Université de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse
Discipline ou spécialité : Ingénieries Enzymatique et Microbienne

---

Présentée et soutenue par Emilie AMILLASTRE

Le 16 Juillet 2012

Amélioration de la robustesse de souches de levures aux stress technologiques par une stratégie de génie microbiologique. Application à la production industrielle de bio-éthanol à partir de matières premières agricoles

---

JURY

Annie MARC	Directeur de Recherche CNRS LRGP, Nancy	Rapporteur
Jean-Marie SABLAYROLLES	Directeur de Recherche INRA UMR SPO, Montpellier	Rapporteur
Stéphane GUILLOUET	Maître de conférences Université de Toulouse, INSA, LISBP	Directeur de thèse
Sandrine ALFENORE	Maître de conférences Université de Toulouse, INSA, LISBP	Co-directeur de thèse
Laurence PREZIOSI-BELLOY	Maître de conférences INRA UMR IATE, Univ. Montpellier II	Examinatrice
Jean-Louis URIBELARREA	Professeur Université de Toulouse, INSA, LISBP	Président
Jean-Michel BAVOUZET	Responsable Service Biocarburants et Boissons fermentées Unité R&D Lesaffre International	Invité
César ACEVES-LARA	Maître de conférences Université de Toulouse, INSA, LISBP	Invité

Ecole doctorale : Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries (SEVAB)

Unité de recherche : Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés UMR 5504 et 792 CNRS-INRA-INSA de Toulouse

Directeurs de Thèse : Stéphane Guillouet, Sandrine Alfenore
Rapporteurs : Annie Marc, Jean-Marie Sablayrolles

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier sincèrement les Docteurs Annie MARC du Laboratoire Réactions et Génie des Procédés de Vandœuvre-lès-Nancy et Jean-Marie SABLAYROLLES de l'UMR Science pour l'Œnologie de Montpellier pour avoir accepté de rapporter sur ce travail de recherche.

J'adresse également mes remerciements aux Docteurs Laurence PREZIOSI-BELLOY de l'UMR IATE de l'Université de Montpellier II, Jean-Michel BAVOUZET de l'Unité R&D de Lesaffre International et César ACEVES du LISBP pour leur participation au jury de cette thèse et pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail.

Je remercie le Professeur Jean-Louis URIBELARREA d'avoir accepté de présider mon jury de thèse et pour ses conseils et pistes qui ont orienté le projet.

Je tiens à remercier le Professeur Nic LINDLEY de m'avoir accueillie au sein du Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés (LISBP) et le Professeur Carole JOUVE de m'avoir intégrée au sein de l'équipe de génie microbiologique.

Je tiens ensuite à exprimer toute ma reconnaissance et à remercier très chaleureusement Sandrine ALFENORE et Stéphane GUILLOUET, mes directeurs de thèse. Leur encadrement consciencieux, leur rigueur scientifique, leur dynamisme et leur investissement m'ont permis de progresser tout au long de ces trois (et quelques) années. Merci pour l'aide pendant les fermentations, pour la rédaction de ce manuscrit, et la répet au McDo de Samatan. Je penserai à vous et garderai mon "filet" pour des occasions très spéciales.

Un grand merci également à César, pour son aide, ses encouragements, sa patience, ses conseils précieux, sa gentillesse, ...

Ma reconnaissance va également à tous les partenaires du projet ANR "FASST" : Charles GHOMMIDH, Laurence PREZIOSI-BELLOY et Pierre TIBAYRENC de l'Université de Montpellier II ainsi que Jean-Michel BAVOUZET et Jean-Luc FUENTES de la société Lesaffre. La compétence, la disponibilité et les conseils de Pierre concernant la sonde capacitive m'ont été d'une aide très précieuse.

Je tiens à remercier l'ensemble du personnel du LISBP pour son accueil chaleureux : Sébastien, Claude, Christophe, Muriel, Régis,... . Merci beaucoup à Sophie BOZONNET pour m'avoir patiemment aidé à repiquer mes millions de clones.

Je remercie tout particulièrement l'ensemble des permanents de l'équipe de génie microbiologique pour leur aide, leur support technique et scientifique et leur disponibilité chaque

fois que j'ai eu besoin d'eux (et ça a été souvent !) : Xavier, Eric, Carole, Gérard, Carine, Nathalie G., Julie L., Luc, Michel.

Je remercie tous mes collègues doctorants et post-doctorants, … du LISBP avec lesquels j'ai passé d'excellents moments au labo et en-dehors

- Les très anciens : Claire, Julien P., Sandra, Romain, Jan, Julien C., Yuri, Vincent, Yoann.
- Les anciens : Bérangère, Julie B., Naziha, Lamia, Sirichai, Yannick, Claudia, Estelle, Mathieu, Jillian, Abril, Laurie, Nathalie L.
- Les p'tits nouveaux (par ordre d'apparition) : Maud, Lannig, Elodie, Sandy, Julie M., Léa, Cuong, Céline.
- Et tous les autres presque du labo Greg, Lio, Justin, Ludo, les Maligoy

Merci à tous pour votre bonne humeur, les pauses café, les comptages de boites, les relais de manip, les nombreuses séances de "papotages", les formations Plouple, les soirées Maktoub-canap moelleux, les devises Shadock ("Il vaut mieux mobiliser son intelligence sur des conneries que sa connerie sur des choses intelligentes !"), l'aide apportée tout au long de la thèse et LE Coaching final.

Merci à Claire future Bérion et Manu, à Delphine et Léa les Globe-trotteuses, les mercredis-filles, les milliers de fou-rires et les moments passés entre Toulouse / Paris / Toulon / Alès.

De grands merci aux copines de Toulouse : Criscri, Aurore, Elo, Elfie, Sam, Julie, les copains et Maël pour les piqueu-niqueux et brunchs et les bons moments passés ensemble depuis près de 20 ans. Et à Colab my BFF et les repas du dimanche midi avec Nico, Boret, les amis Astré et les 25 desserts light ; les week-end bricolage du photobooth et découpe des enveloppes à thé, les soirées chips-banoffee-Zaca fron-canap…

Enfin, je remercie ma famille pour son soutien depuis toujours. Merci à Pau ma coloc-sister qui m'accompagnait à mes précultures, et Max mon chauffeur à la sortie de l'IUT et qui a dit un jour à propos de mon sujet de thèse "C'est trop cool ce que tu fais !". Merci à Maman pour les Tupperware, les appels pendant que je marche et les week end fabrication de biscuits, gâteaux, cakes, pudding, … et Papa pour la résolution de mes problèmes logistiques. Merci pour votre soutien et votre réconfort en tout instant, pleins d'énormes bisous. Je remplacerai les coups de fil en marchant par des sessions Skype.

De gros bisous à mes grands-parents et aux membres de ma famille…

Bref, MERCI !



"When nothing goes right, go left !"

Le tel de Lio

"Le décès est un manque de savoir vivre"

Jean-Louis Uribelarrea

Table des Matières

Introduction générale 1

Chapitre I : Etude Bibliographique 7

I.1 Physiologie et métabolisme de la levure 7

I.1.1 La levure *Saccharomyces cerevisiae* 7

I.1.2 Le métabolisme de *Saccharomyces cerevisiae* 11

I.2 Réponses et tolérance aux stress des souches de levures 16

I.2.1 Notion de stress environnementaux et de tolérance 16

I.2.2 Amélioration des performances et de la tolérance des souches de levures – les techniques 30

I.2.3 Amélioration des performances et de la tolérance des souches de levures – l'état de l'art 32

I.3 Radiations ultra-violettes 40

I.3.1 Conséquences des irradiations aux UV chez la levure : formation de dimères de pyrimidines 41

I.3.2 Réparation des lésions induites par les UV 42

I.3.3 Conséquences de mauvaises ou de non réparations des lésions induites par les UV 44

I.3.4 Récapitulatif de l'effet de radiations UV chez la levure 49

I.4 Synthèse et analyse critique des données de la bibliographie 50

Chapitre II : Matériel & Méthodes 57

II.1 Souches et milieux de fermentation 57

II.1.1 Souches utilisées 57

II.1.2 Composition des milieux 57

II.1.3 Préparation de l'inoculum 60

II.2 Mise en œuvre des bioréacteurs 61

II.2.1 Culture de *Saccharomyces cerevisiae* en mode discontinu alimenté 61

II.2.2 Etude de *Saccharomyces cerevisiae* en culture continue 61

II.3 Méthodes analytiques 63

II.3.1 Caractérisation de la biomasse 63

II.3.2 Mesure de la concentration en glucose, éthanol, glycérol et acides organiques 71

II.3.3 Analyse de la composition des gaz 72

II.4 Méthode de traitement des données expérimentales 72

II.4.1 Détermination des bilans matières en culture en mode discontinu alimenté et continu 72
II.4.2 Analyse des gaz - Vitesses de consommation d'O_2 et de production de CO_2 75
II.4.3 Lissage des données 78
II.4.4 Bilans carbone et élémentaires 79
II.4.5 Rendements globaux 80
II.4.6 Cas particulier de l'éthanol 81

Chapitre III : Modélisation des cinétiques de croissance, de décès et de production : Simulation de conduite de réacteur pour l'obtention de variants robustes à des fluctuations thermiques 85

III.1 Principe et description du procédé d'obtention de variants 86
III.1.1 Principe de l'obtention de variants 86
III.1.2 Représentation schématique du procédé d'adaptation 87
III.2 Formulation du modèle cinétique d'obtention de variants 88
III.2.1 Nomenclature des variables et paramètres du modèle cinétique 88
III.2.2 Bilans de matière sur les différents composés 89
III.2.3 Equations cinétiques du procédé 91
III.2.4 Résolution des équations des bilans de matière 94
III.3 Cultures cellulaires pour l'obtention des grandeurs du modèle 95
III.3.1 Calcul des taux de décès 96
III.3.2 Obtention des taux de décès induits par la présence de chocs thermiques (k_{d1}, k_{d2}) 97
III.3.3 Obtention des taux de décès induits par l'exposition des cellules à un rayonnement UV (k_{dmut}) 110
III.4 Résultats des simulations du chémostat 121
III.4.1 Paramètres cinétiques 121
III.4.2 Application du modèle cinétique 124
III.4.3 Etude de sensibilité de différents paramètres 126
III.4.4 Choix des paramètres de conduite du chémostat d'obtention de variants 134
III.5 Conclusion 136

Chapitre IV : Mise en œuvre d'un réacteur continu dédié à l'obtention de variants robustes à des fluctuations thermiques 141

IV.1 Mise en œuvre du pilote de génération de mutants 141
IV.1.1 Puissance d'exposition aux UV 142
IV.1.2 Taux de dilution du chémostat 142
IV.1.3 Conditions d'aération du chémostat 143

IV.2 Mode de conduite du chémostat 144
IV.3 Caractérisation du régime permanent 146
IV.4 Analyses dynamiques des paramètres de fermentation en mode continu 147
IV.5 Analyse des paramètres cinétiques en mode continu 150
IV.6 Analyse des gaz en mode continu 155
IV.7 Analyse de la viabilité, du décès et des sous-populations cellulaires 158
IV.7.1 Viabilité cellulaire 158
IV.7.2 Evolution des sous-populations 158
IV.7.3 Analyse du décès 164
IV.8 Simulation des variables de fermentations dans les conditions mises en œuvre lors du chémostat d'obtention de variants 165
IV.9 Conclusion 169

Chapitre V : Caractérisation phénotypique de variants issus du chémostat 175
V.1 Stratégie de caractérisation des variants 175
V.2 Caractérisation de la croissance des variants 178
V.2.1 Caractérisation de la croissance sur milieu solide 178
V.2.2 Caractérisation de la croissance des variants en microplaque 182
V.3 Caractérisation des performances fermentaires des variants 184
V.4 Caractérisation phénotypique du variant 86B 186
V.4.1 Analyse de la croissance 187
V.4.2 Analyse du décès 193
V.4.3 Analyse de la production de métabolites et des performances fermentaires 199
V.5 Conclusion 203

Conclusions et Perspectives 207

Références Bibliographiques 219
Annexes 235
Index des Figures 261
Index des Tableaux 267
Nomenclature 271

Introduction générale

Introduction générale

Afin de faire face à l'épuisement des réserves en énergies fossiles ainsi qu'aux problèmes d'émissions de gaz à effet de serre et du réchauffement climatique, il est nécessaire de développer des sources d'énergie alternatives issues d'une ressource renouvelable. Dans ce but, une directive sur la promotion de l'utilisation des énergies renouvelables (2009/28/CE) a été adoptée par l'Union Européenne, en 2009 (Parlement.Européen.et.Conseil.de.l'Union.Européenne 2009). Les biocarburants, principalement avec la filière huile et dérivés (biodiesel), et la filière alcool, peuvent se substituer au pétrole et permettent ainsi de lutter contre les émissions de gaz à effet de serre et de valoriser l'agriculture.

L'ADEME (Agence de l'environnement et de la maîtrise de l'énergie) a réalisé, en février 2010, une analyse de l'impact environnemental de la consommation des biocarburants de première génération qui démontre que l'utilisation de l'éthanol comme carburant permet une réduction des émissions de gaz à effet de serre selon la matière première de 49% à 66% par rapport à l'essence (ADEME 2010; www.bioethanolcarburant.com 2011). Par ailleurs, pour une unité d'énergie fossile consommée dans le procédé de production, le bioéthanol restitue deux unités d'énergie renouvelable, soit un bilan énergétique deux fois supérieur à celui de l'essence. L'utilisation du bioéthanol représente ainsi un atout décisif dans la lutte contre le réchauffement climatique et pour le respect des équilibres environnementaux de la planète.

Le bioéthanol-carburant a initialement été produit au Brésil (programme ProAlcool 1975) et aux Etats-Unis (1978) respectivement à partir de canne à sucre et de maïs (Wheals *et al.* 1999). Plus récemment, depuis le début des années 2000 des programmes ont débuté en Europe. Avec 33,7 % des volumes, la France est le premier producteur européen, à partir de céréales et de betterave sucrière, elle produit 12,5 millions d'hectolitres d'alcool, dont 10,3 Mhl de bioéthanol (campagne 2008-2009) (www.bioethanolcarburant.com 2011).

Contrairement aux idées reçues, la production de bioéthanol en Europe ne s'effectue pas au détriment des ressources alimentaires. Les surfaces agricoles dédiées à la production du bioéthanol représentaient en 2009 3,5% des surfaces consacrées au blé et au maïs et 10,7% des surfaces de betteraves (Cour.des.comptes 2012). Ces surfaces sont nécessaires pour atteindre l'objectif d'incorporation fixé par la directive 2009/28/CE à une part de 10 % d'énergies renouvelables dans la consommation totale de carburants automobiles pour 2020. En 2009, le taux d'incorporation de bioéthanol autour de 5,5% était inférieur aux 7% prévus, résultat d'une trop faible distribution malgré une production suffisante (Cour.des.comptes 2012).

Le bioéthanol est obtenu après fermentation alcoolique des sucres issus de matières premières végétales. Différentes générations se distinguent selon le substrat utilisé. Les biocarburants de première génération sont produits à partir de substrats amylacés, d'origine alimentaire comme la betterave sucrière (sucre, mélasses…), le blé, le colza, le tournesol ou le maïs (amidon, cellulose). L'inconvénient est que seulement une partie des plantes est exploitée et que ces matières premières entrent en concurrence directe avec la chaîne alimentaire animale ou humaine. Les biocarburants de deuxième génération qui utilisent la plante entière, dont la lignocellulose, provenant de résidus agricoles et industriels et des ressources forestières. Cette utilisation de matières économiques et abondantes, non valorisables pour l'alimentaire, permet de maximiser le rendement énergétique à l'hectare et de limiter les surfaces nécessaires (Wheals *et al.* 1999). Les rendements sont très variables mais peuvent atteindre 3,5 à 5 millions de tonnes équivalent pétrole par hectare et par an (Zaldivar *et al.* 2001). Le procédé de production d'éthanol de deuxième génération consiste à hydrolyser la cellulose et les hémicelluloses, provenant de la dépolymérisation de la lignocellulose, pour libérer une majorité des sucres et les fermenter en éthanol.

Sous contraintes industrielles de production de bioéthanol, au niveau de l'étape de fermentation, les micro-organismes sont soumis à différents stress altérant le métabolisme microbien et affectant par suite les performances des procédés. Ces stress sont induits par les fluctuations des paramètres physico-chimiques (température, pH, …) qui sont régulièrement rencontrées du fait des hétérogénéités locales de mélange dans les réacteurs de grand volume (jusqu'à plusieurs milliers de mètres cube) et de l'absence de systèmes de régulation performants. Pour des applications industrielles, l'utilisation de souches plus robustes quels que soient les stress permet de garantir la stabilité du procédé et de limiter les pertes de productivité et les diminutions du titre final et du rendement de production d'éthanol.

Les performances industrielles de production d'éthanol atteignent des titres de 12° à 14° GL avec des productivités de $5 g.L^{-1}.h^{-1}$ et à des rendements éthanol/substrat de 0,42 à 0,43 $g.g^{-1}$.

Différents micro-organismes possèdent de bonnes performances de production d'éthanol sur hexoses, parmi eux les souches de levures : *Saccharomyces cerevisiae* et *uvarum*, *Kluyveromyces marxianus*, et une souche bactérienne *Zymomonas mobilis*. La fermentation alcoolique du glucose par *Saccharomyces cerevisiae* est largement connue et maîtrisée et les performances atteintes sont les meilleures (Ogier *et al.* 1999; Alfenore *et al.* 2002). De plus, le fait que cette levure soit un organisme modèle en biologie (métabolisme connu, nombreux outils) (Goffeau *et al.* 1996) en fait une bonne candidate pour la production industrielle intensive d'éthanol.

Afin de contribuer à l'intensification des performances des procédés de production de bioéthanol, ce sujet de thèse propose de comprendre l'action des stress (ici le stress température)

et plus particulièrement la physiologie de la levure *Saccharomyces cerevisiae* pour pouvoir développer un modèle d'amélioration de la tolérance d'une souche au stress thermique.

Le principe d'amélioration de la tolérance des souches au stress température est basé sur une stratégie couplée de génie microbiologique et de mutagénèse aléatoire par exposition aux ultra-violets (UV). La mutagénèse aux UV génèrera une diversité phénotypique des souches au sein du réacteur. Les différences cinétiques existantes entre la souche sauvage et le variant recherché doivent permettre la sélection du variant lors de cultures continues menées sous pression de sélection (ici la température). L'application d'un profil de température permettra la sélection de ce variant et son implantation. L'enrichissement de la souche résistante se fera sur un critère de mortalité, le variant mourant moins vite étant sélectionné.

Dans le cadre de cette thèse, différentes questions se posent.

- Quel est l'impact de variations de température et de l'exposition aux UV sur les cinétiques de croissance, de production et de décès et sur les différentes populations cellulaires, chez Saccharomyces cerevisiae, en conditions intensives de production d'éthanol ?

- Est-il possible, en mettant en œuvre une stratégie couplée de génie microbiologique et de mutagénèse aléatoire aux UV, d'obtenir un variant possédant une tolérance améliorée au stress température ? Peut-on déduire à partir d'un modèle phénoménologique les conditions optimales d'obtention de ce variant ?

- Quel est l'impact du glycérol sur la protection des levures en conditions de stress thermique ?

- Une meilleure tolérance au stress température en termes de moindre décès se traduit-elle par de meilleures performances fermentaires ?

La démarche employée pour y répondre a consisté dans un premier temps à analyser les interactions entre un paramètre physico-chimique, la température et les cinétiques microbiennes de croissance, décès et production afin de déterminer les paramètres propres à la souche. D'autre part, l'impact de l'exposition aux UV chez les levures a été étudié pour différentes puissances. Les paramètres cinétiques obtenus pour l'effet de la température et des UV ont ensuite permis d'implémenter un outil de simulation développé spécifiquement afin de prédire les temps de fonctionnement d'un réacteur continu d'amélioration de souche et d'optimiser les conditions nécessaires à l'obtention du variant plus tolérant. Selon les conditions optimales définies par le modèle, une culture a été réalisée en mode continu en présence d'une mutagénèse aux UV et d'une pression de sélection. Enfin, des outils de criblage adaptés ont été développés pour caractériser le phénotype des variants obtenus selon les critères d'intérêt industriel en termes de capacités fermentaires et de cinétiques de croissance et de décès.

Une partie de ce travail de thèse a été réalisée dans le cadre d'un projet ANR du Programme National de Recherche sur les Bioénergies intitulé FASST (Fermentation Alcoolique d'hydrolysats lignocellulosique et obtention de Souches adaptées aux Stress Technologiques) en collaboration avec un partenaire industriel Lesaffre et l'UMR Ingénierie des agropolymères et technologies émergentes (IATE) de l'Université de Montpellier II.

