est de l'acide sulfurique à 0,001N (débit 0,6 mL.min<sup>-1</sup>).

La détection est réalisée par réfractométrie. L'intégration des pics de chromatogramme est réalisé par le logiciel Chromeleon 6.80 SP2 (Dionex) et le calcul des concentrations par régression linéaire d'une gamme d'acide fumarique à 10 ; 5 ; 1 ; 0,5 et 0,2 g.L<sup>-1</sup>.

### 3.1.6 Ethanol

Les mesures de concentration en éthanol ont été réalisées par CPG. La séparation est effectuée par une colonne CP7351 PoraBond Q (Agilent). Le gaz vecteur est de l'Hélium (débit constant 1,6 mL.min<sup>-1</sup>).

La détection est réalisée par détecteur à ionisation de flamme (FID). L'intégration des pics de chromatogramme est réalisée par le logiciel Chromeleon 6.80 SP2 (Dionex) et le calcul des concentrations par standards d'éthanol à 0,5 et 1 g.L<sup>-1</sup>.

## 3.2 Suivi de la morphologie

### 3.2.1 Macromorphologie

Les différentes morphologies ont été numérisées en scannant le fond des Erlenmeyers par scanner à plat numérique (HP Scanjet 62710).

Les grossissements ont été obtenus par analyse d'échantillons de culture sous un microscope binoculaire (Leica S8APO) équipé d'une caméra (Leica MC170 HD) et d'un logiciel de traitement d'image (LAS V4.9).

Le diamètre des pellets a été déterminé par le logiciel ImageJ.

### 3.2.2 Microscope Électronique à Balayage (MEB)

Cette méthode a été utilisée pour observer l'agglomération ou non agglomération des conidies après les premières heures suivant l'ensemencement en partie 1 des résultats (Micromorphologie).

Un échantillon de 20 mL est prélevé au temps initial juste après ensemencement et agitation de l'Erlenmeyer ( $t = 0$  h) et à 6 heures de cultures ( $t = 6$  h) puis filtré sur filtre de polycarbonate (Nuclepore™ Whatman) de diamètre 47 mm et porosité 0,8  $\mu\text{m}$ . Le filtre est mis en suspension dans une solution de glutaraldéhyde à 2,5 % v/v pendant 1 heure (fixation des structures biologiques pour éviter la dénaturation). Une seconde filtration de la solution est réalisée sur le même filtre, suivi de deux rinçages par une solution de tampon phosphate à pH 7. Le filtre est ensuite séché en étuve à 105 °C pendant minimum 4 heures. Le centre du filtre est découpé et placé sur une membrane en carbone puis métallisé par une fine couche d'or.

Les observations microscopiques sont réalisées avec un MEB conventionnel sous vide (EVO MA10, Zeiss SMT) équipé d'un filament de tungstène à 15 kV et 100 mA, d'un courant de sonde de 150 pA pour l'imagerie secondaire à haute résolution spatiale. Le détecteur SE est utilisé pour observer la topographie de surface et le détecteur d'électrons rétrodiffusés (BSE) est utilisé pour obtenir des images avec un contraste de numéro atomique. Le détecteur de dérive du silicium de l'EDS est calibré sur cobalt pour des analyses quantitatives pendant 10 s à 10 à 15 kcps avec un temps mort d'environ 15. La micro-analyse chimique est standardisée sur une collection de minéraux dont la composition chimique est bien connue et vérifiée par microsonde électronique (étalons de référence pour la microanalyse aux rayons X n° 7610 de Micro-Analysis Consultant Limited, Royaume-Uni).

## 3.3 Traitements statistiques

Les traitements statistiques menés en partie 3 des résultats (compréhension de l'effet des sels sur la morphologie de *Rhizopus oryzae*) ont été réalisés à l'aide du logiciel RStudio (FactoMineR).

Les principes des techniques utilisées sont résumées ci-dessous de façon simplifiée :

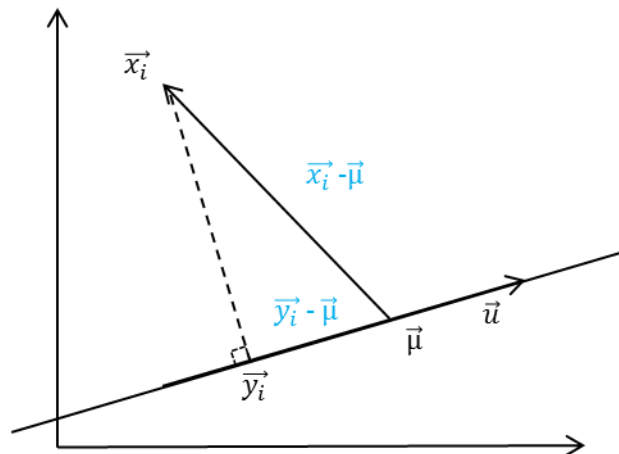
### 3.3.1 PCA : Principal Component Analysis

La méthode de réduction du nombre de dimensions la plus classiquement utilisée est l'Analyse en Composantes Principales (ACP). Cette méthode est dite non-supervisée du fait qu'elle considère toutes les variables analysées sur un même pied d'égalité contrairement aux méthodes supervisées qui distinguent deux types de variables ; celles explicatives et celle(s) à expliquer et construisent des modèles de prédiction de ces dernières en fonction des premières. L'ACP peut être utilisée pour réduire le nombre de dimensions, compresser des données, filtrer du bruit, identifier par corrélation.

L'ACP consiste à rechercher des nouvelles variables appelées composantes principales (CP), combinaisons linéaires des variables initiales, dont la variance est maximale. Les CP sont ensuite classées par ordre décroissant de la variance. Il s'agit, pour l'utilisateur de cette méthode, de sélectionner parmi les premières CP les plus pertinentes conduisant à la construction d'un nouvel espace de représentation dans lequel les données sont projetées. La

dimension de cet espace (égal au nombre de CP retenues) est fortement liée aux données elles-mêmes.

Géométriquement (Figure 10), on considère  $\vec{x}_i$  un point de l'espace multidimensionnel initial, et  $\vec{y}_i$  le point de l'espace initial qui est son projeté orthogonal dans le sous-espace réduit. L'information perdue par la projection peut être mesurée par la distance euclidienne  $\|\vec{y}_i - \vec{x}_i\|$  (tous les deux représentés dans l'espace initial). On cherche alors la transformation linéaire qui minimise la distance entre les points  $\vec{x}_i$  et leur projeté  $\vec{y}_i$ . Cela revient à trouver le sous-espace tel que la moyenne des carrés des distances (dispersion) entre les points et leur projection :  $J_{ACP} = \sum_{i=1}^n \|\vec{y}_i - \vec{x}_i\|^2$  soit minimale. Mais ce sous-espace doit également respecter la dispersion (inertie) maximale des données c'est-à-dire la somme pondérée des carrés des distances des individus au centre de gravité  $\vec{\mu}$ . Dans le cas où les variables sont centrées réduites, la variance de chaque variable vaut 1. L'inertie totale est alors égale à p (nombre de variables). Ainsi minimiser  $J_{ACP} = \sum_{i=1}^n \|\vec{y}_i - \vec{x}_i\|^2$  revient à maximiser  $J'_{ACP} = \sum_{i=1}^n p_i \|\vec{y}_i - \vec{\mu}\|^2$ . On cherche donc la droite passant par le centre de gravité  $\vec{\mu}$  et de vecteur unitaire  $\vec{u}$  pour laquelle le critère  $J_{ACP}$  sera maximal et  $J'_{ACP}$  minimal.



**Figure 10 :** Schématisation simplifiée du principe de l'Analyse en Composante Principale.

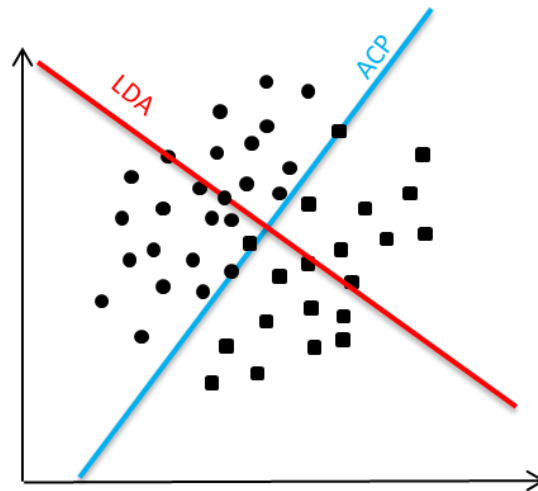
### 3.3.2 LDA : Linear Discriminant Analysis

L'analyse discriminante linéaire (ADL) fait partie des méthodes supervisées, du fait qu'elle cherche à construire un modèle de prédiction des classes d'une variable qualitative (variable à expliquer) en fonction de variables explicatives. La classification supervisée se distingue de la classification non supervisée par le fait que des observations dont on connaît l'appartenance aux classes sont disponibles pour apprendre la règle de décision (on parlera aussi parfois de classifieur). Ces observations, dites d'apprentissage, « supervisent » la construction du classifieur.

De la même façon que l'ACP, l'ADL, consiste à construire un nouvel espace de représentation des données par la recherche de nouvelles variables appelées composantes discriminantes, combinaison linéaire des variables initiales par maximisation du critère de séparation des groupes définis par les classes de la variable qualitative. Ces classes correspondent, dans notre étude, aux types de morphologie (texture) des champignons en fin

d'expérimentation. La quantité  $\frac{\text{variance inter}}{\text{variance totale}}$ <sup>9</sup> mesure le pouvoir discriminant des nouvelles variables. Cette quantité est théoriquement comprise entre 0 et 1 (Traissac et Pierre 1994).

La Figure 11 montre la différence dans la discrimination des données avec prise en compte des classes (LDA) et sans prise en compte (ACP).



*Figure 11 : Représentation schématique des axes fournis par l'ACP et la LDA pour un ensemble de données séparées en deux classes.*

## **4 Banc microfluidique**

Ce banc a été utilisé pour séparer physiquement les conidies en partie 2 des résultats (Développement de la technique EGM).

### **4.1 Principe**

Deux phases huileuse et aqueuse se rencontrent au sein des canaux du système, permettant selon un débit particulier de créer une émulsion. Se forment alors des gouttes de milieu aqueux dans la phase huile. Les conidies de champignons sont contenues dans la phase aqueuse, l'objectif étant de les conserver séparément dans les gouttes d'eau au sein de la phase huileuse.

---

<sup>9</sup> variance inter groupe : variance de cette nouvelle variable mesurant la dispersion des centres de gravité des groupes. variance totale : variance de cette nouvelle variable quantifiant la dispersion des individus autour de leur centre de gravité.



## 4.2 Matériels

### Tensio-actif

Solution de Pico-Surf™ diluée à 5 % dans l'huile FC40 (Dolomite, 3200220)

Concentration du Pico-Surf™ dans l'huile FC40 :  $90 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$

CMC (Concentration micellaire critique)<sup>10</sup> du Pico-Surf™ =  $1,8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$

### Phase huile

Dilution du Pico-Surf™ en huile fluorée FC3283 pour obtenir une solution à  $3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1} > \text{CMC}$

### Phase aqueuse

Milieu YDPDP dilué au  $\frac{1}{2}$

### Microsystème

Moule : M97-C

PDMS (Polydimethylsiloxane)<sup>11</sup> collé sur lame de verre traité à l'OTS (Octadecyl TricholoSilane)<sup>12</sup>

Tubes d'entrées en plastique de diamètre interne  $125 \mu\text{m}$

Tubes de sortie en plastique de diamètre interne  $750 \mu\text{m}$

Le banc microfluidique pour l'encapsulation des spores contient les éléments suivants présentés en Figure 12 :

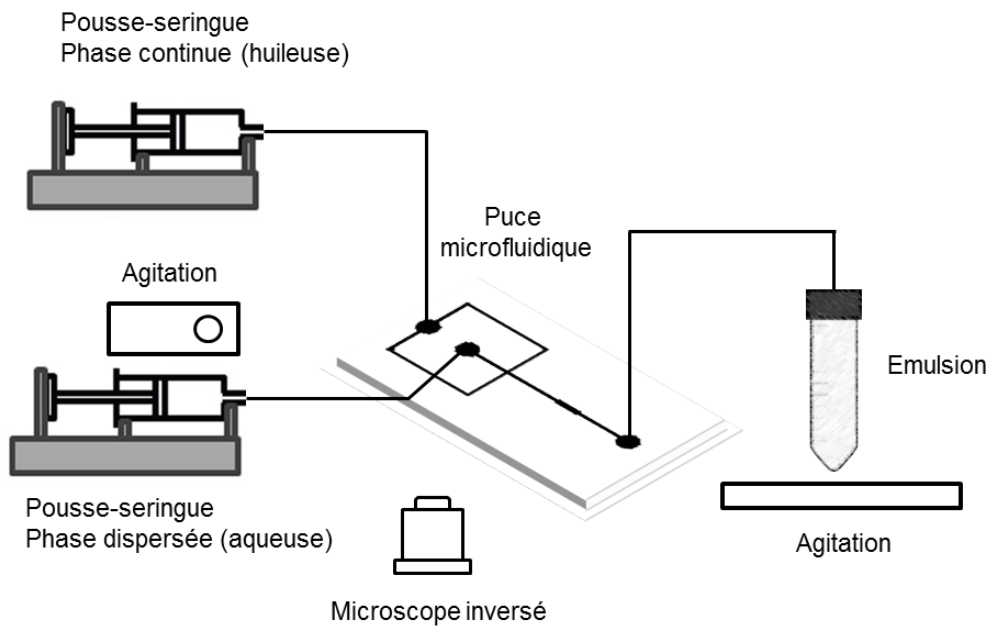
- Un microscope inversé (AXIO observer Mat, objectif x20) au-dessus duquel est placé le système microfluidique, relié à une caméra (Olympus i-speed LT, 2000 images/sec, obturation x20)
- Deux pousse-seringues (Harvard apparatus) pour les phases huileuse et aqueuse contenues dans deux seringues en verre de 10 mL
- Un agitateur magnétique assurant l'homogénéisation de la phase aqueuse contenant les spores
- Un agitateur rotatif sur lequel est placé le tube de récupération de l'émulsion

---

<sup>10</sup> Concentration en tensioactif dans un milieu au-dessus de laquelle des micelles se forment spontanément.

<sup>11</sup> Polymère de composés organosiliciés, communément appelés silicones.

<sup>12</sup> Utilisé comme agent hydrophobant pour le traitement de surfaces inorganiques.



**Figure 12** : Plan de travail microfluidique pour l'encapsulation de conidies.

Pour calculer le volume des gouttes obtenues, celles-ci sont apparentées à des cylindres, la formule suivante est donc utilisée :  $V(\text{goutte}) = \frac{\pi D^2 h}{4}$

Avec D = diamètre des gouttes ( $\mu\text{m}$ )

Et h = profondeur des canaux du microsystème ( $140 \mu\text{m}$ ).

# Résultats

---

## 1 Criblage initial

*L'étude bibliographique met en évidence de nombreux facteurs effectivement impliqués dans la morphologie des différentes espèces de champignons filamenteux composant notre panel. Il est cependant compliqué d'aboutir à une synthèse fiable présentant des résultats concrets, puisque nous avons constaté des divergences en fonction des expériences présentées pour une même espèce et un même facteur, principalement pour les méthodes conventionnelles. Ce criblage initial a donc deux objectifs dans cette étude :*

- *Déterminer si les paramètres physico-chimiques décrits dans l'état de l'art pour le contrôle de la morphologie ont un réel impact sur les souches constituant le panel ;*
- *Sélectionner les souches et les conditions opératoires à conserver pour la mise en œuvre des techniques « nouvelles » de contrôle des morphologies agrégées, principalement basées sur les mécanismes « coagulant et non-coagulant ».*

*Ce premier criblage est principalement visuel, ayant pour but de délimiter notre zone de travail, les résultats pour les souches et méthodes sélectionnées seront affinés qualitativement et quantitativement dans les parties suivantes.*

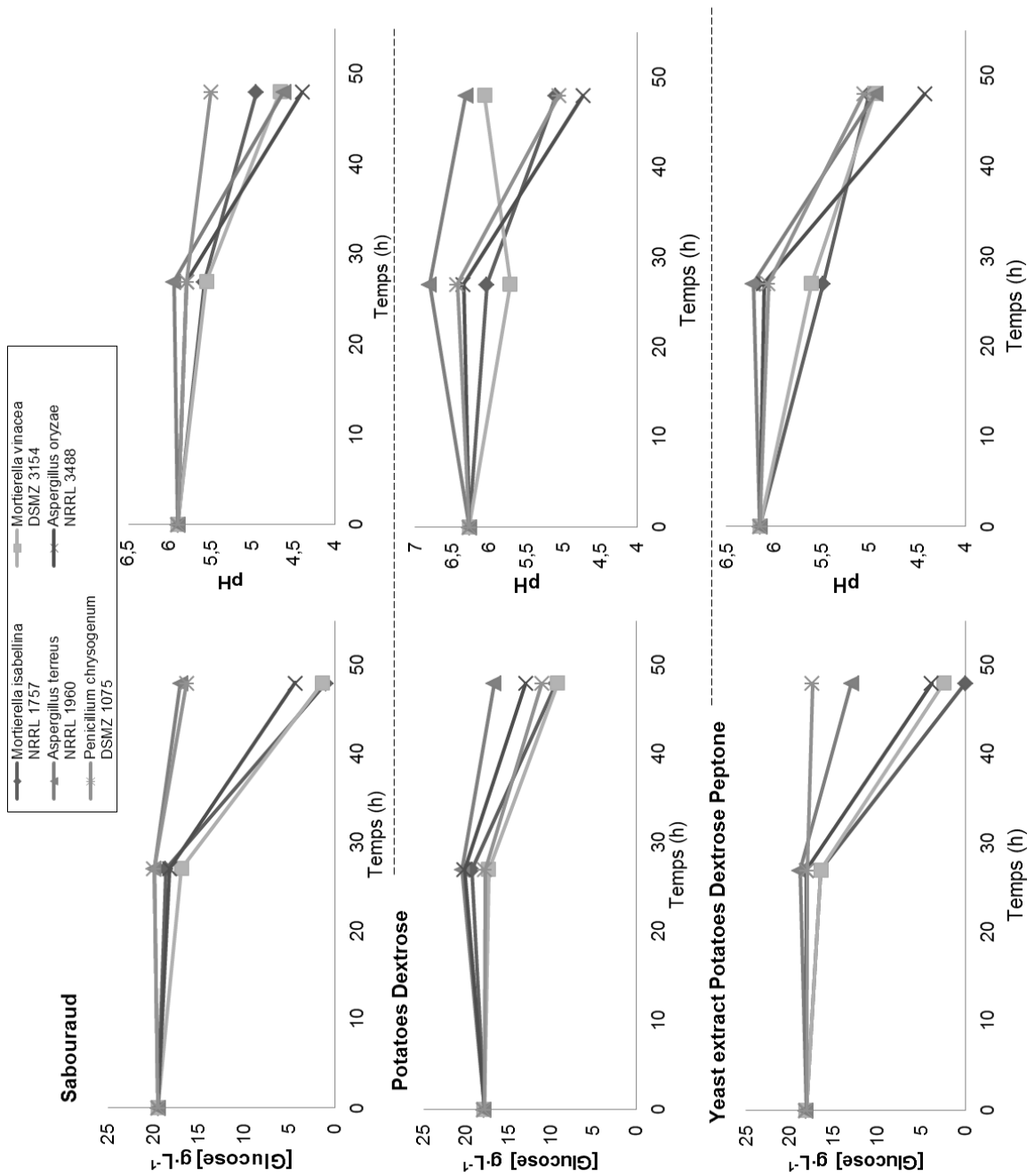
### 1.1 Macromorphologie

#### 1.1.1 Milieu de culture

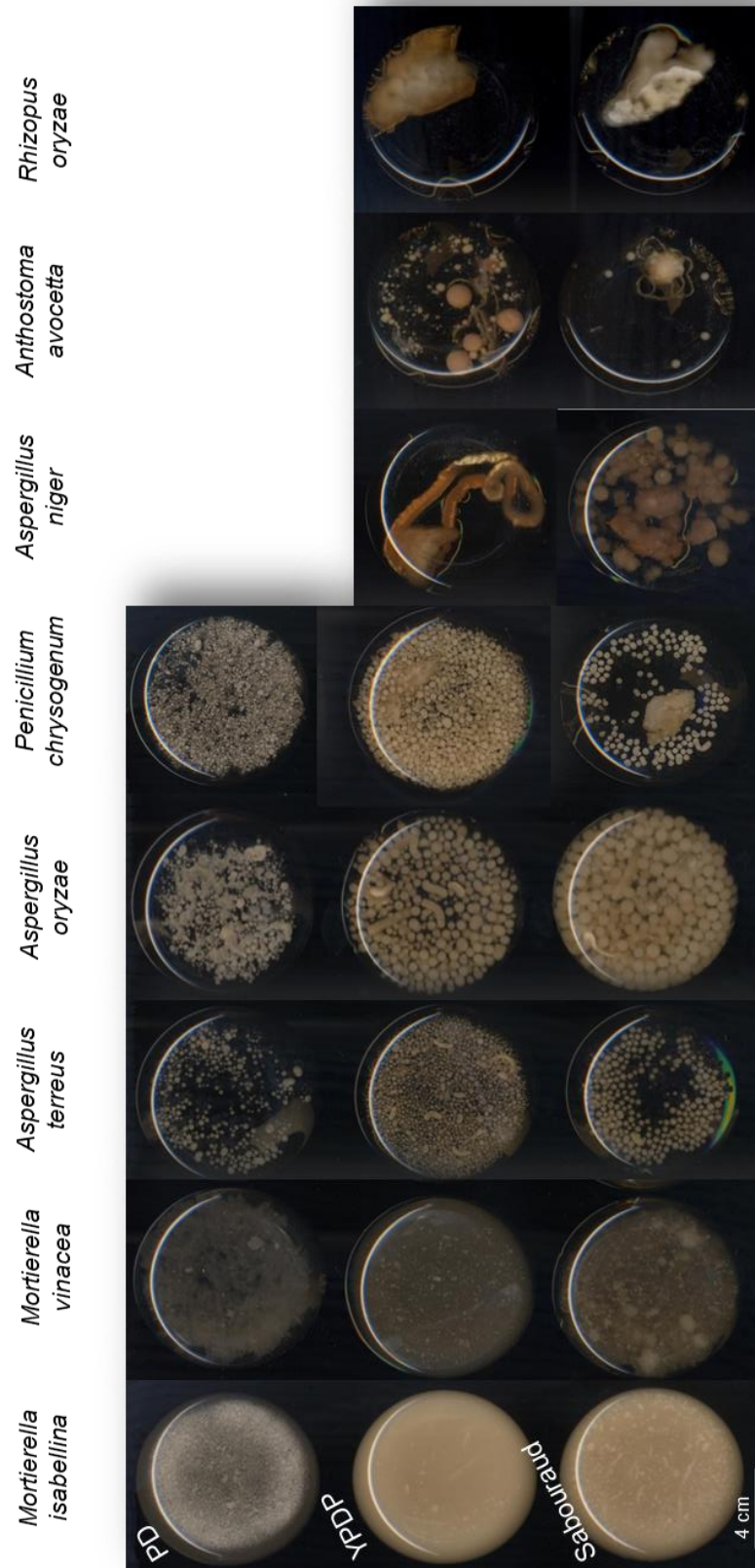
##### 1.1.1.1 Milieux riches

Les souches du panel ont été mises en culture liquide dans trois milieux riches différents : Potatoes Dextrose (PD), Yeast Extract Potatoes Dextrose Peptone (YPDP) et Sabouraud, décrits comme des milieux optimums pour la croissance des microorganismes. Le taux d'ensemencement de  $10^5$  conidies·mL<sup>-1</sup> correspond au taux moyen d'ensemencement dans les articles bibliographiques étudiés, de la même manière qu'un volume de 50 mL en Erlenmeyer sous une agitation de 175 tr·min<sup>-1</sup> (ces critères seront également testés par la suite) à 24°C. L'observation des macromorphologies nous donne une première idée de leurs différents comportements en milieux liquides dans les mêmes conditions de culture.

La Figure 13 est un exemple du suivi de la consommation en glucose et de l'acidification du milieu réalisé pour toutes les souches du panel dans les trois milieux riches. La Figure 14 est également un échantillon du criblage morphologique réalisé dans les différents milieux de cultures pour l'ensemble du panel. Ce premier criblage nous permet de cibler un milieu riche dans lequel l'ensemble des souches montre une croissance favorable, de mettre en évidence les souches dont la croissance sera, quel que soit



**Figure 13 :** Exemple de suivi de la concentration en glucose et de l'acidification des milieux Potatoes Dextrose (PD), Yeast Extract Potatoes Dextrose Peptone (YPDP) et Sabouraud des souches du panel initial.



**Figure 14** : Exemple du criblage morphologique des souches du panel initial en milieux riches *Potatoes Dextrose (PD)*, *Yeast Extract Potatoes Dextrose Peptone (YPDP)* et *Sabouraud*.  
(Photographies d'Erlenmeyer)

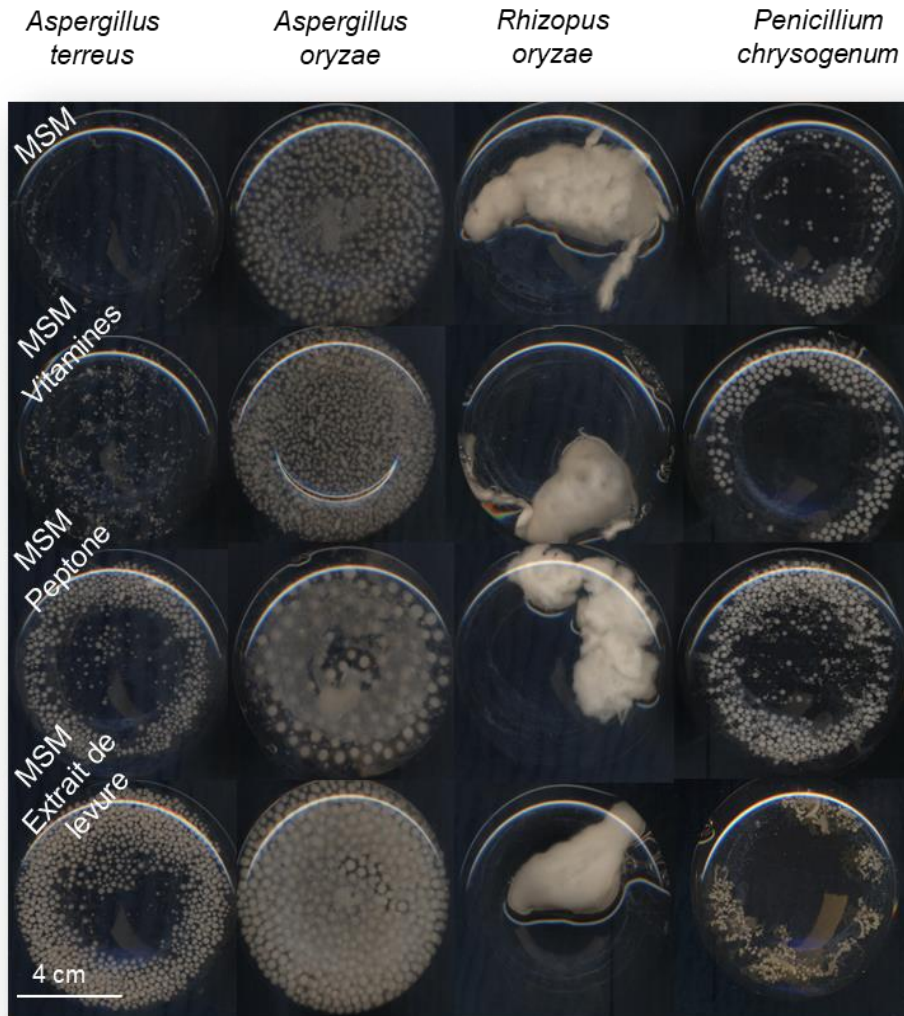
le milieu, difficile à mettre en œuvre dans notre étude car trop éloignée du panel (souches thermophiles ou de croissance plus lente), et de sélectionner différents types de morphologies agrégées.

Comme le montre les résultats présentés ci-dessous, nous avons remarqué dès les premiers criblages une consommation plus lente en milieu PD, associé à une acidification moindre du milieu de culture, qui atteste certainement d'une production plus faible. Les morphologies sont également perturbées.

A cette étape, il semble que le milieu YPDP soit donc le milieu préférable pour la croissance des souches dans un milieu riche standard. Le milieu Sabouraud avait été initialement choisi, mais une trop grande variabilité dans les lots commandés nous a conduit à l'éviter. De plus, les souches présentant déjà une morphologie fluide ou une croissance nécessitant des conditions particulières (espèces thermophiles) ont finalement été écartées. Par la suite, des premiers tests de variations des conditions de pré-culture sur ces souches aux morphologies agrégées ont été effectuées, afin de déterminer si des effets physiques ou chimiques peuvent effectivement entraîner des changements de morphologie significatifs, le but étant d'obtenir des pré-cultures fluides pour un maximum de souches du panel.

#### 1.1.1.2 Milieux minimums avec additifs de croissance

L'étude bibliographique a montré que le milieu riche YPDP sélectionné, composé de matrices complexes tels que la peptone et l'extrait de levure, généralement utilisés pour accélérer et amplifier la croissance des microorganismes, pourrait entraîner des variations morphologiques comparé à un milieu salin défini. Afin d'observer uniquement des impacts liés à la présence ou non de ces additifs, un milieu salin minimum (MSM) a été défini grâce à une synthèse bibliographique. Ce milieu contient les composés nécessaires à la croissance, en concentration suffisante mais sans excès, dont nous contrôlons la composition contrairement aux milieux riches utilisés précédemment. Ce milieu est ensuite supplémenté de peptone ou d'extrait de levure ( $0,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) ainsi que d'un mélange de vitamines dont les types et concentrations sont également couramment employés en microbiologie. Certaines souches de morphologies agrégées ont été inoculées dans les mêmes conditions qu'en milieu riche dans le milieu minimum avec et sans additifs (Figure 15). Le principal effet observé est une croissance un peu plus importante sur les milieux contenant de la peptone ou de l'extrait de levures, dû au fait que ces additifs contiennent de l'azote (sous forme organique) en grande quantité, élément très important à la formation de protéines et de matériel, et qui favorise donc le taux de croissance. Cependant les souches agrégées testées ne montrent pas de variations morphologiques significatives, *A. terreus*, *A. oryzae* et *P. chrysogenum* forment des pellets, *R. oryzae* forme toujours un agrégat. De manière générale, il ne semble donc pas y avoir de modifications importantes de la morphologie en utilisant le milieu riche YPDP précédemment sélectionné. Ce milieu, favorisant la production de biomasse, sera donc conservé pour les investigations suivantes et notamment celles menées en partie 2 et 3 de cette étude.

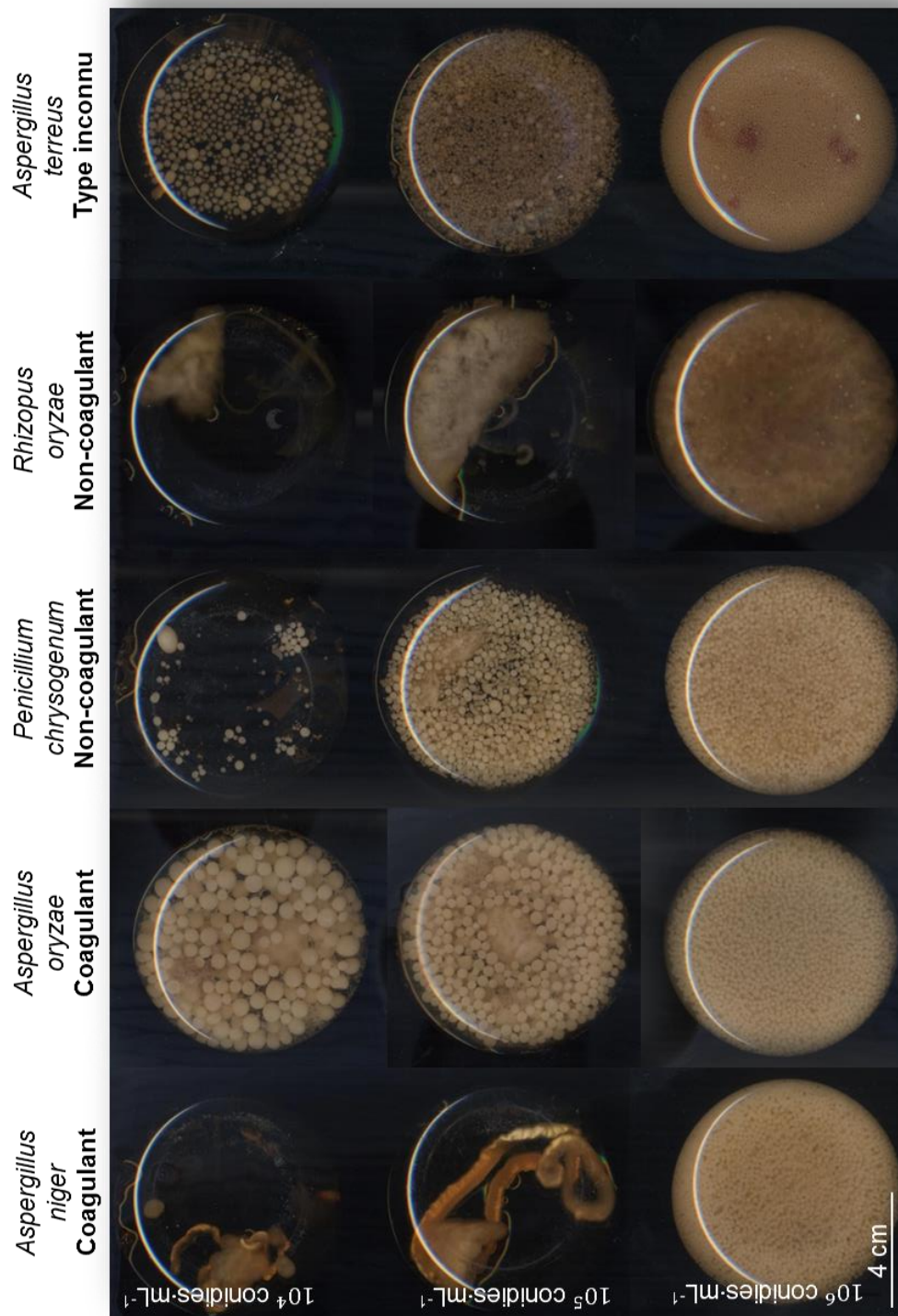


**Figure 15** : Effets d'additifs de croissance ajoutés en milieu salin minimum (MSM) sur la morphologie des souches *A. terreus*, *A. oryzae*, *R. oryzae* et *P. chrysogenum*. (Photographies d'Erlenmeyer)

### 1.1.2 Taux d'ensemencement

Dans la littérature, le taux d'ensemencement est largement décrit comme influençant fortement la morphologie et de plus, il s'agit du seul paramètre dont la variation entrainerait deux comportements distincts selon le type coagulant ou non-coagulant. En effet de nombreuses études décrivent qu'un fort taux d'ensemencement pourrait entrainer une morphologie fluide chez les espèces non-coagulantes mais serait sans impact significatif sur les espèces coagulantes mis à part une diminution de la taille des agrégats (*cf* Etat de l'art, partie 3.2.3, p44).

Afin de vérifier ces informations, 3 taux d'ensemencement ont été mis en œuvre sur 5 souches agrégées de notre panel dont le type de formation d'agrégats est décrit, ou non, en littérature. Les conidies ont été inoculées en Erlenmeyer dans 50 mL de milieu YDPD



**Figure 16** : Effet du taux d'ensemencement sur la morphologie d'*A.niger*, *A. oryzae* (coagulantes), *P. chrysogenum*, *R. oryzae* (non-coagulantes) et *A. terreus* (type inconnu).  
(Photographies d'Erlenmeyer)



et toujours sous une agitation de  $175 \text{ tr}\cdot\text{min}^{-1}$ . La Figure 16 présente les morphologies après 24h de croissance, qui visiblement ne s'accordent pas toujours avec les descriptions bibliographiques. En effet, le mécanisme est vérifié pour la souche *R. oryzae* dont la morphologie agrégée a radicalement évolué en mycélium dispersé dans le milieu, également pour les souches *A. oryzae* et *A. niger* dont les changements se manifestent par une diminution de la taille des pellets et agrégats respectivement. Ces trois souches ont un comportement en accord avec le type leur étant attribué. Cependant, parmi les souches non-coagulantes testées, nous n'observons pas de transition marquée chez *P.chrysogenum* (pourtant décrite en littérature, à partir d'un taux d'ensemencement de  $5\cdot 10^5 \text{ conidies}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), mais une diminution de la taille des pellets comme dans le cas d'un type coagulant. L'augmentation du taux d'ensemencement chez *A. terreus*, dont le type n'est pas clairement établi en littérature, entraîne une diminution de la taille des pellets, comportement identique aux types coagulants.

Ce criblage nous amène à la conclusion que l'effet du taux d'ensemencement est très variable selon les conditions opératoires, les espèces et même au sein d'espèces décrites comme appartenant au même type, malgré un criblage réalisé dans les mêmes conditions. C'est pourquoi nous maintiendrons rigoureusement un taux d'ensemencement de  $10^5 \text{ conidies}\cdot\text{mL}^{-1}$  dans l'intégralité des études suivantes.

### 1.1.3 Puissance dissipée

Pour tester l'effet sur la morphologie de la puissance dissipée, nous avons choisi les souches *A. terreus* et *A. oryzae*, mises en culture selon les critères décidés précédemment mais à trois puissances dissipées différentes :  $0,04$  ;  $0,2$  et  $1 \text{ kW}\cdot\text{m}^{-3}$

Pour obtenir ces trois puissances dissipées, les cultures ont été réalisées dans trois types de fioles (fiole de pénicilline de  $4,5 \text{ cm}$ , fiole Erlenmeyer de  $8 \text{ cm}$ , fiole Fernbach de  $19 \text{ cm}$  de diamètres) remplies respectivement avec des volumes de  $30$ ,  $50$  et  $385 \text{ mL}$ , soumises à une même agitation orbitale de  $175 \text{ tr}\cdot\text{min}^{-1}$ . La puissance dissipée ( $P/V$ ) a été estimée en utilisant les corrélations obtenues par (Büchs et al. 2000) pour des fioles agitées :

$$\frac{P}{V} = Ne' \cdot n^3 \cdot d^4 \cdot V_L^{-\frac{2}{3}}$$

$$Ne' = 75 \cdot Re^{-1} + 25 \cdot Re^{-0,6} + 1,5 \cdot Re^{-0,2}$$

$$Re (\text{nombre de Reynolds}) = \frac{\rho_c \cdot n \cdot d^2}{\mu}$$

$d$  = diamètre de la fiole,

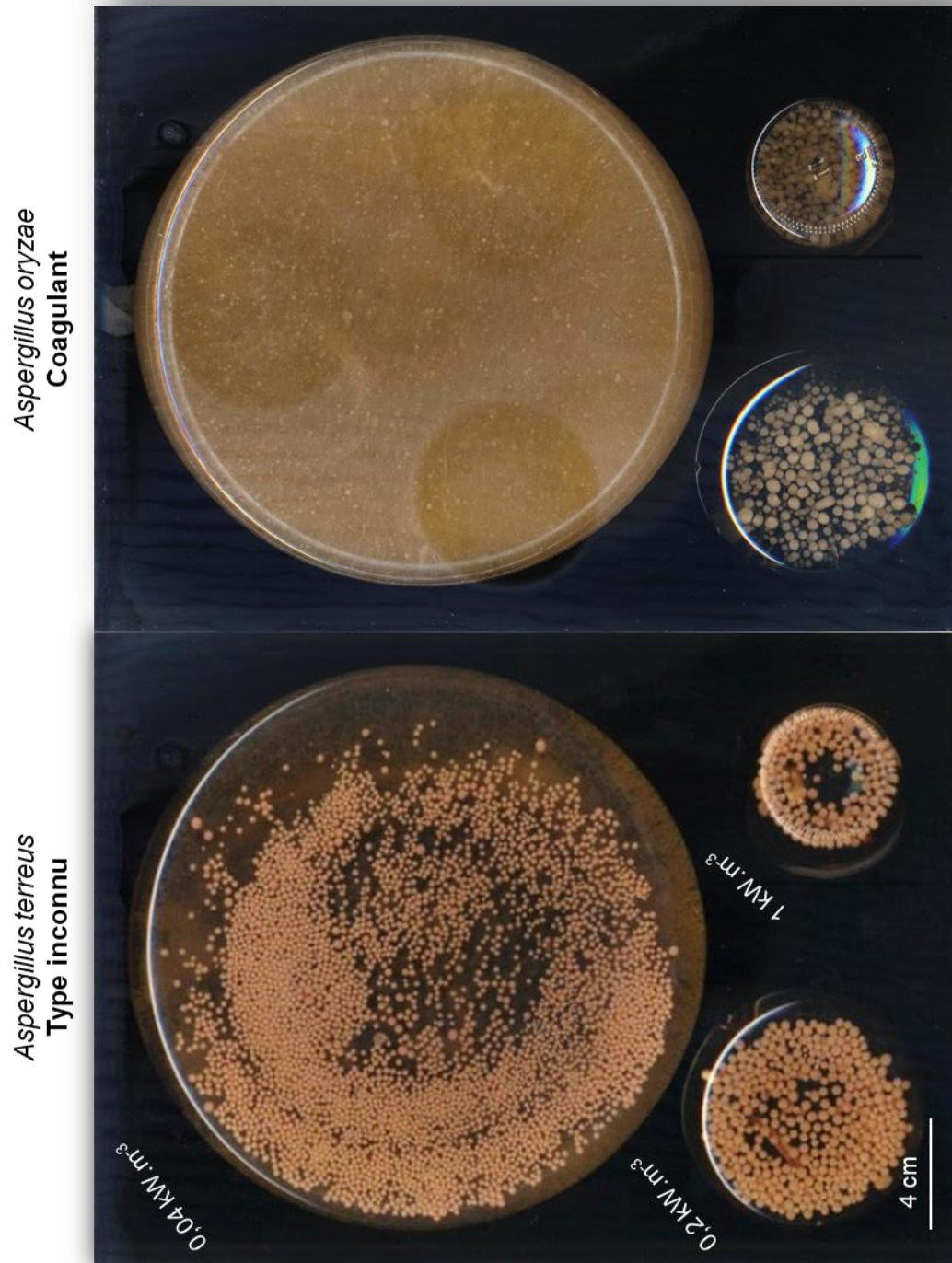
$n$  = vitesse de rotation en tour par seconde,

$V_L$  = volume de liquide et

$\mu$  = viscosité dynamique (de l'eau en début de culture) (Pa.s)

Nous avons observé que la souche *A. terreus* a maintenu une morphologie en pellets quel que soit la valeur de puissance dissipée. *A. oryzae* montre cependant des pellets déstructurées et moins compactes lors d'une faible puissance dissipée appliquée (Figure 17). Cette observation est une fois encore en contradiction avec la littérature.