Ce manuscrit de thèse débute par un premier chapitre bibliographique qui s'intéresse au métabolisme et à la physiologie de la levure *Saccharomyces cerevisiae*, à sa réponse face aux différents stress rencontrés en fermentation éthanolique ainsi qu'à l'amélioration de la tolérance en termes de viabilité, de croissance et de performances fermentaires vis-à-vis de ces stress. Ce chapitre développe également l'effet des radiations ultra-violettes chez la levure, outil de diversification phénotypique utilisé pour l'amélioration de la robustesse des micro-organismes.

Le second chapitre intitulé « Matériel et Méthodes » présente la souche et les milieux de fermentations utilisés, la mise en œuvre des bioréacteurs en cultures discontinues alimentées et en mode continu couplé à la mutagénèse aux UV, ainsi que les méthodes analytiques et le traitement des données expérimentales.

Le troisième chapitre traite des cultures menées en mode discontinu alimenté afin de décrire la réponse physiologique de la souche industrielle de *Saccharomyces cerevisiae* en conditions de stress température et d'exposition aux UV. Les paramètres de croissance, décès et production obtenus ont permis d'établir un modèle dynamique simulant l'apparition de variants plus robustes à des fluctuations thermiques en culture continue, en fonction des conditions de température imposées.

Les résultats de simulations ont fourni les conditions optimales de mise en œuvre du chémostat avec mutagénèse aux UV pour l'obtention de variants. Le chapitre IV présente la réalisation de la culture continue ainsi que l'analyse dynamique des paramètres de fermentation, de la viabilité et du décès des populations cellulaires obtenues.

La caractérisation phénotypique des variants issus de la population du chémostat est décrite au chapitre V. Les performances en termes de croissance, de décès et de production ont été déterminées pour différents clones et comparées à celles de la souche sauvage.

Enfin, la conclusion résume les résultats expérimentaux obtenus relatifs à la réponse et à l'amélioration de la tolérance vis-à-vis du stress thermique chez *Saccharomyces cerevisiae* et expose les perspectives découlant de ce travail de thèse.

Chapitre I :

Etude Bibliographique

Chapitre I : Etude Bibliographique

La production de bioéthanol à partir de substrats lignocellulosiques est en pleine expansion, cependant des verrous technologiques et économiques ont été identifiés à toutes les étapes du procédé. Au niveau de la fermentation alcoolique des hexoses, la levure est confrontée à différents stress (éthanol, température,…) qui induisent des pertes de performances. La compréhension de la physiologie, du métabolisme ainsi que des mécanismes de tolérance de *Saccharomyces cerevisiae* permet de limiter l'impact des stress.

Ce premier chapitre a pour objectif de présenter l'état de l'art en relation avec le domaine d'étude. La première partie s'intéresse à la physiologie de la levure *Saccharomyces cerevisiae* : son génome, son cycle cellulaire, sa membrane et son métabolisme. Une seconde partie traite des stress rencontrés en fermentation éthanolique, de leur impact sur les performances fermentaires et la viabilité de la levure, ainsi que de la notion de tolérance et des technologies d'amélioration de la robustesse vis-à-vis de ces stress. Une troisième partie décrit l'impact des ultra-violets chez les micro-organismes suivant les doses reçues, les lésions de l'ADN qu'ils induisent et les conséquences de ces altérations. Enfin, une dernière partie fait l'analyse critique des données de la bibliographie et expose la stratégie choisie.

I.1 Physiologie et métabolisme de la levure

I.1.1 La levure *Saccharomyces cerevisiae*

La levure est utilisée depuis des siècles pour la transformation du sucre en alcool, pour l'élaboration de pain, de vin, de bière … . Elle a été découverte, isolée et identifiée au milieu du XIX^{ème} siècle. Ce champignon (mycète d'où -myces), capable de métaboliser des sucres, (saccharo-) responsable de la fermentation fut appelé *Saccharomyces cerevisiae* par Meyen en 1837 (Thuriaux 2004). *Saccharomyces cerevisiae* est un organisme eucaryote unicellulaire de forme ronde à ovoïde (5 à 10 µm) se reproduisant par bourgeonnement (Russell 2003).

La levure *Saccharomyces cerevisiae* est très utilisée comme organisme modèle en biologie cellulaire et en génétique (Bernard 1996; Goffeau *et al.* 1996; Thuriaux 2004).

I.1.1.1 Génome et ploïdie

Cette levure est le premier organisme eucaryote dont le génome ait été intégralement séquencé, en 1996 (Goffeau *et al.* 1996). Le génome de *Saccharomyces cerevisiae* a une taille de 12 068 kb et est constitué de 6275 gènes répartis sur 16 chromosomes (Goffeau *et al.* 1996).

Les différents chromosomes peuvent être présents en un seul ou plusieurs exemplaires dans la cellule. Le nombre d'exemplaires définit la ploïdie : les levures haploïdes possèdent un seul exemplaire de chaque chromosome (1n = 16 chromosomes), les levures diploïdes disposent de 2 exemplaires (2n = 32 chromosomes), les levures de ploïdie supérieure à 2n (triploïdes 3n, tétraploïdes 4n, …) sont dites polyploïdes. Des erreurs d'appariement de chromosomes pendant la mitose ou la méiose peuvent provoquer des mutations chromosomiques, qui conduisent à des cellules ne contenant plus un multiple exact du nombre de chromosomes haploïdes ($2n^{+1}$ ou $2n^{-1}$ chromosomes), elles sont alors dites aneuploïdes (Parry *et al.* 1979).

I.1.1.2 Le cycle cellulaire et reproduction

Quelle que soit sa ploïdie, *Saccharomyces cerevisiae* se reproduit par bourgeonnement : reproduction asexuée (Russell 2003). Le cycle cellulaire de la levure représente la période de division dans son intégralité. Le bourgeon est initié pendant la phase G1 puis grossit et se sépare de la cellule mère après la mitose (Figure 1).

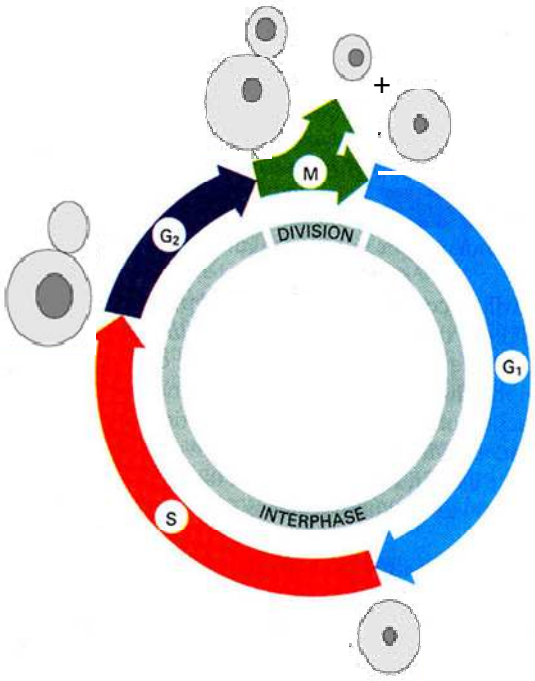


Figure 1. Cycle cellulaire chez *Saccharomyces cerevisiae* (www.md.ucl.ac.be/)

Le cycle cellulaire se compose de quatre phases (Ronot 1998) :

- phase G1, croissance de la cellule et préparation à la phase de synthèse
- phase S, phase de synthèse, réplication de l'ADN
- phase G2, préparation de la cellule à la mitose
- phase M, mitose et cytodiérèse, doublement de la masse et division des chromosomes entre la cellule mère et la cellule fille

La taille des cellules est maintenue à une valeur constante par ajustement de la durée du cycle cellulaire qui est égale au temps nécessaire au doublement de la taille de la cellule (Porro *et al.* 2003). Les phases S et G2 ont une durée relativement constante, la phase G1, d'initiation du bourgeon sera plus longue chez la cellule fille (plus petite) que chez la cellule mère (Hatzis and Porro 2006) et sa durée dépend également du type cellulaire (Ronot 1998).

Après la mitose, les cellules peuvent soit passer en phase G1 lorsqu'elles sont en phase de prolifération (réalisation continue des phases G1, S, G2 et M), soit entrer en phase G0 (Ronot 1998), stade quiescent de non-division jusqu'à ce que l'environnement stimule leur entrée dans le cycle cellulaire (Gray *et al.* 2004; Allen *et al.* 2006).

Une reproduction sexuée est également possible par la conjugaison de deux cellules haploïdes qui donnent une cellule diploïde (Figure 2). La cellule diploïde peut faire intervenir la méiose, qui permet le mélange des gènes, donnant ainsi des cellules haploïdes, ou bien se reproduire par bourgeonnement, conservant ainsi la diploïdie.

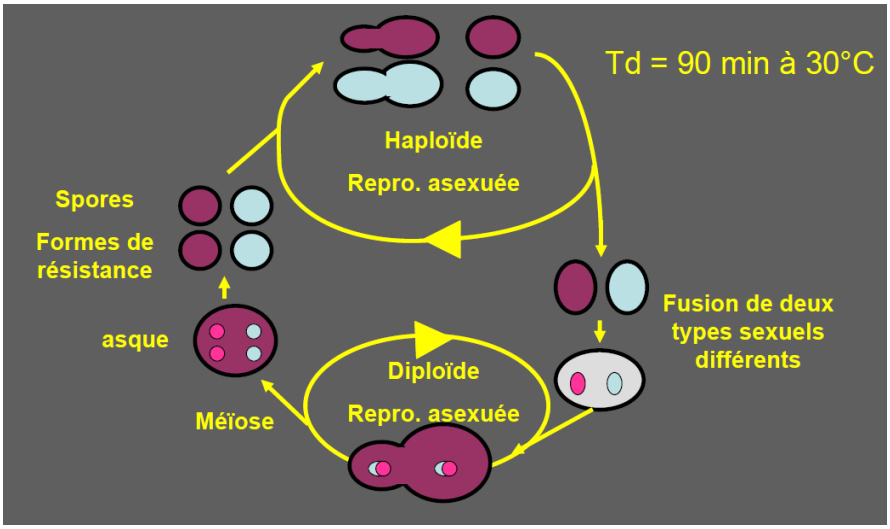


Figure 2. Reproduction sexuée et asexuée chez *Saccharomyces cerevisiae* (www.univ-bpclermont.fr)

I.1.1.3 La membrane plasmique

La membrane plasmique a un rôle de barrière entre le cytoplasme et le milieu extérieur. Elle est constituée d'une bi-couche phospholipidique dans laquelle sont insérés des protéines et d'autres lipides (stérols). Les acides gras sont les constituants élémentaires des lipides membranaires. Chez *Saccharomyces cerevisiae* environ 60 % des acides gras totaux sont les acides gras mono-insaturés palmitoléique (C16:1) (32,3%) et oléique (C18:1) (28%), la membrane contient également des proportions importantes d'acides gras saturés palmitique (C16:0) (12,8%) et stéarique (C18:0) (8%) (Van der Rest *et al.* 1995).

La membrane possède des propriétés de fluidité et est qualifiée de « mosaïque fluide », ses constituants étant en perpétuel mouvement les uns par rapport aux autres. Les liaisons hydrogènes entre les groupements polaires et les interactions de type Van der Walls entre les chaînes carbonées structurent la bi-couche phospholipidique. La fluidité membranaire peut être modifiée par un changement d'environnement (la température accélère les mouvements), par une modification de la composition moléculaire de la membrane (nature des phospholipides, stérols) ou par l'ajout de molécules interagissant avec la membrane (Beney and Gervais 2001). La fluidité change donc en réponse à des stress environnementaux (facteurs physiques ou chimiques) pour maintenir une fluidité optimale.

I.1.1.4 Les besoins nutritionnels de la levure

Le milieu de culture doit apporter tous les éléments nécessaires à la croissance et aux besoins énergétiques de la levure. La biomasse est composée principalement d'eau et des éléments CHON (carbone, hydrogène, oxygène, azote) ; le milieu doit donc fournir ces éléments pour permettre la croissance.

Les besoins des levures pour leur croissance sont les suivants :

- l'eau :

Constituant essentiel des organismes vivants. Les levures sont constituées de 75% d'eau et 25% de matière sèche (Russell 2003).

- une source de carbone :

Le carbone représente environ 50% du poids sec de la levure. Les glucides simples (monosaccharides, disaccharides et trisaccharides) sont fermentescibles par les levures (Leveau and Bouix 1993).

- de l'oxygène (ou des lipides en anaérobie) nécessaire à la synthèse de stérols

En anaérobie stricte, le milieu doit être complémenté avec des stérols et des acides gras insaturés, qui entrent dans la composition de la membrane et ne peuvent être synthétisés par la levure qu'en présence d'une source d'atome d'oxygène (Käppeli and Sonnleitner 1986; Russell 2003).

- une source d'azote :

Les levures contiennent 10% environ d'azote, entrant dans la composition des acides aminés, des acides nucléiques et de certaines vitamines. Il est apporté par le milieu de culture sous la forme de sels d'ammonium (phosphate, sulfate, chlorure et nitrate) (Leveau and Bouix 1993).

- des vitamines

Ce sont des régulateurs et des cofacteurs importants des voies métaboliques. Elles agissent généralement comme co-enzymes ou précurseurs d'enzymes. *Saccharomyces cerevisiae* est auxotrophe pour les vitamines suivantes qui seront ajoutées au milieu de culture : acide pantothénique, acide nicotinique, pyridoxine, myo-inositol, thiamine et biotine (Rose and Harrison 1971; Russell 2003).

- des oligo-éléments (ions inorganiques)

Les oligo-éléments sont nécessaires à une croissance et une fermentation optimale. Il est possible de distinguer les macro-éléments : K^+, Mg^{2+}, Ca^{2+}, Zn^{2+}, Fe^{2+}, Fe^{3+}, Mn^{2+}, Cl^- dont la concentration nécessaire varie entre 0,1 et 1 mM et les micro-éléments : Co^{2+}, B^{2+}, Cd^{2+}, Cr^+, Cu^{2+}, I^-, Mo^+, Ni^{2+} pour lesquels une concentration de 0,1 à 100 µM est suffisante (Russell 2003).

I.1.2 Le métabolisme de *Saccharomyces cerevisiae*

Différents métabolismes de dégradation des sucres se distinguent chez *Saccharomyces cerevisiae* suivant les conditions environnementales. Les facteurs environnementaux ayant le plus d'influence sont la concentration en glucose et en oxygène (Verduyn *et al.* 1984). La levure *Saccharomyces cerevisiae* présente un métabolisme oxydatif en aérobiose et sous certaines conditions d'apport de glucose appelé métabolisme respiratoire et un métabolisme fermentaire en absence d'oxygène (Figure 3). De plus, chez *Saccharomyces cerevisiae* et la plupart des souches du genre *Saccharomyces*, un excès de glucose en aérobie induit une bascule métabolique vers un métabolisme respiro-fermentaire (De Deken 1966).

I.1.2.1 Le métabolisme oxydatif

En culture discontinue, en présence d'oxygène et lorsque la concentration en glucose est inférieure à 150 $mg.L^{-1}$, la levure *Saccharomyces cerevisiae* présente un métabolisme oxydatif (Verduyn *et al.* 1984). Au-delà de cette concentration, il y a production simultanée d'éthanol et le métabolisme devient respiro-fermentaire. En chémostat sous limitation glucose, le métabolisme oxydatif est maintenu jusqu'à un certain taux de dilution appelé taux de dilution critique (Dc), correspondant à une vitesse spécifique critique de consommation de glucose, au-delà le

changement de métabolisme apparait. En métabolisme oxydatif pur, le glucose est entièrement dégradé en H_2O et CO_2, avec production d'énergie sous forme d'ATP et d'intermédiaires nécessaires à la croissance, par les voies de la glycolyse, des pentoses phosphates, du cycle de Krebs et de la phosphorylation oxydative (Figure 3). Cette énergie est utilisée pour la maintenance et la croissance de la levure.

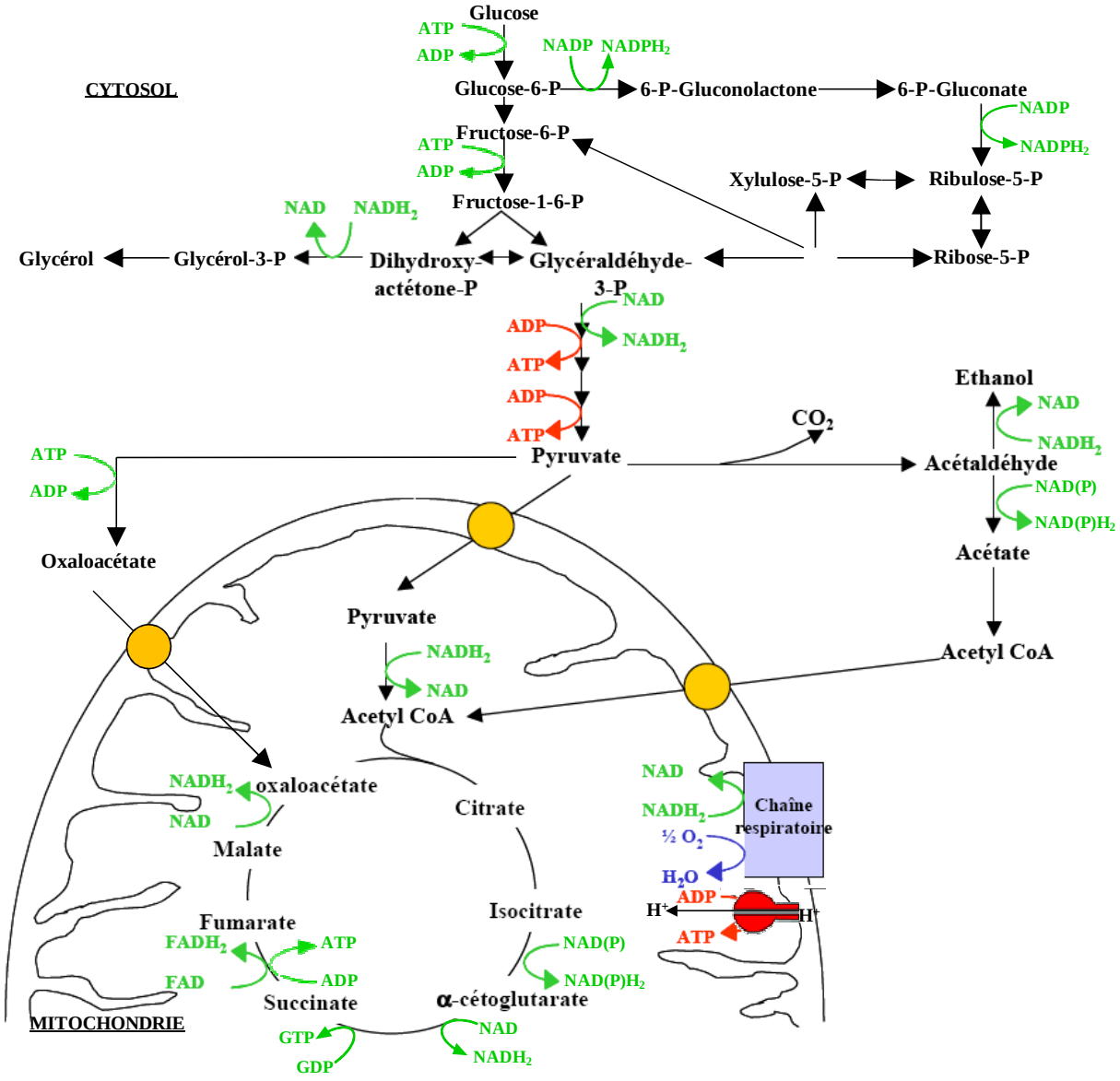


Figure 3. Schéma simplifié du métabolisme central carboné sur glucose chez *Saccharomyces cerevisiae* (Feria Gervasio 2008)

Chez *Saccharomyces cerevisiae*, le glucose est transporté par diffusion facilitée (Van Urk *et al.* 1989) dans le cytosol où il est oxydé dans la voie de la glycolyse jusqu'au pyruvate. Cette voie produit 2 moles d'ATP et réduit 2 moles de NAD^+ par mole de glucose. Le pyruvate issu du glucose est ensuite transporté dans la mitochondrie où il est transformé en acétyl-CoA pour entrer dans le cycle de Krebs et permettre la synthèse de précurseurs du métabolisme et la réduction des cofacteurs oxydés (NAD^+, FAD). Pour pouvoir fonctionner, le cycle de Krebs doit être alimenté en oxaloacétate par la pyruvate carboxylase. Enfin, la phosphorylation oxydative (respiration) réoxyde les cofacteurs réduits. Les électrons et protons des cofacteurs réduits sont transférés le long de la chaîne respiratoire pendant que des protons sont transportés de la matrice mitochondriale vers l'espace inter-membranaire. Le gradient de concentration de protons ainsi généré constituant la force protomotrice est utilisé pour la synthèse d'ATP par l'ATP synthase membranaire (Mitchell 1961). L'énergie nécessaire à la synthèse d'une mole d'ATP est obtenue lorsqu'au minimum 3 protons traversent l'ATP synthase. L'efficacité énergétique de la respiration, caractérisée par le ratio P/O (mole d'ATP généré par atome d'oxygène respiré) varie entre 1 et 3 (valeur maximale calculée par la thermodynamique dans les conditions les plus favorables). L'estimation de cette valeur par des modèles métaboliques à partir de données expérimentales propose une valeur de l'ordre de 1,2 (van Gulik and Heijnen 1995).

Environ 70% du glucose est métabolisé par la voie de la glycolyse, le glucose-6-phosphate provenant des 30% restants est détourné vers la voie des pentoses phosphates pour la production de pentoses phosphates (nucléotides) et de cofacteurs réduits $NADPH,H^+$. Le métabolisme oxydatif permet de fournir de l'énergie à la cellule pour sa croissance (Leveau and Bouix 1993).

I.1.2.2 Le métabolisme fermentaire

En absence totale d'oxygène, *Saccharomyces cerevisiae* présente un métabolisme fermentaire. L'oxygène n'est plus l'accepteur final d'électrons, ce rôle est joué par des molécules organiques comme l'acétaldéhyde. Comme pour le métabolisme oxydatif, le glucose est dégradé par la voie de la glycolyse jusqu'au pyruvate. A ce niveau là, le pyruvate n'est plus dirigé vers le cycle de Krebs mais est converti en éthanol et CO_2 (Figure 3). La première étape est la décarboxylation du pyruvate en acétaldéhyde par la pyruvate décarboxylase, puis la réduction finale de l'acétaldéhyde en éthanol est catalysée par l'alcool déshydrogénase utilisant le $NADH,H^+$ comme coenzyme (Figure 4) (Käppeli and Sonnleitner 1986).



Figure 4. Métabolisme fermentaire – Voie de synthèse de l'éthanol

Le bilan de la dégradation du glucose en éthanol par fermentation est le suivant :

$$C_6H_{12}O_6 + 2\ ADP + 2\ Pi \rightarrow 2\ C_2H_6O + 2\ CO_2 + 2\ ATP$$

Le métabolisme fermentaire produit beaucoup moins d'énergie que le catabolisme aérobie et le cycle de Krebs n'a qu'un rôle anabolique (synthèse de précurseurs), seule la synthèse d'éthanol permet la production d'énergie nécessaire aux besoins de la cellule et la réoxydation du NADH produit lors de la glycolyse (Verduyn *et al.* 1990).

Pour ce métabolisme, le rendement théorique de conversion du glucose en éthanol est de 0,511 $g_{Ethanol}.g_{Glucose}^{-1}$ mais la formation de composés secondaires (glycérol, acides, …), les réactions de maintenance et la synthèse des constituants cellulaires le limitent en pratique dans une gamme de 0,4 à 0,5 $g_{Ethanol}.g_{Glucose}^{-1}$ selon les souches. Le rendement en biomasse, de l'ordre de 0,1 $g_{Biomasse}.g_{Glucose}^{-1}$, est beaucoup plus faible qu'en métabolisme oxydatif (0,5 $g_{Biomasse}.g_{Glucose}^{-1}$) (Käppeli and Sonnleitner 1986). Ce faible rendement peut s'expliquer du fait du non fonctionnement de la chaîne respiratoire en absence d'oxygène ce qui permet la production de 2 ATP seulement (Käppeli and Sonnleitner 1986).

Lors de la fermentation, des métabolites secondaires comme le glycérol et des acides organiques (acides pyruvique, succinique, acétique) sont formés en plus faible quantité (Käppeli and Sonnleitner 1986; Verduyn *et al.* 1990).

Le glycérol, qui provient d'une déviation de la voie de la glycolyse, est le co-produit majoritaire après l'éthanol et le CO_2 (Figure 5).

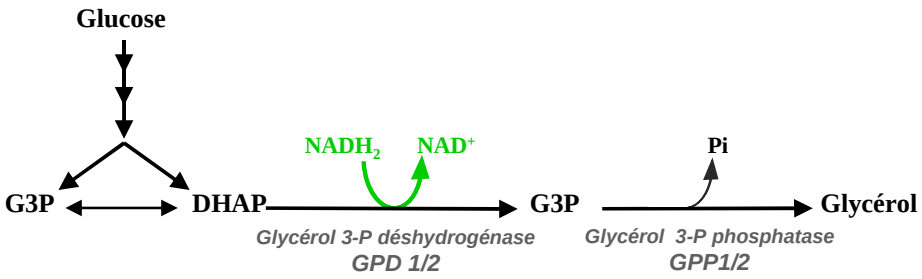


Figure 5. Voie de synthèse du glycérol

Sa synthèse aide au maintien de la balance oxydo-réductive de la cellule (Van Dijken and Scheffers 1986). Lorsqu'un excès de NADH cytosolique est présent dans la cellule, le dihydroxyacétone phosphate (DHAP) est réduit en glycérol-3-phosphate (G3P), qui est déphosphorylé pour aboutir au glycérol. Le glycérol formé est excrété dans le milieu, sa synthèse permet la réoxydation du NADH principalement cytosolique (Verduyn *et al.* 1990; Russell 2003). Cette voie n'est pas utilisée en métabolisme oxydatif où l'excès de NADH est pris en charge par la chaîne respiratoire. La voie du glycérol permet également de fournir l'intermédiaire G3P,

nécessaire à la synthèse des glycérophospholipides et des triacylglycérols (Athenstaedt and Daum 1999; Wang *et al.* 2001). Enfin, le glycérol joue le rôle de composé protecteur lors de stress osmotiques et thermiques (Gardner *et al.* 1993; Omori *et al.* 1996; Torija *et al.* 2003b; Aldiguier *et al.* 2004).

La production d'acides acétique et succinique accentue également le déficit de la balance d'oxydo-réduction (accumulation de NADH et/ou NADPH). Le cycle de Krebs fonctionne dans ce cas en deux branches.

I.1.2.3 Le métabolisme respiro-fermentaire

Chez certaines espèces comme *Saccharomyces cerevisiae*, lorsque l'environnement n'est pas limité en oxygène et en présence d'un excès de glucose (concentration supérieure à 150 $mg.L^{-1}$) la levure passe d'un métabolisme oxydatif à un métabolisme oxydo-réductif (Verduyn *et al.* 1984). Ce phénomène de transition respiro-fermentaire est appelé effet Crabtree et est défini comme la production d'éthanol en aérobiose ou comme la répression de la respiration par la fermentation en condition de non-limitation en oxygène (De Deken 1966).

En culture continue aérobie, la bascule vers un métabolisme respiro-fermentaire se produit au-delà d'un taux de dilution critique (Dc) propre au micro-organisme (Barford and Hall 1979; Postma *et al.* 1989). En chémostat limité par le glucose, le Dc est de 0,31 h^{-1} pour la souche *Saccharomyces cerevisiae* 248 UNSW 703100 (Barford and Hall 1979) et de 0,38 h^{-1} pour *Saccharomyces cerevisiae* CBS 8066 (Postma *et al.* 1989).

L'effet Crabtree qui intervient en condition aérobie ressemble aux phénomènes observés en anaérobie, il entraine une diminution importante du rendement en biomasse et de la vitesse spécifique de consommation d'oxygène, ainsi que la production de métabolites du métabolisme fermentaire (éthanol, glycérol, acides organiques) (Rieger *et al.* 1983; Postma *et al.* 1989; Verduyn *et al.* 1990).

Lors de leur mise en culture, les micro-organismes sont soumis à de multiples stress, altérant la physiologie et le métabolisme microbien et affectant les performances des procédés. Ces stress sont rencontrés en conditions de production intensive d'éthanol et sont également induits par la fluctuation des paramètres physico-chimiques. L'intensification des performances des procédés de production repose donc sur la compréhension de l'effet de ces stress et de la réponse des levures afin d'amplifier leur robustesse et par suite leur tolérance.

I.2 Réponses et tolérance aux stress des souches de levures

I.2.1 Notion de stress environnementaux et de tolérance

Tout au long des procédés de fermentation, les levures peuvent être affectées par une succession de stress qui vont influencer leur métabolisme et réduire la viabilité cellulaire et les performances des procédés (Attfield 1997). Les facteurs de stress environnementaux généralement rencontrés en fermentation sont les stress physiques : température (Watson 1987; Beney *et al.* 2000; Aldiguier *et al.* 2004) ; physico-chimiques : stress osmotique (Beney *et al.* 2000), carence en glucose, toxicités (accumulation de métabolites secondaires (alcool et acides organiques (pH)) (Casey and Ingledew 1986), inhibiteurs (Olsson and Hahn-Hägerdal 1996; Larsson *et al.* 1999)) et physico-mécaniques : agitation. Face à ces stress, pour conserver une certaine survie, les levures vont réagir à différents niveaux par une réduction de l'activité métabolique (diminution de l'assimilation du glucose et de la vitesse de croissance et de production) (Ghose and Tyagi 1979; Aldiguier *et al.* 2004), la modification de la composition lipidique de la membrane (Beaven *et al.* 1982; Beney and Gervais 2001), l'augmentation du niveau intracellulaire de glycérol (Gardner *et al.* 1993; Omori *et al.* 1996) et de tréhalose (Hottiger *et al.* 1987), l'altération de la synthèse de protéines, …

La survie, l'adaptation à l'environnement et par conséquent les performances industrielles dépendent de la fréquence et de l'intensité du ou des stress, de la souche et des conditions physiologiques de la cellule au moment du stress. La tolérance à un stress se traduit par l'amélioration du phénotype de la souche, c'est-à-dire des caractères observables. L'acquisition du phénotype de tolérance aux facteurs environnementaux est très complexe et fait intervenir plusieurs gènes (Zhao and Bai 2009), elle est donc liée à une modification du génotype (caractères génétiques).

Les réponses aux stress se faisant à différents niveaux, la notion de tolérance se définie elle aussi à différents niveaux (macroscopique, microscopique et moléculaire) par une diminution de l'effet des stress. Au niveau macroscopique, la tolérance à un stress consiste à améliorer le taux de croissance, la production d'éthanol et la productivité et à synthétiser des composés protecteurs. Au niveau microscopique, la tolérance est une augmentation de la viabilité (nombre de survivants) et se traduit donc par un décès plus faible. Enfin, au niveau moléculaire, la membrane plasmique d'une souche tolérante aura une composition lipidique modifiée, adaptée aux stress et des protéines protectrices seront synthétisées.

Définir l'effet sur les levures des différents stress rencontrés permettra de comprendre les mécanismes de tolérance à ces stress et contribuera au développement de souches plus robustes. Pour cela, il est essentiel de décrire l'état physiologique des cellules qui est le principal facteur impactant les performances des procédés.

I.2.1.1 La viabilité

L'augmentation de la viabilité en condition de stress est un des critères sur lequel le phénotype de tolérance peut être défini. Postgate (1969) définit la viabilité d'une population microbienne comme la proportion de cellules ayant la capacité de se multiplier lorsque les conditions optimales de croissance pour le micro-organisme considéré sont réunies. Un organisme sera caractérisé de mort s'il ne se multiplie pas dans ces conditions (Postgate *et al.* 1961; Postgate 1969). Pour Russel (2003), la viabilité est la capacité des levures de fermenter rapidement et efficacement plutôt que le simple fait d'être vivante et de se reproduire. Les éléments déterminants la survie d'un micro-organisme sont : une membrane cytoplasmique intacte, une transcription de l'ADN et une traduction de l'ARN, la production d'énergie nécessaire au métabolisme et à la synthèse de constituants cellulaires et, éventuellement, la croissance et la multiplication (Breeuwer and Abee 2000).

Il est possible de distinguer les cellules viables, endommagées et mortes par leur intégrité membranaire. La membrane plasmique a un rôle de barrière et permet des échanges entre le cytoplasme et le milieu extérieur. Son intégrité est l'un des critères permettant de différencier une cellule vivante des cellules mortes ou endommagées, qui ont perdu leur intégrité membranaire (Gregori *et al.* 2001). La détermination du pourcentage de viabilité seul ne permet pas d'évaluer l'état physiologique des levures. En effet, il existe une importante disproportion entre le nombre de cellules dénombrées au microscope et par comptage des UFC (unités formant colonie) sur boite de pétri (Federighi 2004). La mesure complémentaire de la cultivabilité, capacité de se reproduire, est donc importante. Les cellules ayant la capacité de former une colonie sur milieu solide sont dites cultivables.

Les états physiologiques des cellules sont classés sous différentes terminologies (viables, actives, cultivables, dormantes, quiescentes, inactives, moribondes, mortes, …) (Roszak and Colwell 1987; Kell *et al.* 1998; Breeuwer and Abee 2000). Les dénominations retenues sont les suivantes :

- **Viables**, cellules conservant leur intégrité membranaire et une activité métabolique et potentiellement capables de se diviser.
- **Cultivables**, cellules viables capables de se reproduire, de se diviser.
- **Viables Non Cultivables**, cellules viables incapables de se diviser mais conservant une intégrité membranaire et une activité métabolique.
- **Mortes**, cellules non viables, dont la membrane n'est plus intègre.

La perte de cultivabilité a été observée chez les bactéries, elles perdent leur capacité de se reproduire mais conservent une activité métabolique et donc leur viabilité (McDougald *et al.* 1998). Ces cellules viables non cultivables ont pour acronyme VNC (VBNC en anglais pour « Viable But Non Culturable ») (McDougald *et al.* 1998; Federighi 2004). Le phénomène de non cultivabilité serait induit par les stress environnementaux (stress éthanol, température, osmotique) et correspondrait à une stratégie de survie des micro-organismes (Oliver *et al.* 1991; Oliver 2005). Une modification de l'état physico-chimique de la levure peut empêcher le processus de réplication. Par exemple, l'éthanol va entrainer un arrêt de la croissance des cellules alors qu'elles conservent leur activité métabolique (Jones 1987) d'où une prolongation de la phase de production d'éthanol chez *Saccharomyces cerevisiae* malgré l'arrêt de la croissance (D'Amore and Stewart 1987). Le maintien de la viabilité en absence de cultivabilité est une réponse analogue à la réponse à des stress comme la sporulation chez certaines bactéries. Ce doit être une réponse physiologique génétiquement programmée et les cellules devraient être capables de sortir de cet état de dormance en inversant ce programme et « ressusciter » lorsque les conditions redeviennent favorables à la croissance (McDougald *et al.* 1998). D'autres auteurs pensent au contraire que les cellules viables non cultivables sont mourantes et maintiennent une activité métabolique jusqu'à leur mort mais sont incapables de redevenir cultivables. L'état viable non cultivable des cellules est également observé chez *Saccharomyces cerevisiae* lorsque les conditions dans le milieu ne sont pas favorables pour la cellule ; elle se place alors dans un état de quiescence (G0), état inverse du stade de prolifération (Gray *et al.* 2004; Allen *et al.* 2006). Jones *et al.* (1987) suggèrent que la levure passe par une désactivation (état VNC) avant l'apparition du décès cellulaire. Chez *Vibrio vulnificus*, des carences nutritionnelles (carbone, phosphore, azote) permettent de maintenir la cultivabilité à faible température grâce à la synthèse de protéines. L'induction de ces protéines de carence permet ainsi la protection contre d'autres facteurs de stress (température, stress oxydatif et osmotique, UV) (Nystrom *et al.* 1992). Les cellules qui entrent dans un état VNC maintiennent leur intégrité membranaire bien que des modifications de la composition de la membrane aient été rapportées.

Différentes techniques peuvent être utilisées pour distinguer les états physiologiques des cellules par des mesures hors-ligne ou en-ligne. Les levures totales, viables et mortes peuvent être dénombrées sur une cellule de THOMA après coloration au bleu de méthylène, molécule organique existant sous une forme oxydée (bleue) et une forme réduite (incolore), qui permet de différencier les levures viables des mortes. Sous l'action des oxydoréductases des cellules encore actives cette molécule va réagir et les cellules viables apparaîtront blanches alors que les cellules mortes resteront colorées en bleu. La biomasse viable cultivable, c'est-à-dire capable de se reproduire et donc pouvant former une colonie, sera dénombrée par étalement sur milieu solide (Aldiguier 2006).

D'autre part, l'analyse par cytométrie en flux est une méthode rapide et efficace qui permet d'avoir accès à l'état physiologique des cellules selon différents critères mis en évidence par

l'utilisation de différents marqueurs fluorescents, les fluorochromes. Les cellules totales peuvent être marquées par le Syto 9 (Zhang and Fang 2004) ou le DAPI (diamino-4' 6-phénylindol-2 dichlorhydrate) qui se fixent sur l'ADN. D'autres fluorochromes caractérisent l'activité métabolique, comme la FDA (et cFDA (carboxy)fluorescéine diacétate) témoin de l'activité estérase (Bouix and Leveau 2001; Malacrino *et al.* 2001) ou colorent les mitochondries des cellules viables (Rhodamine 123) (Malacrino *et al.* 2001). Enfin des marqueurs colorent les cellules mortes, dont la membrane n'est plus intègre (iodure de propidium : IP) (Nebe-von Caron *et al.* 1998; Zhang and Fang 2004). La combinaison de marqueurs de cellules totales ou viables et de cellules mortes ou endommagées donne accès à la viabilité et à l'état physiologique de la population cellulaire.

Par ailleurs, des mesures en ligne de la biomasse viable sont également utilisées, et permettent une détermination facilitée et précise de la fraction de cellules viables. La mesure de la capacitance appelée également spectroscopie diélectrique est fondée sur les découvertes de plusieurs auteurs qui ont démontré la relation entre la fraction volumique de la biomasse et la variation de la permittivité diélectrique du milieu, dans une gamme de fréquence de 0,1 à 10 MHz appelée β-dispersion (Fricke and Curtis 1934; Schwan 1957; Hanai *et al.* 1975). La mesure est principalement basée sur la capacité des cellules à se polariser, c'est-à-dire à accumuler des charges lorsqu'elles sont exposées à un champ électrique. Les cellules mortes, dont la membrane n'est plus intègre, ne seront pas polarisées et donc non détectées. Une corrélation a été établie entre la concentration en cellules viables et la variation des valeurs de permittivité mesurées (Tibayrenc *et al.* 2010). La mesure de capacitance *in-situ* a été utilisée par Tibayrenc *et al.* (2010) pour déterminer l'effet d'un stress thermique (variation de 33 à 43°C) en fermentation alcoolique sur une souche industrielle de *Saccharomyces cerevisiae*. Un couplage à une méthode microscopique avec un marquage à l'iodure de propidium a montré que la spectroscopie diélectrique est corrélée à cette mesure hors-ligne et permet donc un suivi en-ligne de l'évolution de la concentration en cellules viables. Grâce à l'équation de Cole-Cole (Cole and Cole 1941), Tibayrenc *et al.* (2010) ont relié le spectre de la β-dispersion (permittivité en fonction de la fréquence) au signal diélectrique qui peut être corrélée à la concentration en cellules viables. La rapidité de réponse de cette méthode en fait un outil adapté au suivi de la biomasse viable lors de l'étude du décès en conditions de stress (Tibayrenc *et al.* 2010).

L'analyse de la viabilité et du décès sont des critères importants qui devront être quantifiés précisement, pour l'étude de l'impact de stress sur des populations de levures en fermentation éthanolique.

I.2.1.2 Effet de l'éthanol

La présence d'éthanol constitue le principal stress rencontré en fermentation alcoolique. La levure est inhibée par sa propre production d'éthanol et plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer cette inhibition : la dénaturation et l'inhibition des enzymes glycolytiques (Gray and Sova 1969), l'inhibition du transport du glucose (Leao and Van Uden 1985), une altération de la membrane et de sa perméabilité (Jeffries and Jin 2000), une accélération du flux d'entrée de protons, la diminution des températures optimales de croissance et une amplification du décès dû à la température (Lee *et al.* 1980; D'Amore and Stewart 1987).