Nous avons donc fixé pour la suite des expériences les conditions de culture en fiole Erlenmeyer de capacité 250 mL contenant 50 mL de milieu et soumises à une agitation de  $175 \text{ tr}\cdot\text{min}^{-1}$ , conditions usuellement appliquées dans les études bibliographiques.

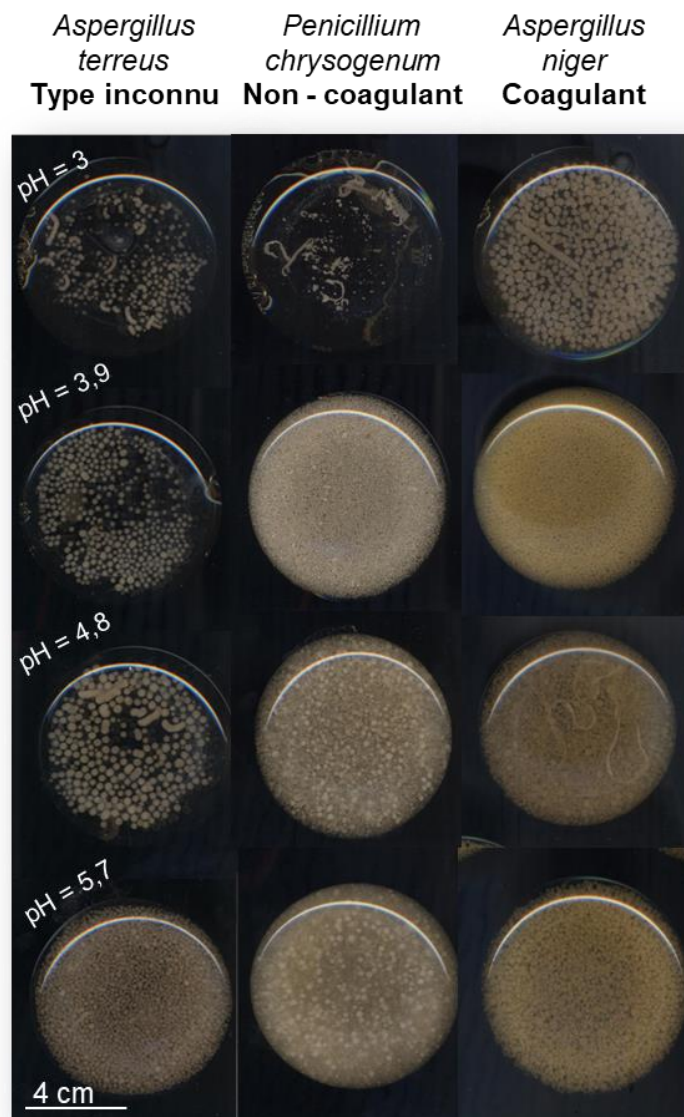


**Figure 17** : Effet de la puissance dissipée sur la morphologie d'A. terreus et A. oryzae.

(Photographies de Fernbach, Erlenmeyer et fiole de pénicilline)

### 1.1.4 pH

L'effet du pH initial a été testé sur trois souches, mises en culture dans quatre milieux YPDP dont le pH a été modifié par ajout d'acide chlorhydrique : 3 ; 3,9 ; 4,8 ; 5,7. Au cours de la culture, le pH est ensuite modifié par le métabolisme des champignons. Cette expérience devrait donc théoriquement préférentiellement impacter la morphologie des espèces coagulantes dont l'agrégation des conidies pendant les premières heures de cultures pourrait être perturbée par une modification du pH initial et donc des liaisons entre les composants des parois (*cf* Etat de l'art, partie 2.4.2.2, p37). C'est pourquoi dans cette expérience préliminaire nous avons choisi de mettre en culture les souches *A. niger* coagulante, *P. chrysogenum* non-coagulante ainsi que *A. terreus* dont nous ignorons le type, qui pourraient montrer des comportements variables.



**Figure 18 : Effet du pH initial sur la morphologie des espèces *A. terreus*, *P. chrysogenum* et *A. niger* en milieu riche YPDP.**

(Photographies d'Erlenmeyer)

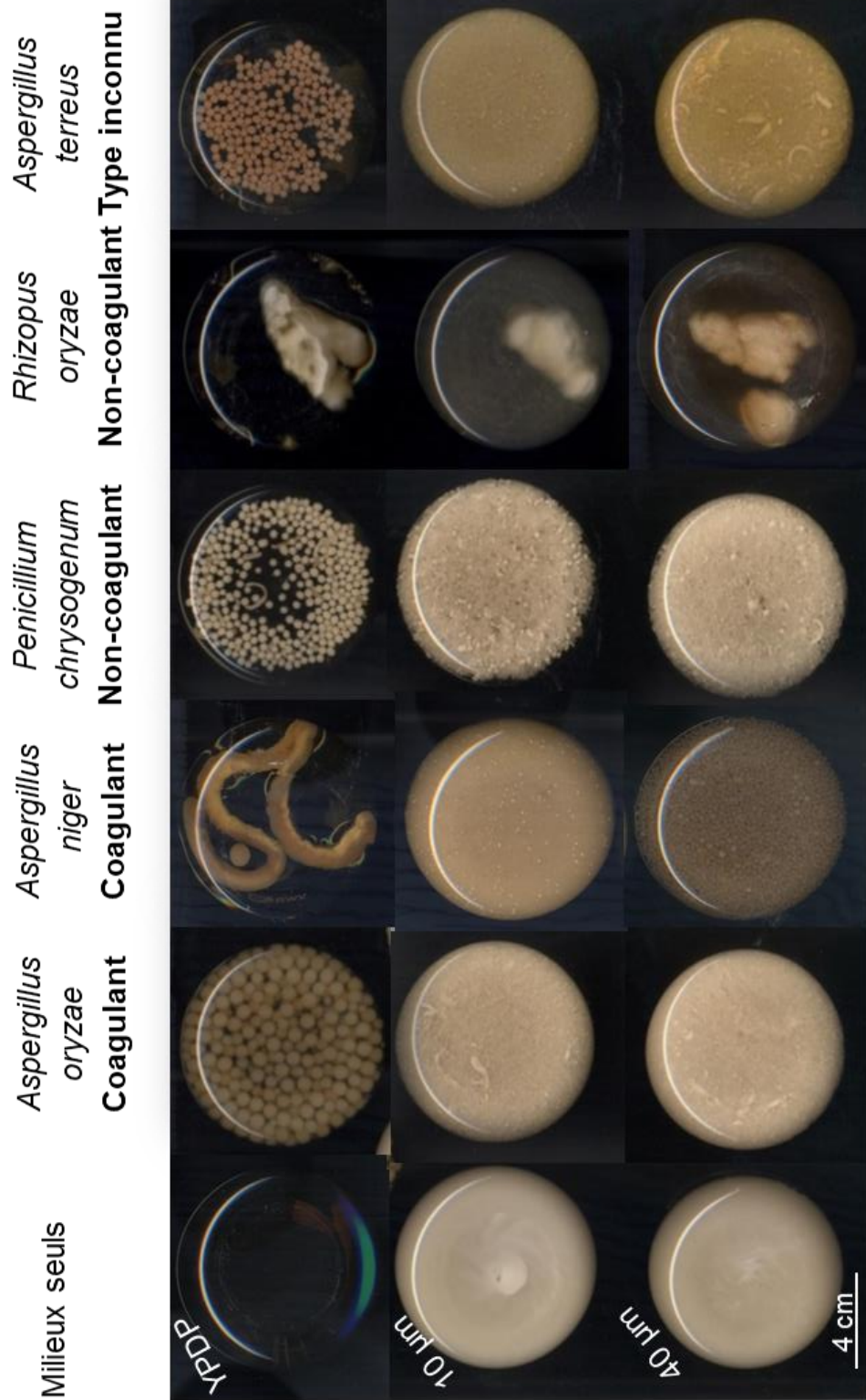
Finalement, nous avons observé que la morphologie des souches n'a pas considérablement changé (Figure 18), mis à part une croissance ralentie à pH bas ainsi qu'une légère diminution de la taille des pellets à pH 5,7 par rapport à pH 4,8 mais sans modification significative des morphologies habituelles pour *A. terreus* et *P. chrysogenum*. En revanche, la souche *A. niger* montre une morphologie agrégée mais différente de celle observée lors du criblage initial en milieu riche, en formant des pellets à pH bas. Sans effet significatif sur la morphologie des souches testées nous avons donc choisi de maintenir le pH initial du milieu YPDP (5,7) pour les expériences suivantes.

### 1.1.5 Microparticules de talc

L'effet des microparticules sur la morphologie nous a semblé être une technique de contrôle morphologique très prometteuse et dont les résultats en littérature semblent plus cohérents, plus reproductibles et plus facilement synthétisables que les techniques dites « classiques ». Un premier criblage a été mené afin de comparer la croissance et le comportement morphologique en présence de talc de plusieurs souches formant classiquement des agrégats, en littérature et dans les résultats présentés précédemment. De plus, puisque les études décrivant cet effet attribuent principalement les causes de transitions morphologiques observées à la perturbation de l'agrégation des conidies due à l'encombrement créé par les microparticules, il nous a semblé intéressant de comparer dans ce premier criblage plusieurs espèces coagulantes et non coagulantes. Enfin, puisque la taille des microparticules est apparemment un critère pouvant être responsable des variations morphologiques décrites, des particules de talc de deux diamètres différents ont été utilisées : 10 et 40  $\mu\text{m}$ . Elles ont été ajoutées à une concentration de 10  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  dans les Erlenmeyers remplis par 50 mL de milieu YPDP. Les cultures ont été menées suivant les conditions opératoires définies précédemment.

Au bout de 24 h la majorité des souches ont montré des croissances clairement différentes, sous forme de mycélium fluide. Seule la souche *R. oryzae* n'a pas montré de réactions remarquables à l'ajout de talc dans le milieu de culture, dont l'agrégation reste totalement inchangée. Encore une fois ces observations ne sont pas forcément en accord avec la « théorie », mais aux vues des importantes transitions morphologiques constatées pour 4 souches agrégées sur 5, cette technique a été choisie pour la suite de nos investigations.

Ainsi nous avons conclu que l'utilisation d'un talc de diamètre 10  $\mu\text{m}$  à une concentration de 10  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  était suffisante pour observer un changement significatif dans la morphologie sans perturbation de la croissance (*cf* Annexes, Figure 50, p145 et Figure 51 p146). Cependant des critères restent encore à optimiser dans cette technique, notamment pour permettre une réelle application industrielle. Nous avons poursuivi ces investigations dans la 2<sup>ème</sup> partie de cette étude.

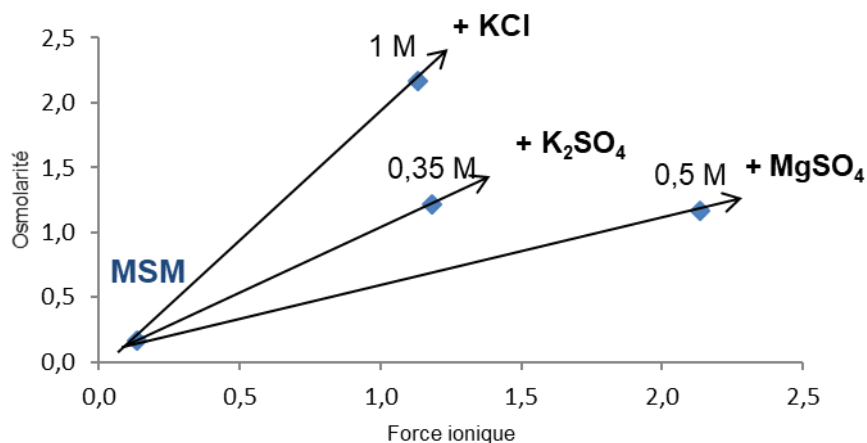


**Figure 19 :** Morphologies de *A.oryzae*, *A. niger*, *A.terreus*, *P.chrysogenum*, et *R.oryzae* en culture additionnée de talc.  
(Photographies d'Erlenmeyer)

### 1.1.6 Osmolarité / Force ionique : dopage en sels minéraux

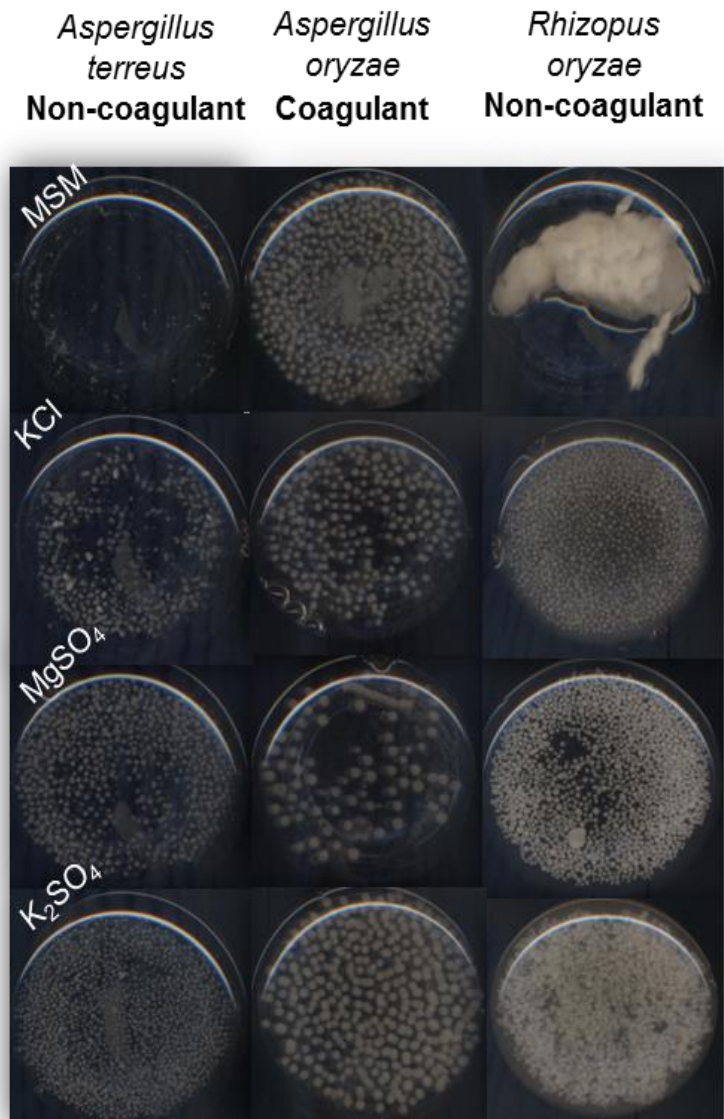
Comme décrit en littérature, l'ajout de sels minéraux dans le milieu de croissance des champignons filamenteux montre des effets significatifs sur la morphologie de certaines espèces. Cette technique, de la même manière que l'utilisation des microparticules, nous a semblé correspondre d'avantage aux objectifs cités en stratégies de cette étude, dans la mesure où les résultats décrits paraissent relativement reproductibles, significatifs et potentiellement opérable au niveau industriel (si les concentrations sont utilisées en concentrations raisonnables). De plus, cette méthode pourrait théoriquement empêcher l'agrégation des espèces non-coagulantes par la mise au point d'un milieu de culture spécifique qui maintiendrait les hyphes hors de contacts pendant toute la croissance.

Pour ce criblage initial, nous avons choisi les souches *R. oryzae* et *A. oryzae* comme espèces non-coagulante et coagulante respectivement ainsi que la souche *A. terreus* de type inconnu. Nous avons testé ces trois souches en présence de KCl, MgSO<sub>4</sub> et K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, dans le milieu MSM, puisqu'un milieu de composition contrôlée est nécessaire. Ces sels modifient l'osmolarité et la force ionique du milieu, qui pourraient avoir des influences spécifiques différentes sur la morphologie des souches testées. L'osmolarité est une mesure du nombre d'osmoles de soluté par kilogramme de solvant, ou de manière plus simple, l'osmolarité représente la concentration de toutes les particules contenues dans un fluide. La force ionique représente quant à elle uniquement la somme des particules chargées. En jouant sur les charges des ions utilisés, on peut influencer préférentiellement osmolarité ou force ionique, et ainsi définir des milieux qui ont par exemple la même force ionique à osmolarité différente. Le diagramme ci-dessous représente l'influence des sels utilisés sur ces deux paramètres chimiques, et les concentrations choisies pour pouvoir séparer les effets.



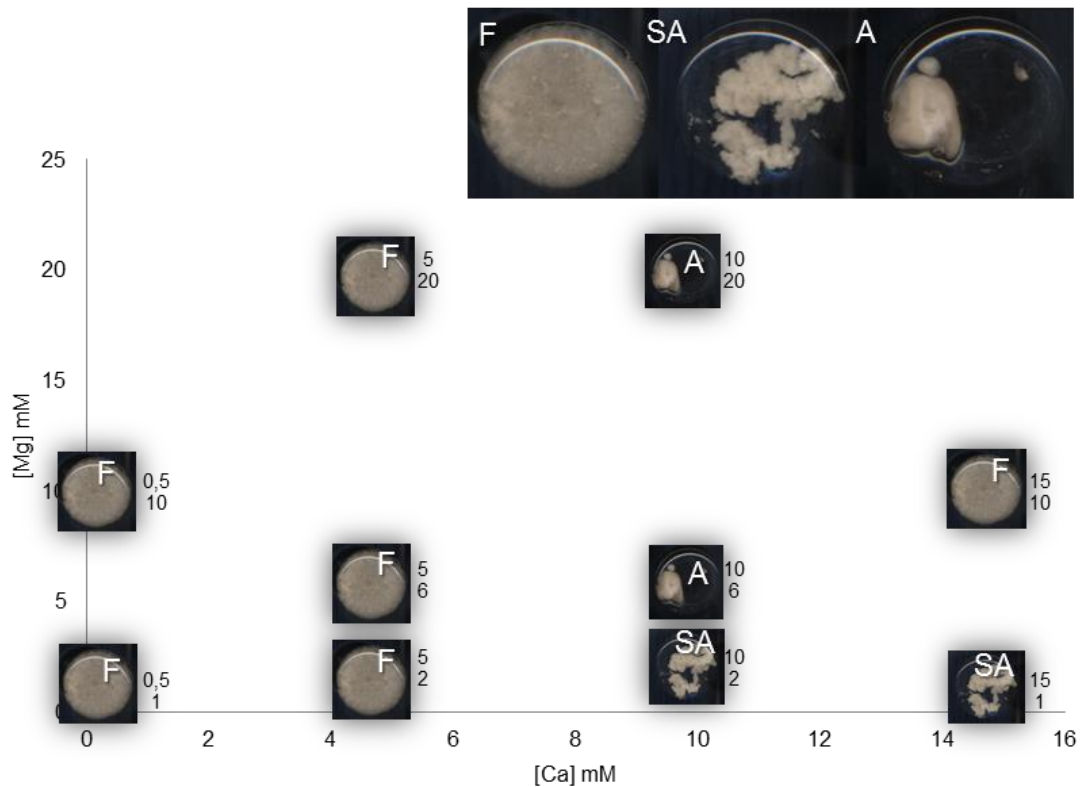
**Figure 20** : Influence des sels minéraux testés sur l'osmolarité et la force ionique du milieu salin minimum (MSM).

Finalement, quel que soit le paramètre chimique influencé, nous avons observé des changements morphologiques intéressants uniquement pour la souche non-coagulante *R. oryzae*, et pas pour les deux autres souches *A. oryzae* (coagulante) et *A. terreus* (type inconnu) (Figure 21).



**Figure 21** : Effets des sels  $KCl$ ,  $MgSO_4$  et  $K_2SO_4$  sur la morphologie d'*A. terreus*, *A. oryzae* et *R. oryzae* en milieu salin minimum (MSM).  
(Photographies d'Erlenmeyer)

La souche *R. oryzae* apparemment réceptive aux sels est donc choisie comme candidate pour l'investigation de cette technique. Un criblage supplémentaire a été réalisé pour déterminer plus finement les concentrations qui sembleraient impacter significativement la morphologie. En croisant nos premiers résultats avec ceux de la littérature, nous avons souhaité conserver l'apport en magnésium et tester l'ajout de calcium dans le milieu. Le calcium est notamment très présent dans l'eau du robinet et nos propres expériences nous ont amené à conclure qu'il avait très certainement un rôle important dans la morphologie des champignons en milieu liquide. Deux sels sont ajoutés aux milieux, le  $CaCl_2$  et le  $MgSO_4$ , afin de visualiser une possible zone de transition morphologique sur une plage étendue de concentrations. Le but était de déterminer une zone de travail à affiner.



**Figure 22 :** Bilan morphologique de *R. oryzae* par ajout de  $\text{CaCl}_2$  et  $\text{MgSO}_4$  en milieu salin minimum (MSM).  
(Photographies d'Erlenmeyer)

Ce premier criblage nous permet d'identifier trois morphologies de *R. oryzae* : fluide (F), semi-agrégée (SA) et agrégée (A). Cependant il semble compliqué d'établir une zone de transition qui mettrait en évidence un lien direct entre ces morphologies et les concentrations en ions  $\text{Mg}^{2+}$  et  $\text{Ca}^{2+}$ . Un des facteurs certainement en cause nous semble être la présence des contre-ions  $\text{Cl}^-$  et  $\text{SO}_4^-$  apportés par les sels. Pour cela, des ajouts croisés en sels  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{CaSO}_4$  et  $\text{MgCl}_2$  couplé à un dosage réel des ions en solution au cours des cultures pourraient permettre de mieux cibler les effets respectifs des ions sur ces morphologies. La partie 3 de ce rapport est consacrée à ces investigations.

### 1.1.7 Conclusions du criblage macromorphologique

Ce premier criblage a permis d'observer que la variation de plusieurs paramètres physico-chimiques classiquement mis en œuvre a effectivement entraîné des modifications morphologiques sur certaines souches testées, mais dans des proportions qui ne semblent pas adaptées à la stratégie de cette étude. En effet, nous souhaitons entraîner des impacts visuellement important (transition de morphologies agrégées en morphologie fluide) sur une majorité de souches agrégées du panel. Ceci nous conforte dans le choix d'investigation de techniques plus récentes qui offrent la perspective d'un contrôle plus large et/ou plus fin. Toutefois ces expériences nous ont permis de déterminer les conditions opératoires (milieux de culture, agitation, taux d'ensemencement) qui seront conservées par la suite.



Ainsi, deux milieux de cultures ont été retenus, un milieu riche pour l'étude des microparticules de talc et de l'agrégation physique des conidies en germination (cf Résultats, partie 2, p89); et un milieu minimum contrôlé pour l'ajout de sels dans l'étude de l'agrégation des hyphes tout au long de la croissance (cf Résultats partie 3, p104). De plus, notre panel a été restreint à 4 espèces de morphologies agrégée, *A. oryzae* en tant qu'espèce coagulante qui montre des résultats en parfait accord avec cette description, *R. oryzae* retenue pour les mêmes raisons en tant qu'espèce non-coagulante, *A. niger* en tant qu'espèce décrite comme coagulante mais dont le comportement n'est pas toujours en accord avec ce type et enfin *A. terreus* dont le mécanisme d'agrégation n'est pas clairement établi dans la littérature.

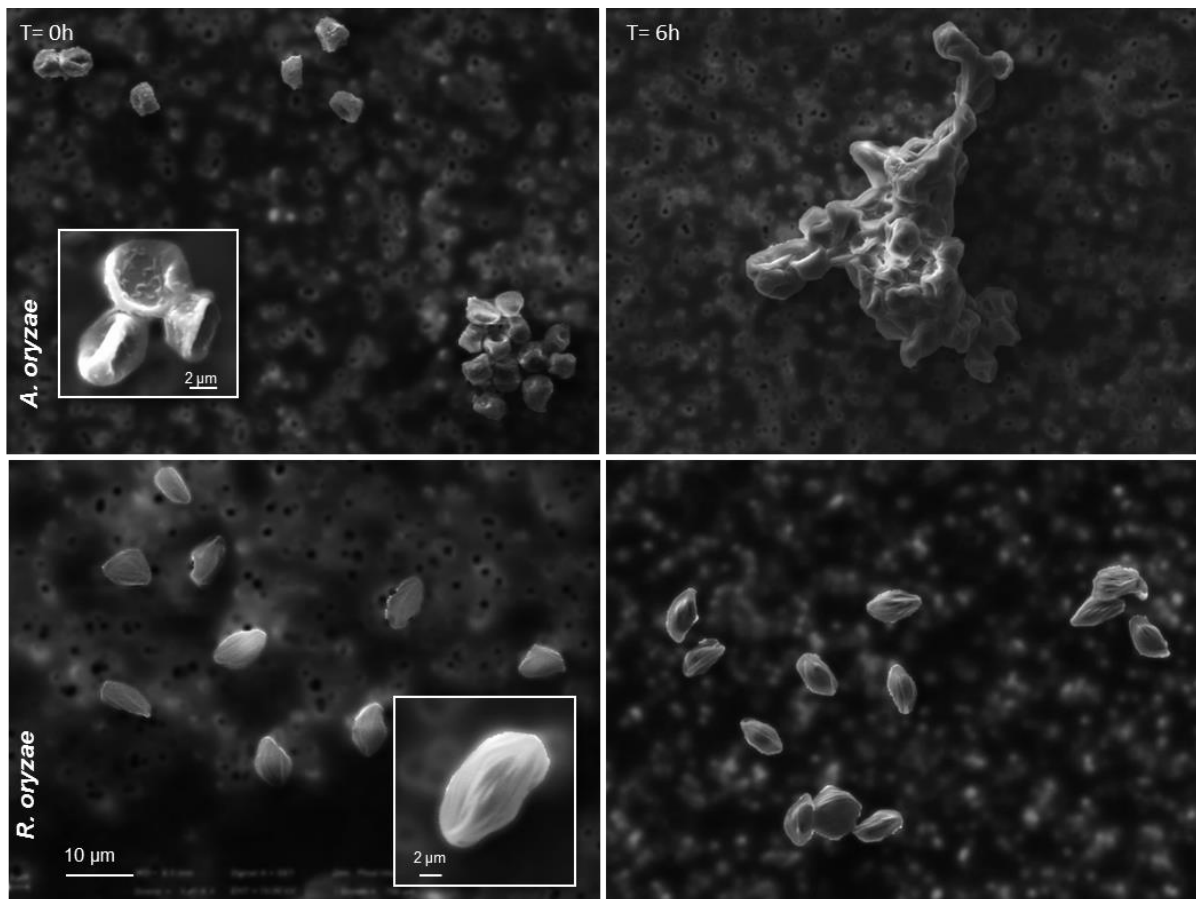
## 1.2 Micromorphologies

En complément de ce criblage macromorphologique, un suivi au microscope électronique à balayage (MEB) sur les quatre souches candidates à nos investigations a été réalisé. Puisque le comportement des conidies avant la germination fait partie des critères de base dans la détermination des types coagulants et non-coagulant, et plus généralement dans la compréhension de la macromorphologie, ces observations micromorphologiques ont pour but d'attester de la présence ou non de l'étape d'agrégation des conidies dès leur mise en culture en milieu riche, et à 6h de culture (temps de germination moyen des souches : 16h, établi par observation microscopique).

### 1.2.1 *A. oryzae* et *R. oryzae*

Pour la souche *A. oryzae* étudiée, on observe une forte coagulation des conidies, avec la présence de structures très condensées à la fin des 6h de cultures (Figure 23). Pour la souche *R. oryzae*, l'agrégation est quasiment inexistante, les conidies sont très proches, mais aucune ne forment de structures condensées comme pour *A. oryzae*.

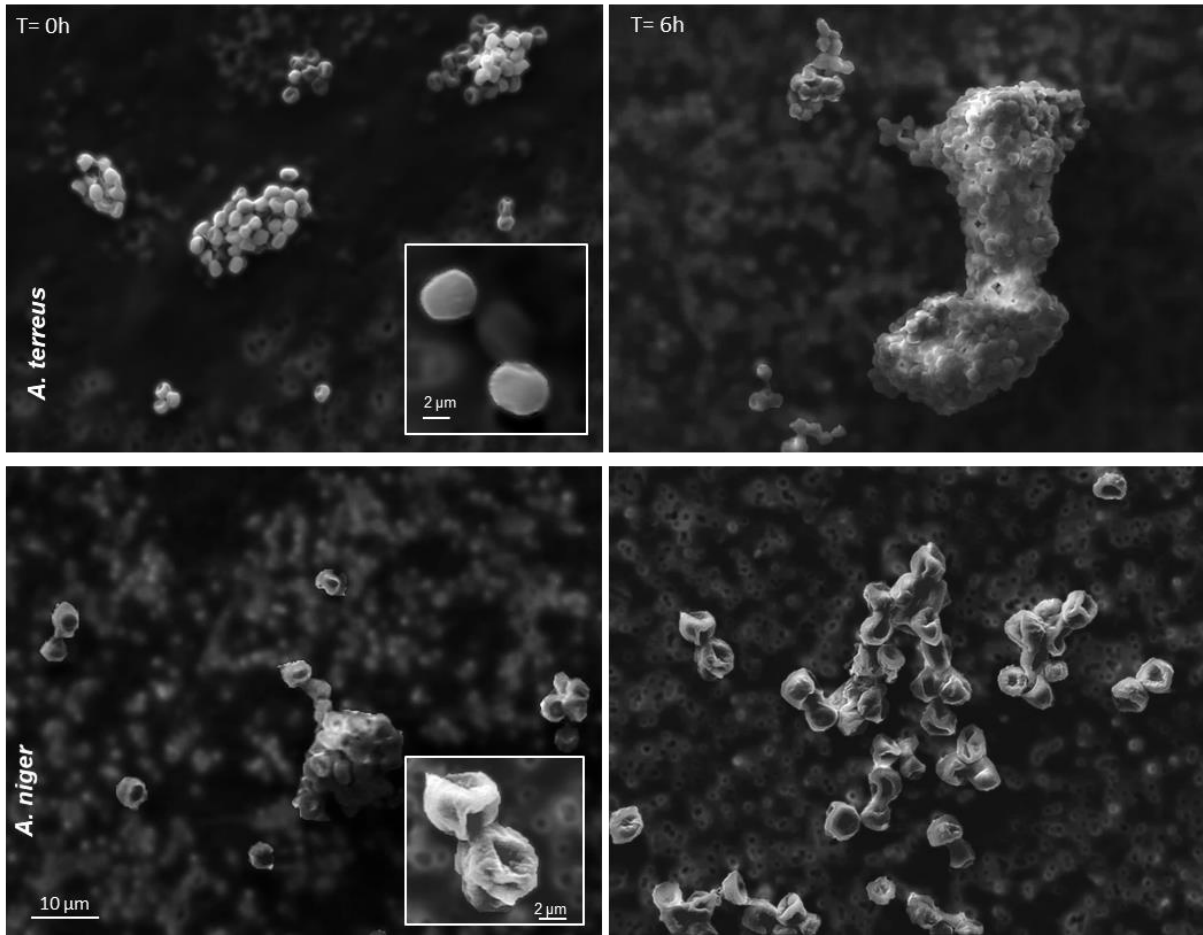
D'autre part l'aspect des conidies entre ces deux espèces est très différent, de taille, de forme et de texture. Pour la souche *A. oryzae* étudiée, il a été observé une texture granuleuse, avec la présence de nervures à la surface des conidies, leur forme est ronde assez régulière et creuse au centre (peut-être dû au traitement de fixation). La surface projetée des conidies d'*A. oryzae* est de  $18 \mu\text{m}^2 (\pm 3,0)$  pour un diamètre de  $4 \mu\text{m} (\pm 0,50)$ . Pour la souche *R. oryzae* étudiée, il a été observé une texture lisse, une forme ovale moins creuse et de taille plus importante. La surface projetée des conidies est de  $25 \mu\text{m}^2 (\pm 3,0)$  pour une largeur d'environ  $6 \mu\text{m} (\pm 0,50)$ .



**Figure 23** : Observation au MEB des espèces *A. oryzae* et *R. oryzae*.  
T = 0h temps initial de mise en culture et T = 6h après mise en culture.  
(Photographies MEB)

### 1.2.2 *A. terreus* et *A. niger*

Les conidies de ces deux espèces présentent une très forte agrégation mais leurs aspects sont cependant très différents. Les conidies d'*A. terreus* sont petites, très rondes et de texture lisse. Leur surface projetée est de  $4,5 \mu\text{m}^2 (\pm 1,0)$  avec un diamètre de  $2,5 \mu\text{m} (\pm 0,50)$ . L'aspect des conidies d'*A. niger* se rapproche de celles d'*A. oryzae*, en taille, en texture et aussi en comportement par la présence de structures condensées et presque fusionnées. Les conidies présentent une surface projetée de  $15 \mu\text{m}^2 (\pm 3,0)$  et un diamètre de  $4 \mu\text{m} (\pm 0,50)$ .



**Figure 24** : Observation au MEB des espèces *A. terreus* et *A. niger*.  
T = 0h temps initial de mise en culture et T = 6h après mise en culture.  
(Photographies MEB)

### 1.2.3 Conclusion du criblage micromorphologique

En observant le comportement des conidies pour les espèces sélectionnées dans cette étude, nous nous assurons de la présence ou non de l'agrégation en accord avec le type lorsque ce dernier est décrit dans la littérature. L'aspect des conidies, leur texture, leur forme et leur taille sont des informations supplémentaires intéressantes mais ces critères sont peu décrits en littérature et ne nous permettent donc pas d'établir une réelle discussion.

Ces observations ont cependant clairement mis en évidence que la souche *A. terreus* dont nous ignorons le type montre des conidies fortement coagulées aux stades précoces de croissance. Pour ces souches présentant une coagulation, l'application de la microfluidique pour l'isolation physique des conidies durant la germination semble effectivement une voie d'investigation intéressante.

## 1.3 Conclusion

Ces criblages, macro et micro-morphologique, ont été essentiels pour délimiter les conditions opératoires qui permettront une comparaison des résultats avec une bonne

reproductibilité en s'affranchissant d'effets physico-chimiques pouvant impacter trop fortement la morphologie. Ces conditions sont les suivantes :

- Culture en fiole Erlenmeyer (250 mL) à volume de 50 mL ;
- Agitation 175 tr·min<sup>-1</sup> à 24 °C ;
- Ensemencement à 10<sup>5</sup> conidies·mL<sup>-1</sup>.

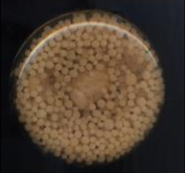

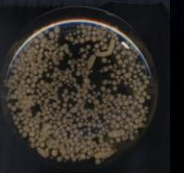

De plus, 4 souches d'intérêt ont été retenues : (le Tableau 5 résume les critères qui ont concrètement favorisé leur sélection)

*A. oryzae* est décrit comme espèce coagulante. Son comportement montrant l'agrégation des conidies, l'absence de transition morphologique lors de l'augmentation du taux d'ensemencement et un mycélium dispersé lors de l'ajout de microparticules de talc tend à nous faire conclure que la souche étudiée est bien un **témoin solide du type coagulant**.

*R. oryzae* montre à l'inverse un comportement parfaitement non – coagulant, sans agrégation des conidies, avec une transition morphologique fluide lors de l'augmentation du taux d'ensemencement, sans réaction à l'ajout de microparticules de talc mais en montrant une transition lors de la modification de l'osmolarité par ajout de sel dans le milieu de culture. Toutes ces observations nous ont suggérées qu'il pourrait s'agir d'un **témoin solide du type non-coagulant**.

*A. niger* est également décrit en littérature, en tant qu'espèce coagulante, pourtant son comportement dans nos expériences nous a semblé **moins défini et moins stable morphologiquement** (moins reproductible, présentant parfois la forme pellet et parfois la forme clumps dans des conditions identiques de culture). La variation du taux d'ensemencement impacte sa forme d'agrégation ainsi que l'ajout de microparticules (comportement qui diffère de l'espèce *A. oryzae* du même type, et des descriptions de la littérature). Nous souhaitons donc apporter des investigations supplémentaires sur cette espèce dans notre étude.

*A. terreus* n'a pas de type d'agrégation connu, nous avons cependant observé une forte coagulation des conidies et un comportement identique à la souche *A. oryzae*. Nous voulons donc observer son comportement lorsque cette souche est soumise aux techniques mises en place dans la suite de notre étude.

Espèces	<i>A. oryzae</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. terreus</i>	<i>R. oryzae</i>
Types théoriques	Coagulant	Coagulant	Inconnu	Non - Coagulant
Observation de l'agrégations des conidies	Oui	Oui	Oui	Non
Morphologies en milieu riche YPDP				
Taux d'ensemencement	0	+	0	++
Microparticules	++	++	++	0
Osmolarité/Force ionique			0	++
	↓ <b>Coagulation typique</b>			↓ <b>Non-coagulation typique</b>

**Tableau 5** : Critères pour le choix des souches d'intérêt dans cette étude.

++ : fort impact sur la morphologie, + : faible impact sur la morphologie, 0 : pas d'impact sur la morphologie.



## **2 Microparticules (MEC) et Microfluidique (EGM)**

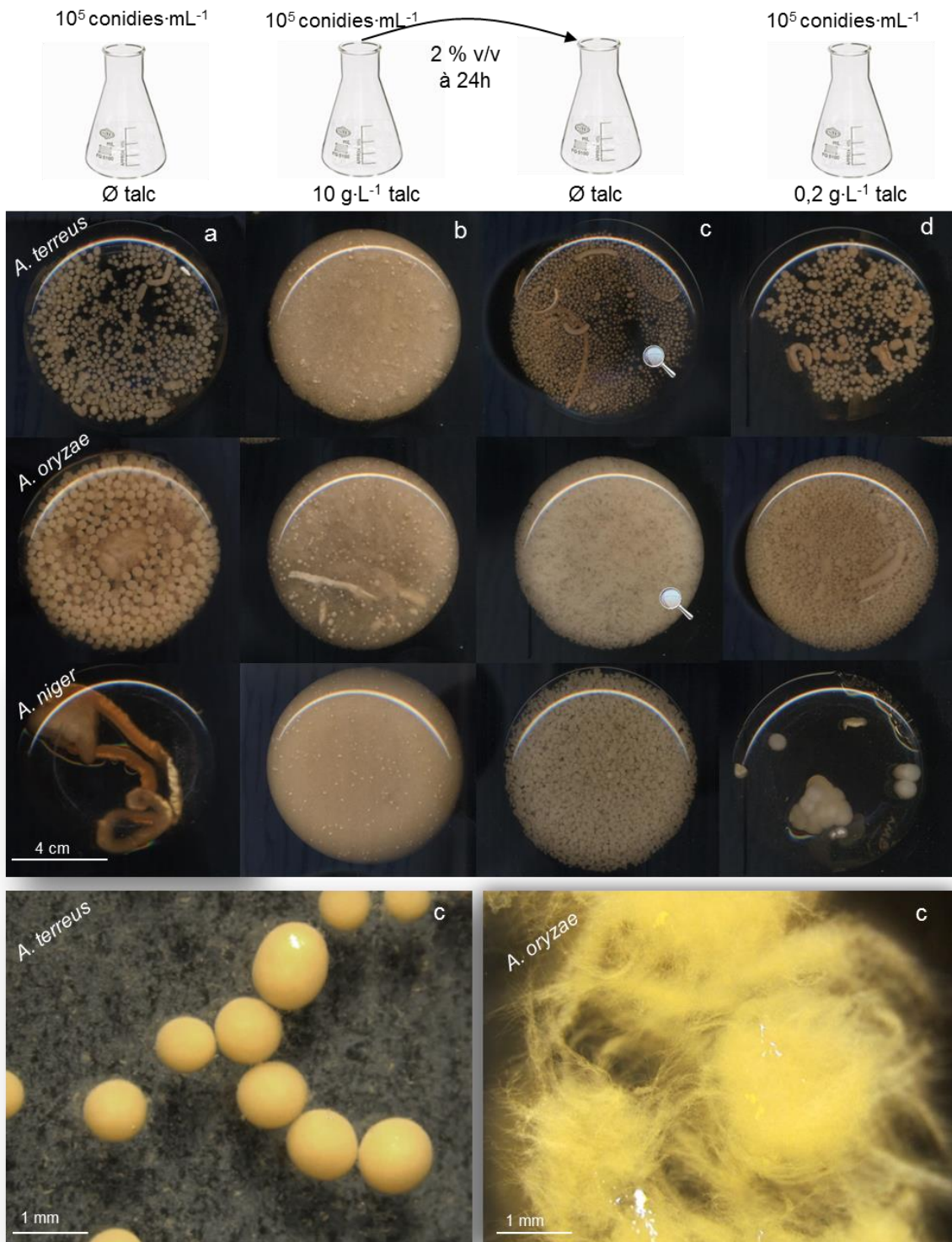
### **2.1 Optimisation de la méthode MEC « Microparticules Enhanced Cultivation »**

*Les résultats du criblage initial en fioles ont mis en évidence des effets très positifs dans la transition des morphologies agrégées en morphologie fluide lors de l'ajout de talc dans les milieux de cultures (Microparticules Enhanced Cultivation MEC). Cependant pour un usage industriel il nous paraît essentiel de pouvoir s'affranchir de la présence du talc dans le milieu de culture, car la mise en œuvre de bioréacteurs à hauts volumes contenant  $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de microparticules n'est pas envisageable (augmentation des coûts de production, problèmes de traitements des résidus solides, déchets minéraux impossible à éliminer par incinération). Ainsi, notre méthode consiste à restreindre l'utilisation du talc en pré-culture puis d'opérer un transfert dans un milieu sans talc. En plus d'offrir une optimisation de la méthode initiale pour une utilisation à l'échelle industrielle, cette expérience pourrait permettre de mieux comprendre l'effet des microparticules sur les champignons filamenteux et de cerner différents comportements selon leur type coagulant ou non-coagulant. Nous avons expérimenté cette étape de propagation pour les trois souches *Aspergillus* sélectionnées, dont la morphologie est dispersée lors de l'ajout de talc dans le milieu de culture.*

#### **2.1.1 Propagation en fiole**

*A. oryzae* et *A. niger*, souches largement décrites en tant qu'espèces coagulantes, ainsi que *A. terreus*, dont nous ignorons le type mais qui présente une forte coagulation lors de l'observation au MEB, ont présenté une réaction similaire à la présence de microparticules dans leur milieu de croissance (transition vers une morphologie fluide). Elles ont donc été une nouvelle fois cultivées en milieu YPDP contenant  $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de talc. A 24h de culture, 1 mL du milieu fluide obtenu a été transféré dans 49 mL de milieu riche YPDP (soit une propagation à 2 % v/v). Un témoin contenant  $0,2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de talc est égalementensemencé à partir de conidies, il permet de vérifier si la présence de talc résiduel issu du prélèvement est un facteur impliqué dans la morphologie observée dans la fiole de transfert. Toutes les cultures ont été réalisées selon les conditions opératoires définies en partie 1.