Impact de la concentration en éthanol sur les cinétiques de croissance, de production et sur la viabilité

L'éthanol a une action inhibitrice complexe sur les levures puisqu'il agit à la fois sur le taux de croissance, la vitesse de fermentation et la viabilité cellulaire (Ghose and Tyagi 1979; Brown *et al.* 1981; Casey and Ingledew 1986; D'Amore and Stewart 1987). Lorsque la concentration en éthanol augmente, l'inhibition de la croissance cellulaire est plus forte et la chute de viabilité plus rapide (D'Amore and Stewart 1987). L'éthanol provoque un arrêt de la croissance, alors que la production continue jusqu'à des concentrations plus élevées, variables suivant les souches (D'Amore and Stewart 1987). Ce découplage entre croissance et production, a été montré chez *Saccharomyces cerevisiae* avec un arrêt de la croissance à 87 $g.L^{-1}$ d'éthanol alors que la production d'éthanol continue jusqu'à une concentration de 114 $g.L^{-1}$ (Ghose and Tyagi 1979). Casey et Ingledew (1986) ont déterminé les concentrations en éthanol provoquant l'arrêt complet de la croissance, c'est-à-dire la concentration critique en éthanol, pour quatre souches du genre *Saccharomyces* de tolérances différentes, celles-ci sont comprises entre 94 et 103 $g.L^{-1}$ (Tableau 1). Par ailleurs, Alfenore *et al.* (2002) ont montré que ces concentrations critiques en éthanol peuvent être augmentées en réalisant un apport exponentiel de vitamines plutôt qu'un apport initial. Cette conduite de fermentation permet alors un arrêt de la croissance cellulaire à 115 $g.L^{-1}$ d'éthanol et un arrêt de la production d'éthanol à 147 $g.L^{-1}$.

Tableau 1. Concentrations en éthanol provoquant un arrêt de la croissance et de la production d'éthanol chez différentes souches du genre *Saccharomyces (S.)*

Souches	Concentration en éthanol		Références
	arrêt de la croissance	arrêt de la production	
S. cerevisiae NRLL-Y-132	87 $g.L^{-1}$	114 $g.L^{-1}$	(Ghose and Tyagi 1979)
S. uvarum	94 $g.L^{-1}$	ND	(Casey and Ingledew 1986)
S. cerevisiae NCYC 366	95 $g.L^{-1}$	ND	(Casey and Ingledew 1986)
S. c. (souche de boulangerie)	95 $g.L^{-1}$	ND	(Casey and Ingledew 1986)
S. sake IFO 2347	103 $g.L^{-1}$	ND	(Casey and Ingledew 1986)
S. cerevisiae CBS8066	115 $g.L^{-1}$	147 $g.L^{-1}$	(Alfenore *et al.* 2002)

La production d'éthanol et la concentration critique des souches dépendent du mode d'alimentation en substrat, de la température et de la pression osmotique. La tolérance à l'éthanol diminue lorsque la température augmente au-delà de la température optimale de production et l'effet létal de l'éthanol est amplifié à température élevée (Lee *et al.* 1980; Casey and Ingledew 1986; Aldiguier *et al.* 2004).

Impact de la concentration en éthanol sur la membrane plasmique

L'éthanol induit également la perméabilisation de la membrane plasmique (Mizoguchi and Hara 1998). Ce phénomène a pu être mis en évidence par une augmentation de nucléotides extracellulaires, suivant un profil de diffusion simple, lorsque des cellules sont en présence de 20% (v/v) d'éthanol. Cette perméabilisation de la membrane et l'impact du stress éthanol sur les levures peut être limité par l'exposition à un stress moins drastique comme une pré-incubation en présence d'une concentration plus faible en éthanol (8% v/v), la fuite de nucléolides étant ainsi fortement ralentie (Mizoguchi and Hara 1998).

En plus d'induire une perméabilisation, l'éthanol diminue la fluidité de la membrane en remplaçant les molécules d'eau autour des têtes polaires des phospholipides, ce qui limite leur répulsion (Thomas *et al.* 1978). La membrane plasmique, ses phospholipides et par suite la fluidité membranaire ont un rôle important dans le mécanisme de tolérance à l'éthanol (Castillo Agudo 1992). Chez *Escherichia coli* (Dombek and Ingram 1984) et *Saccharomyces cerevisiae* (Beaven *et al.* 1982), des modifications de la composition de la membrane interviennent lors de la culture en présence d'éthanol pour palier la rigidification : une augmentation de la proportion d'acides gras insaturés (C18:1) s'accompagne d'une diminution des acides gras saturés (C16:0) (Beaven *et al.* 1982; Dombek and Ingram 1984). Les insaturations permettent d'augmenter la fluidité membranaire en réponse à la rigidification causée par l'éthanol et permettent d'améliorer la tolérance à l'éthanol. La comparaison de la composition de la membrane plasmique de levures plus ou moins tolérantes à l'éthanol montre, dans tous les cas, que la membrane des levures ayant la tolérance la meilleure contient un pourcentage plus important d'acides gras insaturés (D'Amore and Stewart 1987). L'augmentation d'acides gras à courtes chaines (C12) (de 20 à 56%), qui, comme les insaturations, augmentent la fluidité, a également été observée chez différentes souches lors d'un ajout d'éthanol et les souches les plus tolérantes à l'éthanol possèdent une proportion en C12 significativement plus importante (Castillo Agudo 1992).

Impact de l'éthanol sur la synthèse de tréhalose

L'éthanol induit également la synthèse de tréhalose chez *Saccharomyces cerevisiae*, après un stress éthanol à 16% (v/v) (Sharma 1997). Cette augmentation de la concentration intracellulaire en tréhalose pourrait prévenir la dégradation du cytosol et de la membrane face au stress éthanol et ce composé jouerait un rôle dans la tolérance à l'éthanol.

I.2.1.3 Effet de la température

La température est le facteur environnemental qui a la plus grande influence sur la physiologie et l'activité des micro-organismes (Watson 1987). Elle agit à la fois sur le taux de croissance, la vitesse de production d'éthanol, la production de CO_2, la viabilité cellulaire, la composition et l'intégrité de la membrane plasmique… (Lee *et al.* 1981; Watson 1987; Gervais and Martínez De Marañón 1995; Beney and Gervais 2001; Aldiguier *et al.* 2004).

Chaque micro-organisme possède une température limite de croissance au-delà de laquelle sa survie est engagée. La température limite de croissance de la plupart des levures se situe entre 30 et 40°C, elle a été évaluée à 40°C-42°C pour *Saccharomyces cerevisiae* (Watson 1987) et est contrôlée par la thermostabilité des enzymes (Farrell and Rose 1967; Watson 1987). Une croissance à température supérieure à la température limite entraîne une destruction des enzymes, une altération de la membrane (Fintan Walton and Pringle 1980; Gervais and Martínez De Marañón 1995; Martínez De Marañón *et al.* 1999; Guyot *et al.* 2005), l'altération des protéines (Watson 1987) et bien d'autres perturbations qui affectent par suite les cinétiques et diminuent les performances fermentaires et la viabilité.

Impact de la température sur les rendements et les cinétiques de croissance et de production d'éthanol

Les évolutions des vitesses spécifiques de production de biomasse et d'éthanol en fonction de la température suivent un profil parabolique. La température optimale de croissance, définie comme la température à laquelle le taux de croissance est maximal s'est révélée différente de la température optimale de fermentation, température pour laquelle la production d'éthanol est la plus élevée (Watson 1987). Pour *Saccharomyces cerevisiae*, le taux de croissance est maximal à 30°C mais la vitesse de production d'éthanol est plus rapide à température plus élevée. La production maximale d'éthanol se situe suivant les souches entre 3 et 10°C au dessus de la température optimale de croissance, ce qui peut être expliqué par une activité maximale de l'alcool déshydrogénase à 40°C (Brown and Oliver 1982; Watson 1987). Au delà de 35°C apparaît - chez la plupart des souches - une nette diminution du rendement de production d'éthanol, le rendement en biomasse baissant quant à lui au-delà de 27°C (Torija *et al.* 2003b; Aldiguier *et al.* 2004).

Impact de la température sur la viabilité

La viabilité des levures est très affectée par une augmentation de température (Torija *et al.* 2003b). Le gradient de température appliqué, en plus de la température elle-même, a un impact sur la viabilité et un choc thermique affectera beaucoup plus la viabilité des levures qu'une variation graduelle (Gervais and Martínez De Marañón 1995; Marechal *et al.* 1999; Martínez De Marañón *et al.* 1999; Beney *et al.* 2000; Guyot *et al.* 2005). La survie à une température élevée dépend également de la température de croissance des levures qui auront une meilleure survie à un choc thermique si la croissance est préalablement réalisée à une température supérieure à l'optimum (Fintan Walton and Pringle 1980; Coote *et al.* 1991; Steels *et al.* 1994). Ceci s'explique par le fait que les levures adaptent la composition de leur membrane pour maintenir leur intégrité face à un stress thermique ; la membrane des cellules cultivées à température élevée ou qui ont subi un changement de température progressif est plus résistante aux dénaturations thermiques que celle des levures cultivées à basse température (Gervais and Martínez De Marañón 1995; Marechal *et al.* 1999).

De plus, la sensibilité des levures varie suivant les phases de croissance. Les levures sont plus sensibles aux variations de température lorsqu'elles sont en croissance, pendant la phase exponentielle que pendant la phase stationnaire (Parry *et al.* 1976; Steels *et al.* 1994). La sensibilité des cellules à la température change également selon leur position dans le cycle cellulaire puisque l'effet létal est maximal au début de la formation du bourgeon, au départ de la phase S (Parry *et al.* 1976).

En plus d'affecter les cinétiques et la viabilité des levures, l'élévation de température diminue la tolérance aux autres stress ; elle amplifie l'effet létal de l'éthanol (Lee *et al.* 1981; Aldiguier *et al.* 2004) et le stress osmotique (Beney *et al.* 2000).

Tableau 2. Tableau récapitulatif de l'impact de la température sur la viabilité des levures

IMPACT DE LA TEMPERATURE SUR LA VIABILITE				
Souche	Température (°C)		Viabilité	Références
	Isotherme	Température de choc		
S. cerevisiae	25°C	50°C 50°C -0,4°C/min	1% 34	(Gervais and Martínez De Marañón 1995)
S. cerevisiae	30°C 36°C	52°C - 8min 52°C - 8min	5 % 90 %	(Fintan Walton and Pringle 1980)
S. cerevisiae phase exp.	25°C	52°C - 5 min 37°C -30min, 52°C -5 min	0% 10-20%	(Steels *et al.* 1994)
phase stationnaire	25°C	52°C - 5 min 37°C -30min, 52°C -5 min	20% 40-50%	
S. cerevisiae CBS8066 (50 $g.L^{-1}$ éthanol)	30°C 36°C 39°C	-	100% 90% 50%	(Aldiguier *et al.* 2004)

Effet de la température sur la synthèse et l'accumulation de composés

La température, un des facteurs les plus importants de la biosynthèse métabolique, agit sur la synthèse de divers composés dont des métabolites secondaires de la fermentation alcoolique.

Effet de la température sur la synthèse de glycérol

Lors d'une élévation de température, une augmentation de la production de glycérol a été rapportée en fermentation alcoolique pour des cultures en mode isotherme (Remize *et al.* 2000; Balli *et al.* 2003; Torija *et al.* 2003b) et lors de l'application de chocs thermiques (Omori *et al.* 1996; Berovic *et al.* 2007). Omori *et al.* (1996) ont montré la stimulation de la production de glycérol chez *Saccharomyces cerevisiae* pour des chocs réalisés sur la préculture à 45°C et 50°C. Ce phénomène de surproduction de glycérol s'observe quel que soit le substrat utilisé (glucose, fructose, saccharose, moût de raisin), par contre, la concentration en glycérol atteinte est dépendante du substrat et Balli *et al.* (2003) ont montré une concentration plus élevée lors de la fermentation du moût de raisin. De grandes disparités ont également pu être mises en évidence entre les souches au niveau de la concentration en glycérol produite (Radler and Schutz 1982; Remize *et al.* 2000). L'application de chocs successifs permet une augmentation supérieure de la production de glycérol (Berovic *et al.* 2007).

L'effet de la température sur la production de glycérol a également été étudié lorqu'il est couplé à d'autres facteurs de stress tels que l'agitation (Gardner *et al.* 1993) et la pression osmotique pour laquelle un effet synergique existe avec le facteur température (Carvalheiro *et al.* 1999).

D'autre part, lors de l'élévation de la température, l'augmentation du glycérol extracellulaire est couplée à une augmentation des rendements glycérol/substrat et glycérol/biomasse en cultures en mode isotherme (Aldiguier *et al.* 2004).

Une activité plus importante de l'enzyme glycérol 3-P déshydrogénase (GPDH) a également été montrée lors de chocs de température et se traduit par une production de glycérol supérieure (Omori *et al.* 1996). Cette enzyme intervient dans la synthèse de glycérol en réduisant le dihydroxyacétone phosphate (DHAP) en glycérol-3-phosphate (G3P). Cette augmentation d'activité enzymatique est transitoire, elle se poursuit sur plusieurs générations avant de diminuer (Omori *et al.* 1996). Des différences d'activité de l'enzyme GPDH ont également été montrées au niveau des souches (Radler and Schutz 1982).

De plus, il est bien connu que la production de glycérol est couplée à la croissance, cependant un découplage a été mis en évidence à partir de 36°C, la production de glycérol continue en absence de croissance et le découplage est d'autant plus important que la température est élevée (Aldiguier *et al.* 2004).

Un récapitulatif de l'impact de la température sur la synthèse, les rendements de glycérol ainsi que sur l'activité de la GPDH est présenté au Tableau 3.

Tableau 3. Tableau récapitulatif de l'impact de la température sur la synthèse de glycérol

IMPACT DE LA TEMPERATURE SUR LA PRODUCTION DE GLYCEROL						
Souche	Température (°C)		Glycérol	Facteur amélioration	Mode de culture	Références
	Isotherme	T° Choc				
Augmentation de la concentration en glycérol						
S. cerevisiae AXAZ-1 (Argiriou *et al.* 1992)	5°C à 30°C	-	7 (5°C) à 12,8 $g.L^{-1}$ (30°C) à 30°C 12,8 $g.L^{-1}$ (moût) 8,8 $g.L^{-1}$ (glucose)	-	4 substrats flacons, sans agitation	(Balli *et al.* 2003)
S. cerevisiae W1 à W18, *S.c.* K1	18°C 28°C	-	6,4 à 8,9 $g.L^{-1}$	+ 0 à 13%	réacteurs de 200 mL	(Remize *et al.* 2000)
S. cerevisiae (20 souches – Priorat Espagne)	15°C 20°C 25°C 30°C 35°C	-	6,05 $g.L^{-1}$ 6,59 $g.L^{-1}$ 6,91 $g.L^{-1}$ 7,18 $g.L^{-1}$ 7,38 $g.L^{-1}$	-	Moût de raisin fioles	(Torija *et al.* 2003b)
S. cerevisiae 7 souches (Mainz)	25°C	-	4,2 à 10,4 $g.L^{-1}$	-	fioles de 500 mL	(Radler and Schutz 1982)
S. cerevisiae BAW-6	27°C	35°C 45°C 50°C	1,31 $g.L^{-1}$ 1,5 $g.L^{-1}$ 1,43 $g.L^{-1}$	x 1 x 1,15 x 1,09	Choc 10-20 min sur préculture	(Omori *et al.* 1996)
S. cerevisiae (Uvaferm SLO)	18°C	- 34°C (24h) 34°C (2 x 8h)	6,7 $g.L^{-1}$ 8,4 $g.L^{-1}$ 10,9 $g.L^{-1}$	+ 25% + 62%	1 ou 2 chocs successifs réacteur 10L	(Berovic *et al.* 2007)
S. cerevisiae CCMI 396	30°C 44°C	-	0,25M – 0,75M NaCl 2,1 – 4,37 $g.L^{-1}$ 2,5 – 5 $g.L^{-1}$	-	Choc 2h stress osmotique (0 à 1M NaCl)	(Carvalheiro *et al.* 1999)
S. cerevisiae Y13	15°C 20°C 25°C	-	sans agit – 24h agit 0,50 – 0,52 $g.L^{-1}$ 0,63 – 0,58 $g.L^{-1}$ 0,52 – 0,66 $g.L^{-1}$	-	T° + agitation jus de raisin flacons	(Gardner *et al.* 1993)
Augmentation du rendement en glycérol						
S. cerevisiae CBS8066	30°C 33°C 36°C 39°C	-	0,016 $g_{Gly}.g_S^{-1}$ 0,016 $g_{Gly}.g_S^{-1}$ 0,06 $g_{Gly}.g_S^{-1}$ 0,09 $g_{Gly}.g_S^{-1}$	x 1 x 1 x 4 x 6	discontinu alimenté sans limitation en oxygène	(Aldiguier *et al.* 2004)
Augmentation de l'activité de l'enzyme glycérol 3-P déshydrogénase (GPDH)						
S. cerevisiae BAW-6	27°C	45°C 50°C	92,8 $mU.mg^{-1}$ 101,3 $mU.mg^{-1}$	x 1,15 x 1,25	Choc 10-20 min sur préculture	(Omori *et al.* 1996)
S. cerevisiae 7 souches (Mainz)	25°C	-	3 à 245 $mU.mg^{-1}$	-	fioles 500 mL	(Radler and Schutz 1982)

La plupart des études de l'effet de la température sur la production de glycérol sont appliquées à des procédés de vinification impliquant des températures peu élevées pour la souche *Saccharomyces cerevisiae* (15°C à 30°C). A ces températures là, l'augmentation de la concentration en glycérol est souvent couplée à une augmentation de la production d'éthanol et est de ce fait plus attribuable à un taux de croissance plus élevé de la souche qu'à un réel effet de la température. Cependant, des auteurs ont étudié le comportement des souches à des températures supérieures, altérant la viabilité et affectant les cinétiques de croissance et de production et ont montré ainsi une réelle augmentation de la production de glycérol non liée à une augmentation de la production d'éthanol mais bien à l'élévation de température.

Des travaux *in vitro* sur les pyrophosphatases inorganiques de levures, enzymes impliquées dans le métabolisme des lipides et la synthèse d'ADN, ont montré un rôle du glycérol contre la perte de fonctionnalité des enzymes. La température optimale de fonctionnement des pyrophosphatases est de 50°C et l'ajout de 50% de glycérol dans le milieu permet d'élever cette température jusqu'à 80°C et de conserver une activité de l'enzyme jusqu'à 95°C (Tableau 4) (Zancan and Sola-Penna 2005). La plupart des protéines chaperons sont des protéines de choc thermique qui agissent contre l'inactivation et la perte de structure tridimensionnelle des protéines lors de stress. De la même façon, le glycérol aurait une activité chaperon et protègerait les pyrophosphatases du stress température empêchant ainsi une perte de fonction protéique. Le glycérol semble donc avoir un rôle thermoprotecteur (Zancan and Sola-Penna 2005).

De plus, les polyhydroxy alcools (polyols), dont le glycérol fait partie, sont impliqués dans la thermoprotection des protéines catalytiques et structurales contre la dénaturation (Back *et al.* 1979; Henle *et al.* 1982) et dans la thermoprotection de la cellule entière contre le décès (Henle *et al.* 1982; Carvalheiro *et al.* 1999). Le mécanisme d'action présumé du glycérol est la diminution des interactions entre l'eau et l'intérieur hydrophobe des protéines (Henle *et al.* 1982).

Tous ces résultats suggèrent un rôle potentiel du glycérol dans la thermoprotection des levures contre le stress thermique en participant à la stabilisation et la renaturation des protéines cellulaires. Cet effet est transitoire et l'augmentation de l'activité de la GPDH et la production de glycérol ralentissent au cours de cultures successives.

Tableau 4. Impact de l'ajout de glycérol ou de tréhalose sur la température optimale de fonctionnement des pyrophosphatases inorganiques de levures *in vitro* (Zancan and Sola-Penna 2005)

Ajout de glycérol	Ajout de tréhalose	T° optimale des pyrophosphatases
0%	0 M	50°C
25%	1 M	60°C
37,5%	1,5 M	70°C
50%	2 M	80°C

Effet de la température sur l'accumulation de tréhalose

Lors d'un choc thermique, l'accumulation de tréhalose est également observée pour prévenir la dégradation du cytosol, de la membrane et la déshydratation associée (Hottiger *et al.* 1987; Carvalheiro *et al.* 1999). Le tréhalose intracellulaire augmente après une élévation de température puis est dégradé lorsque la température est à nouveau régulée à son niveau basal (Hottiger *et al.* 1987). Du fait du tréhalose produit, les cellules ayant subi un choc thermique sont plus thermotolérantes que des cellules ayant été cultivées en isotherme (Lewis *et al.* 1995). De plus, comme pour le glycérol, une augmentation de l'activité de l'enzyme permettant la synthèse de tréhalose, la tréhalose-phosphate synthase, est observée lors d'un choc thermique (facteur 6) et revient à son niveau basal après un retour à température normale (Hottiger *et al.* 1987). Le tréhalose stabilise les membranes cellulaires et augmente la résistance des cellules aux températures basses et élevées. Le tréhalose, tout comme le glycérol, protège les cellules de différents stress dont la température en stabilisant la conformation native des protéines (Singer and Lindquist 1998; Zancan and Sola-Penna 2005). L'ajout de tréhalose au milieu permet également de décaler, *in vitro*, la température optimale de fonctionnement des pyrophosphatases, de 50°C jusqu'à 80°C pour un ajout de 2 molaires (Tableau 4). Cette protection dépend de la capacité de ces deux osmolytes à remplacer les molécules d'eau et donc d'augmenter la viscosité du milieu (Zancan and Sola-Penna 2005). *In vivo*, la stabilisation des protéines par le tréhalose, a été montrée chez *Saccharomyces cerevisiae* W303 (Singer and Lindquist 1998).

Effet de la température au niveau de la membrane plasmique

La membrane plasmique, qui sert de barrière entre le cytoplasme et le milieu extérieur, est la première cible d'une agression thermique. La fluidité membranaire varie en réponse à des stress environnementaux, les cellules s'adaptent à leur environnement, par une réponse active, en modifiant la composition de leur membrane pour maintenir une fluidité optimale (Marechal *et al.* 1999; Beney and Gervais 2001). La nature des phospholipides (groupements polaires, acides gras) influe sur la fluidité de la membrane. Les insaturations des acides gras dans les phospholipides écartent les chaînes hydrocarbonées les unes des autres et tendent à fluidifier la membrane alors que, les stérols et les acides gras saturés à longue chaîne augmentent les interactions de type Van der Walls et entraînent une rigidification. Les cellules répondent également de façon passive par un autre phénomène que la modification de la composition de la membrane : le changement de phase (Marechal *et al.* 1999). Les phospholipides s'organisent en différentes conformations lorsque les conditions de température et de pression sont modifiées, il se produit alors des transitions de phases entre un état « fluide » et « gel » (Beney and Gervais 2001).

Une diminution de la température conduit à une diminution de la fluidité membranaire, la membrane devenant de plus en plus visqueuse (Sinensky 1974). Des travaux chez les bactéries ont montré que lorsque la température diminue la diminution de la fluidité s'accompagne de la

réduction de l'affinité des protéines de transport pour les substrats et d'une diminution du taux de croissance (Nedwell 1999). A faible température, *Saccharomyces cerevisiae* maintient une fluidité optimale de sa membrane en augmentant le degré d'insaturation des acides gras (Torija *et al.* 2003a). A l'inverse, des températures élevées tendent à augmenter la fluidité membranaire, les levures répondent alors par une saturation plus importante des acides gras de la membrane au détriment des acides gras insaturés (Banat *et al.* 1998). Les levures psychrophiles contiennent ainsi plus d'acides gras insaturés que les thermophiles (Van der Rest *et al.* 1995). Le décès de *Saccharomyces cerevisiae* lors d'un choc thermique a été attribué à une perméabilisation de la membrane causée par la transition de phase de l'état « gel » à l'état « fluide » (Gervais and Martínez De Marañón 1995). Cette désorganisation des phospholipides lors d'un choc de température n'apparaît pas lors d'une augmentation progressive de température, dans ce cas là, l'intégrité de la membrane est moins altérée puisque la cellule dispose d'une durée suffisante pour modifier et adapter sa composition membranaire aux conditions environnementales (Martínez De Marañón *et al.* 1999; Guyot *et al.* 2005).

Effet de la température au niveau moléculaire

Lors d'une élévation de température, les cellules vont aussi répondre par l'induction de l'expression de protéines de choc thermique (HSP) (Watson 1987; Sanchez *et al.* 1992; Mager and Ferreira 1993). L'expression des HSP a également lieu à température normale où elles jouent un rôle essentiel dans le repliement des protéines. Chez *Saccharomyces cerevisiae*, le passage de 25°C à 38°C induit la synthèse d'au moins 52 protéines différentes (Estruch 2000). Plusieurs auteurs ont montré que les HSP ne semblent pas être importantes dans l'acquisition de la thermotolérance mais plutôt pour une récupération rapide après un choc à température élevée sauf pour HSP104 dont l'expression est suffisante à la résistance aux chocs thermiques (Sanchez *et al.* 1992; Mager and Ferreira 1993; Davidson *et al.* 1996). Par contre, lors de l'application d'un faible gradient de température il n'y a pas de synthèse de HSP (HSP104) alors que ces protéines sont produites lors d'une variation brutale de 25°C à 50°C (Guyot *et al.* 2005). D'autre part, la production de HSP (heat shock proteins) est supposée liée à l'accumulation de tréhalose (Hottiger *et al.* 1987; Ling *et al.* 1995; Russell 2003).

I.2.1.4 Effet du pH

Les levures possèdent un pH optimal acide de 5,0 à 5,2 (Russell 2003) et tolèrent théoriquement des pH entre 2,4 et 8,6 (Leveau and Bouix 1993). Les levures sont capables de tolérer une large gamme de pH extracellulaire car leur enveloppe est imperméable aux ions H^+ et OH^- et en dehors de cette gamme il n'y a plus de croissance. Seuls les acides sous forme non dissociée (R-COOH) peuvent pénétrer par diffusion passive dans la cellule et avoir un effet inhibiteur (Verduyn *et al.* 1990). La sensibilité d'une levure à un acide dépend du pH (acide dissocié ou non) et de sa capacité à dégrader l'acide. (Leveau and Bouix 1993)

Le pH influence de façon importante la production de glycérol et d'acides organiques. Leur concentration augmente lorsque le pH augmente, les concentrations en glycérol et acide acétique ont été déterminées respectivement à 6,6 $g.L^{-1}$ et 0,7 $g.L^{-1}$ à pH 4 et à 22,2 $g.L^{-1}$ et 8,7 $g.L^{-1}$ à pH 7 (Russell 2003).

En ce qui concerne la thermotolérance, plus le pH est faible, plus la thermotolérance est forte et celle-ci est maximale à pH 4 (Coote *et al.* 1991; Russell 2003).

Enfin, travailler à un pH bas permet de limiter les contaminations, notamment par les bactéries qui préférent généralement les milieux neutres (pH 7 – 7,5) et tolèrent des variations de pH entre 6 et 9 (Bocquet 1988).

I.2.1.5 Effet des inhibiteurs

L'hydrolyse enzymatique des substrats lignocellulosiques libère des substances inhibitrices dans le milieu. Ces inhibiteurs sont principalement des aldéhydes aromatiques comme le 2-furaldéhyde (furfural) et le 5-hydroxyméthyl-2-furaldéhyde (HMF), des acides aliphatiques comme les acides formique et acétique ainsi que des composés phénoliques (Olsson and Hahn-Hägerdal 1996; Larsson *et al.* 1999; Palmqvist and Hahn-Hägerdal 2000a, 2000b; Klinke *et al.* 2004). La présence d'inhibiteurs dans le milieu de culture va limiter l'utilisation des hydrolysats, affecter les cinétiques de croissance et de production et entraîner une baisse de rendement et de productivité en éthanol.

Les principaux facteurs de stress rencontrés en fermentation éthanolique sont donc la température et l'éthanol. Ces facteurs physiques et physico-chimiques ont des effets similaires sur les cellules et agissent sur les cinétiques de croissance et de production, sur la viabilité cellulaire, sur la composition lipidique de la membrane plasmique et sur l'accumulation de composés. Limiter l'effet de ces stress et favoriser l'adaptation des cellules se traduit par une amélioration de la tolérance des levures vis-à-vis de ces stress. Cette tolérance en termes de production (rendement, titre, productivité), de viabilité ou de croissance va pouvoir être améliorée par différentes techniques.

I.2.2 Amélioration des performances et de la tolérance des souches de levures – les techniques

Plusieurs méthodes peuvent être mises en œuvre afin d'améliorer la tolérance des souches face aux différents stress rencontrés.

Certaines souches sont naturellement tolérantes à certains stress et peuvent être utilisées directement dans les procédés. De telles levures sont isolées d'habitats particuliers où les stress environnementaux sont importants (température, salinité, pH …). Les souches naturellement tolérantes à l'éthanol, thermotolérantes et osmotolérantes de *Saccharomyces cerevisiae* permettent ainsi d'atteindre des titres de 17,6% (v/v) d'éthanol avec des rendements supérieurs à ceux de souches de boulangerie (0,48-0,5 $g_{Ethanol}.g_S^{-1}$ contre 0,32-0,48 $g.g_S^{-1}$) (Argiriou *et al.* 1992) et sont capables de produire plus de 7% (v/v) d'éthanol à 44°C et de tolérer des températures supérieures (Kiran Sree *et al.* 2000).

Par ailleurs, optimiser la stratégie de conduite de la fermentation, pour fournir aux levures les conditions optimales de croissance et de production, est un moyen d'améliorer les performances des souches. Parmi ces stratégies, une aération non limitante du réacteur (Alfenore *et al.* 2004) et l'ajout de composés (Birch and Walker 2000; Alfenore *et al.* 2002; Barber *et al.* 2002) permettent d'améliorer la tolérance naturelle des souches à l'éthanol et à la température.

De plus en plus, les méthodes envisagées sont basées sur des approches moléculaires et font appel à des techniques de recombinaison de l'ADN (génie génétique), d'adaptation et d'évolution naturelle ou dirigée voire de mutagénèse.

I.2.2.1 Recombinaison de l'ADN

La technique la plus classique est la recombinaison de l'ADN qui amplifie la diversité génétique de la population en créant de nouvelles combinaisons conduisant à l'amélioration des capacités fermentaires des levures et de la tolérance à différents stress.

Parmi les techniques de recombinaison de l'ADN se distinguent :

- **le genome shuffling**, qui permet la conjugaison de cellules ne pouvant pas le faire naturellement (souches non sporogènes, de même signe sexuel, d'espèces différentes). Elle peut se faire par méiose et conjugaison des levures (Hou 2010) ou par fusion de protoplastes (Shi *et al.* 2009), dans ce cas la paroi des cellules est supprimée par action enzymatique et les protoplastes obtenus sont fusionnés. Cette technique semble être un moyen efficace et rapide pour améliorer les phénotypes complexes des micro-organismes haploïdes ou polyploïdes.

- **l'hybridation** (Belloch *et al.* 2008), permet le croisement de deux individus différents. Un cas particulier d'hybridation, **le back-crossing** ou rétrocroisement (Attfield 1997; Marullo *et al.* 2009), correspond à des croisements pendant plusieurs générations pour introduire dans une lignée un caractère intéressant.
- **la transformation** d'une levure avec un ADN étranger (Hinnen *et al.* 1978) ou par l'introduction d'un facteur de transcription muté contrôlant la transcription de nombreux gènes (gTME global transcription machinery engineering) (Alper *et al.* 2006).

I.2.2.2 Evolution - Adaptation

Il existe également l'adaptation de souche dont la sélection est réalisée par application d'une pression de sélection correspondant au caractère recherché.

Adaptation naturelle

L'adaptation naturelle est efficace pour améliorer la tolérance des souches mais nécessite des durées de cultures très importantes pour obtenir un mutant (Martín *et al.* 2007; Stanley *et al.* 2009).

La technique BOICS (Brown and Oliver Interactive Continuous Selection) développée par Brown et Oliver permet la sélection, en culture continue, de mutants résistants à un facteur de stress grâce à la présence d'une boucle de rétro-contrôle qui augmente le stress dès que la culture s'adapte (dépassement d'un seuil de CO_2 produit) (Brown and Oliver 1982). Ce dispositif où la culture elle-même détermine l'intensité de la sélection, devrait être applicable à l'isolation de mutants tolérants, quel que soit le micro-organisme et la tolérance recherchée (Brown and Oliver 1982).

Adaptation après mutagénèse aléatoire

La mutagénèse permet de diversifier le génotype et le phénotype de la population. Une étape d'adaptation sur cette population hétérogène va accélérer l'apparition de mutants d'intérêt.

Adaptation après mutagénèse aléatoire par agents mutagènes chimiques

Les principaux agents mutagènes chimiques sont l'éthyl méthane sulfonate (EMS) (Cakar *et al.* 2005), (Stanley *et al.* 2009) et le *N*-Méthyl-*N*'-Nitro-*N*-Nitrosoguanidine (MNNG) (Maga and McEntee 1985). Ces agents entrainent des substitutions de nucléotides permettant des fréquences de mutation de 5.10^{-4} à 5.10^{-2} par gène.

Adaptation après mutagénèse aléatoire par agents mutagènes physiques

De nombreuses formes de radiations électromagnétiques sont dangereuses pour les micro-organismes. Les radiations ionisantes, rayonnements de haute énergie (rayons X et gamma) ionisent les molécules et détruisent l'ADN ; les radiations non ionisantes comme les ultra-violets (UV) ne permettent pas l'ionisation d'atomes ou de molécules mais ont des effets biologiques. En faible quantité ces différentes radiations produiront des mutations et pourront indirectement provoquer la mort, tandis que des doses élevées seront directement létales (James and Nasim 1987). L'exposition à de tels rayonnements (UV, rayons X) est utilisée pour modifier les souches afin d'obtenir des mutants améliorés (Witkin 1969; Sridhar *et al.* 2002).

Quel que soit le caractère à améliorer l'irradiation aux UV peut être utilisée. Les cellules en milieu liquide sont exposées aux UV puis sont étalées sur milieu solide. L'application d'une pression de sélection permet un criblage des levures obtenues, les colonies se développant le plus vite sont ensuite mises en culture en milieu liquide pour l'étude des caractères recherchés. Par contre, la conservation du caractère muté peut être réversible du fait de l'existence de systèmes de réparation chez tous les organismes.

I.2.3 Amélioration des performances et de la tolérance des souches de levures – l'état de l'art

I.2.3.1 Amélioration de la tolérance à l'éthanol

Différentes méthodes ont été mises en œuvre pour améliorer la tolérance des souches à l'éthanol. Dans ces études, l'amélioration de la tolérance est qualifiée par rapport à l'augmentation de la productivité, du titre final, de la viabilité et de la croissance (Tableau 5).

L'amélioration de la tolérance quantifiée par une augmentation du titre d'éthanol a pu être atteinte grâce à des techniques de recombinaison de L'ADN. Une modification génétique par « genome shuffling » combinée à une mutagénèse aux UV des protoplastes d'une souche industrielle de *Saccharomyces cerevisiae* a permis en seulement trois cycles d'améliorer la production d'éthanol, jusqu'à 187% à 40°C (Shi *et al.* 2009). Une nouvelle technique de génome shuffling utilise la reproduction sexuée et asexuée (méiose et conjugaison) pour améliorer la production d'éthanol de 12%. Une souche industrielle diploïde de *Saccharomyces* est mutée à l'EMS, puis la sporulation est induite et les cellules haploïdes issues des spores sont conjugées (Hou 2010). La productivité d'éthanol est également amplifiée de plus de 13% par back-crossing (ou rétrocroisement) (Marullo *et al.* 2009).

L'adaptation des souches est très utilisée pour l'acquisition de la tolérance à l'éthanol. La technique BOICS (Brown and Oliver Interactive Continuous Selection) consiste à sélectionner en

culture continue avec un système de rétro-contrôle des mutants éthanol-tolérants. L'activité fermentaire de *Saccharomyces uvarum* basée sur la production de CO_2 est suivie et un ajout d'éthanol est réalisé lorsque la culture produit plus de CO_2, indiquant une augmentation de la production d'éthanol et donc une amélioration de la tolérance des levures. Le meilleur des mutants possède une vitesse spécifique de production de CO_2 plus de 2 fois supérieure à celle de la souche sauvage, jusqu'à une concentration de 350 $g.L^{-1}$ d'éthanol (Brown and Oliver 1982).

Optimiser la conduite de la fermentation par la gestion de l'alimentation en différents composés contribue également à une meilleure tolérance au stress éthanol. Un apport de vitamines de manière exponentielle tout au long de la culture permet une tolérance jusqu'à 147 $g.L^{-1}$ d'éthanol grâce à l'augmentation à la fois du taux de croissance, de la vitesse spécifique de production d'éthanol et de la viabilité, ce qui correspond à une amélioration de 17% de la production d'éthanol par rapport à un ajout initial de vitamines. Le $P_{critique}$, concentration en éthanol pour laquelle le taux de croissance est nul, est également plus élevé pour la fermentation où l'ajout de vitamines est exponentiel avec 115 $g.L^{-1}$ au lieu de 101 $g.L^{-1}$ avec un ajout initial, preuve de l'amélioration de la tolérance (Alfenore *et al.* 2002).

D'autre part, la tolérance à l'éthanol peut être quantifiée sur le critère de survie des micro-organismes à leur propre production d'éthanol. L'adaptation de souches permet d'améliorer la viabilité d'un facteur 10 environ en présence d'un stress éthanol puisque la tolérance à 8,5% (v/v) d'éthanol peut être acquise par adaptation naturelle en culture continue après 192 jours. L'utilisation de la mutagénèse à l'EMS en plus de la pression de sélection permet d'accélérer cette adaptation en réduisant à 14-28 jours la durée d'obtention d'un mutant (Stanley *et al.* 2010). Une adaptation par mutagénèse à l'EMS couplée à un stress éthanol constant (20% (v/v)) permet d'améliorer la survie de *Saccharomyces cerevisiae* jusqu'à 25% (1% pour la souche sauvage). Des pourcentages de survie encore supérieurs (59%) sont accessibles par application d'un stress éthanol graduel (jusqu'à 55% v/v) qui permet une évolution progressive de la résistance à l'éthanol (Cakar *et al.* 2005).

Toutes les souches issues du genome shuffling combiné à une mutagénèse aux UV des protoplastes ont considérablement amélioré leur tolérance au stress éthanol en termes de viabilité par rapport à la souche de départ et après chaque cycle, jusqu'à 25% (v/v) d'éthanol (Shi *et al.* 2009). Par ailleurs, une technique récente d'ingénierie métabolique de la transcription gTME (global transcription machinery engineering) permet une modification simultanée de plusieurs gènes pour obtenir des phénotypes intéressants dont la tolérance au stress éthanol. Alper *et al.* (2006) ont transformé une souche *Saccharomyces cerevisiae* par introduction du facteur de transcription Spt15p (impliqué dans le positionnement de l'ARN polymérase II) muté par PCR génératrice d'erreur (error-prone polymerase chain reaction). La tolérance à l'éthanol en termes de viabilité est testée en présence de 10% à 20% (v/v) d'éthanol et de 20 $g.L^{-1}$ de glucose et les performances fermentaires de la souche sont testées en présence de 100 $g.L^{-1}$ de glucose, sans ajout d'éthanol. La viabilité ainsi que la productivité de la souche et le rendement en éthanol ont

été améliorés par rapport à la souche sauvage grâce à la présence de trois mutations (substitution d'acides aminés) au niveau du facteur de transcription Spt15p (Alper *et al.* 2006).

D'autre part, la viabilité lors d'un stress éthanol peut être améliorée par l'ajout au milieu de culture d'acides gras insaturés et de stérols. L'éthanol étant connu pour rigidifier la membrane, l'ajout d'acides gras insaturés permet d'augmenter la fluidité membranaire en réponse à la rigidification. La tolérance à l'éthanol des cellules en termes de viabilité est supérieure, lorsque la membrane est enrichie en stérol couplé à un acide gras doublement insaturé (C18:2) plutôt qu'un acide gras mono-insaturé (C18:1). Les cellules enrichies en ergostérol ou stigmastérol et C18:2 sont plus résistantes à l'éthanol que celles enrichies avec d'autres stérols. (Thomas *et al.* 1978). Par ailleurs, lorsque les cellules sont pré-incubées en présence d'éthanol (18% v/v), elles auront une meilleure survie au stress éthanol (8% v/v) (40% de survie au lieu de 10% sans éthanol) (Mizoguchi and Hara 1997). La croissance en présence d'éthanol conduit à l'acquisition de la tolérance à l'éthanol, la levure adaptant la composition lipidique de sa membrane.

Enfin, une meilleure résistance des cellules à l'éthanol peut être obtenue par la réalisation d'un autre stress que le stress éthanol. Lors de l'application d'un stress osmotique il y a accumulation de tréhalose intracellulaire pour prévenir la dégradation du cytosol et de la membrane. Du fait du tréhalose produit, les cellules sont plus tolérantes au stress éthanol et la viabilité des levures est supérieure et ce d'autant plus que le stress osmotique est sévère (Sharma 1997). La présence de tréhalose semble donc jouer un rôle dans la tolérance à l'éthanol.