Comme observé lors du criblage initial (cf Résultats, partie 1.1.5, p78), l'ajout de talc en pré-culture entraîne effectivement une morphologie fluide pour ces trois souches (Figure 25b) alors que la culture sans talc entraîne une morphologie agrégée (Figure 25a). Cependant leur comportement après transfert diffère, *A. oryzae* maintient cette morphologie fluide alors que les souches *A. terreus* et *A. niger* forment à nouveau des pellets après transfert (Figure 25c). La fiole témoin à  $0,2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de talcensemencé avec des conidies présente une morphologie agrégée pour les trois souches (Figure 25d), ce qui démontre que la morphologie fluide obtenue pour *A. oryzae* après transfert est bien due au transfert de mycélium fluide et non à la présence de talc résiduel issu du transfert. La méthode est efficace pour la souche coagulante *A. oryzae*, que nous allons mettre en œuvre en bioréacteur en respectant un taux de propagation d'environ 2 % v/v.



**Figure 25** : MEC transfert en fioles : morphologies des souches *A. terreus*, *A. oryzae* et *A. niger* après 24 h de croissance.

a) milieu YPDP classique ; b) Pré-culture talc 10 g·L<sup>-1</sup> ; c) Transfert à 2 % de la pré-culture talc en milieu YPDP classique ; d) témoin milieu talc 0,2 g·L<sup>-1</sup> ensemencé à partir de conidies

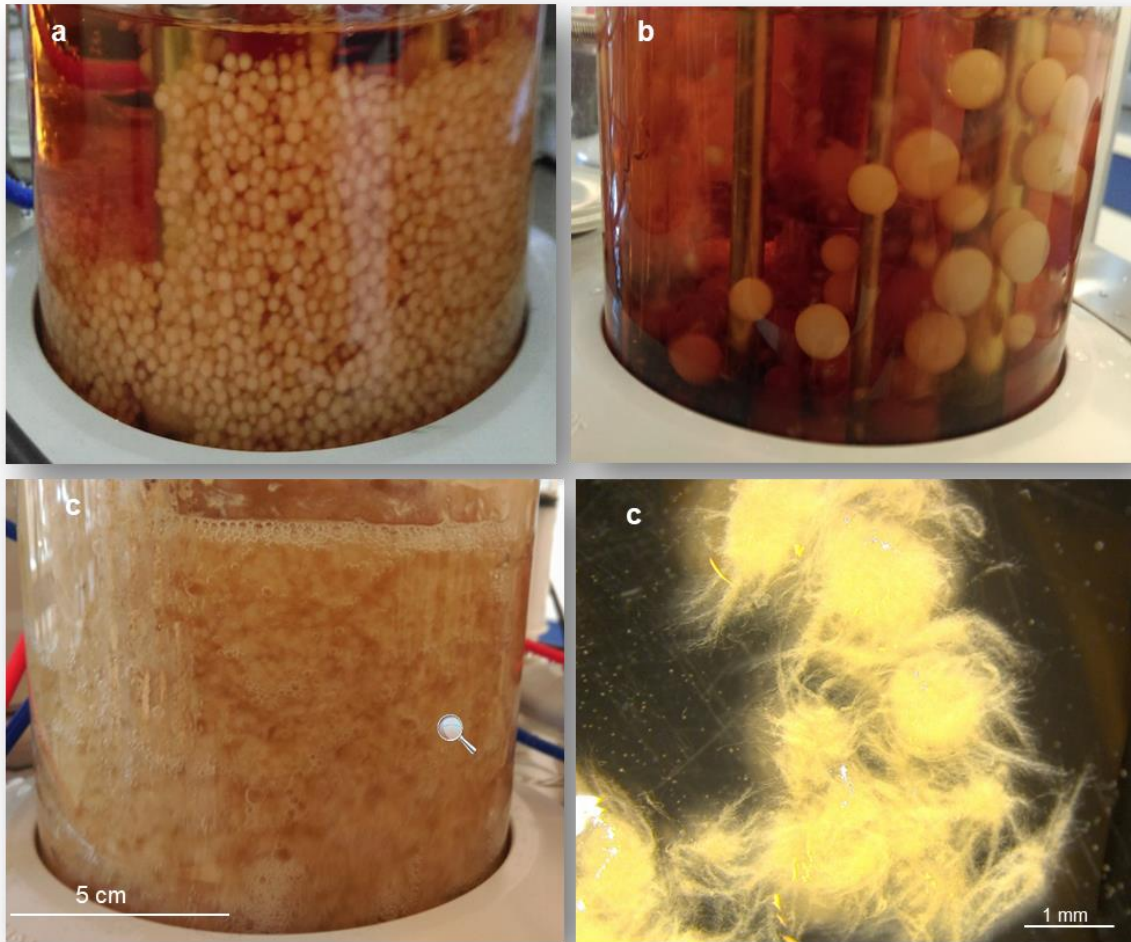


## 2.1.2 Propagation en bioréacteur

Comme expliqué dans notre stratégie (*cf* Enjeux de cette étude, partie 2.3, p54), étudier la possibilité d'augmentation de volume dans la mise au point de techniques de contrôle morphologique nous semble primordial. Pour vérifier que les morphologies fluides en pré-cultures sont maintenues lors d'une propagation, trois bioréacteurs DASGIP ont été conduits, chacun à un volume final de 1,2 L de milieu YPDP classique, à une agitation de  $800 \text{ tr}\cdot\text{min}^{-1}$  à  $24 \text{ }^\circ\text{C}$ . La souche *A. oryzae* précédemment étudiée en transfert en fiole a étéensemencée dans ces bioréacteurs de trois manières :

- Par pré-culture de 24 h en Erlenmeyer en milieu classique YPDP : témoin d'une propagation classique avec pré-culture (mais sans intervention préalable sur la morphologie) ;
- Par ensemencement direct des conidies : témoin d'une propagation classique sans pré-culture (avec un même nombre de conidies qu'en pré-culture et non une même concentration, pour fournir le même nombre d'objets initiaux) ;
- Par pré-culture de 24 h en Erlenmeyer en milieu YPDP et talc  $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  : test de maintien de la morphologie fluide obtenue en pré-culture lors d'une propagation.

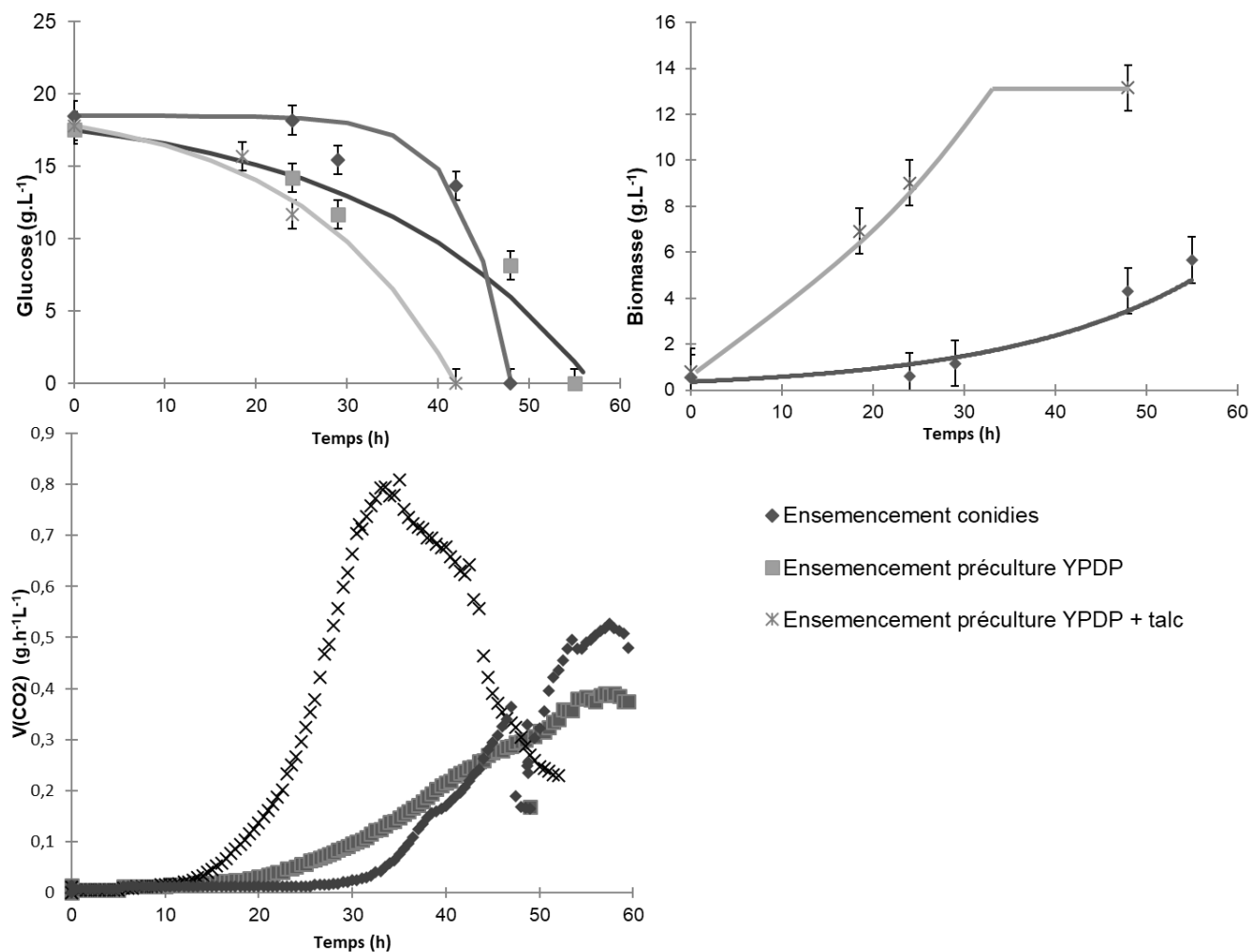
Les pré-cultures ont été menées selon le mode opératoire défini par le criblage initial (*cf* Résultats partie 1, p69) et les bioréacteurs ont étéensemencés à 1,6 % (v/v) à partir des pré-cultures elles-mêmesensemencées à  $10^5 \text{ conidies}\cdot\text{mL}^{-1}$ . L'ensemencement direct a été réalisé à partir de la banque initiale à un nombre de conidies identique à celuiensemencé dans les Erlenmeyer de pré-culture (soit  $5\cdot 10^6 \text{ conidies}$ ). La conduite en batch a duré 60 heures environ, pour une consommation totale du glucose. Les morphologies observées (Figure 26) sont cohérentes avec les expériences précédentes menées en fioles, avec un maintien de la morphologie fluide lors d'un ensemencement par pré-culture additionnée de talc et la présence de pellets lors d'ensemencements classiques (par pré-culture simple et par conidies). Ainsi nous avons proposé une méthode permettant l'obtention d'une morphologie fluide du champignon *A. oryzae* en bioréacteur sans une utilisation intensive de microparticules de talc.



**Figure 26 :** Morphologies d'*A. oryzae* en bioréacteurs a) Ensemencé par conidies b) Ensemencé par pré-culture YPDP c) Ensemencé par pré-culture YPDP+talc.  
(Photographies des bioréacteurs et grossissement loupe binoculaire en bas à droite)

Le suivi du métabolisme montre les effets positifs de la morphologie fluide obtenue par l'utilisation du talc en pré-culture (Figure 27). En effet, le suivi de la concentration résiduelle en glucose dans les bioréacteurs montre une meilleure assimilation (plus rapide) de la source de carbone par la biomasse fluide (bioréacteurensemencé par pré-culture YPDP+talc). En effet les cultures agrégées en pellets ont duré 50 h (ensemencement par pré-culture) et 60 h (ensemencement par conidies) contre 40 h pour la culture fluide, soit un gain maximum de 33 % sur le temps de culture. Les vitesses de production de CO<sub>2</sub> confirment également que la croissance sous morphologie fluide a été plus rapide

De plus, la biomasse fluide formée est plus de deux fois plus importante comparée à la biomasse agrégée produite dans le bioréacteurensemencé par conidies (il n'a pas été possible d'effectuer un suivi de la biomasse dans le bioréacteurensemencé par la pré-culture YPDP sans talc à cause de la morphologie agrégée en pellets impossible à prélever de manière homogène). La méthode permet une réduction de 20h du temps de culture pour atteindre environ le double de concentration en biomasse.



**Figure 27:** Suivi du métabolisme d'*A. oryzae* en bioréacteur ensemencé par conidies, par préculture YPDP et par préculture YPDP+talc.

### 2.1.3 Discussion et conclusion

La méthode de propagation en bioréacteur que nous avons proposée, à partir d'une pré-culture en présence de microparticules de talc, permet bien le maintien de la morphologie fluide de la souche *A. oryzae* obtenue en pré-culture. Ainsi nous avons établi un contrôle de la morphologie de cette espèce, applicable également lors d'un changement d'échelle et qui montre un métabolisme favorable à la croissance. Ceci permettra lors d'une mise en œuvre industrielle d'une part d'accélérer la phase de propagation et d'autre part d'obtenir une biomasse potentiellement plus active (toutes les cellules ont accès aux nutriments).

L'observation que l'espèce *A. oryzae* maintient cette morphologie fluide lors de son transfert en milieu exempt de talc est cohérente avec les mécanismes de formation des pellets qui distinguent les espèces coagulantes et non-coagulantes. En effet, *A. oryzae* appartenant au type coagulant, sa morphologie en pellets apparaîtrait dès la mise en culture des conidies, qui s'agrègent dans les premières heures. Avec la présence de talc, l'agrégation des conidies serait

physiquement déstabilisée en empêchant leur rapprochement, hypothèse déjà établie en littérature. Nous avons montré qu'en plus, le champignon semble incapable de former à nouveau des pellets, une fois les hyphes formées.

A l'inverse nous avons observé que la souche *A. niger* décrite elle aussi parmi les espèces coagulantes ne présente pas le même comportement. Lors de son transfert en milieu conventionnel (sans talc), les hyphes dispersées obtenues grâce au talc s'agrègent à nouveau, laissant supposer que cette souche est capable d'agrégations à différents stades de croissance et pas seulement avant la germination. La souche *A. terreus* présente le même comportement, donc serait capable d'agrégation entre ses hyphes, en plus de l'agrégation entre conidies observée au MEB et typique des souches coagulantes.

Mais une autre hypothèse pourrait également résider dans l'apport d'effets chimique par l'utilisation de microparticules de talc, non soluble mais non inerte chimiquement et formé de silicate de magnésium. Les hypothèses émises jusqu'ici dans le fonctionnement du talc et le mécanisme de coagulation ou de non-coagulation restent donc à vérifier. L'observation directe (par microscopie) du comportement des conidies dans un milieu saturé en talc n'a pas été possible. L'utilisation de microparticules non-solubles et entièrement inertes chimiquement pourrait répondre à cette question, mais s'assurer de manière fiable de l'inactivité chimique d'un composé nous a semblé difficilement réalisable. De plus, cela pourrait engendrer des questions supplémentaires comme de possibles adhésions des conidies aux surfaces des microparticules mises en œuvre.

La mise en place d'une technique de séparation strictement physique des conidies, par microfluidique, comparée à l'utilisation des microparticules de talc, pourrait apporter des explications supplémentaires.

<p><i>Brevet déposé sur cette technique (FR3061204 (A1)), présenté en annexe page 149.</i></p>
--

## 2.2 Développement de l'EGM : « Encapsulated Germination Method »

*En supposant que la morphologie agrégée des souches dites coagulantes résulte effectivement de la coagulation des conidies dans les premières heures de croissance du champignon, maintenir leur séparation physique jusqu'à leur germination pourrait alors théoriquement empêcher cette agrégation. Nous avons donc mis au point une méthode de germination encapsulée (Encapsulated Germination Method EGM) permettant d'isoler les conidies physiquement au sein de gouttes de milieu de culture le temps de leur germination. Ces gouttes sont maintenues dispersées au sein d'une phase continue organique, dans une émulsion créée via un dispositif microfluidique permettant d'isoler 1 conidie par goutte. Pour maintenir les conidies isolées individuellement le temps de l'encapsulation et de la germination, l'émulsion doit être stable afin qu'il n'y ait pas de coalescence des gouttes pendant l'encapsulation dans le microsystème (ceci a déjà été expérimenté pour du criblage de bactéries, de levures et récemment d'un champignon filamenteux) et pendant la germination (dans notre cas réalisée dans un tube de récupération en dehors du microsystème). A l'issue de la germination, l'émulsion doit pouvoir être déstabilisée, afin de récupérer la phase aqueuse contenant les conidies germées et permettre leur mise en culture classique selon les critères définis en partie 1.*

### 2.2.1 Mise au point de la méthode

Cette partie décrit les expériences qui ont été nécessaires pour mettre au point la méthode de germination encapsulée. Le matériel utilisé est décrit page 66 (Matériels et Méthodes, partie 4, Banc microfluidique)

#### 2.2.1.1 Choix du matériel

Le choix du tensio-actif est un paramètre primordial dans la réalisation d'une émulsion. Il déterminera la stabilité de l'émulsion et sera en interaction directe avec les objets encapsulés, deux critères à la base du succès de cette méthode. Deux tensioactifs fluorés ont donc été testés, le Pico-Surf™ 1 et le PFPE à terminaison carboxylique dérivé de Krytox, comme candidats pour la croissance de micro-organismes dans une émulsion, ainsi qu'une huile fluorée (cf Etat de l'art, partie 3.3.2, p48). Le PFPE à terminaison carboxylique a cependant des propriétés de biocompatibilité finalement discutables en raison de sa tête carboxylique polaire. Son utilisation a effectivement entraîné une croissance perturbée lors des tests préliminaires. Seul le Pico-Surf™ 1 montre des propriétés de biocompatibilité satisfaisante pour notre application.

Le milieu riche YPDP a été dilué au demi pour s'affranchir de trop fort impact des composés sur la formation des gouttes, et pour diminuer le risque de germination pendant les la création de l'émulsion.

Enfin, un point de vigilance est à souligner dans une application microfluidique mettant en œuvre les champignons filamenteux, il s'agit de la présence d'hyphes (matures) à éviter absolument lors de l'encapsulation des conidies. Ainsi, la réalisation des banques de conidies pour encapsulation doit impliquer une étape de filtration afin de s'affranchir de tout filaments qui obstrueront les canaux du microsystème.

### 2.2.1.2 Encapsulation

Le PicoSurf™ 1 a été testé à  $1,8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  (concentration égale à la Concentration Micellaire Critique) et  $2,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Ces deux concentrations ont entraîné la coalescence des gouttes au cours de l'encapsulation, soit au sein même du microsysteme soit dans le tube Falcon utilisé pour récupérer l'émulsion. La concentration de  $3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  semble correspondre à la concentration minimale permettant une encapsulation optimale et une émulsion stable (qui correspond au maintien d'une tension interfaciale suffisante autour des gouttes). Les débits des phases ont été ajustés pour obtenir en moyenne une conidie par goutte et une taille de gouttes adaptée à la taille des conidies (2 à 6  $\mu\text{m}$  de diamètre) et des tubes germinatifs (jusqu'à 20-25  $\mu\text{m}$  de longueur). La phase aqueuse contenant les conidies est ainsi injectée à  $3 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$  et la phase huileuse à  $8 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$ . L'observation microscopique de chaque encapsulation a confirmé l'isolement d'une conidie par goutte en moyenne et a permis de mesurer un diamètre de gouttes de  $145 \pm 5 \mu\text{m}$  (correspondant à un volume de 2 nL). L'encapsulation dure ainsi 3 h environ, durant lesquelles 4,5 million de conidies sont encapsulées (vitesse d'encapsulation d'environ 400 objets par seconde). 10 mL d'émulsion et 20 mL d'huile résiduelle sont récupérés en tube Falcon.

### 2.2.1.3 Germination

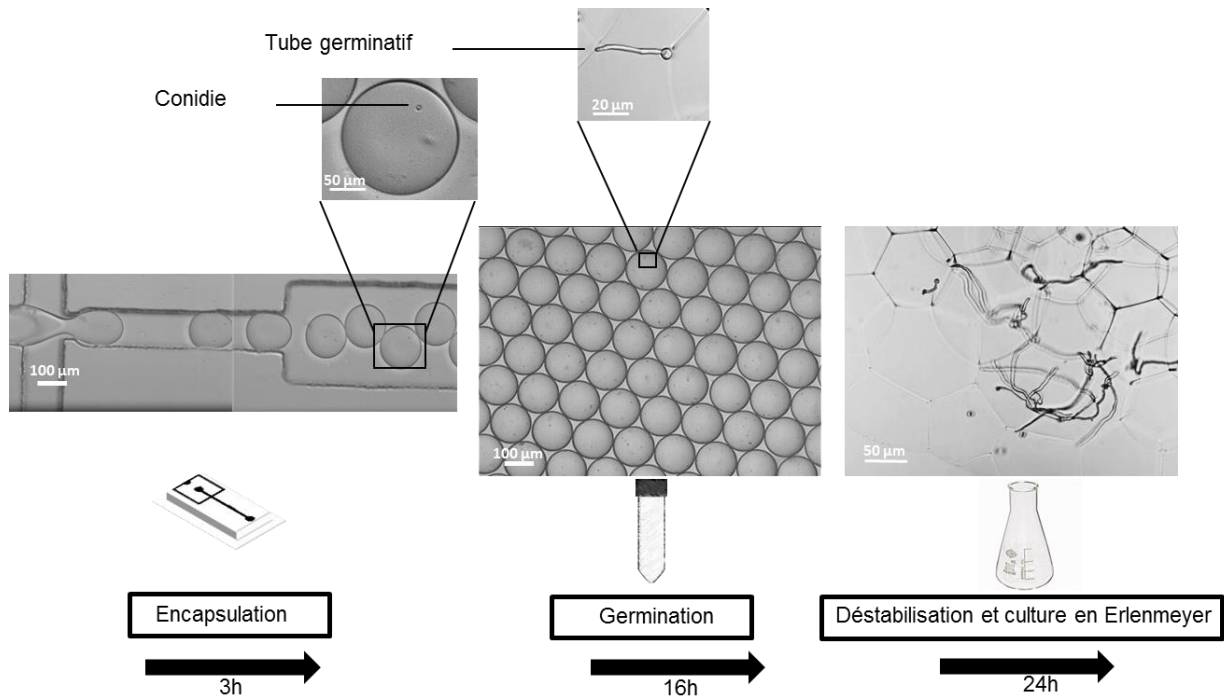
Après 16 heures supplémentaires sous agitation  $80 \text{ tr}\cdot\text{min}^{-1}$  à  $24^\circ\text{C}$ , pour éviter une sur-stabilisation de l'émulsion dans le tube de récupération, nous avons également observé que les conidies étaient bien maintenues dans les gouttes et que les tubes germinatifs apparaissaient (Figure 28).

### 2.2.1.4 Déstabilisation et culture

Lorsque les tubes germinatifs apparaissent, l'émulsion est déstabilisée pour récupérer la phase aqueuse contenant les hyphes. La centrifugation a été testée comme méthode de déstabilisation mais n'a pas été efficace pour la séparation des phases (conduit à une sur-stabilisation de l'émulsion) et risque, de plus, d'altérer la dispersion des cellules qui peuvent s'agréger à nouveau en culot. C'est en réalisant plusieurs rinçages de l'émulsion avec de l'huile fluorée vierge (sans tensioactif) que la concentration en surfactant PicoSurf™ diminue en dessous de la  $\text{CMC}_{13}$  et permet la déstabilisation de l'émulsion, conduisant à deux phases, aqueuse et huileuse, convenablement séparées. Par cette méthode, 10 mL de la phase aqueuse récupérée contenant les tubes germinatifs sont facilement transférés en Erlenmeyer de 250 mL contenant 40 mL de milieu YPDP. La croissance est effectuée pendant 24 h à  $24^\circ\text{C}$  et  $175 \text{ tr}\cdot\text{min}^{-1}$ , paramètres de croissance établis en partie 1.

---

<sup>13</sup> « Concentration Micellaire Critique » : concentration en tensioactif dans une solution à partir de laquelle les micelles se forment spontanément. En dessous de celle-ci le tensioactif forme une couche en surface du liquide et le reste est dispersé dans la solution.



**Figure 28 :** Principe de la méthode de germination encapsulée (EGM).

L'encapsulation des conidies est réalisée pendant 3 h à l'aide d'un microsystème. Une conidie par goutte est maintenue dans l'émulsion dans le tube Falcon pendant 16h jusqu'à ce que des tubes germinatifs apparaissent. Après déstabilisation, la phase aqueuse contenant les tubes germinatifs et les jeunes hyphes est mise en culture.

## 2.2.2 Effet de la germination encapsulée sur la morphologie

### 2.2.2.1 Application de l'EGM aux souches de l'étude

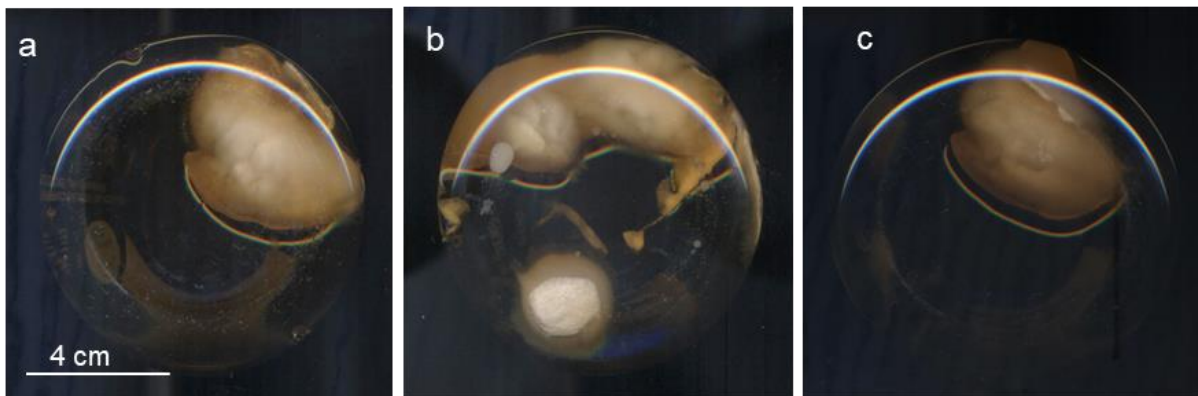
Pour chaque espèce sélectionnée et étudiée précédemment dans l'utilisation de microparticules de talc, une émulsion de conidies encapsulée a été préparée en utilisant l'EGM, ainsi que deux contrôles qui évalueront l'impact des conditions de germination en tube Falcon :

- Un témoin (a) comprenant 10 mL de milieu YPDP (dilué 1/2) inoculé à  $5 \cdot 10^5$  conidies  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> et placé dans un tube Falcon dans les mêmes conditions d'agitation que le tube de récupération de l'émulsion ;
- Un témoin (b), identique au témoin a, additionné de 20 mL de la phase huileuse.

La phase aqueuse résultant de l'émulsion déstabilisée et contenant les conidies germées (10 mL) a ensuite été transférée en fiole Erlenmeyer contenant 40 mL de milieu YPDP. De la même manière, les phases aqueuses des deux témoins ont également été transférées dans deux fioles Erlenmeyer contenant 40 mL de milieu YPDP.

### *Rhizopus oryzae*

Les agrégats formés par *R. oryzae* proviennent théoriquement d'un mécanisme non-coagulant et son comportement lors des tests du criblage initial (partie 1) semble être en accord avec ce type. Cette souche « témoin » du type non – coagulant dans cette étude a donc été cultivée selon la méthode EGM décrite précédemment. Les résultats (Figure 29) montrent qu'aucun changement morphologique n'a été engendré par une séparation des conidies durant la germination, l'agrégation de cette souche étant identique dans toutes les conditions. Ce résultat nous paraît cohérent, les hyphes de *R. oryzae* sont donc capable de s'agréger, la séparation des conidies lors de la germination n'est pas une méthode suffisante pour observer un changement de morphologie.



**Figure 29 :** Culture liquide de *R. oryzae* après 24 heures de croissance pour différentes modes de germination

a) témoin seul, b) témoin avec huile, et c) méthode EGM.  
(Photographies d'Erlenmeyer)

### *Aspergillus oryzae*

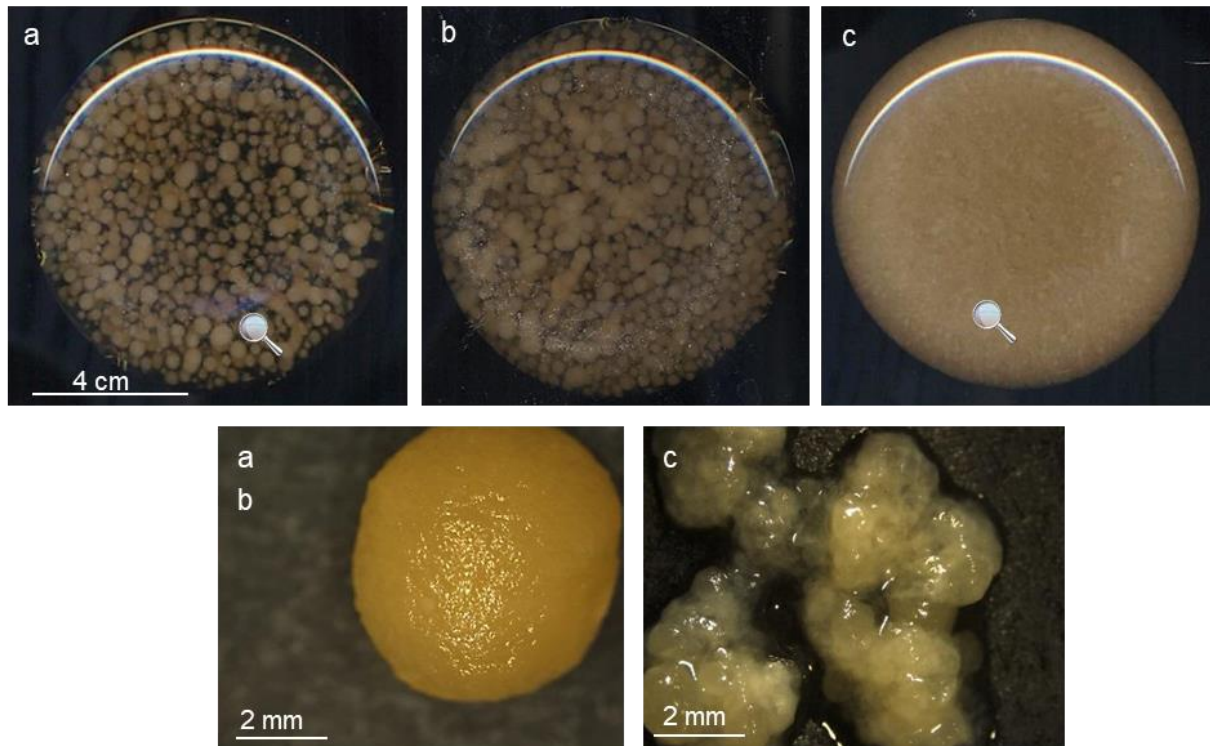
Les pellets formées par *A. oryzae* proviennent, selon la littérature et nos observations microscopiques, de l'agrégation des conidies avant la germination. Il s'agirait donc d'une espèce appartenant au type coagulant. Après 24 heures de croissance, des morphologies très différentes sont observées selon la méthode de germination utilisée. Sans l'encapsulation des conidies, (témoin (a) et témoin (b)), la croissance a conduit à l'agrégation du mycélium en pellets denses de diamètre respectif  $3,2 \pm 0,060$  et  $2,3 \pm 0,030$  mm (Figure 30a et b respectivement). Avec la mise en œuvre de l'EGM, la croissance a abouti à une culture de mycélium fluide librement dispersé dans le milieu (Figure 30c), signe que les hyphes récoltées après germination ne se sont pas réagrégées.

### *Aspergillus niger*

*A. niger* est également décrit en littérature comme espèce coagulante, de la même manière qu'*A. oryzae*. Dans nos conditions de culture, son agrégation se présente parfois sous la forme d'un grand amas de mycélium irrégulier formé de pellets agrégées ou parfois sous la forme de pellets régulières dispersées. L'observation microscopique a effectivement montré une agrégation des conidies avant germination, et dont la forme et l'aspect semblent très proche visuellement de celles d'*A. oryzae*. Au cours de notre expérience d'encapsulation, nous avons



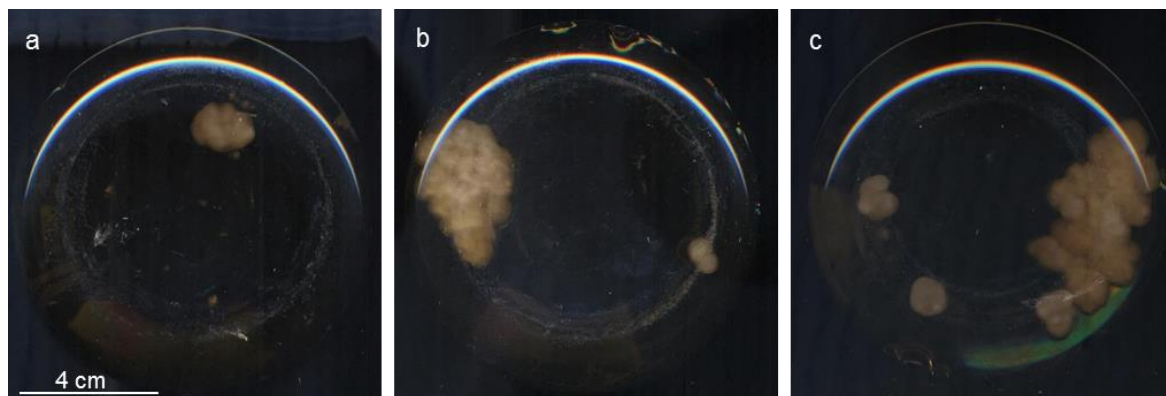
pourtant obtenu le même type d'agrégation, autant pour les témoins (Figure 31 a et b) que pour la culture de germination encapsulée (Figure 31 c). La séparation physique des conidies pendant leur germination par la mise en œuvre de l'EGM n'a donc pas eu d'impact sur la morphologie finale de *A. niger*, ce qui semble montrer que les hyphes récoltées après germination se sont réagrégées.



**Figure 30** : Culture liquide d'*A. oryzae* après 24h de croissance, pour différentes modes de germination

a) témoin seul, b) témoin avec huile, et c) méthode EGM.

(Photographies d'Erlenmeyer en haut et grossissements loupe binoculaire en bas)

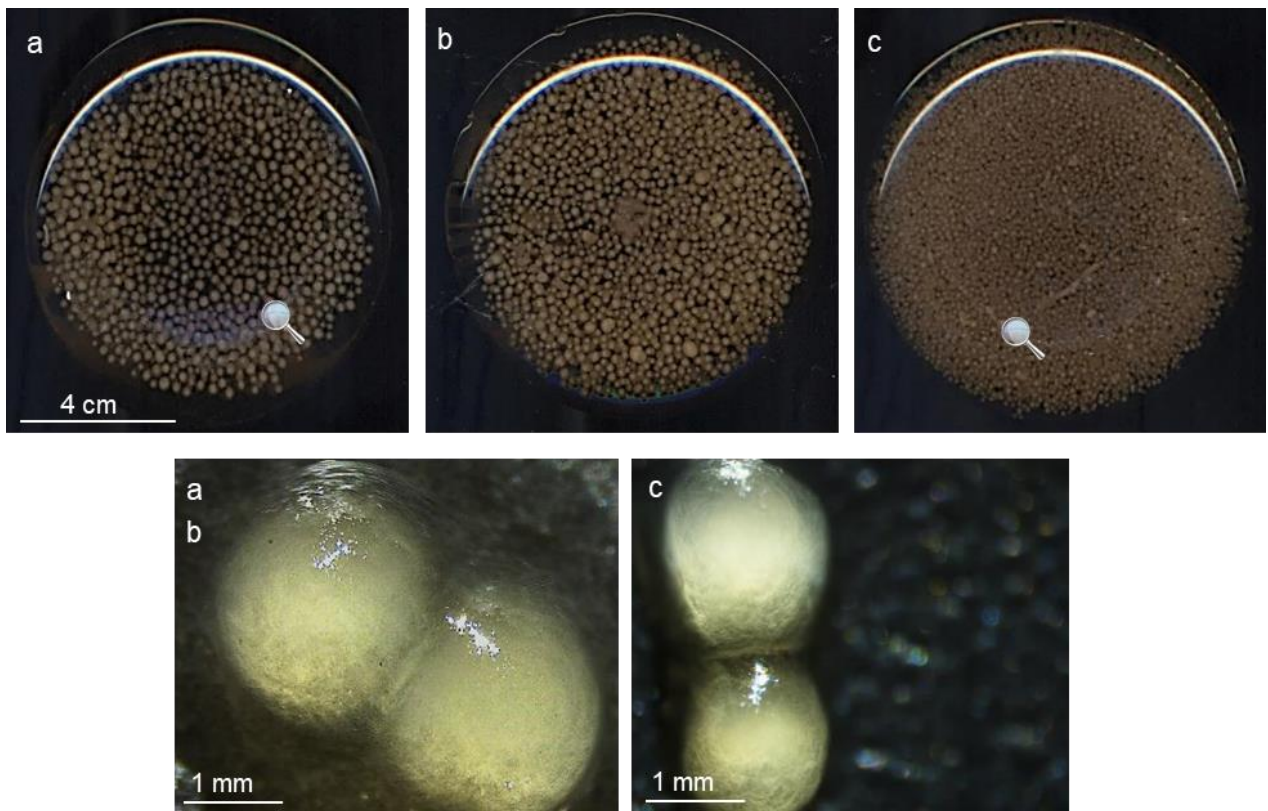


**Figure 31** : Cultures liquides d'*A. niger* après de 24h de croissance pour différentes modes de germination

a) témoin seul, b) témoin avec huile, et c) méthode EGM. (Photographies d'Erlenmeyer)

### *Aspergillus terreus*

Cultivé en milieu liquide, *A. terreus* présente également une morphologie agrégée en pellets et des conidies agrégées et coagulées avant la germination. Cependant son mécanisme d'agrégation est inconnu. L'utilisation de l'EGM ayant montré une différenciation claire de comportement entre les deux souches « témoins » de ces mécanismes, nous espérons obtenir d'avantage d'information sur cette souche par la mise en place de cette technique. Ainsi, lors d'une germination encapsulée, nous n'observons aucun changement morphologique par rapport aux témoins, avec une agrégation en pellets dans les trois cas (Figure 32). Seul le diamètre des pellets a montré une légère différence, inférieur pour la culture après la germination encapsulée,  $1,2 \pm 0,010$  mm, contre  $2,0 \pm 0,020$  mm pour les cultures témoins.



**Figure 32 :** Culture liquide d'*A. terreus* après 24 heures de croissance, pour différentes modes de germination

a) témoin seul, b) témoin avec huile, et c) méthode EGM.

(Photographies d'Erlenmeyer en haut et grossissements loupe binoculaire en bas)

### 2.2.2.2 Discussion

Compte tenu des mécanismes de formation de pellets, nous avons développé une méthode pour éviter l'agrégation des conidies, par leur séparation physiquement au sein d'une émulsion créée par microfluidique. En principe, cette méthodologie devrait permettre, en s'affranchissant de possibles rapprochement entre conidies, la croissance des espèces coagulante sous une morphologie fluide.

En utilisant cette méthode, nous avons observé un changement morphologique de mycélium agrégé en mycélium dispersé pour la souche *A. oryzae* étudiée. A l'inverse, *R. oryzae* n'a montré aucune différence de morphologie, conservant sa forme très agrégée. Ces résultats sont cohérents avec les mécanismes décrits en littérature, en tant qu'espèces coagulantes et non coagulantes, respectivement. L'impact d'une germination encapsulée sur les conidies d'*A. oryzae* réside certainement dans la suppression des forces physico-chimiques ayant naturellement tendance à les rapprocher. Une fois la germination terminée et l'émulsion déstabilisée, le mycélium résultant ne s'est pas aggloméré, résultant en une morphologie finale fluide. En revanche, même si les conidies de *R. oryzae* ont été séparées de la même manière pendant la germination, une fois que les tubes germinatifs ou les "jeunes" hyphes ont été à nouveau en contact, l'agrégation a été possible ce qui a conduit à une morphologie finale agrégée.

Dans le cas d'*A. niger*, nous n'avons pas observé de changement morphologique en utilisant cette méthode, sa morphologie agrégée a été conservée dans toutes nos expériences. Ce résultat n'est pas cohérent avec sa description dans la littérature en tant qu'espèce coagulante. La technique appliquée aux souches « témoins » *A. oryzae* et *R. oryzae* montre pourtant clairement que cette méthode d'encapsulation est efficace pour empêcher l'agrégation entre les conidies. Nous pouvons alors avancer plusieurs hypothèses. L'agrégation des conidies chez cette espèce a été décrite en deux étapes, jusqu'à environ 16 h après inoculation. La durée de germination des conidies dans l'EGM est de 19 h mais il se pourrait que la germination soit plus lente dans nos conditions opératoires (milieu de culture dilué dans les gouttes de l'émulsion). Pour s'affranchir de ce phénomène, plusieurs temps de germination au sein de l'émulsion pourraient donc être expérimentés. Cela permettrait également de déterminer plus finement les stades d'agrégation des souches. Cependant nous avons observé la germination et la présence des tubes germinatifs après déstabilisation de l'émulsion. De plus, lorsque la technique MEC est appliquée à cette souche, les transferts sont effectués 24 h après ensemencement. Les conidies, même les plus tardives, ont alors germé et les hyphes sont déjà formées. Nous pouvons donc envisager que cette espèce est également capable d'agrégation par contact entre hyphes.

Enfin, *A. terreus*, dont la coagulation des conidies est simplement observée, semble également pouvoir s'agréger après la germination, par une fusion entre hyphes.

*Brevet déposé sur cette technique (FRA1758924), texte présenté en annexe (page 159), article scientifique en rédaction.*

### 2.2.3 Application de l'EGM pour la propagation en bioréacteur de *A. oryzae*

Comme la souche *A. oryzae* étudiée répond favorablement à notre méthode avec une morphologie dispersée, nous avons cherché à appliquer cette méthode pour conduire des propagations en bioréacteurs, cette étape faisant partie de notre stratégie d'étude.