Une amélioration de la croissance des levures en condition de stress éthanol traduit également une meilleure tolérance à l'éthanol des souches. Il est possible de modifier la stratégie d'aération ; une aération non limitante du réacteur par rapport à une micro-aération permet un accroissement de 23% de la masse de biomasse viable à 147 $g.L^{-1}$ d'éthanol, résultat d'un taux de croissance et d'un rendement biomasse/substrat supérieurs (facteur 1,2 à 1,5) (Alfenore *et al.* 2004).

L'hybridation de souches du genre *Saccharomyces* tolérantes à 10% d'éthanol (*S. cerevisiae* et *S. bayanus*) ou non (*S. kudriavzevii*) fournit également des hybrides tous capables de se reproduire sur milieu solide en présence de 10% d'éthanol (Belloch *et al.* 2008).

Une adaptation naturelle (192 jours) ou après mutagénèse à l'EMS (14-28 jours) permet d'améliorer la tolérance à un stress éthanol (95 $g.L^{-1}$) : la concentration cellulaire des souches adaptées en présence d'éthanol (8,5% v/v) est doublée pour la souche mutée à l'EMS et quadruplée pour la souche évoluée naturellement (Stanley *et al.* 2010).

Enfin, la technique de recombinaison de l'ADN par génome shuffling (par méiose et conjugaison des spores) permet d'améliorer la croissance en présence de 15% (v/v) d'éthanol (Hou 2010).

Tableau 5. Tableau récapitulatif des améliorations de la tolérance à l'éthanol (gains, souches, techniques)

	Souche	Concentration en éthanol	Souche améliorée	Souche sauvage	Titre ($g.L^{-1}$)	Rdt ($g_P.g_S^{-1}$)	Prod. ($g.L^{-1}.h^{-1}$)	Technique d'amélioration	Références
Augmentation production d'éthanol	*S. uvarum* 5D-cyc	0 $g.L^{-1}$ 100 $g.L^{-1}$ 200 $g.L^{-1}$ 350 $g.L^{-1}$	1,74 $g_{CO2}.g^{-1}.h^{-1}$ 1,56 $g_{CO2}.g^{-1}.h^{-1}$ 1,45 $g_{CO2}.g^{-1}.h^{-1}$ 1,3 $g_{CO2}.g^{-1}.h^{-1}$	0,82 0,61 0,59 0.54	ND	1,82* / 0,86*	1,3 à 1,74 $g_{CO2}.g^{-1}.h^{-1}$ /0,54 à 0,82	Adaptation (éthanol jusqu'à 47 $g.L^{-1}$)	(Brown and Oliver 1982)
	S. cerevisiae	'	1,8 $g.L^{-1}.h^{-1}$	1,59 $g.L^{-1}.h^{-1}$	70	ND	1,8 / 1,59	Back-crossing	(Marullo *et al.* 2009)
	S. c. TH-AADY	-	118,8 $g.L^{-1}$	105,8 $g.L^{-1}$	118 / 105	0,42/0,39*	2,4 / 2,1*	EMS+genome shuffling	(Hou 2010)
	S. c. CBS 8066	-	147 $g.L^{-1}$	126 $g.L^{-1}$	147 / 126	0,42 / 0,38	3,3 / 2,8	Ajout vit. exponentiel	(Alfenore *et al.* 2002)
	S. c. CBS 8066	-	147 $g.L^{-1}$	131 $g.L^{-1}$	147 / 131	0,46 / 0,43	3,3 / 2,6	Aération non limitante	(Alfenore *et al.* 2004)
Augmentation de la viabilité	*S. cerevisiae* SM-3	79 $g.L^{-1}$ 118 $g.L^{-1}$ 158 $g.L^{-1}$ 197 $g.L^{-1}$	100 % 80 % 70 % 50 %	60 % 0 % 0 % 0 %	ND	ND	ND	UV + Genome shuffling par fusion des protoplates	(Shi *et al.* 2009)
	S. c. W303-1A	95 $g.L^{-1}$	52 % (naturelle) 44 % (+EMS)	5 %	42 / 42 35 / 42	0,44 / 0,44 0,51 / 0,44	0,36 / 0,36 0,31 / 0,36	Adaptation naturelle et EMS	(Stanley *et al.* 2010)
	S. cerevisiae CEN.PK 113.7D	158 $g.L^{-1}$ 158 à 395 $g.L^{-1}$ 158 à 434 $g.L^{-1}$	25% 36% 59%	1%	ND	ND	ND	Mutagénèse EMS + adaptation 1h	(Cakar *et al.* 2005)
	S. cerevisiae BY4741	99 $g.L^{-1}$ 118 $g.L^{-1}$	60% 10%	30% 0%	35 / 26	0,40 / 0,35	2,03 / 1,2	*gTME*	(Alper *et al.* 2006)
	S. cerevisiae NCYC 366	126 $g.L^{-1}$+ 0,5M NaCl 126 $g.L^{-1}$+ 1M NaCl 126 $g.L^{-1}$+ 1,5M NaCl	16% 50% 70%	6%	ND	ND	ND	Stress osmotique NaCl	(Sharma 1997)
	S. cerevisiae	63 $g.L^{-1}$	40%	10%	ND	ND	ND	Stress éthanol (142 $g.L^{-1}$) préculture	Mizoguchi and Hara 1997
	S. cerevisiae NCYC366	46 $g.L^{-1}$ Stigmasterol+$C_{18:2}$ 46 $g.L^{-1}$ Ergosterol + $C1_{8:2}$	75% - 10h 65% - 20h	0% 0%	ND	ND	ND	Ajout stérol +acides gras C18:2	(Thomas *et al.* 1978)
Effet sur la crois--sance	*S. cerevisiae* *S. bayanus* *S. kudriavzevii*	79 $g.L^{-1}$	*S.c.* × *S.b.* (+) *S.c.* × *S.k.* (+) *S.c.*×*S.b.*×*S.k* (+)	*S.c.* (+) *S.b.* (+) *S.k.* **(-)**	ND	ND	ND	Hybridation	(Belloch *et al.* 2008)

Prod : productivité ; Rdt : rendement ; Titre, Rdt, Prod → mutant / souche sauvage

ND : non donné ; * non donné dans la publication mais calculé d'après les données disponibles

I.2.3.2 Amélioration de la tolérance à l'acide acétique et aux inhibiteurs issus des hydrolysats lignocellulosiques

Différentes stratégies permettent de limiter l'effet des substances toxiques, inhibitrices pour la cellule, produites au cours de la fermentation ou présentes dans le milieu de culture.

Il est possible d'adapter les souches à des concentrations importantes en acide acétique et en inhibiteurs par évolution naturelle. La tolérance à l'acide acétique de souches modifiées de *Saccharomyces cerevisiae* fermentant le xylose a été améliorée par évolution en mode discontinu et continu (Wright *et al.* 2011). Après adaptation en batch successifs avec des concentrations croissantes en acide acétique, la souche tolère 6 $g.L^{-1}$ d'acide acétique au lieu de 1 $g.L^{-1}$, par contre, cette adaptation naturelle est longue (400 générations, 54 batch, 7mois). De même, après adaptation en culture continue avec une concentration croissance en acide acétique, la souche tolère jusqu'à 5 $g.L^{-1}$ d'acide acétique et la vitesse spécifique de production d'éthanol a été augmentée de 0,36 à 0,63 $g_{Ethanol}.g_X^{-1}.h^{-1}$ (Wright *et al.* 2011). Une autre souche de *Saccharomyces cerevisiae* fermentant le xylose a été adaptée en culture continue (353 heures) avec une alimentation présentant des concentrations croissantes en inhibiteurs (composés phénoliques, furaldéhydes, acides aliphatiques). Cette souche adaptée présente une amélioration des performances de production d'éthanol en mode discontinu sur hydrolysats de bagasse de canne à sucre, avec un rendement en éthanol de 0,38 $g_P.g_S^{-1}$ (contre 0,18 $g_P.g_S^{-1}$) (Martín *et al.* 2007).

D'autre part, plutôt que d'améliorer la tolérance aux inhibiteurs, il est possible de « détoxifier » le milieu en retirant les composés inhibiteurs par des méthodes biologiques, physiques ou chimiques (Larsson *et al.* 1999; Palmqvist and Hahn-Hägerdal 2000a). Différentes méthodes de détoxification d'un hydrolysat acide d'épicéa ont été testées. La fermentation des hydrolysats détoxifiés a montré que l'échange d'anions (à pH 5,5 et 10) et les traitements par des laccases, à l'hydroxyde de calcium et avec *Trichoderma reesei* s'avèrent être les méthodes de détoxification les plus efficaces. Une fermentation de référence sur glucose (35 $g.L^{-1}$) et une fermentation sur hydrolysats d'épicéa sans détoxification ont été réalisées ; les performances obtenues sont présentées dans le tableau suivant (Tableau 6) (Larsson *et al.* 1999).

Tableau 6. Tableau récapitulatif des performances fermentaires de *Saccharomyces cerevisiae* à 30°C sur glucose et sur hydrolysat d'épicéa détoxifié ou non par différentes techniques (Larsson *et al.* 1999)

Méthode de détoxification		$Y_{Ethanol/S}$ ($g.g^{-1}$)	Productivité 6 h ($g.L^{-1}.h^{-1}$)
Référence 35$g.L^{-1}$ glucose		0,45	1,46
Hydrolysat d'épicéa	Sans détoxification	0,32	0,04
	CaOH pH 10	0,44	1,21
	Echange d'anions pH 5.5	0,45	0,66
	Echange d'anions pH 10	0,49	1,42
	Laccase	0,47	0,68
	Trichoderma reesei	0,43	0,55

I.2.3.3 Amélioration de la thermotolérance

L'amélioration de la tolérance à la température peut être quantifiée à la fois par une augmentation de la production d'éthanol, de la viabilité ou de la croissance (Tableau 7).

Une augmentation de la production d'éthanol à température élevée a pu être observée par l'adaptation de souches (Sridhar *et al.* 2002) et par recombinaison de l'ADN (Shi *et al.* 2009). La mutagénèse aux UV et la sélection chez des souches de *Saccharomyces cerevisiae* naturellement thermotolérantes permet d'améliorer encore la thermotolérance en augmentant le titre final en éthanol de plus de 16% (Sridhar *et al.* 2002). De plus, le « genome shuffling » par fusion des protoplastes exposés aux UV a permis d'augmenter la production d'éthanol à température élevée et d'accroître la thermotolérance de *Saccharomyces cerevisiae* jusqu'à 50°C alors que la souche sauvage tolère une température maximale de 40°C (Shi *et al.* 2009).

L'amélioration de la tolérance peut être mise en évidence par une augmentation de la survie des cellules. Chez *Saccharomyces cerevisiae*, la survie en présence de chocs de température peut être améliorée par l'ajout de composés au milieu de culture (acétaldéhyde, ions métalliques, …) (Birch and Walker 2000; Barber *et al.* 2002; Tosun and Ergun 2007). L'ajout d'acétaldéhyde lors d'un changement brutal de température permet de stimuler la croissance et servirait à rétablir la balance d'oxydo-réduction en conditions de stress (Barber *et al.* 2002). L'ajout de magnésium accroît le pourcentage de survie et protègerait les levures en prévenant la perméabilisation des membranes cellulaires (Birch and Walker 2000).

D'autre part, une adaptation des souches par optimisation de la stratégie de conduite (profil de température) est un autre moyen d'améliorer la survie à un choc thermique. Une préculture ou une culture des levures à une température supérieure à l'optimum entraînera des modifications de composition de la membrane plasmique qui sera plus résistante aux dénaturations thermiques provoquées par des chocs que celle des levures cultivées à température normale (Fintan Walton and Pringle 1980). Une adaptation par des chocs thermiques a permis d'améliorer la viabilité d'une souche après 15 cycles successifs de chocs (50°C) et de remise en culture dans un milieu neuf (Balakumar *et al.* 2001). De plus, l'utilisation d'une rampe de température plutôt qu'un choc thermique augmente la survie des levures et contribue à l'accroissement de la thermotolérance par une adaptation progressive. L'augmentation progressive de température agit comme pression de sélection lors de l'adaptation des levures (Gervais and Martínez De Marañón 1995; Martínez De Marañón *et al.* 1999; Beney *et al.* 2000; Guyot *et al.* 2005). La tolérance peut être améliorée par la réalisation au préalable d'un autre stress (stress thermique ou osmotique) de faible intensité avant un choc thermique d'intensité plus importante, la viabilité peut alors être améliorée jusqu'à un facteur 1000 (Lewis *et al.* 1995). Cette tolérance est due d'une part aux protéines de choc mais également au glycérol et au tréhalose synthétisés lors du choc peu intense. L'adaptation par mutagénèse à l'EMS couplée à un stress thermique graduel permet également d'améliorer la tolérance à la température en termes de viabilité jusqu'à 80°C (Cakar *et al.* 2005).

Tableau 7. Tableau récapitulatif des améliorations de la thermotolérance (gains, souches, techniques)

	Souche	Température (°C)		Souche améliorée	Souche sauvage	Titre ($g.L^{-1}$)	Rdt ($g_P.g_X^{-1}$)	Prod. ($g.L^{-1}.h^{-1}$)	Technique d'amélioration	Références
		Isotherme	Choc therm							
Augmentation de la production d'éthanol	*S. c.* (Kiran Sree et al. 2000)	42°C	-	58,2 $g.L^{-1}$	50 $g.L^{-1}$	58,2 / 50	ND	ND	Mutagénèse UV + adaptation	(Sridhar *et al.* 2002)
	S. cerevisiae SM-3	35°C 40°C 45°C 50°C	-	98,5 $g.L^{-1}$ 95,5 $g.L^{-1}$ 95 g. L^{-1} 73,5 g. L^{-1}	60,5 $g.L^{-1}$ 33,3 $g.L^{-1}$	98,5 / 60,5 95,5 / 33,3 95 / 0 73,5 / 0	0,5/0,46* 0,5/0,37* 0,49/0* 0,53/0*	2,05/1,26* 1,99/0,5* 1,98/0* 1,53/0*	UV + Genome shuffling par fusion des protoplates	(Shi *et al.* 2009)
	S. cerevisiae thermotolérante	40°C 43°C 45°C	-	46 $g.L^{-1}$ 38 $g.L^{-1}$ 26 $g.L^{-1}$	-	46 38 26	0,46* 0,38* 0,26*	1,27* 0,7* 0,54*	Adaptation chocs température (15 chocs de 3 h à 50°C)	(Balakumar *et al.* 2001)
Augmentation de la viabilité	*S. cerevisiae*	40°C – 18h	50°C - 3h (15 cycles)	100% (68h)	100% (20h)	46	0.46*	1,27*	Adaptation chocs température	(Balakumar *et al.* 2001)
	S. cerevisiae CEN.PK 113.7D	30°C	52°C à 80°C	28%	1%	ND	ND	ND	EMS + adaptation stress graduel (9stress x10min)	(Cakar *et al.* 2005)
	S. cerevisiae L-2226	30°C	42°C	23% -20mM Mg 2% - 2 mM Mg	0%	37* à 41* 42* à 49*	ND	0,39 à 0,43 0,44 à 0,51	Ajout de magnésium	(Birch and Walker 2000)
	S. cerevisiae A9	25°C	37°C – 45min	x 1000 0,1%	10^{-4}%	ND	ND	ND	Adaptation (chocs température)	(Lewis *et al.* 1995)
	S. cerevisiae C276-4Aa	30°C 36°C	52°C -8min	5 % 90 %	-	ND	ND	ND	Culture à T°C plus élevée avant choc	(Fintan Walton and Pringle 1980)
	S. cerevisiae CBS 1171	25°C	50°C	34% (rampe 0,4°C/min)	1% changement brutal	ND	ND	ND	Changement de T°C progressif	(Gervais and Martínez De Marañón 1995)
Effet sur croissance	*S. cerevisiae* *S. bayanus* *S. kudriavzevii*	37°C	-	*S.c.* × *S.b.* (+) *S.c.* × *S.k.* (+) *S.c.*×*S.b.*×*S.k* (+)	*S.c.* (+) *S.b.* **(-)** *S.k.* **(-)**	ND	ND	ND	Hybridation	(Belloch *et al.* 2008)

Prod : productivité ; Rdt : rendement ; Titre, Rdt, Prod → mutant / souche sauvage

ND : non donné ; * non donné dans la publication mais calculé d'après les données disponibles

Les souches recombinantes issues du genome shuffling ont une meilleure viabilité à température élevée que celle de la souche sauvage et des parents du cycle précédent, jusqu'à 55°C (15,7% de viabilité) (Shi *et al.* 2009).

Lors de chocs thermiques, la viabilité peut également être amplifiée par des procédés d'immobilisation ou d'encapsulation des levures. L'encapsulation de *Saccharomyces cerevisiae* dans des capsules d'alginate-chitosane a permis la culture en mode continu en présence de chocs thermiques (42-45°C) alors que les levures libres sont inactivées (Ylitervo *et al.* 2011), de même pour une immobilisation des levures sur des résidus insolubles de céréales « Brewers' spent grains » (BSG) (Kopsahelis *et al.* 2009).

Une amélioration de la tolérance à la température peut se faire sur le critère de croissance. L'hybridation de souches du genre *Saccharomyces* incapables de se reproduire à 37°C (*S. bayanus* et *S. kudriavzevii*) avec *Saccharomyces cerevisiae* permet une croissance à 37°C de tous les hybrides, sur milieu solide (Belloch *et al.* 2008).

Les cibles réelles d'une amélioration de souches résistantes à des stress température n'étant pas uniques ni clairement identifiées dans la bibliographie, nous avons choisi pour ce travail de réaliser des mutagénèses aléatoires par exposition aux UV. Combinées à un mode de conduite du réacteur imposant des pressions de sélection contrôlées, elles permettront de solliciter l'ensemble du génome d'une population de levures exposée à des rayonnements UV et de muter aléatoirement des cibles diverses pour tendre vers le variant recherché. Cette stratégie pose alors le problème des conséquences de l'irradiation sous rayonnement ultraviolet.

I.3 Radiations ultra-violettes

Les ultra-violets sont des radiations non-ionisantes naturellement émises par le soleil (longueurs d'onde inférieures à 400 nm) qui ne pénètrent que faiblement la matière.

La gamme des rayonnements UV est subdivisée en 3 classes : UV-A (400-315 nm), UV-B (315-280 nm) et UV-C (280-100 nm) pour lesquelles il existe différentes applications (Figure 6).

- UV-A : 365 nm → Identification des bactéries, contrôle qualité

- UV-B : 312 nm → Electrophorèse

- UV-C : 254 nm → Stérilisation, mutagénèse…

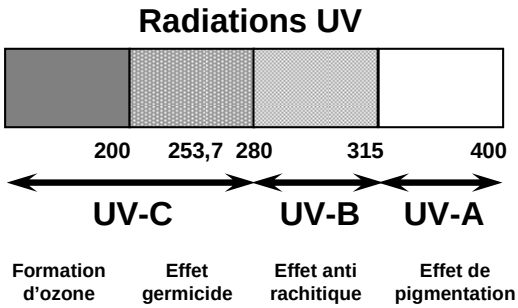


Figure 6. Répartition des classes d'UV suivant leur longueur d'onde (100 à 400 nm) (www.ats84.fr)

La longueur d'onde courte et l'énergie élevée de la lumière UV en font un rayonnement dangereux pour les micro-organismes. Les UV les plus létaux ont une longueur d'onde de 260 nm, la longueur d'onde la plus absorbée par l'ADN (Figure 7).

La levure *Saccharomyces cerevisiae*, organisme eucaryote unicellulaire, compte parmi les micro-organismes les plus utilisés pour l'étude de l'effet des radiations ionisantes et non ionisantes (UV) sur les systèmes biologiques.

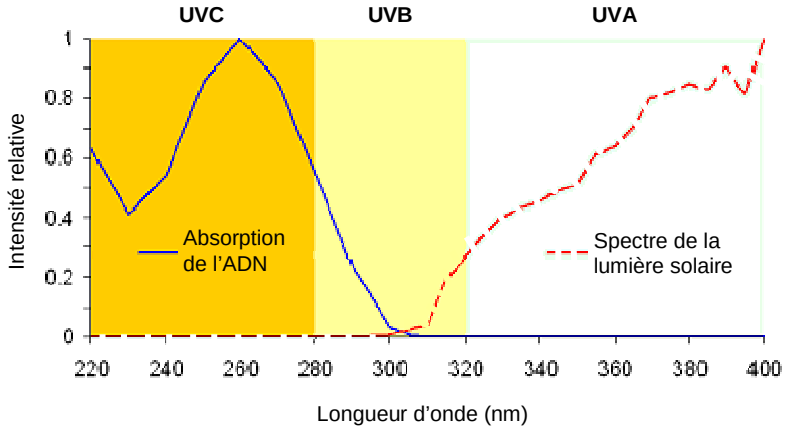


Figure 7. Spectre d'absorption des UV par l'ADN (http://inac.cea.fr)

I.3.1 Conséquences des irradiations aux UV chez la levure : formation de dimères de pyrimidines

Au niveau de l'ADN, les bases pyrimidiques (thymine et cytosine) forment des liaisons hydrogènes avec leurs purines complémentaires (adénine et guanine) (Figure 8).

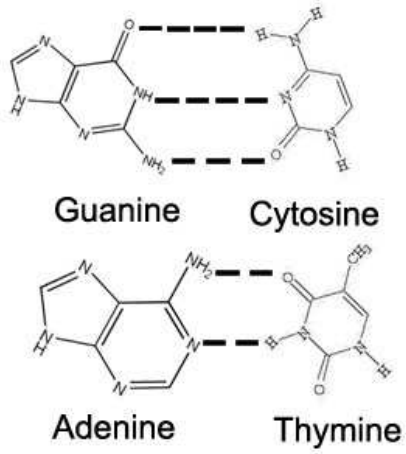


Figure 8. Liaisons hydrogènes entre les bases pyrimidiques et leur purine complémentaire (http://3.bp.blogspot.com/_QwiM5bXMBk8/TTufaRI8hDI/AAAAAAAAABY/1pX5BL2vuEg/s1600/bases.jpg)

Lors de l'exposition aux rayons UV, les lésions induites interviennent le plus fréquemment entre des bases pyrimidiques adjacentes sur le même brin d'ADN, qui réagissent pour former des dimères covalents de deux types (Figure 9).

- Un dimère cyclobutane de pyrimidine ou CPD (cyclobutane pyrimidine dimer) est formé par apparition d'un cycle cyclobutane entre les carbones 5 et 6 des bases pyrimidiques (Chanet *et al.* 1975; James and Nasim 1987; Sinha and Hader 2002).
- Un photoproduit pyrimidine (6-4) pyrimidone est formé par une liaison entre les carbones 6 et 4 (Sinha and Hader 2002; Pfeifer *et al.* 2005).

Les photoproduits (6-4) sont formés en quantité beaucoup plus faible que les CPD.

Ces dimérisations entraînent une déformation et une rigidification de la double-hélice d'ADN interférant avec la réplication et la transcription. La réplication étant rendue difficile, des erreurs responsables de mutations pourront être induites, d'où l'effet cancérogène des rayonnements UV (Resnick and Setlow 1972; James and Nasim 1987).

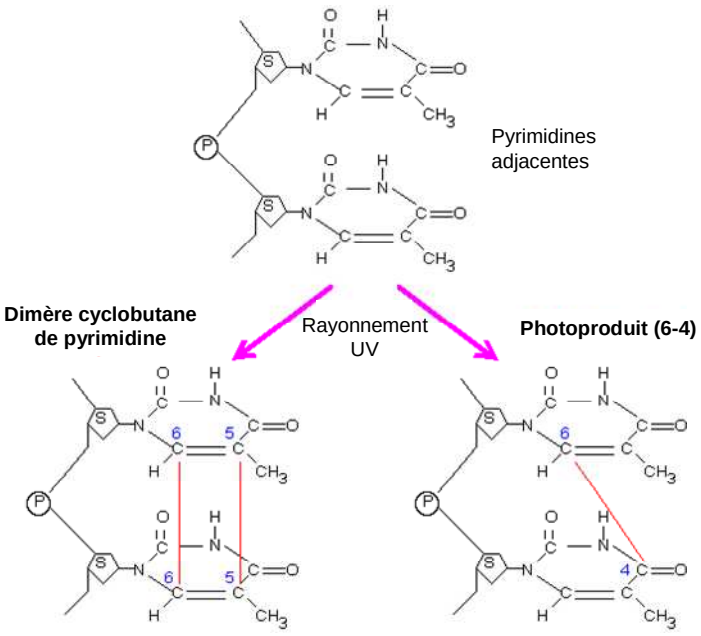


Figure 9. Formation de dimères de pyrimidine (dimères cyclobutane de pyrimidine et photoproduits 6-4) lors de l'irradiation aux UV (www.web-books.com/MoBio/Free/Ch7F5.htm)

I.3.2 Réparation des lésions induites par les UV

Les irradiations UV induisent des lésions létales ou non qui touchent principalement l'ADN mais dont l'effet est réversible. La plupart des lésions induites sur l'ADN sont réparées par l'intervention de systèmes de réparation naturellement présents chez la levure. L'existence de tels systèmes de réparation s'explique par le fait que les organismes sont constamment bombardés par des radiations (Patrick *et al.* 1964; James and Nasim 1987; Friedberg 1988). Différents mécanismes interviennent pour restaurer la zone endommagée ou la supprimer, une tolérance de la lésion peu également être observée.

Chez *Saccharomyces cerevisiae*, les photoproduits (6-4) sont plus rapidement éliminés que les dimères cyclobutane de pyrimidine (McCready and Cox 1993).

I.3.2.1 Restauration de la zone endommagée : la photoréactivation

La photoréactivation est un système de réparation des lésions de l'ADN par exposition à la lumière visible. Elle fait intervenir une enzyme photoréactivante appelée photoligase qui se lie au niveau des pyrimidines adjacentes et permet de restaurer la structure de l'ADN en clivant les dimères. Ce mécanisme fonctionne chez les cellules irradiées aux UV et permet leur réactivation. La photoréactivation fut découverte par Kelner en 1949 chez *Streptomyces griseus* puis chez *Escherichia coli*, (Kelner 1949; Hanawalt and Haynes 1965; Resnick and Setlow 1972; James and Nasim 1987). Ce système répare de nombreuses lésions puisque dans le cas de l'exposition au soleil de levures sensibles aux UV (délétées de leurs systèmes de réparation) une inactivation de

99% de la population cellulaire est observable (Resnick 1970). Les photoligases sont spécifiques du type de lésion, la CPD photoligase se lie aux dimères cyclobutane de pyrimidine, tandis que la 6-4 photoligase se lie spécifiquement aux photoproduits (6-4) (Sinha and Hader 2002).

I.3.2.2 Suppression de la zone endommagée : réparation par excision de nucléotides

Une partie des mutations n'est pas photoréversible et est attribuée non seulement aux dimères qui échappent à l'action des photoligases mais aussi aux lésions autres que les dimères. Dans ce cas là, d'autres systèmes de réparation à l'obscurité (« dark repair ») entrent en jeu ; ces systèmes ne permettent pas de restaurer directement la lésion mais remplacent l'ADN endommagé.

Le mécanisme de réparation par excision de nucléotides intervient sur des dommages de l'ADN importants, provoquant des distorsions de la double hélice d'ADN comme les dimères. Le fragment endommagé est excisé par l'action d'endonucléases qui clivent le brin d'ADN autour de la lésion, puis une ADN polymérase synthétise la zone manquante (Figure 10) (Sinha and Hader 2002).

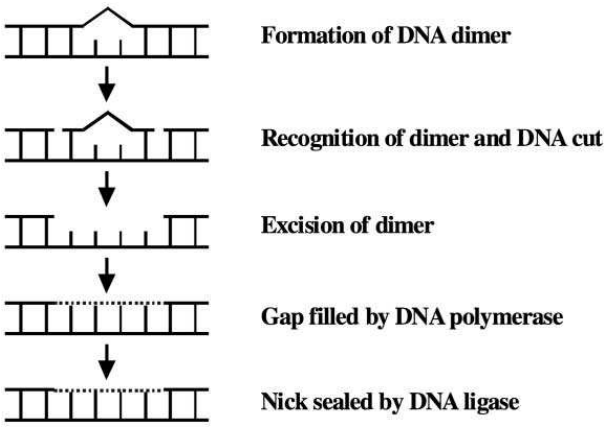


Figure 10. Représentation schématique du mécanisme de réparation par excision de nucléotides (Sinha and Hader 2002)

Ce système de réparation élimine les dommages mais produit également des modifications génétiques favorisant ainsi l'apparition de mutations pouvant conduire aux phénotypes recherchés (James and Nasim 1987).

Pour permettre l'efficacité d'un tel système, il est nécessaire de laisser un temps de « récupération » aux cellules avant leur mise en culture, temps nécessaire aux réparations. Le « liquid holding » est un traitement post irradiation à l'obscurité permettant d'atténuer l'effet des radiations en conservant les cellules à l'obscurité dans un milieu minimum non nutritif pendant une certaine durée (1 à plusieurs jours) nécessaire aux réparations, avant leur étalement sur milieu

solide (Patrick and Haynes 1964; Patrick *et al.* 1964). Le « liquid holding » est efficace après irradiation aux UV chez les cellules haploïdes et diploïdes (Patrick and Haynes 1964).

Les gènes *RAD* (*RAD*1 à *RAD*49), impliqués dans la réparation des lésions induites par les UV et donc dans la résistance aux radiations, entrent en jeu dans la détection de la lésion, dans son excision,… (Sinha and Hader 2002). Des mutants sensibles aux radiations car délétés de leur système de réparation, appelés mutants *rad*, ont été créés afin de comprendre les mécanismes d'action des radiations (formation de dimères, mutations,…) et les phénomènes de réparation qui en découlent et qui seraient présents chez la levure (Alao and Sunnerhagen 2008; Koltovaya *et al.* 2008).

I.3.2.3 Tolérance de la zone endommagée

Les lésions ne sont pas toutes réparées immédiatement. Les dimères de pyrimidine entrainent un blocage de la réplication, la polymérase peut s'arrêter et reprendre au-delà du dimère, laissant un fragment non répliqué.

Une réparation par recombinaison est possible, en effet, les UV (James and Lee-Whiting 1955; James and Nasim 1987) et plus précisément les dimères (Parry and Cox 1965) induisent des recombinaisons génétiques chez la levure. Un échange réciproque entre chromosomes homologues (crossing-over) va permettre de synthétiser le brin d'ADN complémentaire de celui où apparaît la lésion (Sinha and Hader 2002), les cellules filles ne sont alors plus identiques et certaines perdent le fragment muté lors de ces échanges (Tobias 1959; James and Nasim 1987). La réparation par recombinaison peut provoquer des aberrations non létales comme des inversions (retournement à 180° de la partie médiane du chromosome) et des translocations (échange de matériel chromosomique entre des chromosomes non homologues) (James and Nasim 1987).

I.3.3 Conséquences de mauvaises ou de non réparations des lésions induites par les UV

I.3.3.1 Impact sur la croissance cellulaire : retard et inactivation

Des effets morphologiques et physiologiques de l'irradiation aux UV ont été décrits : un grossissement des cellules, des malformations (James and Werner 1966), des changements enzymatiques, des modifications de la paroi cellulaire provoquant un retard dans la séparation des cellules mère et fille, … (James and Nasim 1987). Tous ces phénomènes sont liés à une altération de la croissance et à l'inactivation des cellules.

Les effets des UV dépendent de la dose d'irradiation reçue et une hétérogénéité de réponse de chaque cellule est observée au sein d'une même culture. La conséquence immédiate de l'irradiation des cellules est une perturbation de la division cellulaire, un retard de croissance puis le décès (Tobias 1959). Une lésion dominante conduit à une inhibition de la formation de colonies après une ou quelques divisions. Les lésions récessives entrainent le décès des cellules haploïdes alors que les cellules diploïdes, n'exprimant pas la mutation, seront capables de survivre (Tobias 1959). A faible dose, il est possible de distinguer trois phases pour l'effet des UV sur la division cellulaire : un retard de la première division post-irradiation, un retard dans l'initiation de la seconde génération puis une stimulation de la vitesse de croissance grâce à la photoréactivation (Goodin *et al.* 1971). Par contre, lorsque l'exposition aux UV est trop forte, le dommage est tellement important que la réparation est impossible et induit le décès cellulaire. Il se pourrait alors que le décès soit lié à la saturation des systèmes de réparation.

La photoréactivation a permis de montrer que les dimères sont la cause du retard de division et de l'inactivation. Une dose de radiations UV de 150 $J.m^{-2}$ produit entre $2{,}5.10^4$ et 5.10^4 dimères par cellules et 90% de ces dimères disparaissant lors de l'exposition à la lumière (photoréactivation) (Resnick and Setlow 1972). De plus, la présence d'un ou 2 dimères suffit à provoquer la mort de cellules haploïdes délétées pour 3 systèmes de réparation différents (James and Nasim 1987).

La sensibilité des cellules aux effets des agents mutagènes physiques varie selon les phases de croissance et dépend de leur capacité de réparer les dommages provoqués. Quelle que soit leur ploïdie, les levures sont plus résistantes aux radiations (rayons X et UV) pendant la phase exponentielle, lorsqu'elles prolifèrent et synthétisent des macromolécules radioprotectrices (Parry *et al.* 1976). C'est pendant la phase stationnaire que les levures sont les plus sensibles aux UV ce qui est étroitement lié au ralentissement de la croissance, de la synthèse de molécules protectrices et à la réduction de la fréquence de bourgeonnement. Par contre, des effets contraires s'observent avec des agents mutagènes chimiques ou lors de chocs de température (Parry *et al.* 1976). L'augmentation de la résistance aux UV pendant la phase exponentielle de croissance est conférée par un produit codé par le gène *RAD*50 (Parry *et al.* 1976).

D'autre part, la sensibilité des cellules aux UV varie également en fonction de leur position dans le cycle cellulaire, la résistance augmente peu à peu, atteignant un maximum à la fin de la phase S de synthèse d'ADN puis décline à nouveau. L'étude de la résistance aux rayons X sur des populations synchrones de levures a montré que la réparation était plus efficace en phase G2 qu'en phase G1 et donc que les paires de chromosomes étaient plus favorables à la réparation, il s'agirait d'un mécanisme de réparation pour lequel l'ADN dupliqué mais non séparé servirait de substrat aux enzymes de réparation (James and Nasim 1987). Ces résultats laissent supposer un mécanisme identique pour les UV. Terleth *et al.* (1990b) ont montré que la réparation des lésions chez des souches de *Saccharomyces cerevisiae* irradiées aux UV en phase G2 était plus efficace que celle des cellules irradiées dans les autres phases. Il a été mis en évidence que lors de la phase

G2 les dimères sont rendus accessibles à la réparation (Terleth *et al.* 1990a), du fait de la structure particulière de la chromatine en phase G2 ou par l'existence de mécanismes de réparation supplémentaires pendant cette phase (Terleth *et al.* 1990b).

I.3.3.2 Induction du décès cellulaire par apoptose et par nécrose

L'exposition aux UV est l'une des principales causes de dommages de l'ADN connue pour induire l'apoptose chez les mammifères (Strasser *et al.* 1994; Gottlieb *et al.* 1996). L'apoptose, ou mort programmée des cellules, est un mécanisme homéostatique essentiel permettant l'élimination des cellules inutiles ou sérieusement endommagées (lésions irréparables de l'ADN, problèmes de réplication pouvant entraîner des mutations) par un processus ordonné de « désintégration » cellulaire. Le phénomène d'apoptose intervient également chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* exposée à des stimuli exogènes dont l'exposition aux radiations UV (Del Carratore *et al.* 2002; Gourlay *et al.* 2006), elle est indiquée par une altération de la morphologie et du cycle cellulaire de la levure (Burhans *et al.* 2003; Gourlay *et al.* 2006). Un suivi par cytométrie en flux a permis d'identifier un arrêt du cycle cellulaire en phases G1 et G2/M et l'apparition d'un pic sub-G1 souvent associé aux cellules apoptotiques. Au niveau morphologique, l'apoptose se caractérise par la condensation de la chromatine, l'apparition de vésicules sur la face externe de la membrane plasmique, la dissolution du noyau, le grossissement des vacuoles cytoplasmiques et une autophagie complète du cytoplasme. Del Carratore *et al.* (2002) ont montré que le pourcentage de cellules cultivables diminue lorsque la dose d'UV augmente. Cependant pour de fortes doses UV (300 – 500 $J.m^{-2}$), un marquage des noyaux apoptotiques des cellules par la méthode TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labelling) met en évidence une diminution de ces noyaux. Ceci révèle qu'il y a moins d'apoptose mais plus de décès, donc une nécrose des cellules (Del Carratore *et al.* 2002). L'apoptose est induite chez les levures lors de l'exposition à des doses modérées de radiations UV alors que des doses importantes entraînent une mort cellulaire par nécrose (Del Carratore *et al.* 2002; Burhans *et al.* 2003).

I.3.3.3 Induction de mutations

Chez tous les organismes, la présence de mutations spontanées est observée. Elles sont dues pour la plupart à des erreurs lors de la réplication (Quah *et al.* 1980). Elles peuvent entraîner l'altération des phénotypes et sont généralement néfastes mais, en créant de la variabilité, elles contribuent également au processus d'évolution. Les radiations et en particulier les UV vont induire des mutations en augmentant artificiellement leur fréquence d'apparition. Entre 100 et 280 nm (UV-C) les radiations UV ont un effet mutagène à faible dose et germicide à dose plus élevée. Cette zone correspond aux longueurs d'onde d'absorption des rayons ultraviolets par les acides nucléiques. L'effet mutagène des radiations (Rayons X) a été montré pour la première fois

chez la drosophile par Muller en 1927 (James and Nasim 1987). En agissant sur l'ADN, les UV provoquent des mutations ponctuelles qui sont, pour la plupart, des substitutions de paires de bases (un nucléotide changé par un autre) ; les délétions ou additions étant moins fréquentes (Lawrence and Christensen 1979b; James and Nasim 1987). Parmi les mutations par substitution, se distinguent les transitions (substitution d'une base purique par une autre base purique ou d'une base pyrimidique par une autre) et les transversions (substitution d'une base purique par une base pyrimidique ou d'une pyrimidine par une purine). Sans être spécifiques de l'altération des paires de bases, les UV provoquent 6 fois plus de transitions que de transversions (Lawrence and Christensen 1979a).

Les mutations sont produites pendant la réparation post-réplication, elles résultent d'une mauvaise réparation des lésions de l'ADN. Des expérimentations sur une souche d'*Escherichia coli* délétée de ses systèmes de réparation ont montré une diminution de la résistance aux UV et de leur action mutagène, ce qui montre que les mutations sont créées par la réparation des lésions (Witkin 1969; Lemontt 1971). Chez *Saccharomyces cerevisiae*, des mutations au locus *RAD6* éliminent complètement la capacité des radiations UV à induire des mutations (Lawrence 1974). Les dimères pyrimidiques, lésions les plus nombreuses, sont responsables des mutations, la fréquence de mutants diminuant après élimination des dimères par exposition à la lumière visible (Hanawalt and Haynes 1965; Parry and Cox 1965; Resnick 1969; Botton 1991). Les lésions restantes, dues aux dimères non excisés ainsi qu'aux lésions autres que des dimères, entraînent des mutations très stables qui persisteront sur plusieurs générations (Tobias 1959; James *et al.* 1978). Chez *Escherichia coli*, un délai a été observé avant l'expression des mutations, ainsi 2 à 12 divisions peuvent être nécessaires suivant le type de mutation (Kelner *et al.* 1955).

Le taux de mutations, généralement exprimé par division cellulaire pour un individu, est un paramètre difficile à estimer au vu de la faible fréquence d'apparition des mutations. Le taux de mutations le plus significatif est celui du génome complet (Drake 1991) et s'exprime :

$$\boxed{\mu_g = \mu_{bp} \times G} \quad \textbf{\textit{Équation 1}}$$

μ_g	Taux de mutations par réplication du génome (par division cellulaire)
μ_{bp}	Taux de mutations par réplication d'une paire de base
G	Taille du génome en kb

Drake (1991) a évalué le taux de mutations par division pour plusieurs micro-organismes bactéries, levures, champignons filamenteux, bactériophages) et en a déduit que celui-ci est à peu près constant (variation d'un facteur 2,5) et égal à 0,0033 malgré une grande variabilité de taille du génome (facteur 10^3) et du taux de mutation par paire de base (facteur 10^4). Bien qu'un taux de mutations constant ait été déterminé par cet auteur, des disparités au niveau des valeurs de taux de mutations sont trouvées dans la littérature (Tableau 8).