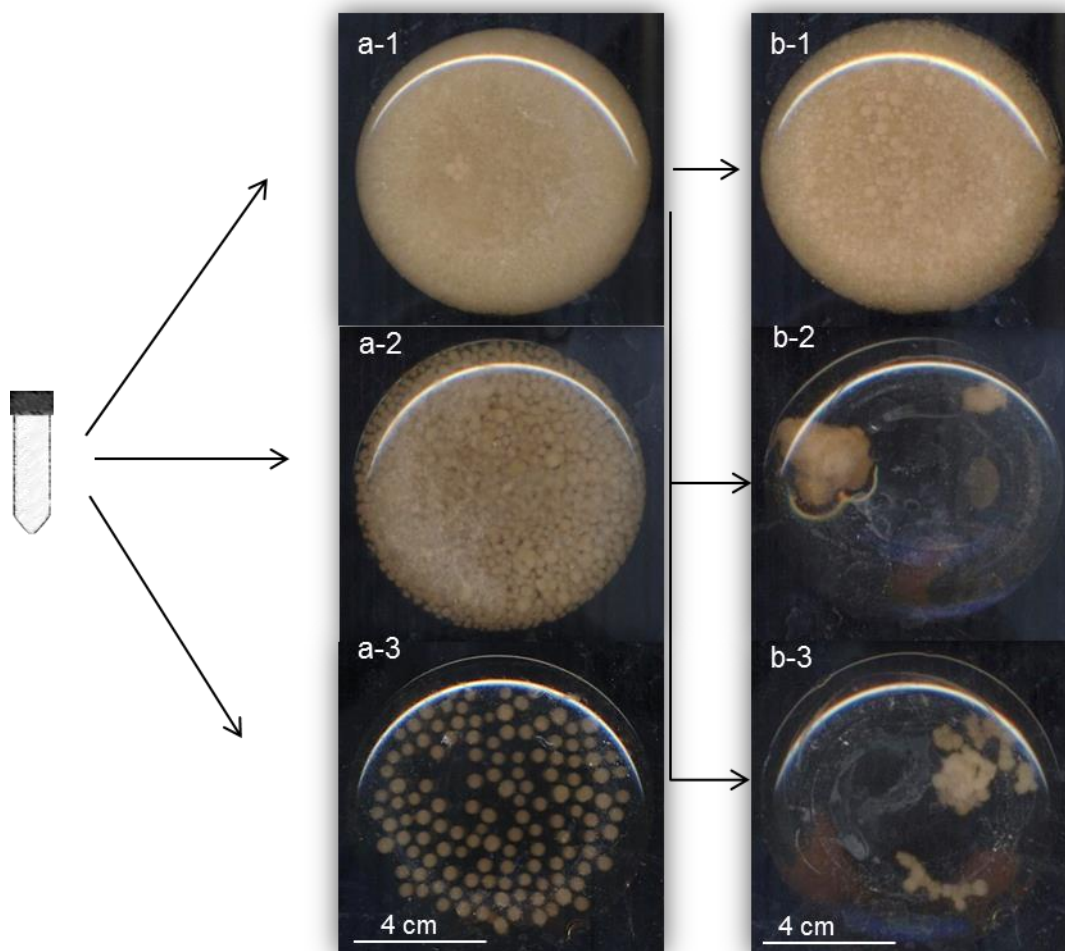
Dans une première expérience, nous avons ensemencé des bioréacteurs soit directement en utilisant l'émulsion déstabilisée, soit en utilisant la culture en fiole ensemencée avec cette émulsion, et présentant une morphologie fluide. Les résultats n'ont pas été satisfaisants, les cultures n'ont pas conservé une morphologie fluide, avec une agrégation des cellules sous forme de pellets (*cf* Annexes, Figure 53, p148), comme dans les témoins ensemencés à partir des cultures en fioles témoins a et b.

Nous avons donc cherché à comprendre quel effet majeur avait ainsi perturbé la morphologie d'*A. oryzae* lors de ce changement d'échelle. Selon notre étude bibliographique, il pourrait principalement s'agir du type d'ensemencement (conidies germées directement ensemencées ou préculture préalable) ainsi que du taux d'ensemencement ou enfin du type d'agitation très variable entre une fiole et un réacteur.

Dans une expérience intermédiaire en fioles, nous avons testé trois taux de transfert (20 %, 4 % et 0,8 % v/v) à partir du tube Falcon contenant l'émulsion déstabilisée dans un volume final de 50 ml en Erlenmeyer. Le taux de 20 % v/v correspond à ce qui avait été réalisé dans les premières expériences en fiole (résultat positif), le taux de 0,8 % v/v correspond à ce qui avait été réalisé pour la première expérience en bioréacteur (résultat négatif).

Avec un taux de transfert de 0,8 % v/v, la culture a formé des pellets sphériques (Figure 33 a-3), et à 4 % v/v, la culture a entraîné la formation de pellets non uniformes (Figure 33 a-2). C'est seulement le taux de transfert de 20 % v/v qui a permis l'obtention d'un mycélium librement dispersé (Figure 33 a-1), comme lors de l'expérience initiale en fioles. Cette même expérience à partir des témoins a et b au lieu de l'émulsion déstabilisée a formé du mycélium agrégé quel que soit le taux de transfert.

Dans une seconde étape de propagation, nous avons inoculé de nouveaux Erlenmeyers à partir de la culture fluide de 24 h obtenue à partir de 20 % v/v de l'émulsion déstabilisée. Là encore, un taux de transfert de 20 % v/v est nécessaire pour conserver une morphologie fluide après 24 heures de culture (Figure 33 b-1).

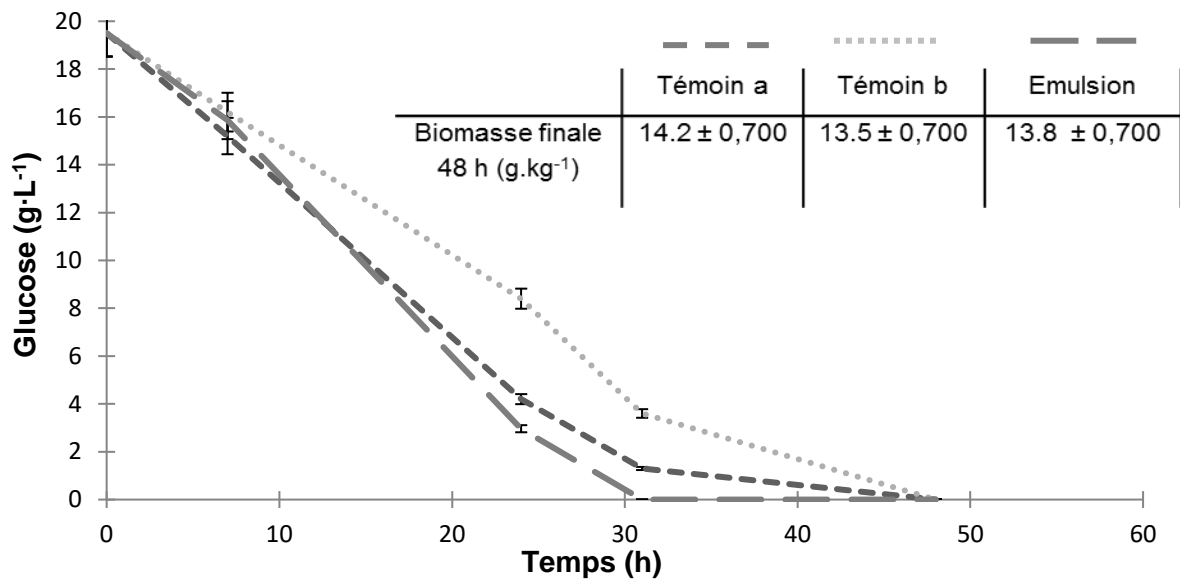


**Figure 33 :** EGM transfert en fioles : Cultures liquides après 24h de croissance d'*A. oryzae* selon différents ensemencements.

a : à partir d'émulsion déstabilisé (a-1 : 20 %, a-2 : 4 % et a-3 : 0,8 % v/v) ;  
 b : à partir de la culture fluide obtenue (b-1 : 20 %, b-2 : 4 % et b-3 : 0,8 % v/v).  
 (Photographies d'Erlenmeyer)

Les conditions d'ensemencement (type et taux) semblent donc avoir été cernés pour réaliser une propagation efficace en bioréacteur. Pourtant, une deuxième expérimentation en bioréacteur, en respectant un ensemencement par pré-culture fluides à 20 % v/v a une fois de plus montré des morphologies agrégées et non un maintien de la morphologie fluide obtenue en fiole.

La propagation en bioréacteur n'a pas montré les mêmes résultats que ceux obtenus en fioles. Pour ces dernières le métabolisme a été suivi en fioles (Figure 34). La concentration finale en biomasse après épuisement du glucose a été relativement similaire dans les trois conditions (de 13,5 à 14,3 ± 0,700 g·L<sup>-1</sup>) mais la consommation de glucose est plus rapide dans le cas de la germination encapsulée avec un gain de temps de 20 h de culture.



**Figure 34 :** Suivi de la concentration en glucose durant les 24h de croissance en Erlenmeyer après les trois conditions de germination, et leur biomasse finale respective.  
 a) témoin seul, b) témoin avec huile, et c) méthode EGM.

## 2.2.4 Conclusion

L'utilisation de la technique EGM a permis une fois de plus d'obtenir une morphologie fluide pour la souche *A. oryzae* étudiée. Cette morphologie fluide a également montré des avantages métaboliques avec une meilleure assimilation du glucose.

Cependant la propagation en bioréacteur n'a pas été fructueuse, la morphologie fluide n'étant pas maintenue nous observons donc à cette étape la possibilité de l'agrégation des hyphes d'*A. oryzae* qui n'avait pas été envisagée jusqu'à présent. Puisque les transferts en fiole ont permis de s'affranchir des effets de taux de propagations, nous pouvons penser que l'agitation (type ou puissance) a impacté la morphologie d'*A. oryzae* et n'a pas permis la propagation de sa morphologie fluide lors de changement de volume.

Ainsi, si les hyphes d'*A. oryzae* qui semblait constituer le témoin du type coagulant « stricte » montrent également une agrégation/fusion dans certaines conditions, alors il est possible que d'autres conditions permettent à l'inverse d'empêcher la réagrégation des hyphes chez *A. niger* et *A. terreus*.

## 2.3 Comparaison des techniques MEC et EGM

Finalement, les résultats de ces deux méthodes sont très proches, avec comme attendu, une transition morphologique vers un mycélium fluide pour notre souche témoin de la

coagulation, *A. oryzae* et aucune transition pour notre souche *R. oryzae* témoin de la non-coagulation. De plus, la morphologie fluide obtenue a montré une amélioration de la croissance du champignon (par l'augmentation de la vitesse de consommation en glucose et la biomasse ou la respiration) et a été maintenue lors d'une implémentation en bioréacteur dans la technique MEC.

En comparant les résultats obtenus sur ces 4 souches par ces deux méthodes, il semble donc que l'effet principal du talc soit effectivement physique, c'est-à-dire permette une isolation des conidies et empêche donc la coagulation. Si le talc avait présenté un effet chimique important, nous aurions alors très certainement observé des résultats différents sur les souches soumises à ces deux méthodes.

Cependant, d'autres points n'ont pas vérifié nos hypothèses ou contredisent la littérature. C'est le cas des résultats obtenus pour les souches *A. niger* et *A. terreus* qui malgré leur coagulation, ne montrent pas de transitions vers un mycélium fluide. Une explication à ce résultat serait alors que la méthode a effectivement permis de supprimer l'agrégation des conidies de ces deux souches mais que ces dernières présentent des étapes d'agréations ultérieures, pendant les stades d'élongation et d'embranchement (comme pour les espèces non coagulantes). A notre connaissance, aucun autre phénomène d'agrégation n'a été décrit avec précision pour ces espèces.

Aussi, *A. oryzae* a montré une réagrégation lors de sa propagation en bioréacteur, pourtant sous morphologie fluide en pré-culture obtenue par EGM. Des différences au sein des bioréacteurs pourraient venir des pré-cultures, contenant dans un cas des microparticules et dans l'autre de possibles traces d'huile et de surfactant résiduels. Mais lors du développement de ces deux techniques, les témoins adéquats ont été menés afin de s'affranchir de ces potentiels effets sur la croissance et la morphologie. Nous pouvons cependant penser qu'il existe un avancement différent dans la croissance de la souche lors de la pré-culture MEC (24 h de culture en milieu talc) et de la pré-culture EGM (19h de germination en émulsion composée de milieu dilué, puis 24 h de culture supplémentaire en milieu classique). Des expérimentations supplémentaires sur ces points pourraient être menées.

Nous avons finalement mis en évidence, pour la première fois, grâce à ces méthodes, que pour trois souches étudiées sur quatre, les deux phénomènes d'agrégation coexistent mais ne s'expriment certainement qu'à certaines conditions qu'il est encore difficile à cerner.





### **3 Osmolarité : Sels de calcium et magnésium**

*La souche témoin du type « non-coagulant » dans cette étude, *R. oryzae*, ne semble pas sensible (pas de changement morphologique) aux deux méthodes précédemment décrites et testées. Ce résultat est cohérent puisque leur principe repose sur la séparation des conidies pendant la germination pour empêcher l'agrégation des conidies, alors que la non-coagulation traduirait un mécanisme d'agrégation entre hyphes. Le criblage initial a montré qu'il était possible de modifier la morphologie en jouant sur la composition du milieu de culture, notamment via l'ajout de sels de calcium et de magnésium dans un milieu minimum de composition contrôlée (cf Résultats, partie 1.1.6, p80). Trois morphologies possibles ont été observées, et dans cette partie nous souhaiterions établir l'origine de ces morphologies à partir des concentrations en ions dissous apportés par les sels. La stratégie mise en place dans cette étude est composée de trois parties :*

- *Un criblage, en fioles Erlenmeyer, de 4 combinaisons en sels de calcium et magnésium ajoutés en différentes concentrations.*
- *Une analyse statistique descriptive des effets observés pour la mise en évidence de corrélations « claires », une analyse discriminante ACP visant à rechercher les facteurs influents majoritairement sur les variations morphologiques et une modélisation LDA (Linear Discriminant Analysis) permettant de prédire l'apparition des morphologies en fonction des données recueillies à l'étape de criblage.*
- *Un scale-up en bioréacteur afin de juger de la pertinence de la méthode et du modèle à volume plus important.*

#### **3.1 Criblage en pré-cultures**

Comme discuté en 1.1.6 p 80, si les ions  $Mg^{2+}$  et  $Ca^{2+}$  semblent avoir un impact sur la morphologie de *R. oryzae*, nous n'avons pas pu établir une zone de transition qui mettrait en évidence un lien direct entre ces morphologies et les concentrations de ces ions. Un des facteurs en cause pouvant être la présence des contre-ions  $Cl^-$  et  $SO_4^{2-}$  apportés proportionnellement à  $Ca^{2+}$  et  $Mg^{2+}$  respectivement dans l'expérience initiale. Nous avons donc décidé de croiser anions et cations en réalisant des ajouts croisés en sels  $CaCl_2$ ,  $MgSO_4$ ,  $CaSO_4$  et  $MgCl_2$ , et de mesurer la concentration réelle de tous les ions en solution au cours des cultures.

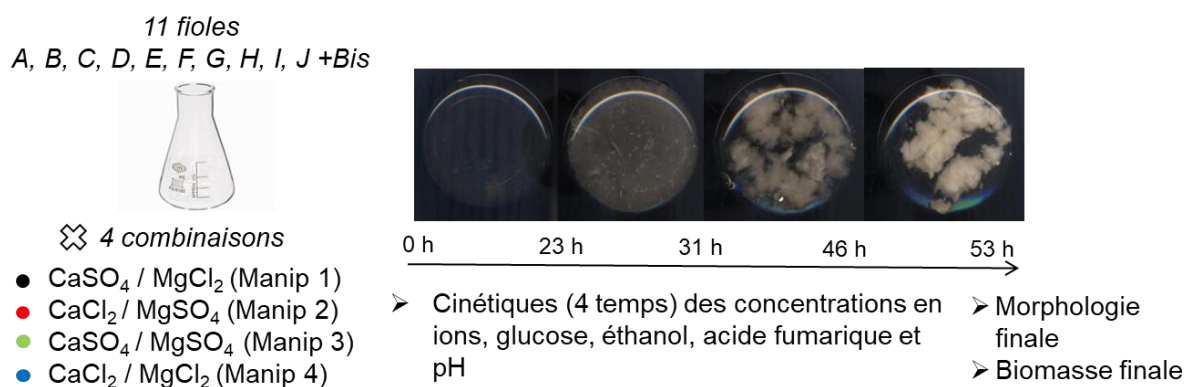
L'étape de criblage (Figure 35) a ainsi consisté à l'ajout de quatre sels dans les fioles Erlenmeyer afin d'obtenir les mêmes 10 concentrations finales en calcium et magnésium mais apportés par quatre combinaisons différentes en sels :

- $MgCl_2/CaCl_2$
- $MgSO_4/CaSO_4$
- $MgCl_2/CaSO_4$
- $MgSO_4/CaCl_2$

Une des 10 fioles de chaque combinaison en sel a été choisie aléatoirement pour être répétée. Nous avons donc mené 44 fioles sur une croissance de 48 h. Ce criblage nous a donné accès aux données suivantes :

- Type de sel et concentrations théoriques en ions ajoutés
  - Concentrations mesurées en ions dissous
  - Concentrations en glucose
  - Concentrations en produits : éthanol et acide fumarique
  - pH
  - Biomasse finale
  - Morphologie finale
- } avec cinétiques

Toutes ces analyses ont été effectuées afin d'obtenir un maximum de données quantitatives pouvant expliquer et/ou traduire quantitativement les données qualitatives de la morphologie observée.



**Figure 35** : Principe du criblage réalisé en pré-cultures et types de données recueillies pour chacune des 44 fioles.

### 3.1.1 Données brutes

#### 3.1.1.1 Morphologie

Les trois morphologies observées lors du criblage initial ont bien été retrouvées pour chaque combinaison de sels (Figure 36). Un état morphologique agrégé (A), semi-agrégé (SA) ou fluide (F) a été attribué à chaque fiole (chaque expérience). Il a été noté que les fioles de mêmes concentrations théoriques en ions, apportés par des sels différents n'ont effectivement pas toujours abouti à la même morphologie, ce qui confirme que les concentrations en  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$  ne peuvent pas à elles seules expliquer la morphologie.

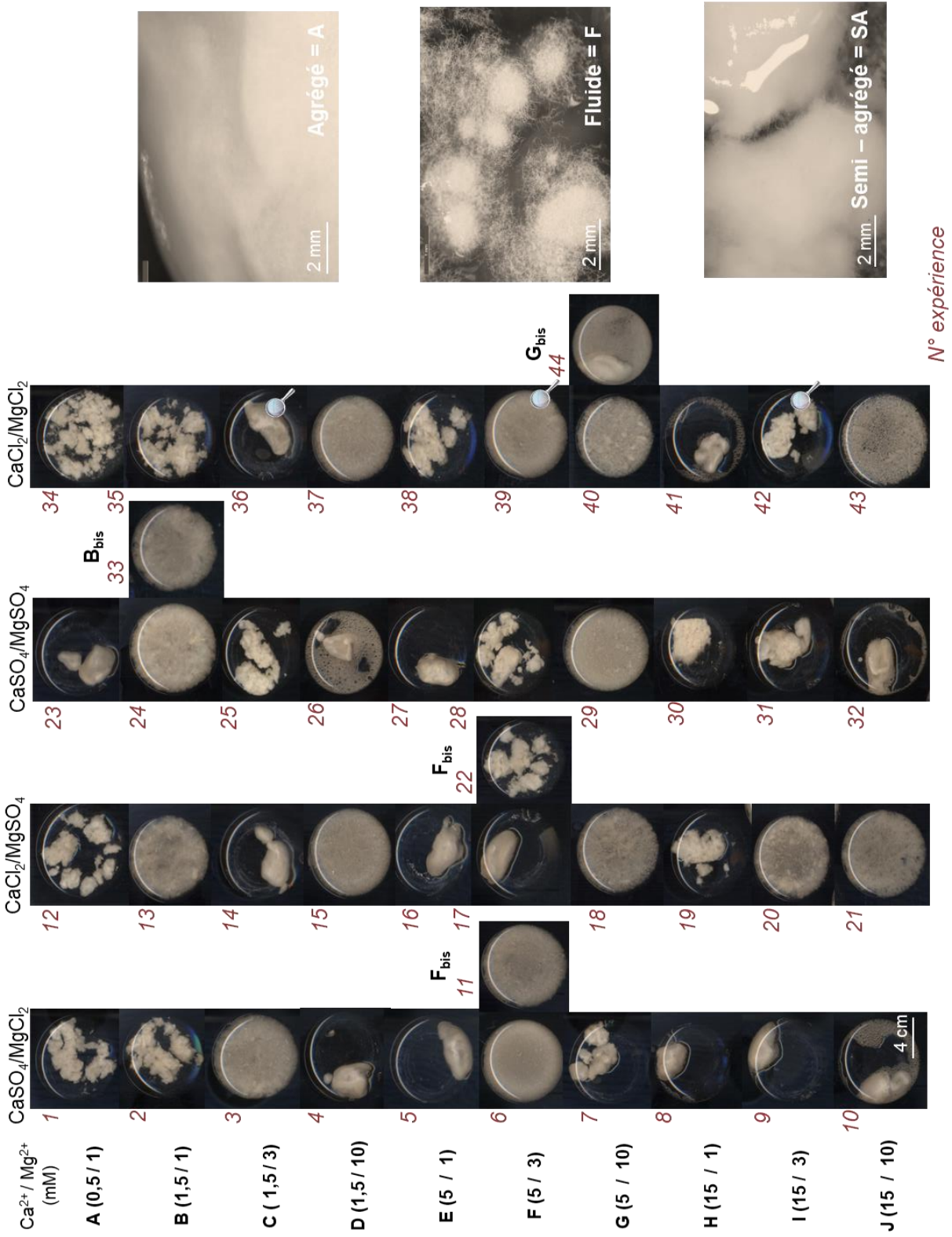


Figure 36 : Données morphologiques du criblage en pré-cultures

### 3.1.1.2 Contrôle de la qualité des données

Le suivi cinétique des concentrations en glucose, anions/cations, éthanol, et acide fumarique n'a pas été utilisé au final dans l'analyse statistique à suivre, mais toutes ces cinétiques ont été tracées et regardées minutieusement afin de contrôler la qualité des données. Dans le cas où des mesures étaient aberrantes par rapport à la tendance de la cinétique, les analyses ont été répétées et les valeurs ont été corrigées.

### 3.1.1.3 Suivi cinétique des concentrations en composés carbonés

Concernant les substrats et produits carbonés (glucose, éthanol, acide fumarique), les cinétiques montrent que la consommation du glucose est de type exponentiel, avec un épuisement qui intervient avant même le prélèvement réalisé à 46h de culture.

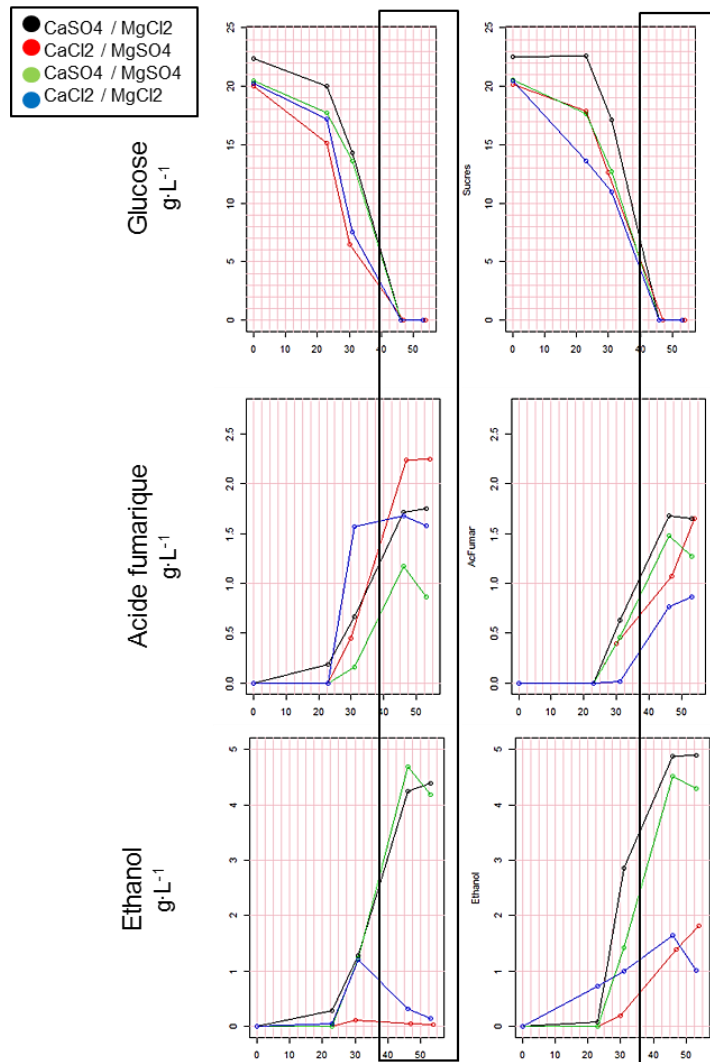
Les produits (éthanol et acide fumarique) s'accumulent en parallèle de la consommation de glucose, de façon semblable à des métabolites primaires (ce qui devra être confirmé par un suivi cinétique de la biomasse). Après épuisement du glucose (entre 46 et 53 h), on observe une diminution de la concentration en produits, signe que le champignon réassimile ces produits (aussi bien l'éthanol que l'acide fumarique) pour les utiliser comme source de carbone et d'énergie (Figure 37).

### 3.1.1.4 Suivi cinétique des anions et cations

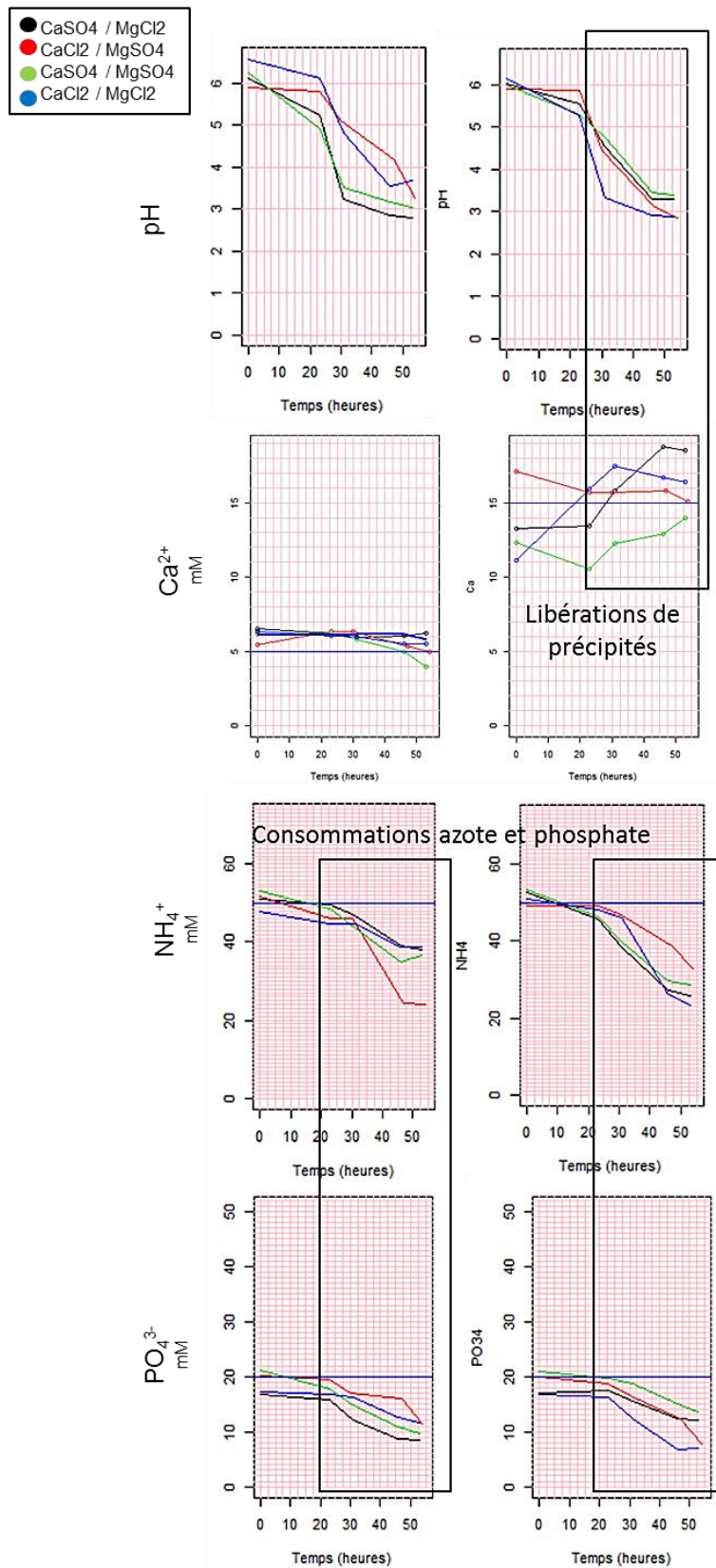
Le suivi cinétique des anions ( $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  et  $\text{NO}_3^-$ ) et des cations ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  et  $\text{NH}_4^+$ ) montre différents phénomènes au cours de la culture :

- Dans quelques cas (notamment le calcium dans les fioles très concentrées), la concentration mesurée est parfois cohérente avec la concentration théorique en fin de culture, mais elle est inférieure au T0. Ceci pourrait être le signe de la formation de précipités lors de la préparation des milieux (qui diminuent la concentration en ions libres) puis de leur dissolution pendant la culture en raison de l'acidification du milieu (Figure 38). Parfois également, les concentrations sont supérieures à la valeur théorique attendue, malgré des redosages sur ces points, et nous n'avons pas pu expliquer clairement ce phénomène.
- Seuls les ions ammonium  $\text{NH}_4^+$  et phosphate  $\text{PO}_4^{3-}$  montrent une consommation visible au cours de la culture (Figure 38).
- Pour tous les autres ions, leur concentration reste quasiment constante, même pour le sulfate  $\text{SO}_4^{2-}$  (Figure 39).

### Réassimilations des produits

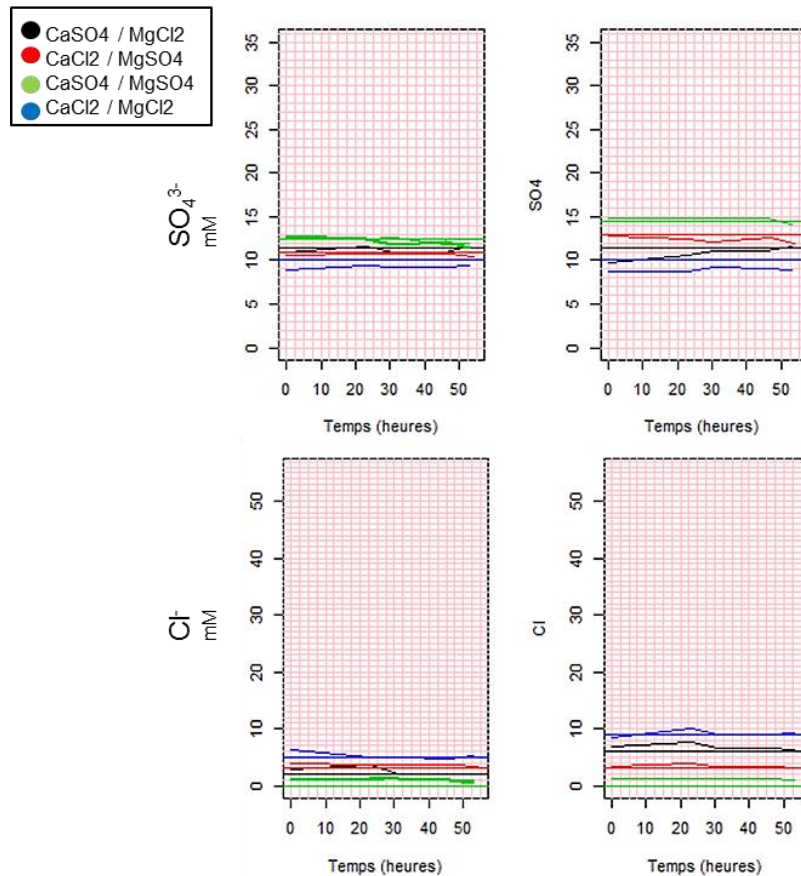


**Figure 37 :** Exemples de cinétiques avec réassimilations des produits lors de l'épuisement du milieu en glucose.



**Figure 38 :** Exemples de cinétique des ions non-constants.

La concentration en ions calcium augmente dans les fioles fortement concentrées probablement par dissolution de précipités avec la diminution du pH. L'azote et le phosphate sont consommés.



**Figure 39** : Exemples de cinétiques des ions constants.

### 3.1.2 Analyse statistique descriptive

Les analyses statistiques ont été réalisées sur les points finaux, il n'était pas possible de conserver l'intégralité des cinétiques pour une analyse, dans un premier temps, descriptive. Ainsi, les données suivantes ont été sélectionnées pour visualiser de façon claire des corrélations entre les différentes données :

- Glucose consommé entre 0 et 30h (avant épuisement)
- Concentrations en Ethanol et Acide fumarique à 53 h
- Biomasse finale à 53h (pas de valeurs intermédiaires disponibles)
- Azote et phosphate consommés entre 0 et 53 h
- Concentrations (constantes) des autres ions
- pH initial et final
- Morphologie finale

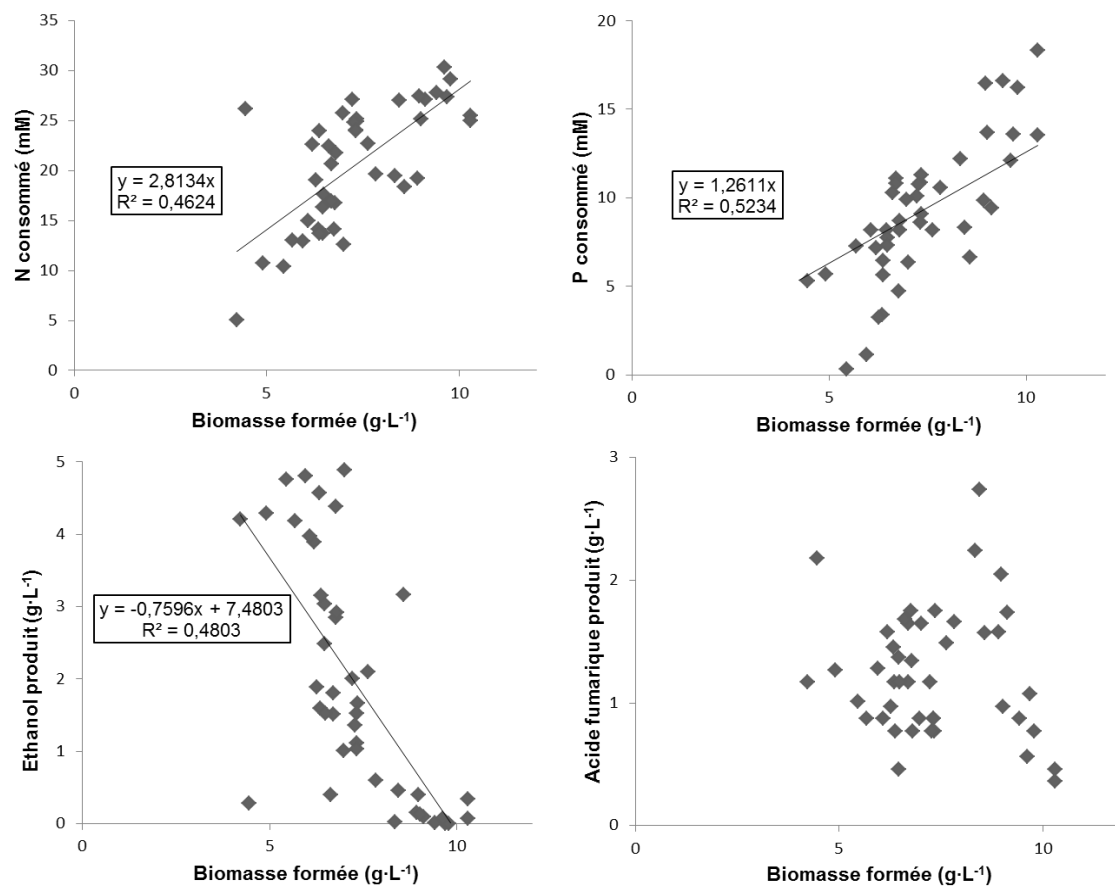
Pour observer des différences de consommation en glucose, nous avons utilisé le point intermédiaire à 30 h avant épuisement. Les concentrations en éthanol et acide fumarique ont été incluses dans l'analyse soit avant (40 h) et soit après réassimilations (53 h) et ont finalement montré de meilleurs résultats à 53 h. Les concentrations initiales en azote et phosphate étant les mêmes dans toutes les fioles, prendre la concentration finale revient à prendre la consommation, ce que nous avons fait. Enfin, pour les ions théoriquement constants mais qui ont montré des

variations de concentrations expliquées ou non, les points initiaux puis les points finaux ont été inclus successivement dans l'analyse.

### 3.1.2.1 Croissance

Dans un premier temps, nous avons cherché à corrélérer les différentes mesures réalisées avec la concentration en biomasse formée lors de la croissance. Nous avons observé (Figure 40) :

- Une corrélation positive entre la croissance et les consommations d'azote et de phosphore, ce qui est cohérent avec une incorporation de ces deux éléments dans la biomasse.
- Une corrélation négative entre production de biomasse et production d'éthanol (productions finales, donc pour une même dose de glucose consommé). Il semble que l'éthanol est formé au détriment de la biomasse, comme s'il y avait une compétition entre ces 2 produits ou que l'éthanol est formé lorsqu'il n'y a plus de formation de biomasse (conséquence indirecte du manque d'oxygène).
- Pas de corrélation (positive ou négative) de la production de biomasse avec la production d'acide fumarique, ni avec la consommation de glucose à 30h.



**Figure 40 :** Corrélations entre biomasse formée et consommations d'azote et de phosphore, production d'éthanol et production d'acide fumarique.



### 3.1.2.2 Morphologie et composés carbonés

Dans un deuxième temps, nous avons regardé les corrélations avec la morphologie, selon les trois états observés agrégé (A), semi-agrégé (SA) et fluide (F). On observe en particulier (Figure 41) que la morphologie fluide est associée :

- A une consommation de glucose plus rapide (glucose consommé à 30h plus élevé) ;
- A une biomasse finale plus forte (et logiquement, une plus forte consommation d'azote et de phosphore) ;
- A un pH final plus acide (en lien avec la consommation d'ammonium plus élevée et à la production d'acide fumarique) ;
- A une production d'acide fumarique qui peut être parfois plus forte ;
- Et à une quasi absence d'éthanol au point final.

A l'inverse, la morphologie agrégée est associée à une consommation de glucose moins rapide, une production de biomasse plus faible, et une plus forte production d'éthanol. La morphologie semi-agrégée présente quant à elle des caractéristiques intermédiaires.

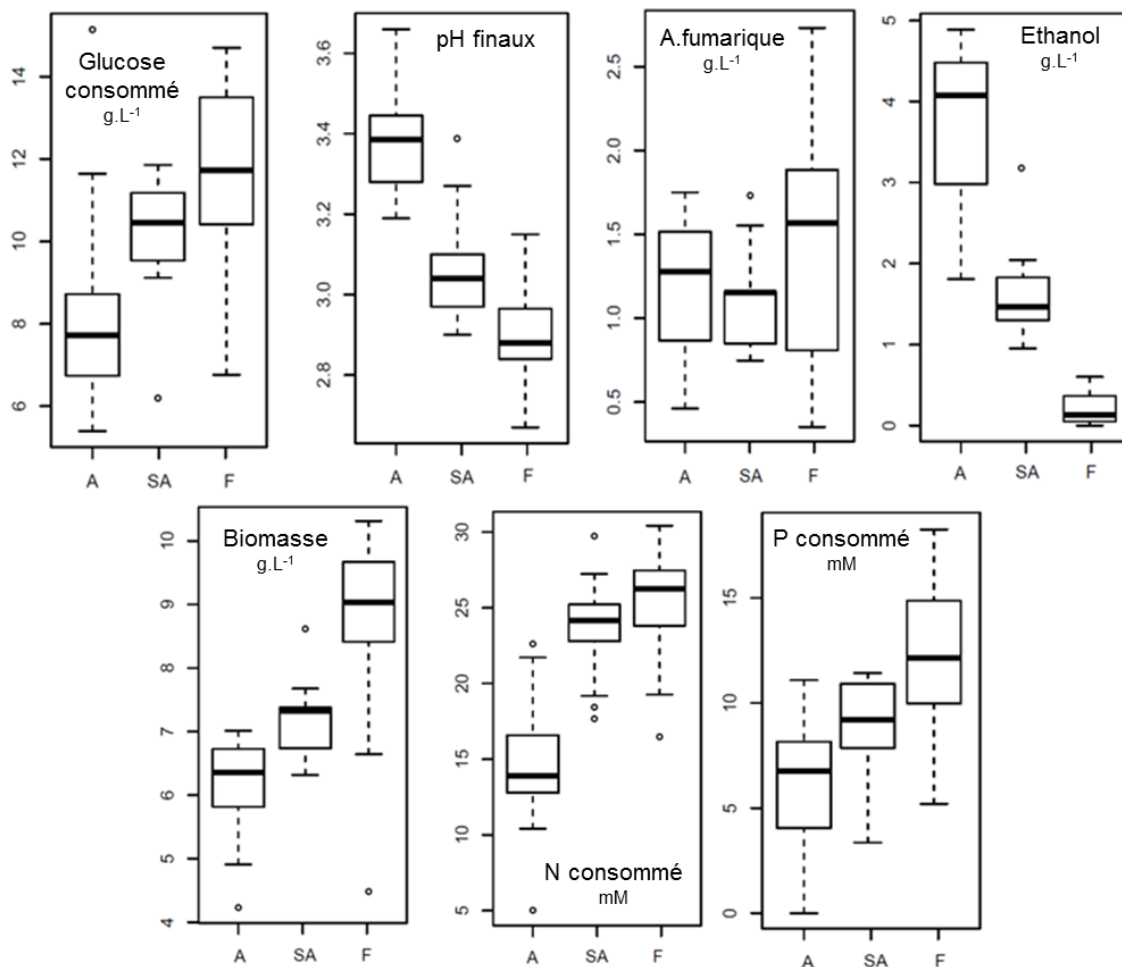
La forte production d'éthanol mesurée lors des morphologies agrégées est cohérente avec la limitation en O<sub>2</sub> au sein de la biomasse, qui déclencherait une voie fermentaire de production d'énergie. La morphologie fluide montre une consommation en glucose plus rapide, une légère augmentation de la production d'acide fumarique et une très faible production d'éthanol, caractéristiques qui offrent des perspectives intéressantes pour une culture en bioréacteurs dans le but d'augmenter la production d'acide fumarique (par une régulation de pH) tout en limitant l'apparition de coproduits (éthanol).

Ces analyses descriptives ont permis dans un premier temps de s'assurer des avantages de la morphologie fluide, nous allons chercher par la suite des corrélations entre les conditions de cultures et les morphologies observées.

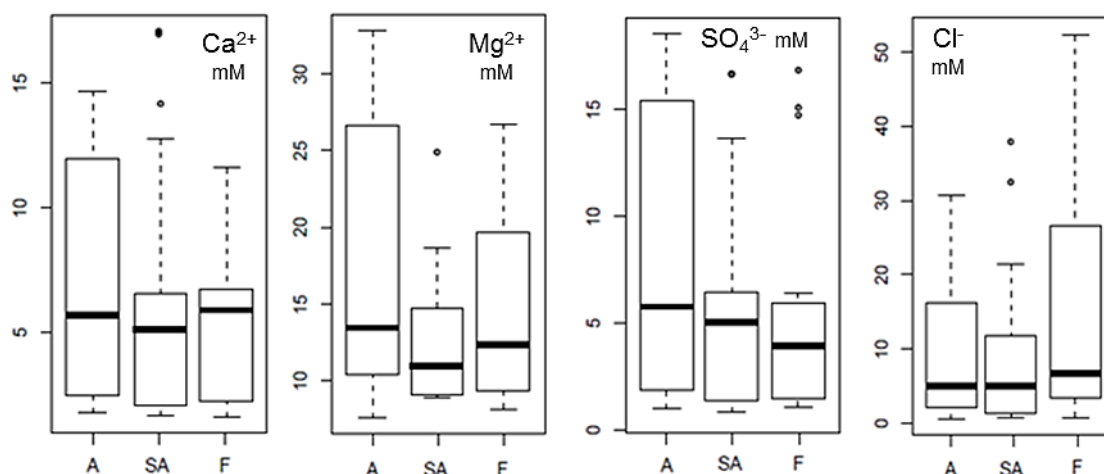
### 3.1.2.3 Morphologie et concentration en anions/cations

Aucune corrélation claire n'a pu être observée entre les concentrations des anions et cations initiales (théorique ou mesurée) ou finales (mesurées) et les morphologies (Figure 42).

Notre objectif est d'établir un lien entre les concentrations réelles en ions dissous dans le milieu et les trois morphologies du champignon, à partir d'un grand nombre d'informations (données entrantes) pouvant autant apporter de l'information que du « bruit de fond » limitant l'observation des effets principaux recherchés. Des techniques statistiques de réduction de dimensions semblent donc appropriées à cet objectif.



**Figure 41 :** Box-plot des données relatives à la croissance et à la production de *R. oryzae* en pré-cultures.



**Figure 42 :** Exemple de box-plot des données relatives aux concentrations en ions dans les feuilles de pré-cultures de *R. oryzae*.

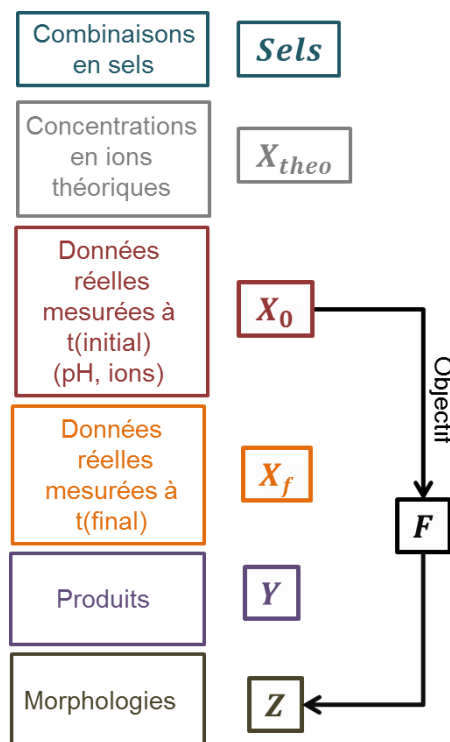
### 3.2 ACP et modélisation LDA

Les données de morphologie sont séparées en trois classes (A, SA et F). Notre objectif est de visualiser les effets des ions principalement responsables de l'attribution d'une expérience (fiolle de pré-culture) à une de ces classes. En d'autres termes nous souhaitons expliquer pour prédire, préférentiellement à partir des concentrations réelles en ions initialement mesurées dans le milieu, la morphologie de *R. oryzae*.

Les deux méthodes ACP (Analyse en Composante Principale) et LDA (Linear Discriminant Analysis ou Analyse linéaire discriminante) effectuent une réduction de dimensions, pour rechercher les axes (facteurs principaux) qui permettent une dispersion maximale des données, puis projettent les données dans le nouvel espace réduit obtenu. L'ACP constitue uniquement une technique de représentation des données dans un nouvel espace de dimension réduite sans prise en compte des classes associées aux données.

La LDA inclut à cette transformation la prédiction d'un nouvel individu (nouvelle expérience ou fiolle) suite à une étape d'apprentissage basée sur un ensemble d'individus dont on connaît la classe. L'analyse discriminante appartient à la famille des méthodes de classification supervisée ou de « supervised machine learning ». Contrairement à l'ACP, l'objectif de la LDA est de réduire le nombre de dimensions tout en préservant au maximum les classes. Pour cela, elle cherche les axes tels que la projection des données dans l'espace engendré par ces axes permette une plus grande séparation des classes (*cf* Matériels et méthodes, partie 3.3, p64).

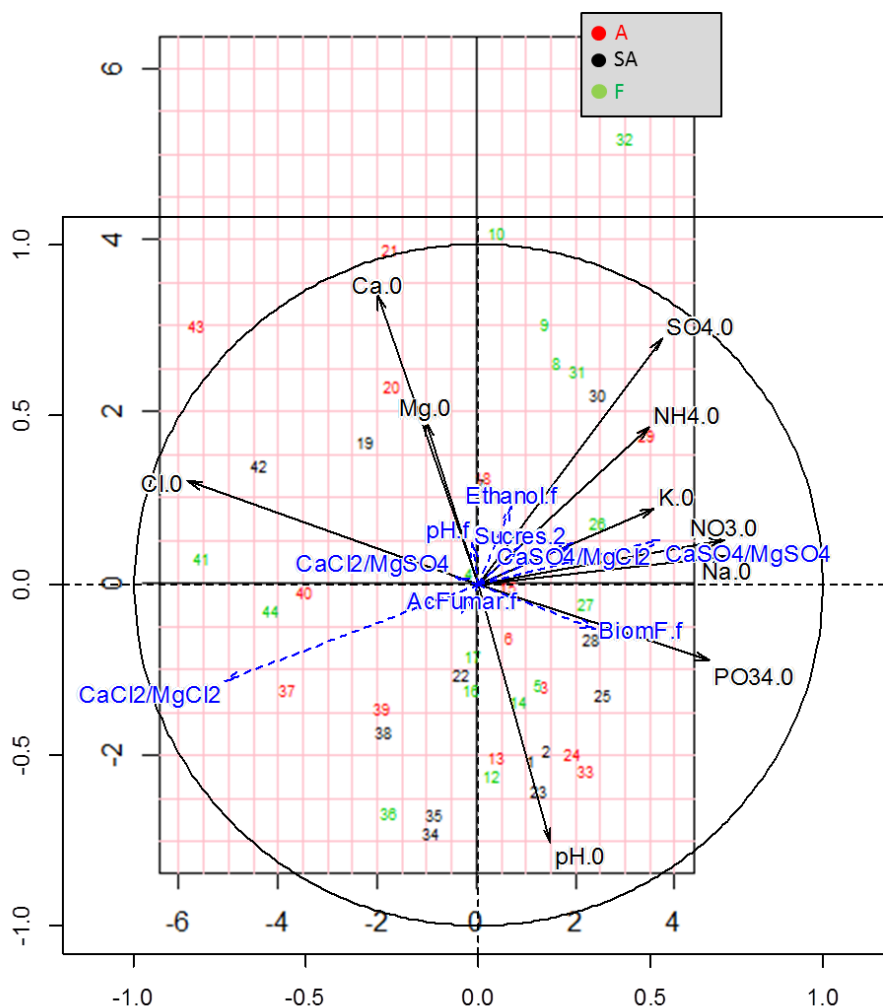
L'objectif de cette analyse statistique est résumé par la Figure 43, que nous avons essayé d'atteindre par l'utilisation de ces deux techniques statistiques.



**Figure 43** : Position de l'objectif de prédiction par LDA.

### 3.2.1 ACP

Les données ayant contribué à la détermination du nouvel espace de projection sont les axes représentés en noir sur la figure ci-dessous (Figure 44). Il s'agit des données initiales réelles mesurées  $X_0$  (cf Figure 43). Les autres axes en bleus correspondent aux données qui n'entrent pas en compte dans la réalisation du nouvel espace mais dont le comportement est également projeté dans cet espace réduit. Les expériences (fioles de pré-cultures, cf Figure 36) ont également été projetées dans cet espace en étant identifiées par couleur dans leur classe morphologique. Nous voulions ainsi pourvoir déterminer, par une réduction de dimensions, une répartition des morphologies en fonction des concentrations en ions initialement mesurées. Les résultats montrent cependant une projection qui sépare difficilement les morphologies observées. L'ACP ne permet donc pas d'expliquer les classes morphologiques observées en fonction de la composition du milieu, dans notre étude.



**Figure 44** : ACP des données de pré-cultures et projection des expériences en fonction de la modalité de morphologie.

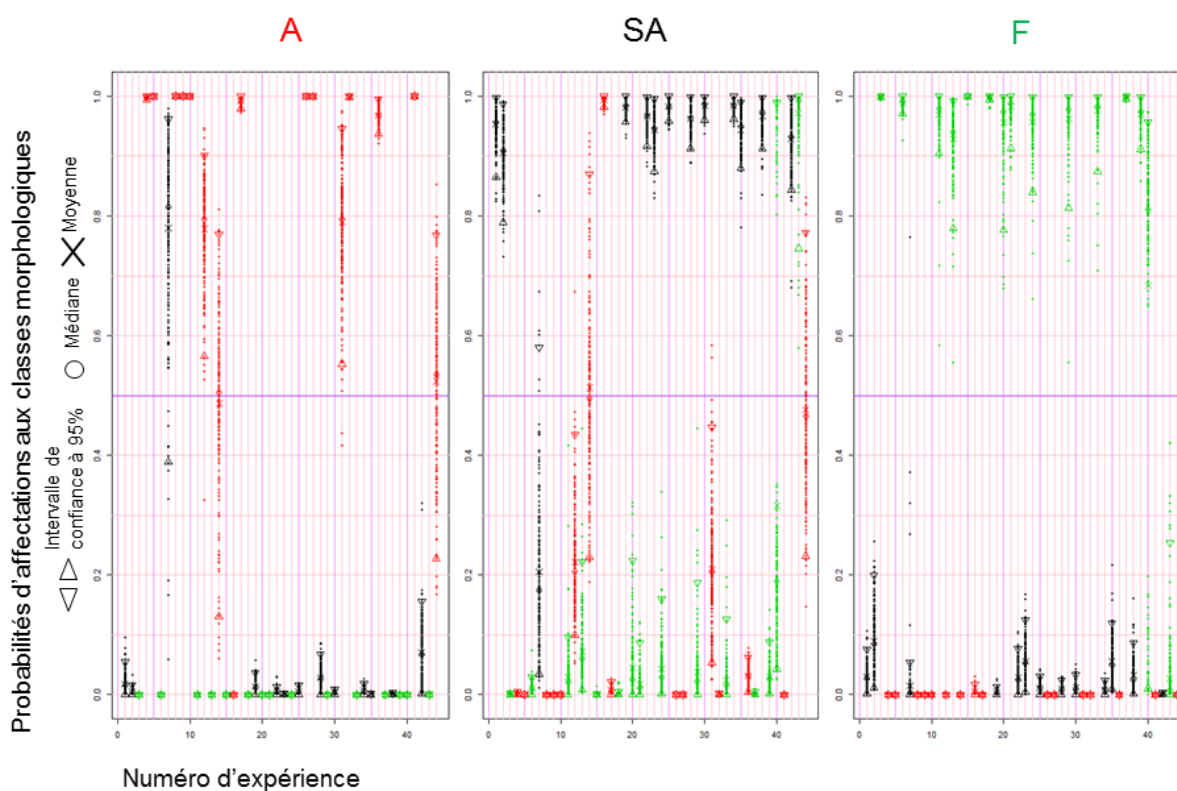
Axes en noir : facteurs principaux du nouvel espace en deux dimensions, axes en bleus : projections des données dans cet espace, numéros : projections des expériences en fonction de leur classe morphologique (rouge = agrégé, noir = semi-agrégé, vert = fluide).

### 3.2.2 LDA

Puisque la LDA prend en compte la classification des données, elle semble plus adaptée à une recherche de corrélation entre les données quantitatives mesurées et les résultats qualitatifs de la morphologie dans lesquels sont classées chaque expérience (fiolle).

Dans un premier temps, afin de tester cette technique, nous avons utilisé les données qui montraient des corrélations claires en analyse descriptive. Ainsi, un modèle prédictif par la LDA, qui attribue à chaque expérience une probabilité d'affectation dans sa classe morphologique, a été établi à partir des produits acide fumarique et éthanol et de la biomasse finale. Les résultats (Figure 45) décrivent des prédictions fiables, avec un intervalle de confiance à 95% compris dans la gamme de 80% à 100% de probabilité d'affectation dans la bonne classe morphologique pour :

- 11 fioles sur 16 prédites dans la morphologie agrégée.
- 12 fioles sur 13 prédites dans la morphologie semi-agrégée,
- 12 fioles sur 14 prédites dans la morphologie fluide,



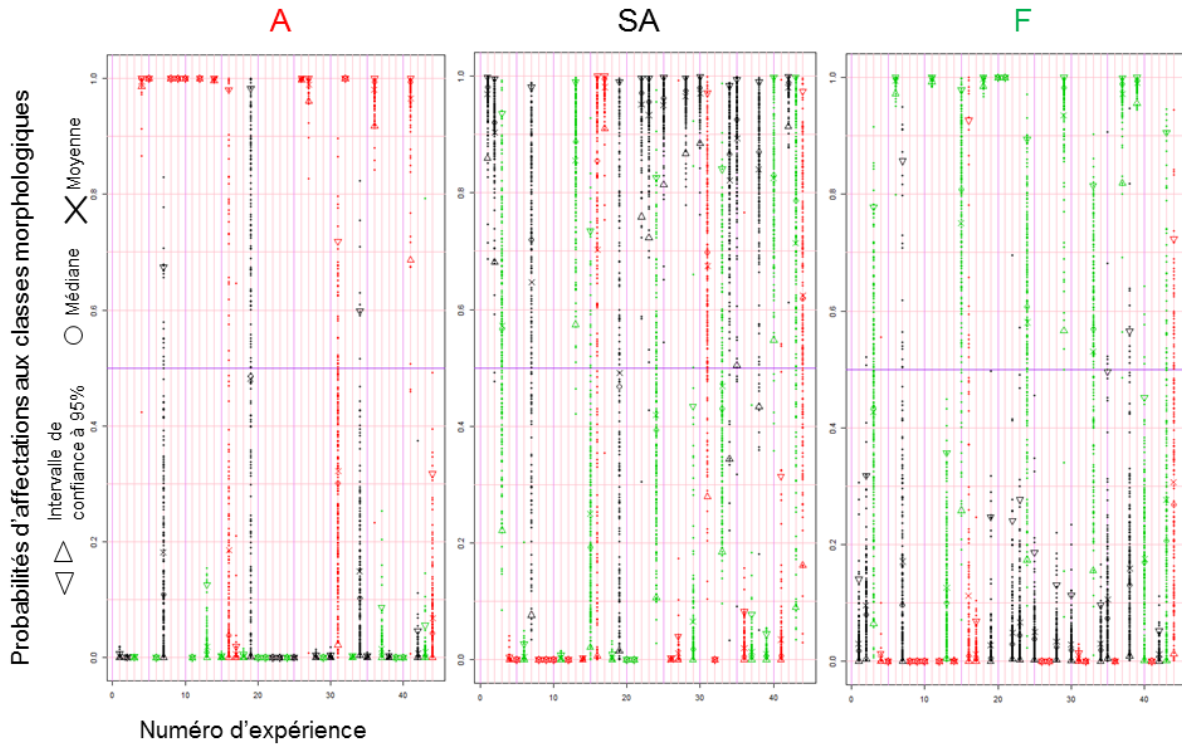
**Figure 45 :** Résultats des prédictions par LDA à partir des données acide fumarique et éthanol.

A = agrégé (rouge), SA = semi-agrégé (noir) et F= fluide (vert)

Les consommations en azote et phosphate (égales aux concentrations finales) ont également montré des corrélations claires en analyses descriptives, nous avons donc effectué une deuxième modélisation LDA afin de prédire les morphologies en fonction des concentrations finales en ions, dont les consommations en  $\text{PO}_4^{3-}$  et  $\text{NH}_4^+$  (Figure 46). Cette modélisation montre des prédictions un peu moins fiables mais toujours intéressantes, avec un

intervalle de confiance à 95% compris dans la gamme de 60% à 100% de probabilité d'affectation dans la bonne classe morphologique pour :

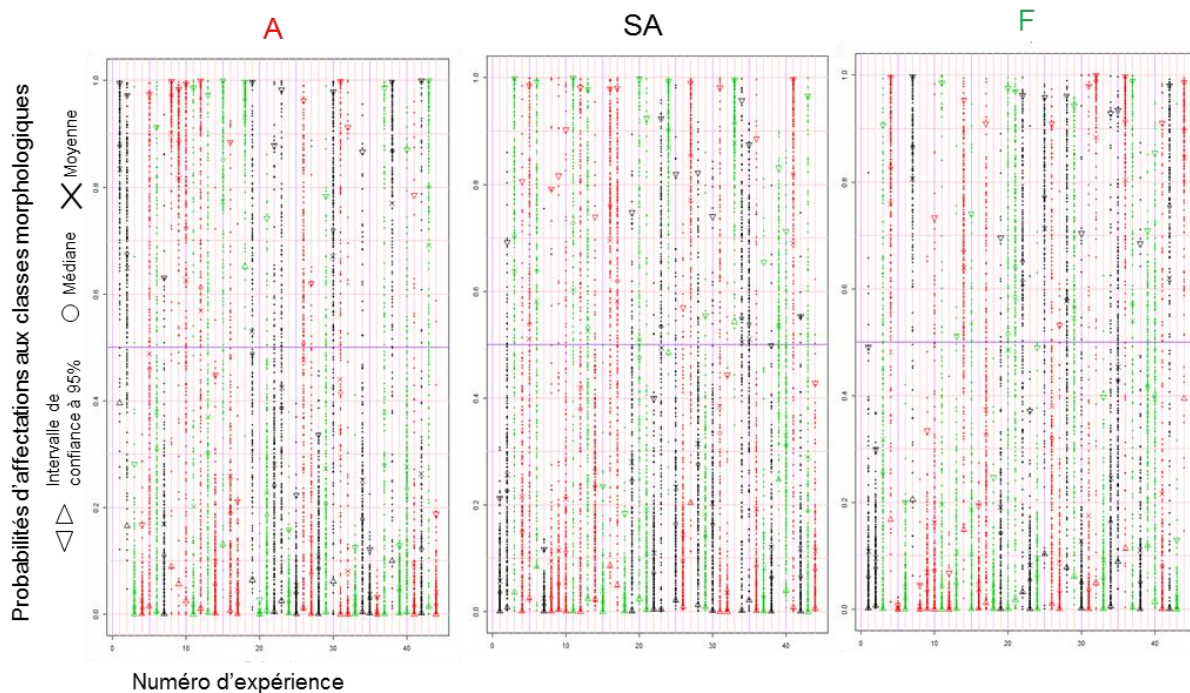
- 12 fioles sur 16 prédites dans la morphologie agrégée.
- 9 fioles sur 13 prédites dans la morphologie semi-agrégée,
- 8 fioles sur 14 prédites dans la morphologie fluide,



**Figure 46 :** Résultats des prédictions par LDA à partir des concentrations finales en ions.

A = agrégé (rouge), SA = semi-agrégé (noir) et F= fluide (vert)

Ainsi la technique s'applique bien à notre set de données, nous avons donc tenté de répondre à l'objectif initial de prédiction des morphologies à partir des conditions initiales de cultures, dont les concentrations en ions (Figure 43). Les résultats obtenus (Figure 47) ont montré l'impossibilité de prédire les morphologies en fonction des conditions initiales de culture : aucune des fioles ne présente un intervalle de confiance à 95% compris dans la gamme de 50% à 100% de probabilité d'affectation dans la bonne classe morphologique.



**Figure 47 :** Résultats des prédictions par LDA à partir des concentrations initiales en ions.

A = agrégé (rouge), SA = semi-agrégé (noir) et F= fluide (vert).

Il semble donc que les ions dissous dans le milieu ne soient pas entièrement responsables des changements morphologiques observés et qu'un ou plusieurs autre(s) paramètre(s) ont variés entre nos différentes fioles de pré-cultures.

### 3.3 Propagation en bioréacteurs

Malgré l'échec à comprendre et prédire l'influence de la composition du milieu initial sur la morphologie, nous avons réalisé une étude appliquée pour tester la possibilité d'extrapolation de cette méthode et juger de l'intérêt d'une morphologie fluide de *R. oryzae* en bioréacteur.

Deux milieux testés en fiole et montrant de fortes prédictions par la technique LDA implémentée sur les données de produits, ont été sélectionnés pour être testés en bioréacteur de 1,2 L :

- Un milieu présentant une forte probabilité d'attribution à la classe agrégée (exp n°5, Figure 45, fiole E manip 1) ; et
- Un milieu présentant une forte probabilité d'attribution à la classe fluide (exp n°15, Figure 45, fiole D manip 2).

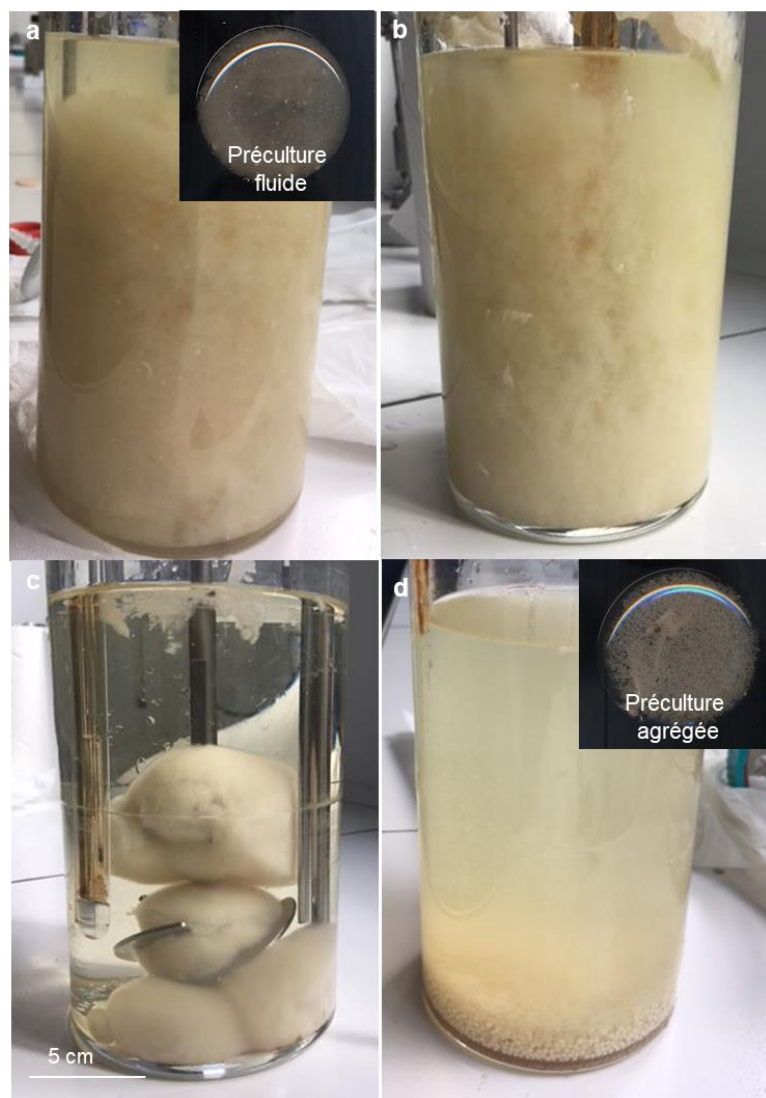
Chaque culture a été réalisée en doublon, avec deux types d'ensemencement différents :

- Soit par une pré-culture de 24h dans le même milieu (a et d, Figure 48),
- Soit par ensemencement direct des conidies, avec un même nombre de conidies (et non une même concentration, pour fournir le même nombre d'objets initiaux) que l'ensemencement des fioles de pré-cultures (b et c, Figure 48).

En pré-cultures, qui ont reproduit à l'identique les expériences en fioles sélectionnées, *R.oryzae* montre les deux morphologies prédites, fluide et agrégée. Cependant la morphologie agrégée varie d'une forme fortement compacte dans les expériences initiales à une forme pellet qui n'avait pas encore été observée jusqu'à présent.

En bioréacteur, *R.oryzae* a donc montré trois types de morphologies finales :

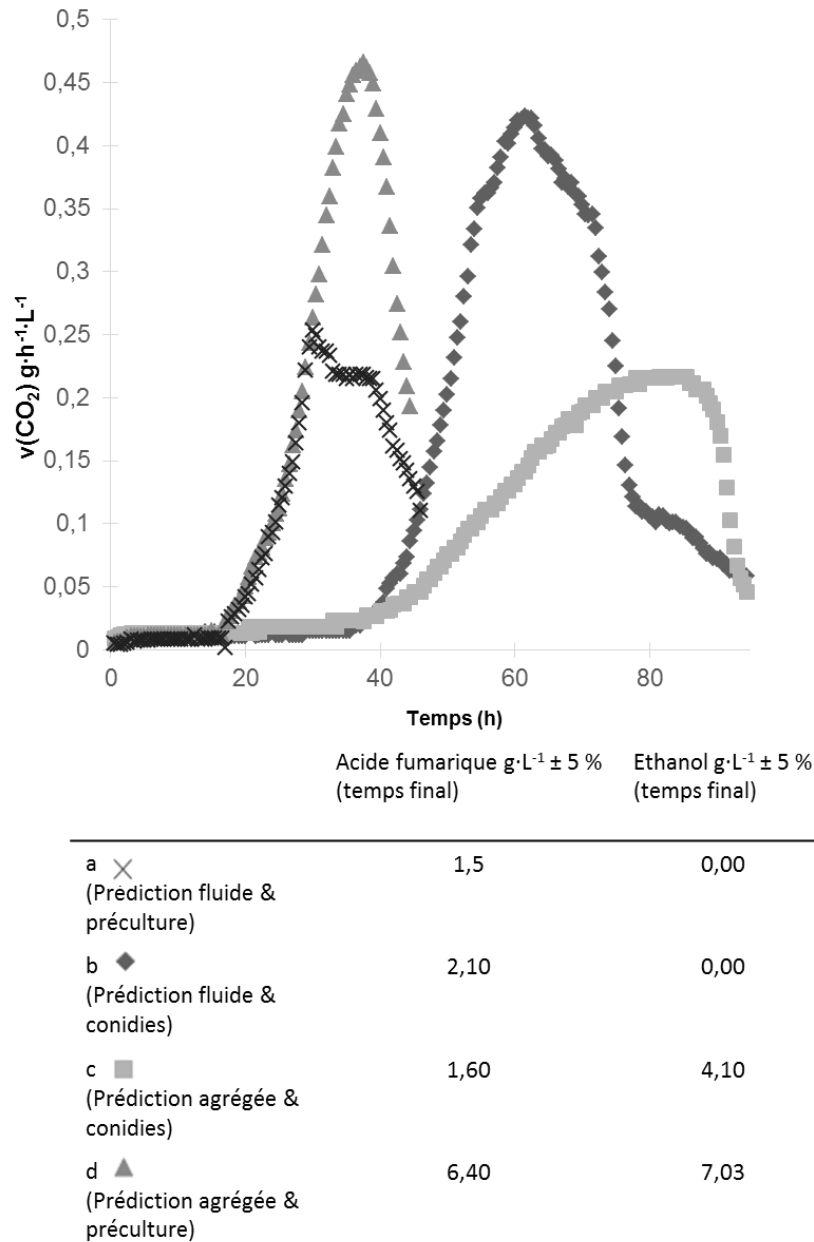
- Fluide lorsque le milieu choisi était fortement prédit dans la classe fluide par la LDA, que ce soit par ensemencement direct et par pré-culture (a et b, Figure 48) ;
- Très agrégée lors d'un ensemencement par conidies dans un milieu fortement prédit comme milieu agrégé par la LDA (c, Figure 48) ;
- En petites pellets lors d'un ensemencement par pré-culture (agrégée en pellets) dans un milieu fortement prédit comme milieu agrégé par la LDA (d, Figure 48).



**Figure 48** : Morphologies de *R.oryzae* en bioréacteurs : scale-up d'expériences en fioles fortement prédites par la méthode LDA.

a : Prédiction fluide et pré-culture, b : Prédiction fluide et conidies, c : Prédiction agrégée et pré-culture, d : Prédiction agrégée et pré-culture.





**Figure 49** : Vitesse de production de CO<sub>2</sub> et concentrations finales en acide fumarique et en éthanol lors des cultures de *R. oryzae* en bioréacteur.

Dans les bioréacteurs ayant étéensemencés par conidies, le champignon montre un comportement morphologique identique à celui observé en fiole. Lorsque la morphologie est fluide, la production de biomasse semble favorisée par les conditions aérobies et la production est déplacée en faveur de l'acide fumarique, l'éthanol n'étant pas produit (les prélèvements en biomasse des morphologies agrégées n'est pas réalisable de manière homogène). La morphologie agrégée présente des résultats inverse, une vitesse plus faible de production de CO<sub>2</sub> et une production d'éthanol favorisée par rapport à l'acide fumarique liée probablement à la limitation en O<sub>2</sub>.

En ce qui concerne les bioréacteurs ensemencés par pré-culture, la vitesse de production de CO<sub>2</sub> est moins importante dans le cas d'une morphologie fluide et les productions en acide fumarique sont identiques pour les deux morphologies (fluide et agrégée). Cependant l'éthanol n'est pas produit, une fois de plus, par la morphologie fluide de *R. oryzae*.

### 3.4 Conclusion

Notre objectif initial était de pouvoir déterminer les concentrations et la nature des ions, réellement mesurés dans le milieu de culture, responsables des morphologies observées chez le champignon *R. oryzae*. Un criblage en fioles de pré-cultures a permis d'alimenter un set de données représentatives du métabolisme du champignon, en fonction de ces trois morphologies (fluide, semi-agrégée, agrégée).

Dans un premier temps nous avons observé, par des statistiques descriptives, que la production d'éthanol paraissait être liée à la morphologie agrégée alors que la production d'acide fumarique à la morphologie fluide. Ces deux produits pouvaient alors constituer des réponses intéressantes pour établir un modèle prédictif.

L'analyse discriminante linéaire (LDA) est fréquemment utilisée dans la modélisation et la classification de données de grande dimension, considérée comme une méthode de référence. De plus, celle-ci prend en compte la classification des données, et est plus adaptée à une recherche de corrélation et de prédiction entre des données quantitatives mesurées et des résultats qualitatifs (morphologie). Cette méthode de modélisation, alimentée par les données de production du champignon (éthanol et acide fumarique), a montré que 35 expériences sur 44 pouvaient être prédites dans la classe morphologique observée. Ainsi le choix de la méthode s'est avéré pertinent, la méthode prédit bien les expérimentations ayant servies à la création du modèle. Cependant, nous n'avons pas réussi à lier directement la morphologie obtenue à la composition initiale en sels du milieu de culture. Ce résultat pose des questions sur de possibles paramètres supplémentaires ayant variés, initialement, entre les expériences.

En effet, une supplémentation en sels a aussi un effet sur le pH et sur l'équilibre des autres ions en solution, ainsi que sur la formation de précipités. Concernant le pH, nous avons choisi de l'ajuster après stérilisation par un ajout d'un volume d'ammoniaque identique dans chaque fiole, afin de s'assurer que la quantité d'azote était identique dans toutes les fioles. Le pH était alors légèrement différent à l'ensemencement, ce que nous avons pris en compte dans la LDA, sans succès. Il pourrait être intéressant, à l'inverse, d'inclure le pH dans le plan d'expériences afin de cribler une plage plus large, ce qui permettrait peut-être d'observer plus facilement l'effet du pH initial. Concernant la stérilisation, les milieux ont été stérilisés à l'autoclave ce qui a pu engendrer des montées en température ayant également un impact sur les milieux (notamment précipiter des espèces). Ce choix de stérilisation est justifié par le fait qu'une filtration aurait pu retenir des précipités déjà observés au moment de la préparation des fioles fortement concentrées en minéraux. Les concentrations initiales en ions auraient donc été modifiées. Nous avons préféré subir ces précipités et mesurer les concentrations réelles des ions en solution à T0, valeurs qui ont été utilisées pour l'analyse statistique, sans succès aussi. Quitte à subir et remesurer la concentration initiale, il pourrait être intéressant de stériliser les milieux par filtration pour tester des compositions différentes de celles obtenus après autoclave.

Enfin, une propagation de *R.oryzae* en bioréacteur a été mise en œuvre dans des milieux de culture présentant de fortes prédiction par la modélisation LDA. Cette méthode a ainsi permis de contrôler la morphologie du champignon aussi bien en fioles de pré-cultures qu'en bioréacteurs.



## Conclusion générale et perspectives

---

*Les différentes recherches menées dans le cadre de cette thèse ont permis de développer des techniques et des outils valorisables dans le domaine de la recherche fondamentale pour mieux comprendre et cerner les comportements morphologiques agrégés des champignons filamenteux. La mise en œuvre de ces outils ont déjà permis dans cette étude d'apporter des points de discussion sur les mécanismes d'agrégation décrits dans la littérature.*

*Ces techniques ont également été testées dans un processus de changement d'échelle et certaines ont montré des résultats exploitables à des fins industrielles.*

Sur la base d'études bibliographiques et d'un criblage initial des facteurs influents sur la morphologie, nous avons conclu et effectivement observé que deux stades d'agrégations pendant la croissance semblaient dominer au sein des espèces : un stade précoce avant germination par agglomération des conidies (coagulation) et un stade plus avancé par fusion des hyphes (non-coagulation). Au cours de ce criblage, parmi les quatre souches choisies dans cette étude, deux d'entre elles ont montré des comportements typiques témoins de ces mécanismes.

L'utilisation de la technique MEC, qui consiste à l'addition de microparticules au milieu de culture, a confirmé que ces deux principaux mécanismes de formation des agrégats mycéliens semblaient effectivement se distinguer en fonction des souches étudiées. La souche *A. oryzae* étudiée, témoin du mécanisme de coagulation, a montré une transition morphologique fluide après 24 h de croissance en présence de microparticules de talc. Cette morphologie fluide a été maintenue lors du transfert de la souche en milieu exempt de talc. La souche *R. oryzae*, témoin du mécanisme de non-coagulation, n'a montré aucun changement morphologique à la suite de l'ajout de talc.

Nous avons alors cherché à mieux cerner l'effet des microparticules de talc sur les conidies, qui pourraient agir selon un mode d'action physique (par dispersion des conidies) ou chimique (par modification de la composition du milieu).

La microfluidique, technique récemment mise en œuvre en biologie, nous a semblé pouvoir s'appliquer à cette démarche de compréhension. Elle permet l'isolement d'objets les uns des autres, en s'affranchissant de tout contact physique entre eux. Ainsi, les conidies ont été encapsulées au sein de gouttes de milieu de culture classique (non-modifié chimiquement) pendant leur germination (technique EGM). Une fois de plus, les deux mécanismes d'agrégation ont été observés. La souche *A. oryzae* étudiée, soumise à l'EGM, a montré une morphologie fluide mais pas la souche *R. oryzae*. La séparation des conidies pendant la germination permet la croissance d'*A. oryzae* selon une morphologie fluide. Nous avons ainsi apporté la preuve que l'effet du talc est principalement d'ordre physique, il disperse les conidies dans le milieu de culture.

Cependant, ces deux techniques ont aussi montré des résultats plus complexes à analyser lorsqu'elles sont appliquées aux autres souches étudiées.

L'espèce *A. niger*, très étudiée dans la littérature, est classée dans les souches coagulantes (comme *A. oryzae*) depuis les premières descriptions des mécanismes d'agrégation. Cependant, la dispersion des conidies par la technique MEC ou par la technique

EGM n'a pas entraîné de transition morphologique fluide pour cette souche. Nous pensons donc que l'espèce *A. niger*, bien que classée parmi les types coagulants, présente également la faculté de s'agréger selon un type non-coagulant, entre hyphes.

Concernant *A. terreus*, même si l'agrégation de cette espèce n'est pas clairement décrite selon un des mécanismes, la littérature et nos observations montrent une forte coagulation des conidies avant germination. Pourtant la souche étudiée a montré, comme pour *A. niger*, une réagrégation des hyphes obtenues suite aux deux techniques MEC et EGM. Nous supposons donc une fois encore que cette espèce soit capable de plusieurs stades d'agréations, aussi bien pendant la germination que pendant la croissance des hyphes.

Les applications en bioréacteurs de ces deux méthodes ont par ailleurs montré des différences. La souche *A. oryzae* maintient une morphologie fluide en bioréacteur ensemencé par pré-culture MEC (fluide). Ceci a dans un premier temps confirmé que la souche n'avait pas la capacité de s'agréger par fusion des hyphes, la déstabilisation des conidies semblait suffisante à l'obtention et à la conservation d'une morphologie fluide. Cependant, la souche *A. oryzae* ensemencée en bioréacteur par pré-culture EGM fluide a montré une réagrégation. Les conditions de propagation (type et taux d'ensemencement et d'agitation, température, volume et composition du milieu de culture) ont pourtant été strictement identiques.

Il serait intéressant d'effectuer des expériences complémentaires sur ces méthodes. Différents temps de germination en émulsion pourraient mettre en évidence plusieurs stades d'agréations des conidies, pour une même souche ou en fonction des différentes souches testées. Aussi, le temps de pré-culture MEC et EGM avant ensemencement des bioréacteurs étant légèrement variable entre les deux méthodes, cette étape pourrait être d'avantage investiguée.

D'autre part, ces deux techniques de dispersion des conidies en milieu liquide n'ont pas eu d'impact sur la souche *R. oryzae*. Ceci est en accord avec le mécanisme d'agrégation non-coagulant.

C'est pourquoi nous avons investigué une troisième méthode, visant cette fois à maintenir les hyphes dispersées dans le milieu de culture tout au long de la croissance. Cette méthode est basée sur la modification de la composition chimique du milieu de culture, en modifiant en particulier la teneur en calcium et magnésium. Nous avons ainsi obtenu des variations morphologiques de cette souche, d'un état classiquement agrégé à deux états : semi-agrégé et fluide.

Nous avons cherché à comprendre l'effet des sels de calcium et de magnésium sur la morphologie de cette souche. Pour cela, un criblage impliquant quatre combinaisons en quatre sels nous a permis l'accès à un grand nombre de données quantitatives, reliées aux résultats qualitatifs de la morphologie. Les productions (éthanol et acide fumarique), la consommation en sucre et la formation de biomasse ont rapidement montré des corrélations claires par analyses statistiques descriptives. Mais notre objectif de départ était de décrire des corrélations entre la composition initiale du milieu et les morphologies finales.

Il existe plusieurs méthodes statistiques classiquement utilisées dans les problèmes de discrimination et de classement, telle que l'analyse discriminante, la régression logistique ou encore la segmentation (arbres de discrimination). En pratique, l'analyse discriminante linéaire (LDA) est fréquemment utilisée. Cette méthode est jugée pertinente et robuste dans la

modélisation et la classification de données de grande dimension de natures quantitatives et qualitatives. La LDA a effectivement montré des résultats pertinents quant à la corrélation des données du métabolisme avec la morphologie. Cependant, nous n'avons pas pu aboutir à l'objectif ambitieux d'établir des liens concrets entre la composition initiale du milieu de culture et les morphologies observées. Il apparaît donc clairement que les concentrations en calcium, magnésium, sulfate, et chlorure ne peuvent pas à elles seules expliquer la morphologie observée. D'autres paramètres non identifiés, que nous souhaitons (quasiment) constants, sont donc impliqués dans ces changements morphologiques, et certains choix que nous avons faits sur la méthode de préparation pourraient être réévalués à la lumière de ce résultat. De manière générale, nos résultats invitent à agrandir la plage d'étude et à faire varier d'autres paramètres impliqués dans cette étude. Ces nouveaux paramètres, pris en compte dans la technique LDA, pourraient alors permettre d'expliquer les changements morphologiques observés à partir de la composition réelle et initiale du milieu de culture. De plus, le caractère prédictif d'une modélisation ne pourra être validé qu'à condition d'expérimenter des conditions de culture différentes de celles utilisées pour construire le modèle, et de comparer les résultats aux prédictions.

Nous supposons donc que les souches *A. niger* et *A. terreus* étudiées présentent deux stades d'agrégation, par contact entre conidies et par contact entre hyphes. Nous avons montré l'efficacité de méthodes qui permettent de s'affranchir de ces deux stades. Pour s'assurer alors du maintien d'une morphologie fluide pour ces souches, la combinaison de ces méthodes entre elles pourrait être une solution appropriée.

Les méthodes décrites précédemment, nous ont permis d'éclaircir les différents comportements morphologiques observés sur les quatre souches étudiées, mais ont également été mis en œuvre dans un schéma de propagation propre aux conditions industrielles.

La morphologie fluide d'*A. oryzae* a ainsi été conservée lors de l'ensemencement d'un bioréacteur de milieu classique, à partir d'une pré-culture de talc. Cette culture a montré des avantages non négligeables pour une culture industrielle, comparé à la culture témoin de morphologie type pellets. Alors qu'en morphologie pellets, la taille des pellets dépend de l'historique de la culture et est subie au cours de la propagation, la morphologie fluide peut être maintenue constante lors de la propagation, et facilite les transferts. De plus, la morphologie fluide a montré une biomasse ayant une meilleure assimilation de l'oxygène et du glucose. Ceci permet concrètement de diminuer la durée de croissance du micro-organisme d'un facteur deux.

Des avantages similaires ont été montrés en fiole de culture suite à l'utilisation de la microfluidique. La culture fluide obtenue en fiole par transfert des conidies germées en émulsion montre une meilleure assimilation du glucose. Même si la propagation en bioréacteur nécessite encore une optimisation de la méthode, l'encapsulation de conidies de champignons filamenteux à une vitesse de 400 objets par seconde pourrait s'appliquer pour le contrôle morphologique à plus grande échelle, d'autant plus que la propagation « fiole en fiole » a montré que le volume de pré-culture peut être facilement augmenté.

Enfin, la propagation en bioréacteur de *R. oryzae* dont la morphologie a considérablement variée lors de l'ajout de sels en milieu défini, a montré des résultats potentiellement intéressants pour une future étape de production. Nous avons montré que sa

forme agrégée, difficilement mis en œuvre, produit de l'éthanol en grande quantité mais peu d'acide fumarique. La morphologie fluide, à l'inverse, présente un métabolisme favorable à la production d'acide fumarique et sans production d'éthanol. Ces changements métaboliques sont la preuve que la morphologie agrégée diminue l'accès à l'oxygène et amène les cellules de champignons dans un état de stress. Aussi, la limitation de coproduit (éthanol) pendant la culture fluide est un avantage considérable pour maximiser le rendement de conversion du substrat en acide fumarique. Dans une étude complémentaire, il pourrait être très intéressant de tester cette technique pour la mise en œuvre d'autres souches décrites comme non-coagulantes, par exemple *P. chrysogenum* ou *A. nidulans*.

*En conclusion, les travaux menés au cours de cette thèse ont fait progresser la compréhension des morphologies agrégées des champignons filamenteux. Nous avons apporté de nouveaux outils dont les applications actuelles et futures permettraient d'établir un nouveau schéma explicatif de ces morphologies. L'obtention de morphologies fluides, maintenues lors des premières étapes de mise à l'échelle, montre également le potentiel d'applications industrielles pour ces techniques.*



## Références

- Abe, Shigeo; Furuya, Akira; Tokyo; Takeshi, Saito; Sagamigahara-shi; Ken'ichiro, Takayama (1960) Method for producing L-malic acid by fermentation. Brevet 3,063,910.
- Académie des technologies (2014) Biotechnologies blanches et biologie de synthèse, consulté le 9 février 2017.
- Adl, Sina M.; Simpson, Alastair G. B.; Farmer, Mark A.; Andersen, Robert A.; Anderson, O. Roger; Barta, John R. et al. (2005) The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. In : The Journal of eukaryotic microbiology, vol. 52, n° 5, p. 399–451. DOI: 10.1111/j.1550-7408.2005.00053.x.
- Agbogbo, Frank K.; Coward-Kelly, Guillermo (2008) Cellulosic ethanol production using the naturally occurring xylose-fermenting yeast, *Pichia stipitis*. In : Biotechnology Letters, vol. 30, n° 9, p. 1515–1524. DOI: 10.1007/s10529-008-9728-z.
- Amanullah, A.; Leonildi, E.; Nienow, A.; Thomas, C. (2001) Dynamics of mycelial aggregation in cultures of *Aspergillus oryzae*. In : Bioprocess and Biosystems Engineering, vol. 24, n° 2, p. 101–107. DOI: 10.1007/s004490100235.
- Angumeenal, A. R.; Venkappayya, D. (2013) An overview of citric acid production. In : LWT - Food Science and Technology, vol. 50, n° 2, p. 367–370. DOI: 10.1016/j.lwt.2012.05.016.
- Battat, E.; Peleg, Y.; Bercovitz, A.; Rokem, J. S.; Goldberg, I. (1991) Optimization of L-malic acid production by *Aspergillus flavus* in a stirred fermentor. In : Biotechnology and bioengineering, vol. 37, n° 11, p. 1108–1116. DOI: 10.1002/bit.260371117.
- Baudot, Patrick; Bley, Daniel; Brun, Bernard; Pagezy, Hélène; Vernazza-Licht, Nicole (1997) Impact de l'Homme sur les milieux naturels : perceptions et mesures.
- Ben Chaabane, Fadhel; Chaussepied, Bernard (2016) Process for the continuous production of cellulases by a filamentous fungus using a carbon substrate obtained from an acid pretreatment. Brevet 9249402 B2.
- Beneyton, Thomas; Wijaya, I. Putu Mahendra; Postros, Prexilia; Najah, Majdi; Leblond, Pascal; Couvent, Angélique et al. (2016) High-throughput screening of filamentous fungi using nanoliter-range droplet-based microfluidics. In : Scientific reports, vol. 6, p. 27223. DOI: 10.1038/srep27223.
- Bennett, Joan W (2010) An overview of the genus *Aspergillus*. In : Molecular biology and genomics, consulté le 20 juin 2018.
- Beopoulos, Athanasios; Cescut, Julien; Haddouche, Ramdane; Uribe Larrea, Jean-Louis; Molina-Jouve, Carole; Nicaud, Jean-Marc (2009) *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. In : Progress in lipid research, vol. 48, n° 6, p. 375–387. DOI: 10.1016/j.plipres.2009.08.005.
- Berovic, Marin; Legisa, Matic (2007) Citric acid production. In : M. Raafat El-Gewely, coord.: Biotechnology Annual Review, 13<sup>e</sup> tome: Elsevier, p. 303–343.

- Bizukoje, M.; Ledakowicz, S. (2010) The morphological and physiological evolution of *Aspergillus terreus* mycelium in the submerged culture and its relation to the formation of secondary metabolites. In : World Journal of Microbiology and Biotechnology, vol. 26, n° 1, p. 41–54. DOI: 10.1007/s11274-009-0140-1.
- Bowman, Shaun M.; Free, Stephen J. (2006) The structure and synthesis of the fungal cell wall. In : BioEssays, vol. 28, 2006, p. 799–808.
- Bozell, Joseph J.; Petersen, Gene R. (2010) Technology development for the production of biobased products from biorefinery carbohydrates—the US Department of Energy’s “Top 10” revisited. In : Green Chemistry, vol. 12, n° 4, p. 539. DOI: 10.1039/b922014c.
- Braun, Sergei; Vecht-Lifshitz, Susan E. (1991) Mycelial morphology and metabolite production. In : Trends in Biotechnology, vol. 9, p. 63–68, consulté le 28 septembre 2017.
- Brown, Stephen H.; Bashkirova, Lena; Berka, Randy; Chandler, Tyler; Doty, Tammy; McCall, Keith et al. (2013) Metabolic engineering of *Aspergillus oryzae* NRRL 3488 for increased production of L-malic acid. In : Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 97, n° 20, p. 8903–8912. DOI: 10.1007/s00253-013-5132-2.
- Büchs, Jochen; Maier, Ulrike; Milbradt, Claudia; Zoels, Bernd (2000) Power consumption in shaking flasks on rotary shaking Machines. In : Biotechnology and bioengineering, vol. 69, n° 6, consulté le 25 janvier 2017.
- Calam, Christopher Towers; Oxford, Albert Edward; Raistrick, Harold (1939) Studies in the biochemistry of micro-organisms. Itaconic acid, a metabolic product of a strain of *Aspergillus terreus*. In : Biochemical journal, vol. 33, n° 9, p. 1488–1495, consulté le 10 juillet 2018.
- Carlsen, Morten; Spohr, Anders B.; Nielsen, Jens; Villadsen, John (1996) Morphology and physiology of an [alpha]-amylase producing strain of *Aspergillus oryzae* during batch cultivations. In : Biotechnology & Bioengineering, vol. 49, p. 266–276, consulté le 8 août 2018.
- Clausell-Tormos, Jenifer; Lieber, Diana; Baret, Jean-Christophe; El-Harrak, Abdeslam; Miller, Oliver J.; Frenz, Lucas et al. (2008) Droplet-based microfluidic platforms for the encapsulation and screening of Mammalian cells and multicellular organisms. In : Chemistry & biology, vol. 15, n° 5, p. 427–437. DOI: 10.1016/j.chembiol.2008.04.004.
- Cooper, Jasmin; Stamford, Laurence; Azapagic, Adisa (2016) Shale Gas. A Review of the Economic, Environmental, and Social Sustainability. In : Energy Technology, vol. 4, n° 7, p. 772–792. DOI: 10.1002/ente.201500464.
- Cronenberg, C.C.H; Ottengraf, S.P.P; van den Heuvel, J.C; Pottel, F; Ziele, D; Shügerl, K; Bellgardt, K.H (1994) Influence of age and structure of *Penicillium chrysogenum* pellets on the internal concentration profiles. In : Bioprocess Engineering, vol. 10, p. 209–216, consulté le 2 novembre 2017.
- Cundell, A.M; Mueller, W.C; Traxler, R.W (1976) Morphology and ultrastructure of a *Penicillium sp.* grown on n-hexadecane or peptone. In : Applied and environmental microbiology, vol. 31, p. 408–414, consulté le 7 août 2018.

Currie, James N. (1917) The citric acid fermentation of *Aspergillus niger*. In : Journal of biological chemistry, vol. 31, p. 15–37, consulté le 4 avril 2018.

de Vries, Onno M. H.; Fekkes, M. Peter; Wösten, Han A. B.; Wessels, Joseph G. H. (1993) Insoluble hydrophobin complexes in the walls of *Schizophyllum commune* and other filamentous fungi. In : Archives of Microbiology, vol. 159, n° 4, p. 330–335. DOI: 10.1007/BF00290915.

Desfougeres, Thomas; Pignede, Georges (2015) Souches de levure aptes à métaboliser le xylose et résistantes aux inhibiteurs, procédés d'obtention et utilisation. Brevet EP 2855711 B1.

Dien, B. S.; Cotta, M. A.; Jeffries, T. W. (2003) Bacteria engineered for fuel ethanol production: current status. In : Applied microbiology and biotechnology, vol. 63, n° 3, p. 258–266. DOI: 10.1007/s00253-003-1444-y.

Dien, B.S; Bothast, R.J (2009) The Alcohol Text Book. A primer for lignocellulose biochemical conversion to fuel ethanol. Avec la collaboration de Ingledew, WM, Kelsall, DR, Austin, GD and Kluhspies, C. 5<sup>e</sup> édition, consulté le 10 août 2018.

Driouch, Habib; Roth, Andreas; Dersch, Petra; Wittmann, Christoph (2014) Filamentous fungi in good shape: Microparticles for tailor-made fungal morphology and enhanced enzyme production. In : Bioengineered bugs, vol. 2, n° 2, p. 100–104. DOI: 10.4161/bbug.2.2.13757.

Driouch, Habib; Sommer, Becky; Wittmann, Christoph (2010) Morphology engineering of *Aspergillus niger* for improved enzyme production. In : Biotechnology and bioengineering, vol. 105, n° 6, p. 1058–1068. DOI: 10.1002/bit.22614.

Droulers, Martine; Carrizo, Silvina (2010) Stratégies agro-industrielles autour de la filière des biocarburants au Brésil et en Argentine. In : Revue Géographique de l'Est, vol. 50, p. 3–4, consulté le 1 août 2018.

Du, Lian-Xiang; Jia, Su-Juan; Lu, Fu-Ping (2003) Morphological changes of *Rhizopus chinensis* 12 in submerged culture and its relationship with antibiotic production. In : Process Biochemistry, vol. 38, n° 12, p. 1643–1646. DOI: 10.1016/S0032-9592(02)00089-4.

Dynesen, Jens; Nielsen, Jens (2003) Surface hydrophobicity of *Aspergillus nidulans* conidiospores and its role in pellet formation. In : Biotechnology progress, vol. 19, n° 3, p. 1049–1052. DOI: 10.1021/bp0340032.

Eisenman, Helene C.; Casadevall, Arturo (2012) Synthesis and assembly of fungal melanin. In : Applied microbiology and biotechnology, vol. 93, n° 3, p. 931–940. DOI: 10.1007/s00253-011-3777-2.

Elander, R. P. (2003) Industrial production of beta-lactam antibiotics. In : Applied microbiology and biotechnology, vol. 61, n° 5-6, p. 385–392. DOI: 10.1007/s00253-003-1274-y.

Ferraboschi, Patrizia; Casati, Silvana; Grisenti, Paride; Santaniello, Enzo (1994) Selective Enzymatic Transformations of Itaconic Acid Derivatives: An Access to Potentially Useful Building Blocks. In : Tetrahedron, vol. 50, n° 10, p. 3251–3258, consulté le 10 août 2018.

- Fisher, D. J. (1973) Charges on fungal spores. In : *Pesticide Science*, vol. 4, n° 6, p. 845–860. DOI: 10.1002/ps.2780040612.
- Fromentin, A; Biollay, F; Dauriat, A; Lucas-Porta, H; Marchand, J-D; Sarlos, G (2000) Caractérisation de filière de production de bioéthanol dans le contexte helvétique. Avec la collaboration de Ecole polytechnique fédérale de lausanne. Office fédéral de l'énergie, consulté le 1 août 2018.
- Gadd, Geoffrey M.; Rome, Louise de (1988) Biosorption of copper by fungal melanin. In : *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 29, n° 6, p. 610–617. DOI: 10.1007/BF00260993.
- Galbraith, J. C.; Smith, J. E. (1969) Filamentous growth of *Aspergillus niger* in submerged shake culture. In : *Transactions of the British Mycological Society*, vol. 52, n° 2, p. 237–246. DOI: 10.1016/S0007-1536(69)80036-7.
- Gao, Difeng; Zeng, Jijiao; Yu, Xiaochen; Dong, Tao; Chen, Shulin (2014) Improved lipid accumulation by morphology engineering of oleaginous fungus *Mortierella isabellina*. In : *Biotechnology and bioengineering*, vol. 111, n° 9, p. 1758–1766. DOI: 10.1002/bit.25242.
- Gauder, Martin; Graeff-Hönninger, S.; Claupein, W. (2011) The impact of a growing bioethanol industry on food production in Brazil. In : *Applied Energy*, vol. 88, n° 3, p. 672–679. DOI: 10.1016/j.apenergy.2010.08.020.
- Gerin, P. A.; Dufrene, Y.; Bellon-Fontaine, M. N.; Asther, M.; Rouxhet, P. G. (1993) Surface properties of the conidiospores of *Phanerochaete chrysosporium* and their relevance to pellet formation. In : *Journal of Bacteriology*, vol. 175, n° 16, p. 5135–5144. DOI: 10.1128/jb.175.16.5135-5144.1993.
- Gibbs, P. A.; Seviour, R. J.; Schmid, F. (2000) Growth of filamentous fungi in submerged culture: problems and possible solutions. In : *Critical reviews in biotechnology*, vol. 20, n° 1, p. 17–48. DOI: 10.1080/07388550091144177.
- Goldberg, Israel; Rokem, J. Stefan; Pines, Ophry (2006) Organic acids. Old metabolites, new themes. In : *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, vol. 81, n° 10, p. 1601–1611. DOI: 10.1002/jctb.1590.
- Gonciarz, J.; Bizukoje, M. (2014) Adding talc microparticles to *Aspergillus terreus* ATCC 20542 preculture decreases fungal pellet size and improves lovastatin production. In : *Engineering in Life Sciences*, vol. 14, n° 2, p. 190–200. DOI: 10.1002/elsc.201300055.
- Grimm, L. H.; Kelly, S.; Hengstler, J.; Göbel, A.; Krull, R.; Hempel, D. C. (2004) Kinetic studies on the aggregation of *Aspergillus niger* conidia. In : *Biotechnology and bioengineering*, vol. 87, n° 2, p. 213–218. DOI: 10.1002/bit.20130.
- Grimm, L. H.; Kelly, S.; Krull, R.; Hempel, D. C. (2005) Morphology and productivity of filamentous fungi. In : *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 69, n° 4, p. 375–384. DOI: 10.1007/s00253-005-0213-5.

- Grinberg; Heath (1997) Direct evidence for Ca<sup>2+</sup> regulation of hyphal branch induction. In : Fungal genetics and biology : FG & B, vol. 22, n° 2, p. 127–139. DOI: 10.1006/fgbi.1997.1011.
- Harris, S. D. (2008) Branching of fungal hyphae. Regulation, mechanisms and comparison with other branching systems. In : Mycologia, vol. 100, n° 6, p. 823–832. DOI: 10.3852/08-177.
- Hendriksen, Hanne V.; Kornbrust, Beate A.; Østergaard, Peter R.; Stringer, Mary A. (2009) Evaluating the potential for enzymatic acrylamide mitigation in a range of food products using an asparaginase from *Aspergillus oryzae*. In : Journal of agricultural and food chemistry, vol. 57, n° 10, p. 4168–4176. DOI: 10.1021/jf900174q.
- Hibbett, David S.; Binder, Manfred; Bischoff, Joseph F.; Blackwell, Meredith; Cannon, Paul F.; Eriksson, Ove E. et al. (2007) A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. In : Mycological research, vol. 111, n° Pt 5, p. 509–547. DOI: 10.1016/j.mycres.2007.03.004.
- Hille, A.; Neu, T. R.; Hempel, D. C.; Horn, H. (2009) Effective diffusivities and mass fluxes in fungal biopellets. In : Biotechnology and bioengineering, vol. 103, n° 6, p. 1202–1213. DOI: 10.1002/bit.22351.
- Holtze, C.; Rowat, A. C.; Agresti, J. J.; Hutchison, J. B.; Angilè, F. E.; Schmitz, C. H. J. et al. (2008) Biocompatible surfactants for water-in-fluorocarbon emulsions. In : Lab on a chip, vol. 8, n° 10, p. 1632–1639. DOI: 10.1039/b806706f.
- Hyde, Geoffrey J.; Heath, I. Brent (1997) Ca<sup>2+</sup> Gradients in Hyphae and Branches of *Saprolegnia ferax*. In : Fungal Genetics and Biology, vol. 21, n° 2, p. 238–251. DOI: 10.1006/fgbi.1997.0978.
- Jarry, Alain; Seraudie, Yolaine (1995) Production of itaconic acid by fermentation. Brevet 5,457,040.
- Jones, Laura A.; Sudbery, Peter E. (2010) Spitzenkorper, exocyst, and polarisome components in *Candida albicans* hyphae show different patterns of localization and have distinct dynamic properties. In : Eukaryotic cell, vol. 9, n° 10, p. 1455–1465. DOI: 10.1128/EC.00109-10.
- Ju, Lu Kwang; Lee, Jaw F.; Armiger, William B. (1991) Enhancing oxygen transfer in bioreactors by perfluorocarbon emulsions. In : Biotechnology Progress, vol. 7, n° 4, p. 323–329. DOI: 10.1021/bp00010a006.
- B. S. Kamel, Y. Kakuda, éds. (2012) Technological Advances in Improved and Alternative Sources of Lipids. Boston, MA : Springer Verlag.
- Karaffa, Levente; Kubicek, Christian P. (2003) *Aspergillus niger* citric acid accumulation: do we understand this well working black box? In : Applied microbiology and biotechnology, vol. 61, n° 3, p. 189–196. DOI: 10.1007/s00253-002-1201-7.
- Kaup, B.-A.; Ehrich, K.; Pescheck, M.; Schrader, J. (2008) Microparticle-enhanced cultivation of filamentous microorganisms: Increased chloroperoxidase formation by *Caldariomyces fumago* as an example. In : Biotechnology and bioengineering, vol. 99, n° 3, p. 491–498. DOI: 10.1002/bit.21713.

Keller, Nancy P.; Turner, Geoffrey; Bennett, Joan W. (2005) Fungal secondary metabolism - from biochemistry to genomics. In : Nature reviews. Microbiology, vol. 3, n° 12, p. 937–947. DOI: 10.1038/nrmicro1286.

Klis FM; Boorsma A; De Groot PW (2006) Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. In : Yeast, vol. 23, 2006, n° 0749-503X, p. 183–202.

Koibuchi, K.; Nagasaki, H.; Yuasa, A.; Kataoka, J.; Kitamoto, K. (2000) Molecular cloning and characterization of a gene encoding glutaminase from *Aspergillus oryzae*. In : Applied microbiology and biotechnology, vol. 54, n° 1, p. 59–68. DOI: 10.1007/s002530000329.

Krull, Rainer; Cordes, Christiana; Horn, Harald; Kampen, Ingo; Kwade, Arno; Neu, Thomas R.; Nortemann, Bernd (2010) Morphology of filamentous fungi: linking cellular biology to process engineering using *Aspergillus niger*. In : Advances in biochemical engineering/biotechnology, vol. 121, p. 1–21. DOI: 10.1007/10\_2009\_60.

Krull, Rainer; Cordes, Christiana; Horn, Harald; Kampen, Ingo; Kwade, Arno; Neu, Thomas R.; Nörtemann, Bernd (2010) Morphology of filamentous fungi: linking cellular biology to process engineering using *Aspergillus niger*. In : Advances in biochemical engineering/biotechnology, vol. 121, p. 1–21.

Krull, Rainer; Wucherpfennig, Thomas; Esfandabadi, Manely Eslahpazir; Walisko, Robert; Melzer, Guido; Hempel, Dietmar C. et al. (2013) Characterization and control of fungal morphology for improved production performance in biotechnology. In : Journal of biotechnology, vol. 163, n° 2, p. 112–123. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2012.06.024.

Kuenz, Anja; Gallenmuller, Yvonne; Willke, Thomas; Vorlop, Klaus-Dieter (2012) Microbial production of itaconic acid: developing a stable platform for high product concentrations. In : Applied microbiology and biotechnology, vol. 96, n° 5, p. 1209–1216. DOI: 10.1007/s00253-012-4221-y.

Lévy, Nicolas (2009) Energie renouvelable. les ressources végétales renouvellent la chimie. Avec la collaboration de ENS/DESCO/CEA. INRA, éd. En ligne : <http://culturesciences.chimie.ens.fr/node/1206>.

Liao, Wei; Liu, Yan; Frear, Craig; Chen, Shulin (2007) A new approach of pellet formation of a filamentous fungus -*Rhizopus oryzae*. In : Bioresource Technology, vol. 98, n° 18, p. 3415–3423. DOI: 10.1016/j.biortech.2006.10.028.

Lin, Pey-Jin; Scholz, Alexandra; Krull, Rainer (2010) Effect of volumetric power input by aeration and agitation on pellet morphology and product formation of *Aspergillus niger*. In : Biochemical Engineering Journal, vol. 49, n° 2, p. 213–220. DOI: 10.1016/j.bej.2009.12.016.

Liu, Yan; Liao, Wei; Chen, Shulin (2008) Study of pellet formation of filamentous fungi *Rhizopus oryzae* using a multiple logistic regression model. In : Biotechnology and bioengineering, vol. 99, n° 1, p. 117–128. DOI: 10.1002/bit.21531.

Maddi, Abhiram; Bowman, Shaun M.; Free, Stephen J. (2009) Trifluoromethanesulfonic acid-based proteomic analysis of cell wall and secreted proteins of the ascomycetous fungi

*Neurospora crassa* and *Candida albicans*. In : Fungal genetics and biology : FG & B, vol. 46, n° 10, p. 768–781. DOI: 10.1016/j.fgb.2009.06.005.

Magnuson, Jon K.; Lasure, Linda L. (2004) Advances in Fungal Biotechnology for Industry, Agriculture, and Medicine. Organic Acid Production by Filamentous Fungi. Jan S. Tkacz, Lene Lange.

Makagiansar, H. Y.; Ayazi Shamlou, P.; Thomas, C. R.; Lilly, M. D. (1993) The influence of mechanical forces on the morphology and penicillin production of *Penicillium chrysogenum*. In : Bioprocess Engineering, vol. 9, n° 2-3, p. 83–90. DOI: 10.1007/BF00369035.

marketsandmarkets (2016) Industrial Enzymes Market by Type (Amylases, Cellulases, Proteases, Lipases, and Phytases), Application (Food & Beverages, Cleaning Agents, and Animal Feed), Source (Microorganism, Plant, and Animal), and Region - Global Forecast to 2022. marketsandmarkets. En ligne : <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/industrial-enzymes-market-237327836.html>.

Mashaghi, Samaneh; Abbaspourrad, Alireza; Weitz, David A.; van Oijen, Antoine M. (2016) Droplet microfluidics. A tool for biology, chemistry and nanotechnology. In : TrAC Trends in Analytical Chemistry, vol. 82, p. 118–125. DOI: 10.1016/j.trac.2016.05.019.

Max, Belen; Salgado, José Manuel; Rodriguez, Noelia; Cortes, Sandra; Converti, Attilio; Dominguez, José Manuel (2010) Biotechnological production of citric acid. In : Brazilian Journal of Microbiology, vol. 41, p. 862–875, consulté le 28 juin 2018.

McGinn, S. M.; Beauchemin, K. A.; Coates, T.; Colombatto, D. (2004) Methane emissions from beef cattle: Effects of monensin, sunflower oil, enzymes, yeast, and fumaric acid. In : Journal of animal science, vol. 82, n° 11, p. 3346–3356. DOI: 10.2527/2004.82113346x.

Meeuwse, Petra; Tramper, Johannes; Rinzema, Arjen (2011) Modeling lipid accumulation in oleaginous fungi in chemostat cultures: I. Development and validation of a chemostat model for *Umbelopsis isabellina*. In : Bioprocess and Biosystems Engineering, vol. 34, n° 8, p. 939–949. DOI: 10.1007/s00449-011-0545-8.

Metz, B; Kossen, N.W.F (1977) The growth of molds in the form of pellets. In : Biotechnology and bioengineering, vol. 19, p. 781–799.

Meussen, Bas J.; Graaff, Leo H. de; Sanders, Johan P. M.; Weusthuis, Ruud A. (2012) Metabolic engineering of *Rhizopus oryzae* for the production of platform chemicals. In : Applied microbiology and biotechnology, vol. 94, n° 4, p. 875–886. DOI: 10.1007/s00253-012-4033-0.

Meyer, Hans-Peter; Schmidhalter, Diego R. (2014) Industrial Scale Suspension Culture of Living Cells. Chapitre 3 : Filamentous Fungi Fermentation. Avec la collaboration de Anders Norregaard, Stuart M. Stocks, John M. Woodley et Krist V. Gernaey. 1<sup>re</sup> édition : Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

Meyer, Vera; Andersen, Mikael R.; Brakhage, Axel A.; Braus, Gerhard H.; Caddick, Mark X.; Cairns, Timothy C. et al. (2016) Current challenges of research on filamentous fungi in relation to human welfare and a sustainable bio-economy: a white paper. In : Fungal biology and biotechnology, vol. 3, p. 6. DOI: 10.1186/s40694-016-0024-8.

Miller, Richard G.; Sorrell, Steven R. (2014) The future of oil supply. In : Philosophical transactions. Series A, Mathematical, physical, and engineering sciences, vol. 372, n° 2006, p. 20130179. DOI: 10.1098/rsta.2013.0179.

Ministère de la Transition écologique et solidaire (2016) Biocarburants. En ligne : <https://www.ecologique-solidaire.gouv.fr/biocarburants>.

Morath, Shannon U.; Hung, Richard; Bennett, Joan W. (2012) Fungal volatile organic compounds. A review with emphasis on their biotechnological potential. In : Fungal Biology Reviews, vol. 26, n° 2-3, p. 73–83. DOI: 10.1016/j.fbr.2012.07.001.

Muller, Anna; Faubert, Patrick; Hagen, Michael; Castell, Wolfgang zu; Polle, Andrea; Schnitzler, Jorg-Peter; Rosenkranz, Maaria (2013) Volatile profiles of fungi - chemotyping of species and ecological functions. In : Fungal genetics and biology : FG & B, vol. 54, p. 25–33. DOI: 10.1016/j.fgb.2013.02.005.

Müller, Christian; Spohr, Anders B.; Nielsen, Jens (2000) Role of substrate concentration in mitosis and hyphal extension of *Aspergillus*. In : Biotechnology & Bioengineering, vol. 67, n° 4, p. 390. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0290(20000220)67:4<390::AID-BIT2>3.3.CO;2-F.

Najah, Majdi; Calbrix, Raphaël; Mahendra-Wijaya, I. Putu; Beneyton, Thomas; Griffiths, Andrew D.; Drevelle, Antoine (2014) Droplet-based microfluidics platform for ultra-high-throughput bioprospecting of cellulolytic microorganisms. In : Chemistry & biology, vol. 21, n° 12, p. 1722–1732. DOI: 10.1016/j.chembiol.2014.10.020.

Nielsen, Jens; Johansen, Claus L.; Jacobsen, Michael; Krabben, Preben; Villadsen, John (1995) Pellet Formation and Fragmentation in Submerged Cultures of *Penicillium chrysogenum* and Its Relation to Penicillin Production. In : Biotechnology progress, vol. 11, p. 93–98.

OCDE (2011) Perspective d'avenir pour la biotechnologie industrielle, consulté le 10 juillet 2018.

Ochsenreither, Katrin; Fischer, Christian; Neumann, Anke; Syldatk, Christoph (2014) Process characterization and influence of alternative carbon sources and carbon-to-nitrogen ratio on organic acid production by *Aspergillus oryzae* DSM1863. In : Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 98, n° 12, p. 5449–5460. DOI: 10.1007/s00253-014-5614-x.

Okabe, Mitsuyasu; Lies, Dwiarti; Kanamasa, Shin; Park, Enoch Y. (2009) Biotechnological production of itaconic acid and its biosynthesis in *Aspergillus terreus*. In : Applied microbiology and biotechnology, vol. 84, n° 4, p. 597–606. DOI: 10.1007/s00253-009-2132-3.

Overman, Sue Ann; Romano, Antonio H (1969) Pyruvate carboxylase of *Rhizopus nigricans* and its role in fumaric acid production. In : Biochemical and biophysical research communications, vol. 37, p. 457–463, consulté le 11 juillet 2018.

Papagianni, M.; Matthey, M.; Kristiansen, B. (1999b) The influence of glucose concentration on citric acid production and morphology of *Aspergillus niger* in batch and culture. In : Enzyme and Microbial Technology, vol. 25, n° 8-9, p. 710–717. DOI: 10.1016/S0141-0229(99)00102-7.



- Papagianni, Maria (2004) Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. In : *Biotechnology Advances*, vol. 22, n° 3, p. 189–259. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2003.09.005.
- Papagianni, Maria; Matthey, Michael; Berovic, Marin; Kristiansen, Bjorn (1999a) *Aspergillus niger* Morphology and citric acid production in submerged batch fermentation: effects of culture pH, phosphate and manganese levels. In : *Food technology and biotechnology*, vol. 37, n° 3, p. 165–171, consulté le 30 août 2018.
- Paul, G.C; Priede, M.A; Thomas, C.R (1999) Relationship between morphology and citric acid production in submerged *Aspergillus niger* fermentations. In : *Biochemical Engineering Journal*, vol. 3, n° 2, p. 121–129. DOI: 10.1016/S1369-703X(99)00012-1.
- Paul, Gopal C.; Thomas, Colin R. (1998) Characterisation of mycelial morphology using image analysis. In : K. Schügerl, coord.: *Relation Between Morphology and Process Performances*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, p. 1–59. En ligne : <http://dx.doi.org/10.1007/BFb0102278>.
- Pazouki, M.; Panda, T. (2000) Understanding the morphology of fungi. In : *Bioprocess Engineering*, vol. 22, n° 2, p. 127–143. DOI: 10.1007/s004490050022.
- Peberdy, John F. (1994) Protein secretion in filamentous fungi - trying to understand a highly productive black box. In : *Trends in Biotechnology*, vol. 12, n° 2, p. 50–57. DOI: 10.1016/0167-7799(94)90100-7.
- Peterson, Robyn; Nevalainen, Helena (2012) *Trichoderma reesei* RUT-C30--thirty years of strain improvement. In : *Microbiology (Reading, England)*, vol. 158, n° Pt 1, p. 58–68. DOI: 10.1099/mic.0.054031-0.
- Petit, Michel (2016a) Le changement climatique dû aux activités humaines. Livret de l'environnement. Institut de France, éd. Académie des sciences, consulté le 27 août 2018.
- Petit, Michel (2016b) Le changement climatique dû aux activités humaines. Livret de l'environnement. Institut de France - Académie des sciences, consulté le 27 août 2018.
- Pirt, S J; Callow, D S (1960) Studies of the growth of *Penicillium chrysogenum* in continuous flow culture with reference to penicillin production. In : *Journal of applied bacteriology*, vol. 23, p. 87–98, consulté le 17 juillet 2018.
- Priegnitz, Bert-Ewald; Wargenau, Andreas; Brandt, Ulrike; Rohde, Manfred; Dietrich, Sylvia; Kwade, Arno et al. (2012) The role of initial spore adhesion in pellet and biofilm formation in *Aspergillus niger*. In : *Fungal Genetics and Biology*, vol. 49, p. 30–38, consulté le 18 juillet 2018.
- Prosser, J.I; Trinci, A.P.J (1978) A Model for Hyphal Growth and Branching. In : *Journal of General Microbiology*, vol. 111, p. 153–164, consulté le 10 août 2018.
- Ratledge, Colin (2004) Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for Single Cell Oil production. In : *Biochimie*, vol. 86, n° 11, p. 807–815. DOI: 10.1016/j.biochi.2004.09.017.
- Reczey, K.; Szengyel, Zs.; Eklund, R.; Zacchi, G. (1996) Cellulase production by *T. reesei*. In : *Bioresource Technology*, vol. 57, n° 1, p. 25–30. DOI: 10.1016/0960-8524(96)00038-7.

- Reich, Kristian; Thaci, Diamant; Mrowietz, Ulrich; Kamps, Anja; Neureither, Marcus; Luger, Thomas (2009) Efficacy and safety of fumaric acid esters in the long-term treatment of psoriasis--a retrospective study (FUTURE). In : Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology : JDDG, vol. 7, n° 7, p. 603–611. DOI: 10.1111/j.1610-0387.2009.07120.x.
- Restino, Clémence (2012) Production d'acide itaconique par des souches d'*Aspergilli* par fermentation en milieu solide. Université de reims champagne-ardenne, Reims, France, consulté le 28 juin 2018.
- Rhodes, R.A; Lagoda, A.A; Misenheimer, T.J; Smith, M.L; Anderson, R.F; Jackson, R.W (1962) Production of fumaric acid in 20-liter fermentors. In : Applied Microbiology and Biotechnology, n° 10(1), p. 9–15, consulté le 9 octobre 2017.
- Rhodes, R.A; Moyer, A.J; Smith, Mabel L; Kelley, Sinah E (1959) Production of Fumaric Acid by *Rhizopus arrhizus*. In : Applied microbiology, vol. 7, n° 2. En ligne : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1057471/pdf/applmicro00322-0014.pdf>, consulté le 24 janvier 2018.
- Ring, Koon-Ling; deGuzman, Maria (2017) Chemical economics handbook. Fumaric Acid, consulté le 31 juillet 2018.
- Riquelme, Meritxell; Bartnicki-Garcia, Salomon (2004) Key differences between lateral and apical branching in hyphae of *Neurospora crassa*. In : Fungal genetics and biology : FG & B, vol. 41, n° 9, p. 842–851. DOI: 10.1016/j.fgb.2004.04.006.
- Riquelme, Meritxell; Yarden, Oded; Bartnicki-Garcia, Salomon; Bowman, Barry; Castro-Longoria, Ernestina; Free, Stephen J. et al. (2011) Architecture and development of the *Neurospora crassa* hypha - a model cell for polarized growth. In : Fungal biology, vol. 115, n° 6, p. 446–474. DOI: 10.1016/j.funbio.2011.02.008.
- Roa Engel, Carol A.; Straathof, Adrie J. J.; Zijlmans, Tiemen W.; van Gulik, Walter M.; van der Wielen, Luuk A M (2008) Fumaric acid production by fermentation. In : Applied microbiology and biotechnology, vol. 78, n° 3, p. 379–389. DOI: 10.1007/s00253-007-1341-x.
- Saber, Mohammad; Nakhshiniev, Bakhtiyor; Yoshikawa, Kunio (2016) A review of production and upgrading of algal bio-oil. In : Renewable and Sustainable Energy Reviews, vol. 58, p. 918–930. DOI: 10.1016/j.rser.2015.12.342.
- Sauer, Michael; Porro, Danilo; Mattanovich, Diethard; Branduardi, Paola (2008) Microbial production of organic acids: expanding the markets. In : Trends in Biotechnology, vol. 26, n° 2, p. 100–108. DOI: 10.1016/j.tibtech.2007.11.006.
- Saunders, P.T; Trinci, A.P.J (1979a) Determination of Tip Shape in Fungal Hyphae. In : Journal of General Microbiology, vol. 110, p. 469–473.
- Saunders, P.T; Trinci, A.P.J (1979b) Determination of Tip Shape in Fungal Hyphae. In : Journal of General Microbiology, vol. 110, p. 469–473.

Schuster, E.; Dunn-Coleman, N.; Frisvad, J. C.; Van Dijck, P W M (2002) On the safety of *Aspergillus niger* - a review. In : Applied microbiology and biotechnology, vol. 59, n° 4-5, p. 426–435. DOI: 10.1007/s00253-002-1032-6.

Semighini, Camile P.; Harris, Steven D. (2008) Regulation of apical dominance in *Aspergillus nidulans* hyphae by reactive oxygen species. In : Genetics, vol. 179, n° 4, p. 1919–1932. DOI: 10.1534/genetics.108.089318.

Silar, Philippe (2016) Protistes Eucaryotes. Origine, Evolution et Biologie des Microbes Eucaryotes.

Silverman-Gavrila, L. B.; Lew, R. R. (2000) Calcium and tip growth in *Neurospora crassa*. In : Protoplasma, vol. 213, n° 3-4, p. 203–217. DOI: 10.1007/BF01282158.

Silverman-Gavrila, Lorelei B.; Lew, Roger R. (2003) Calcium gradient dependence of *Neurospora crassa* hyphal growth. In : Microbiology (Reading, England), vol. 149, n° Pt 9, p. 2475–2485. DOI: 10.1099/mic.0.26302-0.

Singh, Ajay; Kumar, P.K.R; Schügerl, K (1992) Bioconversion of cellulosic materials to ethanol by filamentous fungi. In : Advances in biochemical engineering/biotechnology, vol. 45, p. 30–55, consulté le 16 juillet 2018.

Skory, Christopher D; Freer, Shelby N; Bothast, Rodney J (1997) Screening for ethanol-producing filamentous fungi. In : Biotechnology Letters, vol. 19, n° 3, p. 203–206, consulté le 16 juillet 2018.

Smith, J. J.; Lilly, M. D.; Fox, R. I. (1990) The effect of agitation on the morphology and penicillin production of *Penicillium chrysogenum*. In : Biotechnology and bioengineering, vol. 35, n° 10, p. 1011–1023. DOI: 10.1002/bit.260351009.

Spohr, Anders; Carlsen, Morten; Nielsen, Jens; Villadsen, John (1998)  $\alpha$ -Amylase production in recombinant *Aspergillus oryzae* during fed-batch and continuous cultivations. In : Journal of Fermentation and Bioengineering, vol. 86, n° 1, p. 49–56. DOI: 10.1016/S0922-338X(98)80033-0.

Straathof, Adrie J. J. (2014) Transformation of biomass into commodity chemicals using enzymes or cells. In : Chemical reviews, vol. 114, n° 3, p. 1871–1908. DOI: 10.1021/cr400309c.

Stringer, Mary A; Timberlake, William E (1995) dewA encodes a fungal hydrophobin component of the *Aspergillus* spore wall. In : Molecular Microbiology, vol. 16, p. 33–44, consulté le 17 juillet 2018.

Takahashi, Koji; Yamada, Hirokazu (1959) Studies on the effects of some physical conditions on the submerged mold culture. II. On the two types of pellet formation in shaking culture. In : J.Chemic.Soc.Jpn, vol. 33, p. 707, consulté le 30 octobre 2017.

Tang, Haiying; Abunasser, Nadia; Garcia, M.E.D.; Chen, Meng; Simon Ng, K. Y.; Salley, Steven O. (2011) Potential of microalgae oil from *Dunaliella tertiolecta* as a feedstock for biodiesel. In : Applied Energy, vol. 88, n° 10, p. 3324–3330. DOI: 10.1016/j.apenergy.2010.09.013.

- Tari, Canan; Ozkan, Kamer; Oncu, Selale; Avci, Tuba (2011) The relationship of pellet morphology to polygalacturonase production of *Rhizopus oryzae* in various media composition. In : GIDA, vol. 36, p. 25–31, consulté le 7 août 2018.
- Theilleux, Jacques; Baduel, Paul (1992) Fermentations : Principales applications industrielles. In : Techniques de l'Ingénieur, consulté le 16 janvier 2017.
- Traissac; Pierre (1994) Eléments de méthodologie statistique pour la discrimination et le classement : application au ciblage des interventions, consulté le 25 septembre 2018.
- Tresner, H.D; Hayes, Jean A. (1971) Sodium Chloride Tolerance of Terrestrial Fungi. In : Applied microbiology and biotechnology, vol. 22, n° 2, p. 210–213, consulté le 4 janvier 2017.
- Tucker, Keith G.; Thomas, Colin R. (1992) Mycelial morphology: The effect of spore inoculum level. In : Biotechnology Letters, vol. 14, consulté le 3 janvier 2017.
- van Vleet, J. H.; Jeffries, T. W. (2009) Yeast metabolic engineering for hemicellulosic ethanol production. In : Current opinion in biotechnology, vol. 20, n° 3, p. 300–306. DOI: 10.1016/j.copbio.2009.06.001.
- Vicente, Gemma; Bautista, L. Fernando; Rodríguez, Rosalía; Gutiérrez, F. Javier; Sádaba, Irantzu; Ruiz-Vázquez, Rosa M. et al. (2009) Biodiesel production from biomass of an oleaginous fungus. In : Biochemical Engineering Journal, vol. 48, n° 1, p. 22–27. DOI: 10.1016/j.bej.2009.07.014.
- Walisko, Robert; Krull, Rainer; Schrader, Jens; Wittmann, Christoph (2012) Microparticle based morphology engineering of filamentous microorganisms for industrial bio-production. In : Biotechnology Letters, vol. 34, n° 11, p. 1975–1982. DOI: 10.1007/s10529-012-0997-1.
- Walther, Andrea; Wendland, Jürgen (2003) Septation and cytokinesis in fungi. In : Fungal Genetics and Biology, vol. 40, n° 3, p. 187–196. DOI: 10.1016/j.fgb.2003.08.005.
- Wargenau, Andreas; Fleissner, André; Bolten, Christoph Josef; Rohde, Manfred; Kampen, Ingo; Kwade, Arno (2011) On the origin of the electrostatic surface potential of *Aspergillus niger* spores in acidic environments. In : Research in microbiology, vol. 162, n° 10, p. 1011–1017. DOI: 10.1016/j.resmic.2011.07.006.
- Watters, M. K.; Griffiths, A. J. (2001) Tests of a cellular model for constant branch distribution in the filamentous fungus *Neurospora crassa*. In : Applied and environmental microbiology, vol. 67, n° 4, p. 1788–1792. DOI: 10.1128/AEM.67.4.1788-1792.2001.
- Wiebe, M. G.; Trinci, A. P. (1991) Dilution rate as a determinant of mycelial morphology in continuous culture. In : Biotechnology and bioengineering, vol. 38, n° 1, p. 75–81. DOI: 10.1002/bit.260380110.
- Willke, Th; Vorlop, K-D (2004) Industrial bioconversion of renewable resources as an alternative to conventional chemistry. In : Applied microbiology and biotechnology, vol. 66, n° 2, p. 131–142. DOI: 10.1007/s00253-004-1733-0.
- Willke, Th.; Vorlop, K.-D. (2001) Biotechnological production of itaconic acid. In : Applied microbiology and biotechnology, vol. 56, n° 3-4, p. 289–295. DOI: 10.1007/s002530100685.

Wucherpennig, T.; Kiep, K. A.; Driouch, H.; Wittmann, C.; Krull, R. (2010) Morphology and Rheology in Filamentous Cultivations. In : *Advances in Applied Microbiology*, vol. 72, 2010, p. 89–136.

Wucherpennig, Thomas; Hestler, Timo; Krull, Rainer (2011) Morphology engineering - osmolality and its effect on *Aspergillus niger* morphology and productivity. In : *Microbial Cell Factories*, vol. 10, p. 58. DOI: 10.1186/1475-2859-10-58.

Xu, J.; Wang, L.; Ridgway, D.; Gu, T.; Moo-Young, M. (2000) Increased heterologous protein production in *Aspergillus niger* fermentation through extracellular proteases inhibition by pelleted growth. In : *Biotechnology progress*, vol. 16, n° 2, p. 222–227. DOI: 10.1021/bp000006s.

Yanagita, Tomomichi; Kogané, Fusaé (1963) Site of biosyntheses of sulfur compounds in growing colonies of *Aspergillus niger*. In : *The Journal of General and Applied Microbiology*, vol. 9, n° 3, p. 331–336, consulté le 9 octobre 2017.

Zhang, Jianguo; Zhang, Jining (2016) The filamentous fungal pellet and forces driving its formation. In : *Critical reviews in biotechnology*, vol. 36, n° 6, p. 1066–1077. DOI: 10.3109/07388551.2015.1084262.

Znidarsic, P; Komel, R; Pavko, A (2000) Influence of some environmental factors on *Rhizopus nigricans* submerged growth in the form of pellets. In : *Journal of microbiology and biotechnology*, vol. 16, p. 589–593, consulté le 8 août 2018.

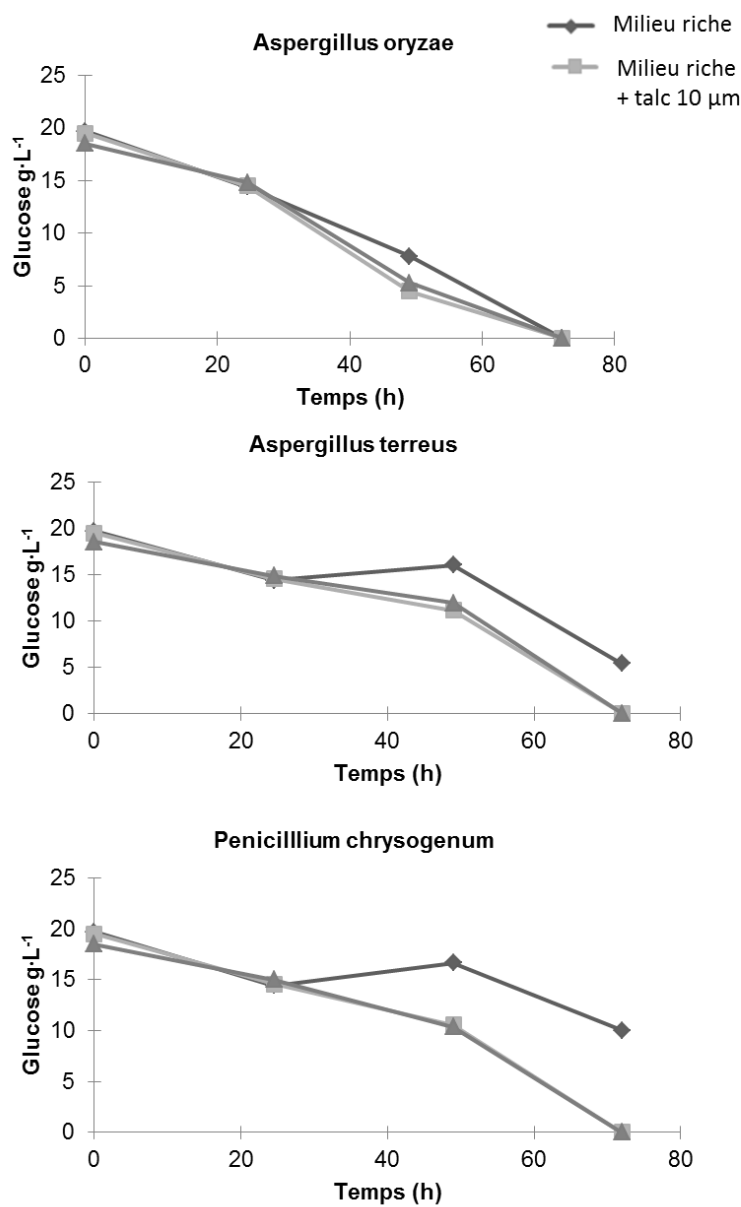
Žnidaršič, P.; Pavko, A. (2001) The Morphology of Filamentous Fungi in Submerged Cultivations as a Bioprocess Parameter. In : *Food technology and biotechnology*, vol. 39, n° 3, p. 237–252.



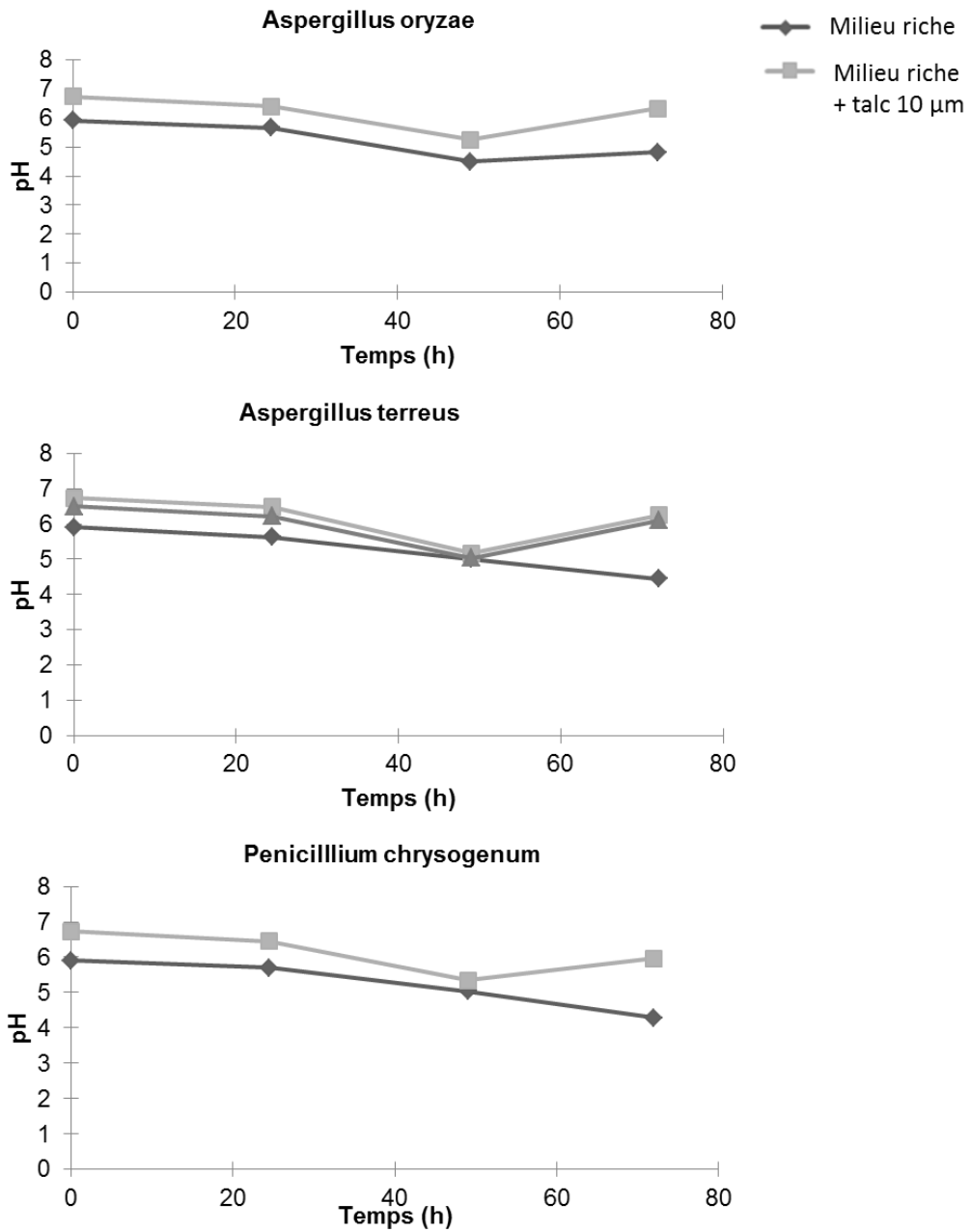
# Annexes

## 1 Données complémentaires

### Exemples de suivis du métabolisme en milieu talc



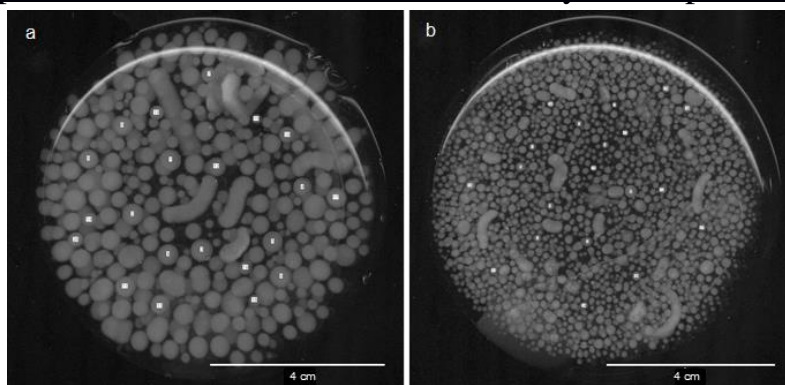
*Figure 50 : Exemples de suivis de la consommation en glucose en milieu talc*



**Figure 51** : Exemples de suivis du pH en milieu talc



## Exemples de détermination du diamètre moyen des pellets par ImaJ



Pellet number	Width	Pellet number	Width
1	0.44	1	0.151
2	0.449	2	0.213
3	0.474	3	0.160
4	0.389	4	0.160
5	0.415	5	0.258
6	0.440	6	0.222
7	0.347	7	0.116
8	0.389	8	0.160
9	0.466	9	0.169
10	0.339	10	0.196
11	0.449	11	0.142
12	0.398	12	0.187
13	0.415	13	0.169
14	0.271	14	0.160
15	0.212	15	0.142
16	0.237	16	0.178
17	0.406	17	0.178
18	0.262	18	0.222
19	0.305	19	0.196
20	0.313	20	0.142
Mean	0.371	Mean	0.176
Standard deviation	0.080	Standard deviation	0.034

**Figure 52** : Exemple de détermination du diamètre des pellets des souches étudiées  
a : *A. oryzae*, b : *A. terreus*



**Figure 53** : Propagation *A. oryzae* par pré-culture EGM en bioréacteur DASGIP

a : Ensemencement direct de l'émulsion, b : Ensemencement de l'émulsion après pré-culture, c : Ensemencement du témoin seul après pré-culture, d : Ensemencement du témoin huile après pré-culture

## **2 Descriptions d'inventions**

### **2.1 Contrôle de la morphologie d'*Aspergillus oryzae* par utilisation durant la préculture de microparticules de talc**

La présente invention concerne un procédé de production du champignon *Aspergillus oryzae* sous forme de mycélium libre.

#### **Etat de la technique**

La morphologie des champignons filamenteux est un paramètre important à prendre en compte lors de la mise en œuvre de ces champignons dans les bioprocédés. En effet, la morphologie des champignons filamenteux a une influence sur la rhéologie du milieu dans lequel ils se développent et par voie de conséquence sur les phénomènes de transfert de matière et de chaleur, et notamment le transfert des nutriments et de l'oxygène. Ainsi le contrôle de la morphologie permet d'améliorer la productivité du champignon et/ou faciliter sa mise en culture dans un bioréacteur.

On distingue classiquement deux types de morphologie : une morphologie non agrégée dite "mycélium libre" en opposition à une morphologie agrégée ("pellet" selon la terminologie anglo-saxonne). Pour des raisons d'accessibilité de l'oxygène et des nutriments (c'est-à-dire éviter les limitations diffusionnelles), il est préférable de mettre en œuvre dans un bioréacteur les champignons filamenteux sous forme mycélium libre.

Il est connu de la littérature scientifique que l'utilisation de microparticules de talc dans le milieu de culture permettait de contrôler la morphologie du champignon *Aspergillus terreus* (Joanna Gonciarz, Marcin Bizukojc, *Engineering in Life Sciences*, 2014, 14, 190-200) et donc d'obtenir un gain de productivité lorsque que ces champignons sont cultivés pour produire des enzymes dans un milieu de culture contenant du talc.

Le champignon *Aspergillus oryzae* présente également un intérêt industriel en raison de sa capacité à produire par exemple des enzymes, du type cellulases ou amylases, utiles dans l'industrie des biocarburants. Plusieurs publications ont également montré son intérêt dans le domaine de la chimie verte car le champignon est également capable de produire, dans certaines conditions, des acides dicarboxyliques en C4 (comme par exemple l'acide malique, l'acide fumarique et encore l'aide succinique). Elle peut donc servir de souche-plateforme pour produire de nombreuses enzymes et molécules d'intérêt dans l'industrie de la fermentation.

Un but de l'invention est de fournir un procédé de production, notamment à l'échelle industrielle, du champignons *Aspergillus oryzae* avec une morphologie du type mycélium libre.

#### **Résumé de l'invention**

Ainsi l'invention se rapporte à un procédé de production du champignon *Aspergillus oryzae* sous forme de mycélium libre, comprenant au moins les étapes suivantes :

- a) on prépare dans un bioréacteur un milieu de culture stérilisé A adapté à la croissance du champignon *Aspergillus oryzae* contenant au moins 0,5 g/L de talc ;

- b) on ajoute au milieu de culture stérilisé A des spores d'*Aspergillus oryzae* à raison d'au moins 10 spores/ mL de milieu de culture ;
- c) on incube en présence d'oxygène le milieu de culture stérilisé A issu de l'étape b) à une température comprise entre 15 et 45°C pendant au moins 6 heures de manière à obtenir un milieu de culture A contenant des champignons de l'espèce *Aspergillus oryzae* sous forme de mycélium libre.

La demanderesse a observé de manière surprenante qu'il est possible de favoriser le développement du champignon *Aspergillus oryzae* sous forme de mycélium libre à partir de spores en réalisant une culture dans un milieu aqueux, compatible avec ledit champignon et qui contient par ailleurs des microparticules de talc. Les microparticules de talc ont une taille généralement comprise entre 2 à 20 µm et de préférence comprise entre 5 et 10 µm.

De préférence le milieu de culture A contient entre 5 et 20 g/L de talc.

Dans un mode de réalisation préféré, à l'étape b) le milieu de culture A estensemencé avec  $10^2$  à  $10^5$  spores/mL de culture.

Il est à noter que cette étape de mise en culture des spores du champignon *Aspergillus oryzae* est conduite dans un bioréacteur et qui inclut des réacteurs de petit volume tel que par exemple une fiole.

Selon un mode de réalisation préféré, le milieu de culture obtenu après l'étape c) est utilisée comme préculture du champignon *Aspergillus oryzae* sous forme de mycélium libre pour réaliser au moins une première étape de propagation qui inclut au moins les étapes suivantes :

- a) on transfère toute ou partie du milieu de culture A issu de l'étape c) dans bioréacteur contenant un milieu de culture stérilisé B exempt de talc, avec un rapport volumique (V milieu A ajouté)/(V milieu B) compris entre 0,1% et 10%, de manière à produire un milieu de culture B contenant des champignons du genre *Aspergillus oryzae* sous forme de mycélium libre;
- b) on cultive en présence d'oxygène le milieu de culture B issu de l'étape d) à une température comprise entre 15 et 45°C pendant au moins 6 heures de manière à obtenir un milieu de culture B contenant des champignons *Aspergillus oryzae* sous forme de mycélium libre.

De manière surprenante, il a été constaté par la demanderesse que le champignon *Aspergillus oryzae* sous forme de mycélium libre obtenus à l'issue de l'étape c) peut être mis en culture dans un milieu exempt de talc et continuer croître dans ledit milieu tout en conservant sa morphologie mycélium libre. En effet lorsqu'on réalise la même expérience avec les champignons *Aspergillus niger* et *Aspergillus terreus*, on constate que ces derniers reprennent la forme « pellets » une fois transférés dans un milieu de culture exempt de talc.

Ce mode de réalisation est avantageusement mis en œuvre pour la production à l'échelle industrielle du champignon *Aspergillus oryzae* sous forme de mycélium libre.

Ainsi le procédé selon l'invention utilise le milieu de culture produit à l'étape c) comme inoculum à partir duquel on peut réaliser une étape de propagation/croissance mycélienne du champignon. Etant donné que l'étape de croissance mycélienne est effectuée dans un milieu ne nécessitant pas l'ajout de talc, le protocole de production selon l'invention présente l'avantage

d'être également économique tant du point de vue des coûts en matières premières que des coûts liés au retraitement des résidus solides chargés en déchets minéraux qui sont difficiles voire impossibles à éliminer par un procédé d'incinération.

Selon un mode de réalisation préférée, le milieu de culture issu de l'étape e) est utilisé pour conduire une seconde étape de propagation. A cette fin, on opère au moins les étapes suivantes :

- c) on transfère toute ou partie du milieu de culture B issu de l'étape e) dans un bioréacteur contenant un milieu de culture stérilisé C exempt de talc, avec un rapport volumique ( $V$  milieu B ajouté) / ( $V$  milieu C) compris entre 0,1% et 10%, de manière à produire un milieu de culture C contenant des champignons du genre *Aspergillus oryzae* sous forme de mycélium libre ;
- d) on cultive en présence d'oxygène le milieu de culture C issu de l'étape f) à une température comprise entre 15 et 45°C pendant au moins 6 heures de manière à obtenir un milieu de culture C contenant des champignons du genre *Aspergillus oryzae* sous forme de mycélium libre.

Dans le cadre de l'invention, on peut également procéder à une étape h) dite de production (bioconversion) de molécules d'intérêt par le champignon. Cette étape h) peut être menée de façon concomitante à l'étape e) ou à l'étape g). Cette étape h) peut alternativement être réalisée après les étapes e) ou g).

Par exemple les molécules d'intérêts susceptibles d'être produites par *Aspergillus oryzae* sont choisies parmi des enzymes, des alcools, des acides organiques, des esters. Les enzymes sont des cellulases qui peuvent être choisies parmi les endoglucanases, les exoglucanases, et les  $\beta$ -glucosidases

Alternativement, le champignon peut sécréter des enzymes telles que des amylases ou encore des asparaginases.

## Figures

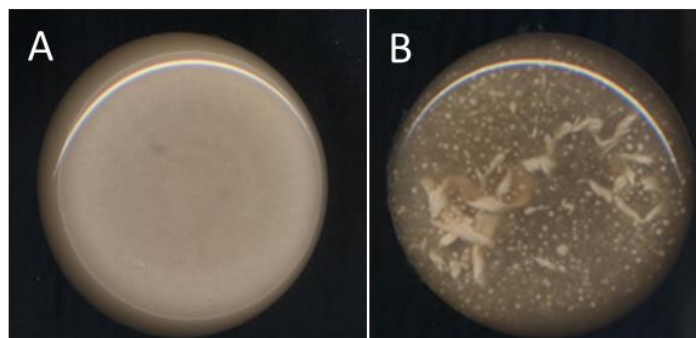


Figure 1

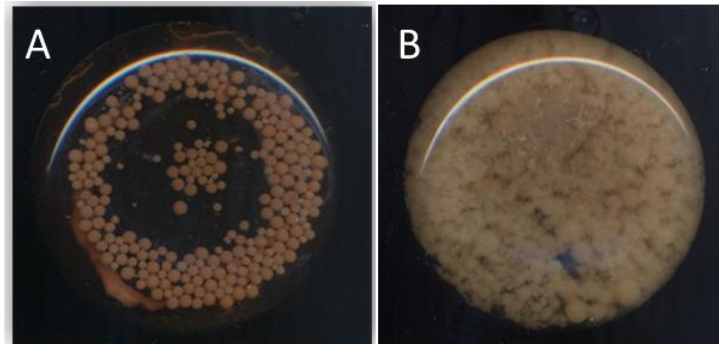


Figure 2

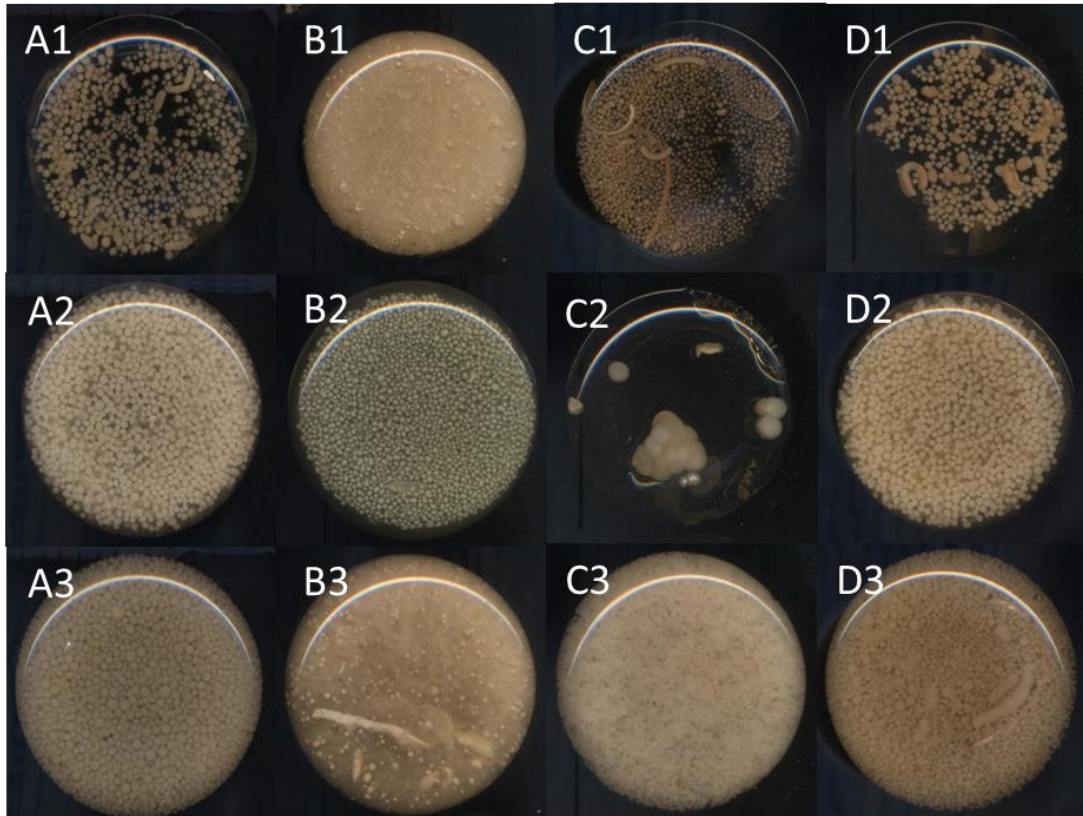


Figure 3

### Description détaillée de l'invention

Les autres caractéristiques et avantages de l'invention vont apparaître à la lecture de la description qui va suivre, donnée à titre uniquement illustratif et non limitatif, en se référant aux figures annexées et décrites ci-après :

- la Figure 1 montre les images des cultures des champignons *Aspergillus terreus* et *Aspergillus ozyzae* dans un milieu Sabouraud contenant 10 g/L de talc, après 24 heures de culture ;
- la Figure 2 montre les images des cultures des champignons *Aspergillus terreus* et *Aspergillus ozyzae*, après transfert des cultures de la figure 1 dans un milieu Sabouraud exempt de talc et 72 heures d'incubation.
- la Figure 3 montre les images des cultures des champignons *Aspergillus terreus*, *Aspergillus niger* et *Aspergillus ozyzae*, après 48 heures de culture dans différentes conditions en milieu YPDP (Yeast Extract Peptone Potatoes).

L'invention se rapporte donc à un procédé de production du champignon *Aspergillus oryzae* sous forme de mycélium libre qui comprend au moins les étapes suivantes :

- a) on prépare dans une première fiole de culture un milieu de culture A adapté à la croissance du champignon *Aspergillus oryzae* et contenant au moins 1 g/L de talc ;
- b) on ajoute au milieu de culture A des spores d'*Aspergillus oryzae* à raison d'au moins 10 spores/mL de milieu de culture ;
- c) on incube le milieu de culture A issu de l'étape b) à une température comprise entre 15 et 45°C pendant au moins 6 heures de manière à obtenir un milieu de culture A contenant des champignons du genre *Aspergillus oryzae* sous forme de mycélium libre.

Les étapes a) à c) du procédé permettent de fournir *in fine* un milieu de culture dans lequel le champignon *Aspergillus oryzae* s'est développé sous forme de mycélium libre à partir de spores. La souche de champignon mise en œuvre dans le procédé peut être naturelle ou bien une souche modifiée par mutation, par sélection ou par recombinaison génétique.

Selon l'invention l'étape a) consiste à préparer dans un bioréacteur qui inclut notamment des réacteurs de petit volume, par exemple en fiole un premier milieu de culture A optimisé dans lequel les spores d'*Aspergillus oryzae* après inoculation sont susceptibles de se développer. Tout milieu de culture aqueux qui contient au moins une source de carbone, d'azote et de phosphore et éventuellement des oligoéléments peut être utilisé comme milieu de culture des spores et sont connus de l'homme de l'art.

Conformément à l'invention, le milieu de culture contient en outre des microparticules de talc (3MgO.4SiO<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O). La teneur en talc présent dans une quantité d'au moins 0,5 g/L de milieu de culture, de préférence comprise entre 5 et 10 g/L de milieu de culture. On peut utiliser toute source de talc disponible sur le marché et dont le diamètre moyen des particules est généralement compris entre 2 et 20 µm et de préférence compris entre 5 et 10 µm.

L'étape b) d'inoculation des spores d'*Aspergillus oryzae* est réalisée de manière à obtenir un milieu de culture A contenant au moins 10 spores/mL et de préférence entre 10<sup>2</sup> et 10<sup>5</sup> spores/mL de milieu de culture.

Après inoculation des spores, le milieu de culture est mis en incubation (étape c) de manière à permettre la croissance cellulaire mycélienne d'*Aspergillus oryzae*.

L'étape c) est réalisée en présence d'oxygène dans les conditions opératoires suivantes :

- Température : entre 15 et 45°C, et de préférence entre 24 et 30°C ;
- Durée : au moins 6 heures, de préférence au moins 24 heures ;
- pH : entre 2.5 et 8, de préférence compris entre 6 et 8.
- Volume du milieu de culture : entre 50mL et 5L

Pour l'étape c), on peut également assurer une agitation du milieu de culture et avec ou sans contrôle de la teneur en oxygène dissous dans le milieu.

A l'issue de l'étape c), le milieu de culture A contient généralement au moins 2 g/L de biomasse, de préférence entre 7 et 12 g/L de biomasse.

Afin de limiter au maximum les risques de contamination, les bioprocédés industriels, qui peuvent mettre en jeu des bioréacteurs de plusieurs dizaines, voire centaines de mètres cubes, font appel à des étapes successives et croissantes de propagation pour accroître la masse cellulaire tout en limitant la durée de la phase de latence observée lors de la phase de croissance.

Dans ce contexte, le milieu de culture contenant *Aspergillus oryzae* sous forme mycélium libre constitue l'inoculum avec lequel on opère au moins la première étape de propagation.

L'étape de propagation selon l'invention met en œuvre au moins les étapes suivantes :

- d) on transfère toute ou partie du milieu de culture B issu de l'étape e) dans un bioréacteur contenant un milieu de culture stérilisé C exempt de talc, avec un rapport volumique (V milieu B ajouté) / (V milieu C) compris entre 0,1% et 10%, de manière à produire un milieu de culture C contenant des champignons du genre *Aspergillus oryzae* sous forme de mycélium libre ;
- e) on cultive en présence d'oxygène le milieu de culture C issu de l'étape f) à une température comprise entre 15 et 45°C pendant au moins 6 heures de manière à obtenir un milieu de culture C contenant des champignons du genre *Aspergillus oryzae* sous forme de mycélium libre.

Conformément à ce mode de réalisation, le milieu de culture A issu de l'étape c) est avantageusement employé comme inoculum pour conduire l'étape dite de propagation. En effet de manière surprenante, il a été observé que la morphologie mycélium libre du champignon *Aspergillus oryzae* est conservée lorsque le champignon est transféré dans un milieu ne contenant pas de talc. Ce mode de réalisation est particulièrement avantageux pour la production à l'échelle industrielle du champignon *Aspergillus oryzae* sous forme de mycélium libre car il est plus économique (coûts en matières premières et pour le retraitement des résidus solides).

L'étape de mise en culture e) est généralement effectuée dans les mêmes conditions que celles mentionnées précédemment pour l'étape c), à savoir :

- Température : entre 15 et 45°C, et de préférence entre 24 et 30°C ;
- Durée : au moins 6 heures, de préférence au moins 24 heures ;
- pH : entre 2.5 et 8, de préférence compris entre 6 et 8.

Le rapport volumique ou taux d'ensemencement est un paramètre important car il conditionne la durée de la phase de latence (phase initiale après ensemencement, qui précède le début de la phase de croissance, au cours de laquelle aucune activité biologique n'est mesurée). Plus l'inoculum est important et plus la phase de latence sera courte, limitant ainsi les risques de contamination sur l'étape en question.

Selon l'invention, le rapport volumique (V milieu B ajouté) / (V milieu C) est compris entre 0,1% et 10% et de préférence compris entre 1 et 10%

Dans le cadre de l'invention, l'étape e) de culture du champignon peut être conduite selon différents modes pour alimenter et soutirer le milieu de culture du bioréacteur.

Ainsi on peut mettre en œuvre l'étape e) selon un mode batch dans lequel le bioréacteur est rempli avec le milieu de culture stérilisé, avant ajout de l'inoculum. L'étape f) se déroule ensuite sans addition supplémentaire de milieu.

Alternativement, l'étape e) peut être menée selon un mode fed-batch (ou alimentation semi-continue) dans lequel le milieu de culture est apporté au fur et à mesure de la multiplication du champignon.

Enfin, l'étape e) peut être mis en œuvre en mode continu, avec ou sans confinement des champignons, dans lequel l'ajout du milieu de culture et le soutirage sont effectués aux mêmes débits et commencent quand les cellules entrent en phase stationnaire de croissance.



Comme indiqué ci-avant, les bioprocédés industriels peuvent comporter N étapes successives de propagation. A cette fin, on peut transférer tout ou partie du milieu de culture obtenu à l'issue de la première étape de propagation pour réaliser une seconde étape de propagation dans un bioréacteur de volume plus important contenant un milieu de culture stérile exempt de talc.

Si le procédé industriel met en œuvre plus de deux étapes de propagation, on utilisera tout ou partie de milieu de culture issu d'une étape X précédente de propagation pour ensemercer le bioréacteur de l'étape suivante X+1 de propagation. Ces étapes successives de croissantes de propagation se font généralement dans un rapport volumique  $(V \text{ milieu X}) / (V \text{ milieu X+1})$  compris entre 0,1% et 10%. Après transfert, on met en culture le nouveau milieu ensemençé dans les conditions décrites ci-avant pour permettre la croissance du champignon en bioréacteur.

Dans le cadre de l'invention, la croissance du champignons e) et g) pendant la phase de propagation du champignon peut s'accompagner d'une étape de production de molécules d'intérêt par le champignon (étape h).

Cette étape de production h) peut se faire de façon concomitante à la croissance du champignon dans le milieu de culture. Dans ce cas de figure, les molécules d'intérêt sont généralement des métabolites dits "primaires" qui sont des composés produits par le champignon et utiles à sa croissance dans un milieu de culture donné. Les métabolites primaires peuvent être des enzymes, des acides aminés, des acide organiques, des alcools, des lipides, des nucléotides, des sucres.

Il est également possible d'induire la synthèse par le champignon de métabolites dits "secondaires" pendant ou après la phase de croissance. Ces métabolites secondaires peuvent être choisis parmi des enzymes, des acides aminés, des acide organiques, des alcools, des lipides, des nucléotides, des sucres.

Par exemple on peut ajouter au milieu de culture un substrat inducteur qui en s'accumulant dans le milieu de culture va provoquer une modification du comportement physiologique du champignon.

La méthode selon l'invention de production du champignon *Aspergillus oryzae* peut avantageusement être intégrée dans un procédé de production de bio-solvant, par exemple d'alcools (éthanol, butanol et/ou isopropanol), dit de seconde génération qui fait intervenir une étape d'hydrolyse enzymatique de la biomasse lignocellulosique au moyen d'enzymes de type cellulases sécrétés par des champignons. De manière préféré, les cellulases sont choisies parmi les endoglucanases, les exoglucanases et les  $\beta$ -glucosidases.

Dans ce type d'application, l'étape h) de production de cellulases peut être induite en ajoutant dans le milieu de culture un ou plusieurs substrats carbonés choisis parmi le lactose, le sophorose, le xylose, le gentiobiose, le cellobiose.

## **Exemples**

### **Exemple 1**

Une première série de tests en fioles Erlenmeyer de 250 mL a été menée afin de comparer la croissance et le comportement morphologique de deux souches d'*Aspergillus* en milieu Sabouraud exempt de talc et en milieu Sabouraud contenant du talc.

On a d'abord préparé un milieu Sabouraud liquide contenant 10g/L de talc à 10 $\mu$ m.

50 mL du milieu Sabouraud complété avec du talc sont versés dans des fioles Erlenmeyer de 250 mL et mis en stérilisation 20 min à 121°C. Des spores d'*Aspergillus terreus* (souche X) et d'*Aspergillus oryzae* (souche Y) ont été ensemencées à raison de 10<sup>5</sup> spores/mL dans le milieu Sabouraud stérilisé.

Les fioles sont mises en incubation à une température de 24°C pendant 24 heures.

Au bout de 24 heures d'incubation, on observe que les spores d'*Aspergillus terreus* (Fig. 1A) d'*Aspergillus oryzae* (Fig. 1B) se sont développées en adoptant la forme de mycélium libre non agrégé.

1mL de chacune des cultures obtenues après 24 heures d'incubation ont été ensuite transféré en fioles Erlenmeyer de 250 mL contenant 49 mL d'un milieu Sabouraud stérilisé et ne contenant pas de talc.

Les fioles sont mises en incubation pendant 72 heures à 24°C. Les figures 2A et 2B sont les photographies des fioles après 72 heures d'incubation. On constate qu'en milieu exempt de talc *Aspergillus terreus* s'est développé en adoptant une morphologie agrégée du type pellets (Fig. 2A). Au contraire et de manière surprenante chez *Aspergillus oryzae*, la croissance dans un milieu sans talc s'est faite en conservant une morphologie du type mycélium libre (Fig. 2B).

Parallèlement, un test témoin a été effectué qui confirme qu'en absence de talc dans le milieu de culture Sabouraud, la croissance d'*Aspergillus oryzae* à partir de spores produit un champignon sous forme agrégée. La figure 3 est une image de la fiole témoin prise après 48 heures d'incubation à 24°C d'un milieu Sabouraud stérilisé et ensemencé à 10<sup>5</sup> spores/mL.

### Exemple 2

Une autre série de tests a été réalisée afin de confirmer que la croissance d'*Aspergillus oryzae* à partir d'un inoculum prélevé d'un milieu additionné de talc sous forme de mycélium libre se fait avec conservation de la morphologie mycélium libre.

Ainsi des spores d'*Aspergillus terreus* (souche X), d'*Aspergillus niger* (souche Z) et d'*Aspergillus oryzae* (souche Y) ont été mis en culture dans du milieu YPDP (Yeast Extract Peptone Potatoes) contenant :

- 24 g/L de Potatoes Dextrose
- 4 g/L d'extrait de levure
- 4 g/L de Bacto Peptone

Les figures 3-A1, 3-A2 et 3-A3 sont des images des Erlenmeyers après incubation du milieu YPDP sans talc ensemencé avec 10<sup>5</sup> spores/mL avec des spores d'*Aspergillus terreus*, d'*Aspergillus niger* et d'*Aspergillus oryzae*, respectivement.

On observe qu'après 48 heures de mise en culture dans un milieu exempt de talc, les trois souches d'*Aspergillus* se développent en adoptant une morphologie du type pellets.

Les figures 3-B1, 3-B2 et 3-B3 montrent les fioles après 48 heures d'incubation à 24°C en milieu YPDP comprenant 10g/L de talc et ensemencé avec 10<sup>5</sup> spores/mL d'*Aspergillus terreus*, d'*Aspergillus niger* et d'*Aspergillus oryzae*, respectivement.

On remarque donc que les spores d'*Aspergillus terreus* et *Aspergillus oryzae* croissent en prenant une morphologie du type mycélium libre tandis qu'*Aspergillus niger* adopte une conformation agrégée.

Des inoculum (1 mL) prélevés sur les cultures (milieu YPDP comprenant 10g/L de talc) des trois souches d'*Aspergillus* obtenues après 24 heures d'incubation à 24°C ont été transférés en milieu YPDP sans talc (49 mL). Les figures 3-C1, 3-C2 et 3-C3 montrent les cultures en Erlenmeyers après 48 heures d'incubation. On observe que seule la souche *Aspergillus oryzae* (Fig. 3-C3) est capable de croître en conservant la morphologie mycélium libre dans un milieu ne comprenant pas de talc. Les souches *Aspergillus terreus* (Fig. 3-C1), *Aspergillus niger* (Fig. 3-C3) au contraire perdent la morphologie mycélium libre au profit de la morphologie agrégée en pellets.

Une autre série de test a été réalisée en milieu YPDP supplémenté avec 0,2 g/L de talc, cette teneur en talc correspondant à la teneur dans le milieu après transfert de l'inoculum.

Les spores d'*Aspergillus terreus*, d'*Aspergillus niger* et d'*Aspergillus oryzae* ont été ensemencés à  $10^5$  spores/mL dans le milieu et ensuite mis en culture à 24°C pendant 48 heures.

On observe un développement des spores avec une morphologie agrégée chez les trois souches d'*Aspergillus* (Fig. 3-D1, 3-D2 et 3-D3). On en conclut que la présence de talc résiduel (0,2 g/L) apporté par l'inoculum n'est pas à l'origine de la morphologie fluide obtenue pour *Aspergillus oryzae*.

## REVENDEICATIONS

- 1) Procédé de production de champignons de l'espèce *Aspergillus oryzae* sous forme de mycélium libre, comprenant au moins les étapes suivantes :
  - a) on prépare dans un bioréacteur un milieu de culture stérilisé A adapté à la croissance du champignon *Aspergillus oryzae* contenant au moins 0,5 g/L de talc ;
  - b) on ajoute au milieu de culture stérilisé A des spores d'*Aspergillus oryzae* à raison d'au moins 10 spores/ mL de milieu de culture ;
  - c) on incube en présence d'oxygène le milieu de culture stérilisé A issu de l'étape b) à une température comprise entre 15 et 45°C pendant au moins 6 heures de manière à obtenir un milieu de culture A contenant des champignons de l'espèce *Aspergillus oryzae* sous forme de mycélium libre.
- 2) Procédé selon la revendication 1, comprenant au moins une première étape de propagation incluant les étapes suivantes :
  - d) on transfère toute ou partie du milieu de culture A issu de l'étape c) dans bioréacteur contenant un milieu de culture stérilisé B exempt de talc, avec un rapport volumique (V milieu A ajouté) / (V milieu B) compris entre 0,1% et 10%, de manière à produire un milieu de culture B contenant des champignons du genre *Aspergillus oryzae* sous forme de mycélium libre;
  - e) on cultive en présence d'oxygène le milieu de culture B issu de l'étape d) à une température comprise entre 15 et 45°C pendant au moins 6 heures de manière à obtenir un milieu de culture B contenant des champignons *Aspergillus oryzae* sous forme de mycélium libre.

- 3) Procédé selon la revendication 2, comprenant en outre une seconde étape de propagation incluant les étapes suivantes :
  - f) on transfère toute ou partie du milieu de culture B issu de l'étape e) dans un bioréacteur contenant un milieu de culture stérilisé C exempt de talc, avec un rapport volumique (V milieu B ajouté) / (V milieu C) compris entre 0,1% et 10%, de manière à produire un milieu de culture C contenant des champignons du genre *Aspergillus oryzae* sous forme de mycélium libre ;
  - g) on cultive en présence d'oxygène le milieu de culture C issu de l'étape f) à une température comprise entre 15 et 45°C pendant au moins 6 heures de manière à obtenir un milieu de culture C contenant des champignons du genre *Aspergillus oryzae* sous forme de mycélium libre.
- 4) Procédé selon les revendications 2 ou 3, comprenant en outre une étape h) de production de molécules d'intérêt par les champignons du genre *Aspergillus oryzae* sous forme de mycélium libre.
- 5) Procédé selon la revendication 4, dans lequel l'étape h) de production de molécules d'intérêt est conduite de façon concomitante à l'étape e) ou g).
- 6) Procédé selon la revendication 4, dans lequel l'étape h) de production de molécules d'intérêt est conduite après les étapes e) ou g).
- 7) Procédé selon l'une des revendications 4 à 6, dans lequel les molécules d'intérêts sont choisies parmi des enzymes, des alcools, des acides organiques, des esters.
- 8) Procédé selon la revendication 7, dans lequel les enzymes sont des cellulases.
- 9) Procédé selon la revendication 8, dans lequel les cellulases sont choisies parmi les endoglucanases, les exoglucanases, et les  $\beta$ -glucosidases
- 10) Procédé selon la revendication 7, dans lequel les enzymes sont des amylases.
- 11) Procédé selon la revendication 7, dans lequel les enzymes sont des asparaginases.
- 12) Procédé selon l'une des revendications précédentes, dans lequel le milieu de culture A contient entre 5 et 20 g/L de talc.
- 13) Procédé selon l'une des revendications précédentes, dans lequel à l'étape b) le milieu de culture A estensemencé avec au moins  $10^5$  spores/mL.

## 2.2 Procédé de modification de la morphologie de champignons filamenteux agrégés de type coagulant

La présente invention a pour objet un procédé de modification de la morphologie de champignons filamenteux agrégés de type coagulant par encapsulation des spores dans une émulsion microfluidique.

### **Etat de la technique**

Les champignons filamenteux sont couramment utilisés pour produire des enzymes, susceptibles, par exemple, de catalyser la transformation de biomasse en éthanol dans le cadre de la fabrication de bio-carburants, ou de fabriquer différents acides utiles dans l'industrie agroalimentaire. *Aspergillus oryzae* permet par exemple de produire plusieurs enzymes (cellulases, amylases) utiles à l'industrie de production de biocarburants mais également pour la chimie et l'alimentaire (exemple : l'asparaginase qui permet de réduire le taux d'acrylamide dans les aliments). Plusieurs publications récentes ont aussi montré son intérêt potentiel pour la production d'acides dicarboxyliques en C4 (malate, fumarate, succinate).

La morphologie des champignons filamenteux est susceptible d'impacter directement la productivité des souches, principalement en modifiant le transport de l'oxygène et des nutriments au sein du mycélium. On distingue classiquement deux types de morphologie pour ces champignons : une morphologie non agrégée nommée mycélium libre, et une morphologie agrégée pouvant se présenter sous la forme de plusieurs agrégats sphériques, nommés pellets ou sous la forme d'un seul agrégat. Selon les espèces de champignons considérées, l'agrégation peut se produire à plusieurs stades de la croissance, à des stades dit « précoces » avant et pendant la germination des spores ou à des stades plus avancés lorsque le mycélium est déjà formé. Ainsi, les espèces dont l'agrégation est effective entre les spores en germination sont appelées espèce de type « coagulants » alors que celles s'agrégeant plus tardivement uniquement lors de la croissance du mycélium sont regroupées sous les espèces de type « non-coagulant ».

Les champignons se présentant sous des formes agrégées présentent des limitations diffusionnelles qui affectent leur productivité. Le contrôle de la morphologie des champignons filamenteux pour garantir l'obtention de mycéliums libres, constituerait donc un avantage significatif pour la maîtrise des procédés de production d'enzymes mettant en œuvre ces champignons, afin d'améliorer leur productivité et de faciliter leur culture en bioréacteur.

Il n'existe à ce jour dans la littérature aucune étude relative au contrôle de la morphologie des champignons filamenteux présentant une morphologie agrégée par mise en œuvre de techniques microfluidiques.

## Résumé de l'invention

La présente invention propose l'utilisation de la microfluidique afin d'isoler physiquement, au sein d'une émulsion, les spores de champignons filamenteux au cours de leur germination. A la fin de la germination, la déstabilisation de l'émulsion, la récupération des tubes germinatifs puis leur mise en culture permet d'obtenir une croissance fluide pour certaines espèces ayant habituellement une croissance sous forme agrégée.

La croissance sous forme fluide facilite la mise en culture des champignons et permet d'augmenter les productivités des procédés les mettant en œuvre.

L'invention a ainsi pour objet un procédé de modification de la morphologie de champignons filamenteux agrégés de type coagulant comprenant :

- a) l'encapsulation des spores desdits champignons filamenteux dans la phase dispersée d'une émulsion eau-dans-huile,
- b) la germination des spores encapsulées dans ladite phase dispersée de l'émulsion,
- c) la récupération des spores germées non agrégées,

ladite émulsion étant obtenue par mise en œuvre d'un dispositif microfluidique,

- d) la mise en culture des spores germées en milieu liquide.

Au sens de la présente demande, la microfluidique est définie comme la technologie des systèmes qui manipulent de petits volumes de fluides ( $10^{-9}$  à  $10^{-18}$  litres), en utilisant des canaux de la dimension de quelques dizaines de micromètres.

Beneyton et al. a décrit en 2016 l'utilisation de la microfluidique pour l'encapsulation des spores de l'espèce *Aspergillus niger* pour le criblage enzymatique haut-débit de souches mutantes par fluorescence. Un grand nombre de spores soumises à une mutagénèse aléatoire sont encapsulées séparément au sein de gouttes de milieu de culture, dispersée dans une phase continue d'huile. Au cours de leur croissance, la dégradation d'un substrat fluorescent contenu dans les gouttes permet d'évaluer la production d'enzymes par le champignon encapsulé et ainsi de sélectionner parmi la population les souches mutantes les plus performantes. Beneyton et al. ne décrit pas la mise en œuvre de cette technologie pour modifier la morphologie de champignons filamenteux.

Le procédé selon l'invention permet la modification de la morphologie de champignons filamenteux qui, naturellement forment des agrégats par regroupement des spores au cours de leur développement (= type coagulant). La présente invention a pour objet de prévenir, voire de supprimer cette agrégation en isolant physiquement les spores les unes des autres avant et pendant la germination, par leur encapsulation dans une émulsion eau-dans-huile obtenue par microfluidique.

## Description des figures

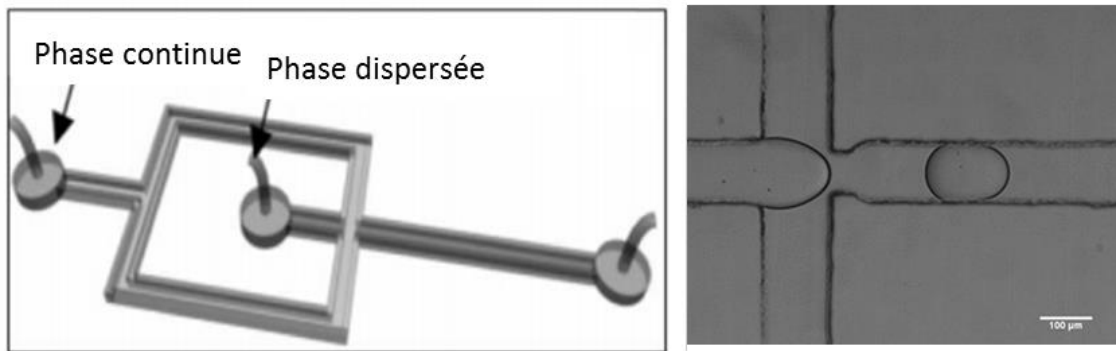


Figure 1

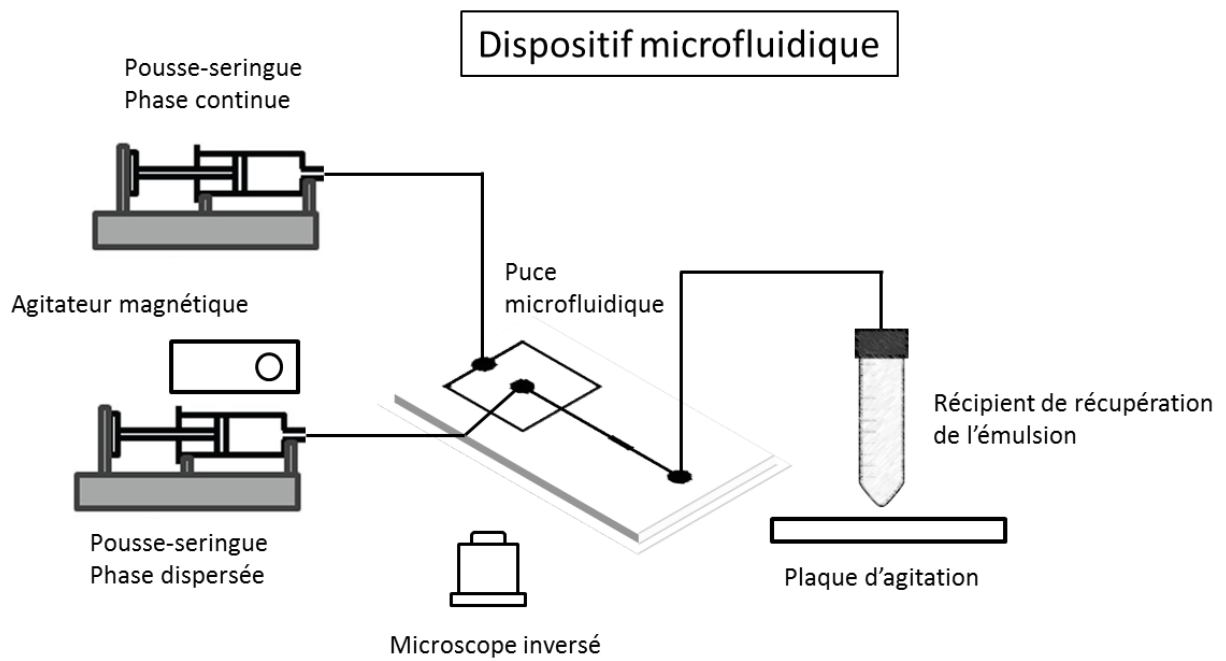
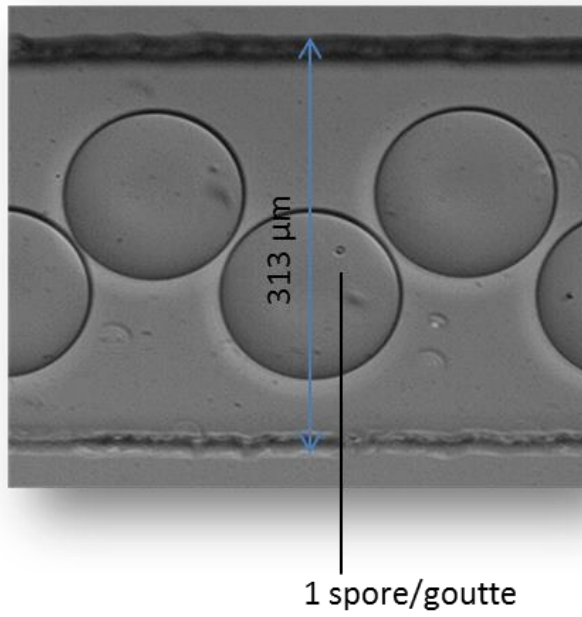
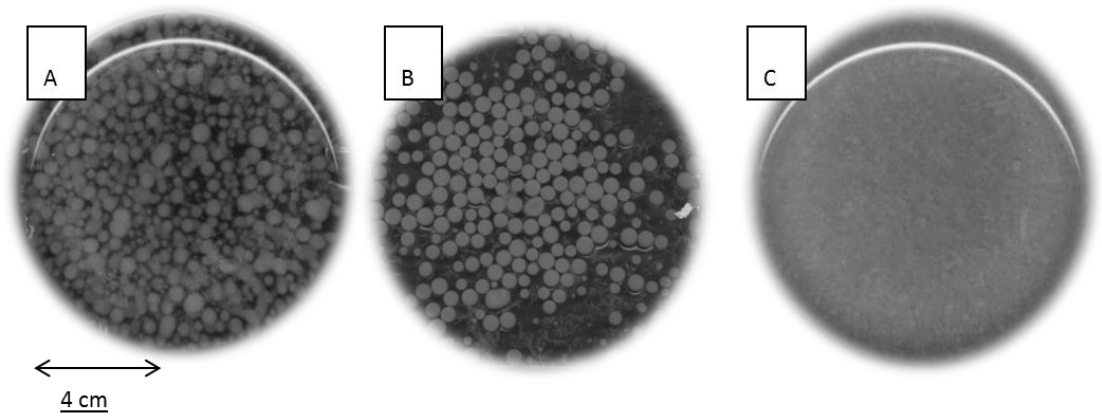


Figure 2



*Figure 3*



*Figure 4*



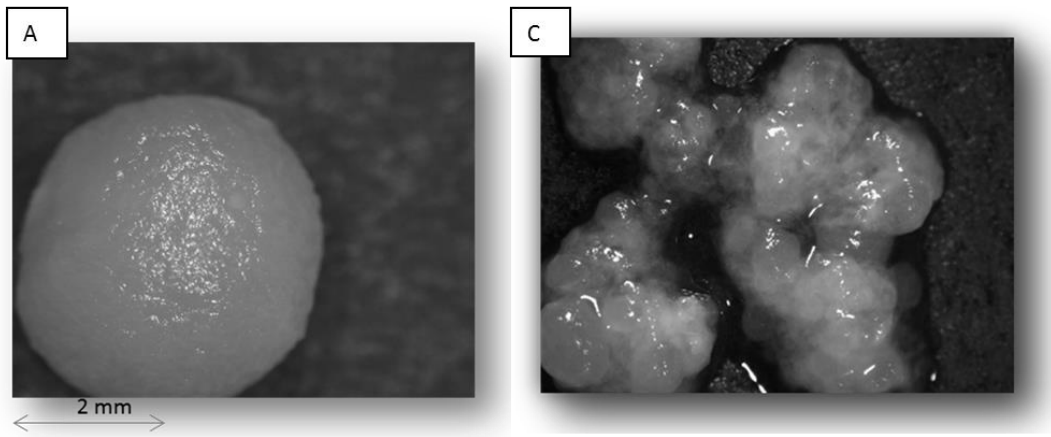


Figure 5

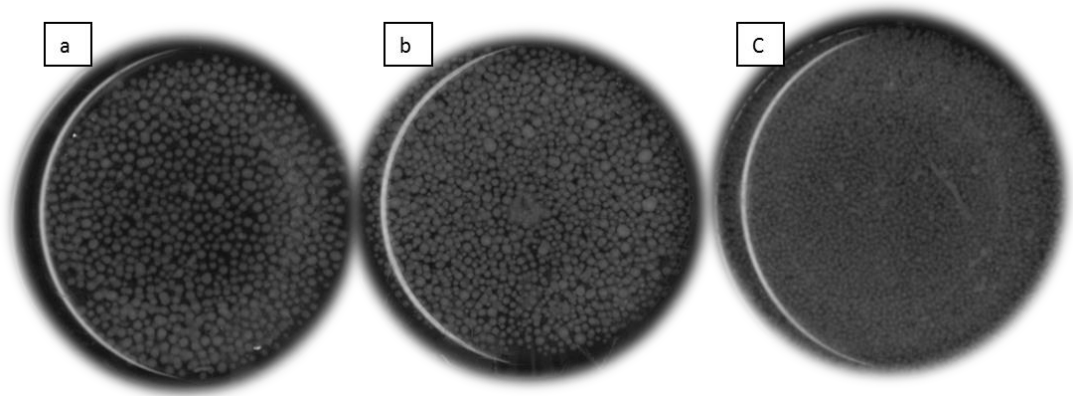


Figure 6

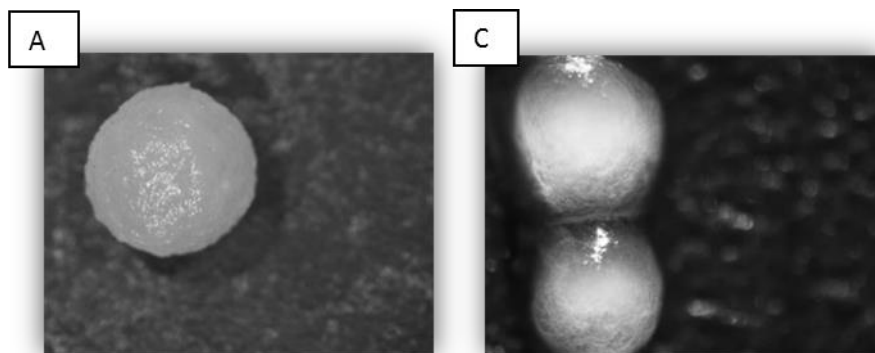


Figure 7

*La Figure 1 illustre une géométrie typique utilisée pour la formation de gouttes à une jonction en « flow-focusing ».*

*La Figure 2 illustre un dispositif microfluidique mis en œuvre dans les exemples de l'invention.*

*La Figure 3 est une observation microscopique de l'encapsulation des spores réalisée en mettant en œuvre le procédé de l'invention.*

*La Figure 4 est une série de photographies d'Erlenmeyer de culture d'Aspergillus oryzae observées dans les conditions de l'exemple 2 : 4A) et 4B) illustrent une culture témoin, 4C) illustre une culture de spores issues du procédé d'encapsulation de l'invention.*

*La Figure 5 représente des photographies en loupe binoculaire de culture d'Aspergillus oryzae observées dans les conditions de l'exemple 2 : 5A) échantillon de la culture témoin, 5C) échantillon de la culture issue du procédé d'encapsulation de l'invention.*

*La Figure 6 est une série de photographies d'Erlenmeyer de culture d'Aspergillus terreus observées dans les conditions de l'exemple 3 : 6A) et 6B) illustrent une culture témoin, 6C) illustre une culture de spores issues du procédé d'encapsulation de l'invention.*

*La Figure 7 représente des photographies en loupe binoculaire de culture d'Aspergillus terreus observées dans les conditions de l'exemple 3 : 7A) échantillon de la culture témoin, 7C) échantillon de la culture issue du procédé d'encapsulation de l'invention.*

### **Champignon filamenteux de morphologie agrégée**

Dans le cadre de la présente demande, on entend par champignon filamenteux de morphologie agrégée appartenant au type coagulant, un champignon dont les spores non germées et en cours de germination s'agrègent naturellement entre elles.

Selon un mode préféré de réalisation, le champignon filamenteux de morphologie agrégée est choisi parmi les espèces *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger* ou *Aspergillus nidulans*, et plus préférentiellement parmi les souches appartenant à l'espèce *Aspergillus oryzae*.

Dans le cadre du présent procédé, on utilise des spores de champignons filamenteux. Les spores peuvent être filtrées avant utilisation dans le procédé de l'invention, afin de s'affranchir de la présence éventuelle de mycélium.

### **Encapsulation**

Le procédé de modification de la morphologie des champignons filamenteux selon l'invention comprend une première étape d'encapsulation des spores du champignon dans la phase dispersée d'une émulsion eau-dans-huile.

L'émulsion est obtenue par mise en œuvre d'un dispositif microfluidique.

La phase dispersée de l'émulsion est une phase aqueuse comprenant au moins de l'eau, des spores de champignon à encapsuler en suspension dans un milieu de culture liquide.

Le milieu de culture peut être tout milieu connu de l'homme du métier pour permettre la germination des champignons filamenteux objets de la présente demande. Il peut s'agir par exemple d'un milieu riche contenant des sources de nutriments complexes (par exemple : extrait de levure, peptone) ou d'un milieu minimum contenant des composés définis (par exemple : sels minéraux, composés carbonés et azotés).

Il peut s'agir par exemple d'un milieu Yeast Extract-Peptone-Dextrose comprenant 24g/L de dextrose de pomme de terre, 5g/L de peptone et 5g/L d'extrait de levure.

La phase huileuse de l'émulsion comprend au moins une huile biocompatible n'interférant pas dans la croissance de micro-organisme. En particulier, la phase huileuse comprend au moins une huile fluorée. Les huiles fluorées sont en effet connues pour être biocompatibles pour des utilisations avec des microorganismes (voir par exemple Baret J.-C., *Surfactants in droplet-based microfluidics, Lab on a chip*, **2012**, *12*(3), p. 422).

L'huile fluorée peut être choisie parmi les perfluoroalcanes, les perfluoroamines et les perfluoroéthers. De préférence, ladite huile fluorée peut être choisie parmi le perfluoropentane, le perfluorohexane, le perfluorotripropylamine et le perfluoropolyéther.

Selon un mode préféré de réalisation, la phase huileuse comprend une huile fluorée, par exemple celle commercialisée par la société 3M sous la dénomination Fluorinert FC-3283.

Outre l'huile, la phase huileuse comprend au moins un tensioactif permettant la stabilisation des gouttes de phase aqueuse dispersées dans la phase huileuse. Le tensioactif peut, de préférence, être choisi parmi les tensioactifs biocompatibles. De préférence, le tensioactif est fluoré, tel que celui commercialisé par la société Dolomite sous la dénomination Picosurf.

L'émulsion selon l'invention est obtenue par microfluidique, c'est-à-dire par mise en œuvre d'un système miniaturisé permettant de générer en flux des microgouttes de façon reproductible et contrôlée au sein de microcanaux agencés selon une géométrie particulière.

Ces géométries sont bien connues de l'homme de l'art. On peut citer, parmi les méthodes les plus classiques pour générer un flux de microgouttes, la jonction en T et la géométrie de focalisation de flux (« flow-focusing » en terminologie anglo-saxonne). Selon un mode préféré de réalisation, l'émulsion selon l'invention est obtenue au moyen d'un système microfluidique présentant une géométrie « flow-focusing ». Dans ce type de système, la phase dispersée est injectée colinéairement à deux flux d'huile l'entourant. Selon les conditions expérimentales choisies, un jet de phase dispersée peut se former entre les deux flux d'huile. Le co-flux laminaire ainsi créé passe à travers une constriction, ce qui l'affine et induit éventuellement la rupture du jet de phase dispersée en gouttelettes. Dans la géométrie « flow-focusing », les gouttes sont donc de préférence formées au niveau d'une jonction en croix ou similaire. Ce type de système est par exemple illustré à la Figure 1.

Le dispositif microfluidique selon l'invention comprend notamment :

- un premier conduit microfluidique, alimenté en phase aqueuse contenant en suspension les spores à encapsuler ;
  - un deuxième conduit microfluidique alimenté en phase huileuse ;
- le premier conduit débouchant dans le deuxième conduit et formant une jonction fluidique avec ce dernier.

Les deux phases liquides n'étant pas miscibles, une interface se forme au niveau de la jonction fluidique, correspondant à l'intersection des conduits microfluidiques, permettant ainsi la formation de gouttes de phase aqueuse dispersées dans la phase huileuse, c'est-à-dire la formation de l'émulsion. Les pressions et débits des deux phases liquides sont dimensionnés de telle manière que l'interface reste stable par équilibre entre lesdites pressions et la tension interfaciale.

Le dispositif microfluidique selon l'invention comprend, de préférence, également au moins un conduit microfluidique d'évacuation de l'émulsion formée.

Selon un mode préféré de réalisation, le dispositif microfluidique présente une géométrie plane, en particulier le dispositif selon l'invention est une puce microfluidique.

Les premier et deuxième conduits microfluidiques du système microfluidique mis en œuvre, en particulier les conduits de la puce microfluidique utilisée, ont, de préférence, une section pouvant s'inscrire dans un cercle de diamètre compris entre 1  $\mu\text{m}$  et 1 mm, de préférence entre 50 et 500  $\mu\text{m}$ , et en particulier de l'ordre de 125  $\mu\text{m}$ .

La phase aqueuse de l'émulsion obtenue au moyen du dispositif selon l'invention se présente sous la forme de gouttes dispersées dans la phase huileuse, lesdites gouttes présentant un diamètre compris entre 10  $\mu\text{m}$  et 1 mm, de préférence entre 50 et 500  $\mu\text{m}$ , et plus préférentiellement entre environ 140 et 150  $\mu\text{m}$ . Le diamètre des gouttes peut, par exemple être mesuré par toute méthode connue de l'homme du métier, et notamment par analyse d'image sur un microscope optique.

Un tel dispositif ou une telle puce microfluidique peut être fabriqué à partir d'un substrat en silicium, silice ou verre par des techniques classiques de photolithographie et gravure empruntées à la microélectronique. En variante, le dispositif peut être réalisé en matière plastique (notamment en polydiméthylsiloxane - PDMS) par moulage, à partir d'un moule, réalisé à son tour par photolithographie.

Le dispositif microfluidique selon l'invention peut avantageusement être traité hydrophobe, par exemple par traitement à l'OTS (octadécyltrichlorosilane).

Le dispositif microfluidique d'encapsulation peut, en outre, comprendre :

- un moyen d'injection, dans le premier conduit dudit dispositif, d'une suspension formée par la phase aqueuse et par les spores à encapsuler ; il peut s'agir par exemple d'une seringue avec un pousse-seringue ou d'un contrôleur en pression ; et

- un moyen d'injection, dans le premier conduit dudit dispositif, de la phase huileuse ; il peut s'agir également d'une seringue avec un pousse-seringue ou d'un contrôleur en pression.

Dans le cadre de la présente invention, la concentration de spores dans la phase aqueuse et les débits d'injection des phases sont adaptés de manière à avoir en moyenne entre 1 et 10 spores par goutte, de préférence 1 spore par goutte.

En particulier, la phase aqueuse comprenant les spores peut être introduite dans le dispositif microfluidique à un débit compris entre 0,1 et 20 mL/h, de préférence entre 1 et 10 mL/h, et plus préférentiellement de l'ordre de 3 mL/h.

La phase huileuse contenant le tensioactif peut être introduite dans le système microfluidique à un débit compris entre 1 et 50 mL/h, de préférence entre 5 et 20 mL/h, et plus préférentiellement de l'ordre de 8 mL/h.

L'étape d'encapsulation du procédé selon l'invention peut durer au moins 30 minutes, de préférence de 30 min à 10h, de préférence encore de 1 à 5h, et plus préférentiellement environ 3h.

L'émulsion formée est récupérée en sortie du dispositif microfluidique par le conduit microfluidique de sortie. Le conduit microfluidique de sortie présente une section pouvant s'inscrire dans un cercle de diamètre compris entre 125 et 1 500  $\mu\text{m}$ , de préférence entre 500 et 1 000  $\mu\text{m}$ , et en particulier de l'ordre de 750  $\mu\text{m}$ .

Contrairement aux systèmes microfluidiques couramment développés par exemple pour le criblage enzymatique, on ne cherche pas à récupérer séparément chacune des spores isolées pour les caractériser, ni à les trier, puisque la population utilisée est identique génétiquement.

Ainsi, l'émulsion en sortie du dispositif microfluidique est récupérée dans son intégralité dans un récipient unique et est maintenue sous agitation pour éviter qu'elle ne casse. L'agitation peut par exemple être maintenue entre 50 et 300 tr/min, de préférence entre 120 et 150 tr/min, et plus préférentiellement de l'ordre de 120 tr/min entre 20 et 30°C.

### **Germination**

Une fois l'encapsulation réalisée, le procédé selon l'invention met en œuvre une étape b) de germination des spores.

L'émulsion récupérée à l'issue de l'étape a) est maintenue sous agitation le temps nécessaire à la germination des spores, de préférence entre 1 et 40h, préférentiellement entre 10 et 30 heures, et plus préférentiellement encore environ 19h.

La germination est réalisée à température ambiante, en particulier entre 20 et 30°C, de préférence à 24°C.

Comme précédemment, l'agitation peut par exemple être maintenue entre 50 et 300 tr/min, de préférence entre 120 et 150 tr/min, et plus préférentiellement de l'ordre de 120 tr/min entre 20 et 30°C.

### **Récupération des spores germées**

Une fois la germination terminée, l'émulsion est déstabilisée de manière à récupérer une phase aqueuse contenant les spores germées (appelées tubes germinatifs), correspondant au début de formation du mycélium.

La fin de la germination est connue de l'homme du métier. Des données sont disponibles dans la littérature pour chaque champignon et une observation microscopique permet de le confirmer.

Tous les moyens connus de l'homme du métier pour casser l'émulsion peuvent être mis en œuvre.

Selon un mode préféré de réalisation, la récupération des spores germées non agrégées est réalisée par déstabilisation de l'émulsion.

Par exemple, l'émulsion peut être rincée au moyen d'une phase huileuse dépourvue de tensioactif, jusqu'à ce que la concentration en tensioactif soit trop faible pour assurer la stabilité de la dispersion des gouttes de phase aqueuse dans l'huile. Les deux phases peuvent ensuite être aisément séparées.

La phase aqueuse ainsi récupérée peut être utilisée pour ensemercer une culture à plus grande échelle, comme une fiole, un fermenteur de propagation, voire un fermenteur de production.

### **Mise en culture des spores germées**

Le procédé selon l'invention comprend une dernière étape d) de mise en culture des spores germées en milieu liquide.

La mise en culture de l'étape d) est de préférence opérée sous agitation entre 20 et 30°C, de préférence 24°C, dans un milieu permettant la croissance de microorganismes filamenteux, de préférence milieu riche.

La mise en culture de l'étape d) dure de préférence entre 1h et 48h, et notamment environ 24h.

Le procédé selon l'invention permet d'obtenir, après généralement 24h de croissance, une culture fluide, non agrégée, de mycélium de champignons filamenteux ce qui présente un avantage pour leur mise en œuvre industrielle (propagation facilitée, meilleure croissance par diffusion facilitée des nutriments au sein du mycélium).

La mise en culture peut être utilisée comme étape préliminaire à l'ensemencement d'un bioréacteur ou toute autre installation permettant la propagation et la croissance du champignon filamenteux encapsulé selon l'invention.

### **Exemple**

#### Exemple 1 : Protocole

##### *Phase aqueuse :*

On a préparé une phase aqueuse composée de 15 mL d'une solution de milieu riche YPDP (Potatoes dextrose 24g/L, Yeast Extract 5g/L et Peptone 5g/L) diluée au demi et ensemencée par des spores de champignons à une concentration de  $5 \cdot 10^5$  spores/mL, dans une seringue en verre.

Une agitation magnétique est mise en place dans la seringue pour éviter la sédimentation des spores. La banque de spores a été précédemment filtrée afin de s'affranchir de la présence éventuelle de mycélium.

##### *Phase huileuse :*

On a préparé une phase huileuse composée de 30mL de solution d'huile fluorée FC3283 additionnée du surfactant biocompatible Picosurf à 3g/L, dans une seringue en verre.

##### *Dispositif expérimental :*

Le dispositif expérimental est composé d'une puce microfluidique illustrée à la Figure 2 comprenant des canaux microfluidiques, obtenue par réticulation et collage de PDMS (RTV 615, société Momentive) sur une lame de verre par Plasma air (création de site actifs sous l'action d'un champ électrique Radio Fréquence qui entraîne une forte adhérence entre les deux surfaces. Cette méthode consiste à activer la surface au plasma oxygène (ou air seul). Pour ce faire, un vide primaire est créé et un gaz excité est généré sous l'effet d'un champ électrique Radio-Fréquence. Les électrons et les ions à forte énergie qui constituent le plasma permettent de casser les liaisons de surface et de créer des sites "actifs", deux surfaces PDMS-PDMS ou PDMS-verre ainsi traitées peuvent alors créer des liaisons et adhérer fortement).

La puce microfluidique présentée à la Figure 2 est percée au niveau de l'arrivée des phases aqueuse et huileuse, et en sortie. Les conduits microfluidiques d'entrée ont un diamètre interne de 125  $\mu\text{m}$  et celui de sortie de 750  $\mu\text{m}$ .

Un traitement à l'OTS (octadécyltrichlorosilane) rend le système hydrophobe.

La puce microfluidique est placée sous un microscope inversé équipé d'une caméra permettant de visualiser en temps réel l'encapsulation. Les deux seringues contenant les phases aqueuse et huileuse sont placées sur deux pousse-seringues, permettant le réglage séparé des débits de chaque phase. L'émulsion en sortie de la puce microfluidique est recueillie dans un tube Falcon 50mL maintenu à une agitation constante de 120 tr/min durant toute la durée de la germination.

*Encapsulation :*

La phase aqueuse contenant les spores est injectée à un débit de 3 mL/h, la phase huileuse contenant le surfactant à un débit de 8 mL/h. L'encapsulation dure 3h et permet d'obtenir environ 10 mL d'émulsion et 20 mL d'huile fluorée.

*Germination :*

L'émulsion est maintenue, avec une agitation de 120 tr/min à 24°C, pendant 19 heures, temps nécessaire à la germination des spores.

*Déstabilisation de l'émulsion :*

A la fin de l'étape de germination, l'émulsion est déstabilisée afin de récupérer uniquement la phase aqueuse contenant les spores germées. Pour se faire, des rinçages successifs à l'huile FC3283 dépourvue de surfactant sont réalisés :

L'huile résiduelle au fond du tube est prélevée, puis l'huile vierge est ajoutée en quantité équivalente à celle de l'émulsion (environ 10 mL). Le tube est agité manuellement pendant 5 min. Cette opération est répétée autant de fois que nécessaire jusqu'à observer une phase aqueuse claire et sans huile, contenant les spores germées.

*Croissance :*

La phase aqueuse ainsi récupérée (8 mL environ) est ensuite transférée en Erlenmeyer de contenance 250 mL dans le milieu riche YPDP qsp 50 mL.

La croissance à 24°C sous agitation 175 tr/min dure 24h.

Exemple 2 : application à *Aspergillus oryzae*

Les spores d'*Aspergillus oryzae*, espèce qui présente une morphologie de type agrégée en pellets formées par un mécanisme coagulant lors de sa culture en milieu riche liquide, sont encapsulées selon le protocole décrit dans l'exemple 1.

L'observation de l'étape d'encapsulation par le microscope (Figure 3) montre la présence d'en moyenne 1 spore/goutte et une taille de goutte d'environ 140 à 150 µm de diamètre (2 nL).

Deux témoins dont les spores ne sont pas encapsulées selon le procédé de l'invention sont également préparés :

- un témoin A comprenant 10 mL de milieu YPDP dilué au demi, ensemencé à  $5.10^5$  spores/mL et placé en tube Falcon dans les mêmes conditions que le tube de récupération de l'émulsion ; et

- un témoin B, identique au témoin A, additionné de 20 mL d'huile + tensioactif

Après mise en œuvre du procédé décrit à l'exemple 1, les 10 mL d'émulsion déstabilisée selon l'invention contenant les spores germées sont transférés dans un Erlenmeyer contenant 40 mL de milieu riche YPDP. De la même manière, les deux témoins sont également transférés dans deux Erlenmeyer contenant 40 mL de milieu riche YPDP.

Au bout de 24h de croissance, la souche d'*Aspergillus oryzae* testée (NRRL 3488) montre les morphologies présentées à la Figure 4

Les photos de la Figure 4 sont prises en scannant le fond des Erlenmeyers contenant les champignons après 24h de culture. On observe que les photos A et B présentent un mycélium agrégé sous forme de « pellets » distinctes contrairement à la photo C où la culture est fluide sans agrégats. Les photographies prise en loupe binoculaire en Figure 5 montrent un grossissement de la culture A : grossissement d'une « pellet » et de la culture C : grossissement d'un échantillon fluide extrait de la culture C.

L'isolement des spores durant leur germination au moyen du procédé selon l'invention entraîne un important changement morphologique de cette souche lors de sa croissance en milieu liquide.

### Exemple 3 : Application à *Aspergillus terreus*

Les spores d'*Aspergillus terreus*, espèce qui présente une morphologie de type agrégée en pellets formées par un mécanisme non-coagulant lors de sa culture en milieu riche liquide, sont encapsulées selon le protocole décrit dans l'exemple 1.

De la même manière que dans l'exemple 2, l'observation de l'étape d'encapsulation par le microscope montre la présence d'en moyenne 1 spore/goutte et une taille de goutte d'environ 140 à 150 µm de diamètre (2 nL).

Deux témoins dont les spores ne sont pas encapsulées selon le procédé de l'invention sont également préparés :

- un témoin A comprenant 10 mL de milieu YPDP dilué au demi,ensemencé à  $5.10^5$  spores/mL et placé en tube Falcon dans les même conditions que le tube de récupération de l'émulsion ; et

- un témoin B, identique au témoin A, additionné de 20 mL d'huile + tensioactif

Après mise en œuvre du procédé décrit à l'exemple 1, les 10 mL d'émulsion déstabilisée selon l'invention contenant les spores germées sont transférés dans un Erlenmeyer contenant 40 mL de milieu riche YPDP. De la même manière, les deux témoins sont également transférés dans deux Erlenmeyer contenant 40 mL de milieu riche YPDP.

Au bout de 24h de croissance, la souche d'*Aspergillus terreus* testée (NRRL 1960) montre les morphologies illustrées aux Figures 6 et 7.

On observe que la morphologie de la souche d'*Aspergillus terreus* étudiée est agrégée sous forme de pellets dans les 2 cultures témoins (sans encapsulation, Figure 6 A et B), mais également après encapsulation sous forme de pellets de diamètre légèrement inférieur (Figure 6 C)

Les photographies prise en loupe binoculaire en Figure 7 montrent un grossissement de la culture A : grossissement d'une « pellet » et de la culture C : grossissement de deux « pellets ».

Comme il apparait dans les présents exemples, le procédé selon l'invention permet une encapsulation de champignons filamenteux agrégés de type coagulants (par exemple la souche *Aspergillus oryzae*) mais ne donne pas de bons résultats pour des champignons de type non-coagulants (par exemple la souche *Aspergillus terreus*)

En effet, l'espèce *Aspergillus terreus* appartenant au type non-coagulant est capable de s'agréger après germination par agrégation des filaments mycéliens. La séparation physique



des spores avant et pendant la germination ne permet donc pas d'empêcher cette espèce de présenter une morphologie agrégée en milieu liquide. *Aspergillus oryzae* appartenant au type coagulant ne s'agrège qu'aux stades précoces de son développement (avant et durant la germination), en séparant les spores par cette technique il n'y a plus d'agrégation possible pour cette espèce.

### **Revendications**

1. Procédé de modification de la morphologie de champignons filamenteux agrégés de type coagulant comprenant :

- a) l'encapsulation des spores desdits champignons filamenteux dans la phase dispersée d'une émulsion eau-dans-huile,
- b) la germination des spores encapsulées dans ladite phase dispersée de l'émulsion,
- c) la récupération des spores germées non agrégées,

ladite émulsion étant obtenue par mise en œuvre d'un dispositif microfluidique,

- d) la mise en culture des spores germées en milieu liquide.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le champignon filamenteux de morphologie agrégée de type coagulant est choisi de préférence parmi les espèces *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger* ou *Aspergillus nidulans*, et plus préférentiellement parmi les souches appartenant à l'espèce *Aspergillus oryzae*.

3. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que la phase dispersée de l'émulsion est une phase aqueuse comprenant au moins de l'eau, des spores de champignon à encapsuler en suspension dans un milieu de culture liquide.

4. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la phase huileuse de l'émulsion comprend au moins une huile biocompatible n'interférant pas dans la croissance de micro-organisme, de préférence au moins une huile fluorée.

5. Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que la phase huileuse comprend au moins un tensioactif, de préférence biocompatible.

6. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le dispositif microfluidique comprend un premier conduit microfluidique alimenté en phase aqueuse contenant en suspension les spores à encapsuler, et un deuxième conduit microfluidique alimenté en phase huileuse, le premier conduit débouchant dans le deuxième conduit et formant une jonction fluïdique avec ce dernier.

7. Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que les premier et deuxième conduits microfluidiques ont une section pouvant s'inscrire dans un cercle de diamètre compris entre 1  $\mu\text{m}$  et 1 mm ; de préférence entre 50 et 500  $\mu\text{m}$ , et en particulier de l'ordre de 125  $\mu\text{m}$ .

8. Procédé selon l'une quelconque des revendications 3 à 7, caractérisé en ce que la phase aqueuse de l'émulsion se présente sous la forme de gouttes dispersées dans la phase huileuse, lesdites gouttes présentant un diamètre compris entre 10  $\mu\text{m}$  et 1 mm, de préférence entre 50 et 500  $\mu\text{m}$ , et plus préférentiellement entre environ 140 et 150  $\mu\text{m}$ .

9. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que dispositif microfluidique d'encapsulation comprend, en outre :

- un moyen d'injection, dans le premier conduit dudit dispositif, d'une suspension formée par la phase aqueuse et par les spores à encapsuler, ledit moyen d'injection étant par exemple d'une seringue avec un pousse-seringue ; et

- un moyen d'injection, dans le deuxième conduit du dispositif, de la phase huileuse ; ledit moyen d'injection étant par exemple une seringue avec un pousse-seringue.

10. Procédé selon l'une quelconque des revendications 8 ou 9, caractérisé en ce que la concentration de spores dans la phase aqueuse et les débits d'injection des phases sont adaptés de manière à avoir en moyenne entre 1 et 10 spores par goutte, de préférence 1 spore par goutte.

11. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le dispositif microfluidique d'encapsulation comprend, en outre un conduit microfluidique de sortie, permettant la récupération de l'émulsion, présentant une section pouvant s'inscrire dans un cercle de diamètre compris entre 125 et 1 500 $\mu\text{m}$ , de préférence entre 500 et 1 000 $\mu\text{m}$ , et en particulier de l'ordre de 750  $\mu\text{m}$ .

12. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'étape b) de germination est opérée sous agitation à température ambiante, en particulier entre 20 et 30°C, de préférence à 24°C, le temps nécessaire à la germination des spores, de préférence entre 1 et 40h, préférentiellement entre 10 et 30 heures, et plus préférentiellement encore environ 19h.

13. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'étape c) de récupération des spores germées est mise en œuvre par déstabilisation de l'émulsion, de préférence par rinçage au moyen d'une phase huileuse dépourvue de tensioactif, jusqu'à ce que la concentration en tensioactif soit trop faible pour assurer la stabilité de la dispersion des gouttes de phase aqueuse dans la phase huileuse.

14. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'étape d) de mise en culture des spores germées est opérée sous agitation entre 20 et 30°C, de préférence 24°C, dans un milieu permettant la croissance de microorganismes filamenteux, de préférence milieu riche.

15. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la mise en culture est utilisée comme étape préliminaire à l'ensemencement d'un bioréacteur ou toute autre installation permettant la propagation et la croissance du champignon filamenteux encapsulé.

## ABREGE

L'invention a pour objet un procédé de modification de la morphologie de champignons filamenteux agrégés de type coagulant comprenant :

- a) l'encapsulation des spores desdits champignons filamenteux dans la phase dispersée d'une émulsion eau-dans-huile,
- b) la germination des spores encapsulées dans ladite phase dispersée de l'émulsion,
- c) la récupération des spores germées non agrégées,

ladite émulsion étant obtenue par mise en œuvre d'un dispositif microfluidique,

- d) la mise en culture des spores germées en milieu liquide.



## **Title**

Understanding and control of filamentous fungi morphology in submerged culture

## **Keywords**

fungal morphologies, submerged fermentations, coagulant and non-coagulant mechanisms, microparticles (MEC), microfluidics, mineral salts, pre-cultures, bioreactor propagations.

## **Abstract**

Biotechnology has for many years operated a large collection of microorganisms in food and health sectors. Today, this field fits perfectly into the ecological transition of chemical and energy sectors, by designing high-performance processes to replace petroleum products. Filamentous fungi represent important organisms in industrial biotechnologies, widely used to produce metabolites with strong commercial interests such as antibiotics, enzymes or organic acids. Their implementation in submerged environment is continually attracting new research to overcome issues associated with their behavior. Indeed, this mode of cultivation generates different fungal morphologies, mainly dependent on their intrinsic biological properties but also on physico-chemical conditions within their environment. This characteristic of filamentous fungi very often influences their implementation and their productivity.

This thesis proposes an original study to identify and control the underlying phenomena that influence fungal morphogenesis. To this end, we propose research combining fundamental and applied studies on several strains of strong industrial interest. We have investigated and developed various pioneering techniques for the control of fungal morphology. Microparticles implementation and development of a microfluidic encapsulation technique allowed us to confirm and deepen the aggregation mechanisms of fungal conidia. On the other hand, the addition of mineral salts in the culture medium prevented hyphae aggregation. To validate an extrapolation of these results towards an industrial process, these tools were also implemented during the first steps of scale-up. These works bring results and perspectives in the control of bioprocesses involving filamentous fungi.

## Titre

Compréhension et contrôle de la morphologie des champignons filamenteux en milieu liquide

## Mots-clés

morphologies fongiques, fermentations liquides, mécanismes coagulants et non-coagulants, microparticules (MEC), microfluidique, sels minéraux, pré-cultures, propagations bioréacteurs.

## Résumé

La biotechnologie exploite depuis de très nombreuses années une importante collection de micro-organismes pour fabriquer des produits dans des secteurs tels que l'alimentation et la santé. Elle s'inscrit aujourd'hui parfaitement dans la transition écologique du secteur de la chimie et de l'énergie, en concevant des produits performants pour substituer les produits d'origine pétrolière. Les champignons filamenteux représentent d'importants organismes en biotechnologies industrielles, largement utilisés pour la production de métabolites d'intérêts commerciaux tels que les antibiotiques, les enzymes ou encore les acides organiques. Leurs mises en œuvre en milieu liquide attirent continuellement de nouvelles recherches afin de surmonter les problèmes associés à leur comportement. En effet ce mode de culture engendre différentes morphologies fongiques, dépendantes principalement de leurs propriétés biologiques intrinsèques mais aussi des conditions physico-chimiques au sein de leur environnement. Cette caractéristique conditionne bien souvent leur mise en œuvre et leur productivité.

Cette thèse propose une étude originale dont l'objectif est d'identifier et de contrôler les phénomènes sous-jacents qui influent sur la morphogénèse des champignons. Pour cela nous proposons des recherches couplant des études fondamentales et appliquées sur plusieurs souches de fort intérêt industriel. Nous avons investigué, mis au point et développé différentes techniques pionnières dans la maîtrise de la morphologie fongique. La mise en œuvre de microparticules et le développement d'une technique d'encapsulation par microfluidique ont permis de confirmer et d'approfondir les mécanismes relatifs à l'agrégation des conidies de champignon. D'autre part, l'ajout de sels minéraux dans le milieu de culture a montré l'affranchissement de l'agrégation des hyphes de champignons. Pour concrétiser une extrapolation des résultats vers un procédé industriel, ces outils ont également été implémentés au cours des premières étapes de changement d'échelle. Ainsi ces travaux apportent des résultats et des perspectives concrètes dans la maîtrise des bioprocédés impliquant les champignons filamenteux.