Tableau 8. Tableau récapitulatif des taux de mutations spontanées et induites par les UV exprimés en nombre de mutations par division et par individu

Taux de mutations	Souche	Haploïdes (mut /div /cell)	Diploïdes (mut /div /cell)	Références
Mutations spontanées	*S. cerevisiae*	$1{,}4.10^{-4}$	$2{,}7.10^{-4}$	(Hall *et al.* 2008)
	S. cerevisiae	9.10^{-8}	1.10^{-4}	(Ohnishi *et al.* 2004)
	E. coli	*$1{,}4.10^{-8}$ h^{-1}.$cell^{-1}$*		(Kubitschek and Bendigkeit 1961)
	S. cerevisiae	6.10^{-8} à 2.10^{-7}	2.10^{-7} à 4.10^{-7}	(Magni and Von Borstel 1962)
	S. c., E. coli, N.crassa, Bactériphages	$2{,}4.10^{-3}$ à $3{,}8.10^{-3}$	-	(Drake 1991)
UV	*Schizo. pombe*	*$1{,}4.10^{-2}$ /population*	-	(Haefner 1967)
	S. cerevisiae	10^{-3}	5.10^{-4} à 2.10^{-3}	(Hashimoto *et al.* 2005)

Suivant la ploïdie, les mutations auront un impact plus ou moins important sur le phénotype de la cellule. Les mutations induites sont pour la plupart récessives à cause de la perte de fonctionnalité d'un gène. Les cellules haploïdes exprimeront la mutation que celle-ci soit dominante ou récessive, par contre, les levures diploïdes exprimeront seulement les lésions dominantes et auront un phénotype normal lors de lésions récessives. Le caractère récessif ne sera exprimé chez les cellules polyploïdes que si les mutations se font également sur tous les gènes complémentaires (Mortimer 1955; Tobias 1959; Russell 2003).

Le taux de mutations induites par les UV a été évalué à 10^{-3} pour un gène haploïde et devrait donc être de 10^{-6} pour deux gènes homozygotes chez des cellules diploïdes (pour lesquelles l'expression de mutations est théoriquement moins fréquente que chez les haploïdes) ; or ce n'est pas le cas chez *Saccharomyces cerevisiae* et la fréquence est plus élevée que prévu (5.10^{-4} à 2.10^{-3}) (Hashimoto *et al.* 2005). La même observation a été faite par Ohnishi *et al.* (2004) et Magni and Von Borstel (1962) avec un taux de mutations plus élevé chez les souches diploïdes que chez les haploïdes respectivement d'un facteur 100 et 2. L'hypothèse d'une perte d'hétérozygotie et donc de la production d'un allèle homozygote par crossover mitotique a été avancée, après mutagénèse aux UV (Hashimoto *et al.* 2005).

Pour les levures de ploïdie supérieure à 2n (triploïdes à hexaploïdes), la tendance générale est l'augmentation de la sensibilité avec l'augmentation de la ploïdie ; un plus grand nombre de chromosomes fournissant un plus grand nombre de sites altérables (Mortimer 1958). Ces observations faites pour l'exposition aux rayons X doivent se vérifier avec l'irradiation aux UV.

L'aneuploïdie, qui fait partie des mutations chromosomiques, est le résultat d'erreurs d'appariement de chromosomes pendant la mitose ou la méiose. La fréquence d'apparition de

cellules aneuploïdes est augmentée par les UV (Parry *et al.* 1979). Un traitement post-irradiation à la lumière visible a montré une diminution de la fréquence d'aneuploïdes prouvant ainsi que ce sont les dimères de pyrimidines qui sont impliqués dans ces mutations chromosomiques. Les levures aneuploïdes sont plus sensibles aux radiations UV pendant la phase exponentielle que les cellules en phase stationnaire alors que l'inverse est observé chez les cellules possédant 2n chromosomes (James and Nasim 1987).

I.3.4 Récapitulatif de l'effet de radiations UV chez la levure

En résumé, l'exposition aux rayonnements UV entraîne chez la levure la formation de nombreuses lésions dont les plus fréquentes sont les dimères de pyrimidine (CPD et photoproduits (6-4)). La conséquence de la formation de ces lésions au niveau de l'ADN est l'induction de différents systèmes de réparation nécessitant l'action ou non de la lumière et des enzymes spécifiques. Ces réparations peuvent être efficaces et rétablir le génotype natif de la levure mais peuvent également induire des modifications du génotype et donc des mutations responsables ou non de modification du phénotype. Enfin, lorsque la dose d'UV reçue est trop importante ou lorsque les mutations induites conduisent à des génotypes non-viables, un décès des cellules est observé (Figure 11).

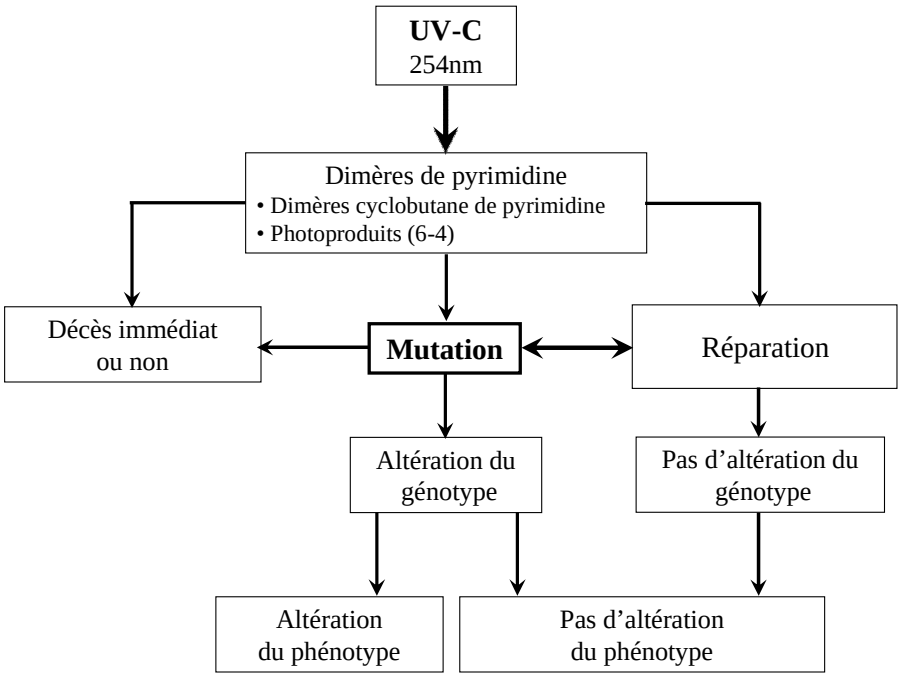


Figure 11. Schéma récapitulatif de l'effet des UV sur les levures

I.4 Synthèse et analyse critique des données de la bibliographie

Saccharomyces cerevisiae est un organisme modèle en biologie, son métabolisme est connu et de nombreux outils ont été développés (Goffeau *et al.* 1996). La fermentation alcoolique par cette levure est maîtrisée et les performances (titre, rendement, productivité) de production industrielle intensive d'éthanol sont les plus élevées (Ogier *et al.* 1999; Alfenore *et al.* 2002). Cependant, les performances des procédés industriels sont affectées par de nombreux stress. La production d'éthanol conduite en mode discontinu est réalisée à une concentration initiale en glucose élevée et les levures font face à une concentration élevée en éthanol en fin de fermentation. Un stress osmotique, un stress éthanol ainsi que des stress environnementaux causés par les fluctuations des paramètres physico-chimiques (température, pH, …) sont donc rencontrés. Tous ces stress conduisent à une diminution de la viabilité et des cinétiques de croissance et de production d'éthanol, affectant par suite les rendements et la productivité. Améliorer la tolérance aux différents stress est nécessaire à l'intensification des performances de la fermentation alcoolique.

Améliorer la tolérance est possible par l'amélioration des souches utilisées. L'amélioration de souches peut être réalisée grâce à des approches aléatoires ou « rationnelles ». Les approches aléatoires ont l'avantage de créer des souches non considérées comme des organismes génétiquement modifiés (OGM) qui pourront être utilisées sans contraintes dans les procédés industriels. Des méthodes classiques d'adaptation naturelle (Balakumar *et al.* 2001), ou par mutagénèse aux UV (Sridhar *et al.* 2002) ou par agents chimiques (Cakar *et al.* 2005; Stanley *et al.* 2010) suivies d'une pression de sélection sont efficaces pour obtenir des souches tolérantes mais ont l'inconvénient de nécessiter de nombreux cycles successifs de mutation et de sélection. De nouveaux outils, comme le genome shuffling par fusion des protoplastes (Shi *et al.* 2009) ou par méiose et conjugaison (Hou 2010) et l'ingénierie métabolique de la transcription (gTME) (Alper *et al.* 2006), donnent également des souches possédant des phénotypes de tolérance améliorée et de bonnes performances.

Néanmoins, quelle que soit la technique utilisée, pour tester la tolérance à des stress et améliorer la thermotolérance, assez peu d'auteurs ont utilisé le réacteur comme outil d'obtention et de contrôle des conditions intensives de production d'éthanol où les levures sont confrontées à d'importantes concentrations en substrat et en éthanol (Alfenore *et al.* 2002; Aldiguier *et al.* 2004; Marullo *et al.* 2009). Seuls les travaux utilisant le mode continu pour l'adaptation de souches sont souvent réalisés en réacteur, par contre la caractérisation des souches obtenues n'est pas réalisée dans des conditions réalistes de production intensive d'éthanol (Stanley *et al.* 2010). La plupart des études sont réalisées en milieux non contrôlés, où des variations des paramètres physico-chimiques (pH, oxygène dissous, évaporation de liquide,…) peuvent être induites et impacter les effets observés.

D'autre part, les méthodes de sélection sont réalisées soit en mode continu (Brown and Oliver 1982; Stanley *et al.* 2010) soit en mode discontinu (Sridhar *et al.* 2002). Wright *et al.*, en réalisant des adaptations de souches pour l'amélioration de la tolérance à la fois en cultures continue et discontinue, ont montré que l'adaptation en culture continue est plus rapide et moins contraignante que la réalisation de cultures discontinues successives (Wright *et al.* 2011). De plus, dans les travaux de Wright *et al*. (2010), l'adaptation en chémostat permet une meilleure conservation de la tolérance.

Par ailleurs, de nombreux auteurs appliquent les conditions de stress en milieux non nutritifs (0,9% NaCl) (Sharma 1997; Cakar *et al.* 2005), or les levures sont plus sensibles aux chocs température lorsqu'elles se divisent, pendant la phase exponentielle, que pendant la phase stationnaire (Parry *et al.* 1976; Steels *et al.* 1994). L'étude des stress est donc biaisée par le fait que les cellules soient non proliférantes.

En ce qui concerne la thermotolérance, seulement peu d'études rapportent la sélection de souches de *Saccharomyces cerevisiae* capables de croître et produire de l'éthanol à 40°C et au delà (Balakumar *et al.* 2001; Sridhar *et al.* 2002; Shi *et al.* 2009). Aucune n'est réalisée dans des conditions proches du process, en conditions de fermentation alcoolique intensive et la caractérisation phénotypique est rarement effectuée dans des conditions controlées.

La caractérisation phénotypique des souches est rarement faite dans des conditions réalistes de production intensive d'éthanol. La caractérisation complète des performances des souches obtenues doit se faire en termes de titre final, de productivité et de rendement éthanol, qui sont les critères d'intérêts industriels, chacun des paramètres pris indépendamment n'étant pas suffisants. Le gain par rapport à la souche sauvage doit être évalué sur ces trois critères de performance. De nombreuses études ne donnent pas d'information sur ces critères, les performances évaluées sont le plus souvent la viabilité et le titre en éthanol, il est parfois possible de calculer les paramètres manquants à partir des données mais les renseignements sur la durée de la fermentation ou le substrat résiduel n'apparaissent pas dans tous les articles.

D'autre part, lorsque des méthodes semblent performantes et que le titre final, la productivité et le rendement sont déterminés, il manque des fermentations de caractérisation. Grâce à l'ingénierie de la transcription (gTME) des mutants tolérants à l'éthanol sont obtenus, leur viabilité en présence de différentes concentrations en éthanol (10% à 20%) est déterminée en présence de 20 $g.L^{-1}$ de glucose ce qui n'est pas représentatif des conditions industrielles. Les performances fermentaires de ces souches (titre, productivité, rendement) sont également caractérisées par rapport à celle de la souche sauvage mais sur un milieu ne contenant pas d'éthanol et la concentration critique en éthanol qui atteste d'une meilleure tolérance à l'éthanol n'est pas déterminée (Alper *et al.* 2006). Hou a généré par génome shuffling des souches à la fois osmotolérantes et tolérantes à l'éthanol, caractérisées en termes de viabilité sur milieu solide contenant des concentrations élevées en glucose ou en éthanol. Par contre, les paramètres, de la

souche tolérante et de la souche sauvage, ne sont évalués sur milieu liquide qu'en condition de stress osmotique (300 $g.L^{-1}$ de glucose), le stress éthanol n'étant pas étudié (Hou 2010).

De plus, lorsque des souches tolérantes sont obtenues, il est nécessaire de tester leur stabilité, l'intérêt étant de conserver le phénotype amélioré obtenu. Après congélation à -80°C de souches tolérantes à l'acide acétique (5 et 6 $g.L^{-1}$) obtenues par adaptation en réacteur continu et par batch successifs, Wright *et al.* ont montré qu'après une semaine de culture sur milieu contenant 20 $g.L^{-1}$ de xylose et 5 $g.L^{-1}$ d'acide acétique, les souches ne présentent aucune croissance ni consommation du xylose (Wright *et al.* 2011). Après stockage, la tolérance est complètement perdue. Les souches ont été cultivées en chémostat avec une concentration en acide acétique croissante (0 à 7 $g.L^{-1}$ pendant 8 jours) pour déterminer si le phénotype est inductible par l'acide acétique. Les souches issues des batch successifs ne présentent pas de phénotype stable de tolérance alors que l'adaptation en chémostat a conduit à une tolérance inductible par l'acide acétique. Ce phénotype de tolérance nécessite une induction par l'acide acétique et n'est donc pas exprimé quand les cellules sont transférées d'un milieu sans acide acétique à un milieu contenant une concentration importante. Shi *et al.* ont montré que leurs souches sont génétiquement stables puisqu'elles conservent leur thermotolérance et leur tolérance à l'éthanol à chaque génération pendant 50 générations successives. Par contre, ces souches ne semblent pas avoir été conservées à -80°C, un stress congélation qui pourrait contribuer à la perte du phénotype de tolérance. Très peu d'auteurs déterminent la stabilité des souches obtenues (Shi *et al.* 2009; Wright *et al.* 2011), le phénotype de tolérance obtenu ne sera dans certains cas pas conservé. Pour toutes les autres souches tolérantes obtenues par les différentes techniques, les tests de stabilité n'ont pas été réalisés.

Les radiations UV ont un impact sur les cellules, leur utilisation comme agent mutagène (Sridhar *et al.* 2002) permet de générer une diversité phénotypique. Par contre, une trop forte dose entraine des lésions non réparables de l'ADN qui conduisent pour la plupart au décès des cellules. L'avantage de travailler avec des cellules diploïdes est que les mutations létales générées peuvent être compensées par d'autres mutations, alors que dans les cellules haploïdes, elles entrainent le décès (Hou 2010). Ainsi, même si la plupart des mutations sont récessives et ne seront pas exprimées chez les cellules diploïdes (Mortimer 1955; Tobias 1959), les mutations intéressantes obtenues seront mieux maintenues que chez les cellules haploïdes.

Plusieurs auteurs ont montré une augmentation de la production de glycérol avec une élévation de la température, suggérant un rôle thermoprotecteur de ce composé. Cependant, de nombreuses études sont réalisées dans une gamme de température entre 5 et 30°C (Remize *et al.*

2000; Balli *et al.* 2003; Berovic *et al.* 2007), 30°C étant la température optimale de croissance de *Saccharomyces cerevisiae*. Dans cette gamme, la température affecte le taux de croissance et comme la production de glycérol est couplée à la croissance jusqu'à 36°C (Aldiguier *et al.* 2004), il est normal de voir une augmentation du glycérol avec la température. La production plus importante de glycérol découle de vitesses de fermentations plus rapides à 30°C qu'à des températures inférieures.

Pour étudier un réel impact de la température sur la production de glycérol et confirmer un rôle thermoprotecteur de ce composé, la température doit être supérieure à la température optimale de croissance, afin d'induire un stress et créer une nécessité de protection. Dans ces conditions de stress thermique une réelle augmentation de la concentration en glycérol a été observée (Omori *et al.* 1996; Carvalheiro *et al.* 1999; Aldiguier *et al.* 2004).

Toutes ces études ne font que constater un effet de la température sur la production de glycérol, néanmoins aucun modèle rapportant ce phénomène n'a été développé. Les modèles existants décrivant l'effet de la température en fermentation alcoolique ne décrivent que les cinétiques de croissance et production d'éthanol (Chapitre III) (Costa *et al.* 2001; Phisalaphong *et al.* 2006).

En conclusion, pour améliorer la tolérance des souches aux fluctuations environnementales (température), le moyen le plus efficace semble être une adaptation en réacteur contrôlé, en mode continu et en conditions de production intensive d'éthanol. Une mutagénèse par irradiation aux UV permettra d'accélérer l'apparition d'un mutant d'intérêt. Pour la caractérisation du phénotype des souches obtenues il semble préférable de réaliser des cultures en mode discontinu alimenté en conditions réalistes de production d'éthanol et en présence d'une pression de sélection pour mettre en évidence les performances fermentaires (titre final, productivité, rendement) des souches adaptées par rapport à celles de la souche sauvage.

Chapitre II :

Matériel et Méthodes

Chapitre II : Matériel & Méthodes

II.1 Souches et milieux de fermentation

II.1.1 Souches utilisées

La souche de levure utilisée est une souche industrielle diploïde de *Saccharomyces cerevisiae*, fournie par la société Lesaffre et sélectionnée pour sa tolérance à des concentrations élevées en éthanol et à la température. Cette souche sera nommée « souche sauvage » dans le manuscrit.

II.1.2 Composition des milieux

II.1.2.1 Milieu de remise en culture, de stockage et de conservation des souches

Milieu de remise en culture (YEPD)

Le milieu YEPD (Yeast Extract Peptone Dextrose) est un milieu riche permettant la remise en culture des levures isolées sur boites de pétri.

Ce milieu est stérilisé par autoclavage pendant 20 minutes à 121°C.

Composition pour 1 litre	
Bactopeptone	10 g
Glucose	20 g
Nacl	9 g
Extrait de levure	10 g
Eau déminéralisée	qsp 1L

Milieu de stockage

Les souches sont stockées à -80°C dans un milieu contenant 70% (v/v) de milieu YEPD et 30% (v/v) de glycérol pur.

Milieu solide d'isolement et de conservation

Avant leur remise en culture, les souches sont repiquées sur boite de pétri contenant du milieu YEPD solide (15 $g.L^{-1}$ d'agar-agar). Les boites de pétri sont conservées à 4°C.

Milieu de conservation de populations microbiennes issues du réacteur

Ce milieu permet la conservation de populations de cellules. Le prélèvement est centrifugé et le culot est suspendu dans ce milieu avant d'être conservé à -80°C.

Ce milieu est stérilisé par autoclavage pendant 20 minutes à 121°C.

Composition pour 1 litre	
Glycérol	200 g
Saccharose	12 g
Extrait de levure	10 g
Eau déminéralisée	qsp 1L

II.1.2.2 Milieu de fermentation

Le milieu de fermentation est identique pour toutes les cultures. Ce milieu minéral complet est obtenu en ajoutant au milieu salin des oligo-éléments, des vitamines et du glucose.

Milieu salin

Le milieu salin est composé de sels principaux et d'un complément azoté (glutamate de sodium). Le pH est ajusté à 4 avec de l'acide orthophosphorique et le milieu est stérilisé par autoclavage pendant 20 minutes à 121°C.

Composition pour 1 litre	
- KH_2PO_4 :	3,0 g
- $(NH_4)_2SO_4$:	3,0 g
- $MgSO_4$, 7 H_2O :	0,5 g
- Na_2HPO_4, 12H_2O :	3,0 g
- Glutamate de sodium :	1,0 g
Eau du réseau	qsp 1L

Solution d'oligo-éléments

Les oligo-éléments sont préparés sous forme d'une solution concentrée 500 fois, le volume à ajouter est donc de 2 mL par litre de milieu salin. La solution est stérilisée sur membrane Minisart 0,2 µm (Sartorius®) et conservée à 4°C et à l'abri de la lumière.

Composition pour 100 mL de solution concentrée	
- EDTA-Na_2 :	1,5 g
- $ZnSO_4$, $7H_2O$:	0,45 g
- $MnCl_2$, H_2O :	0,38 g
- $CoCl_2$, $6H_2O$:	0,25 g
- $CuSO_4$, $5H_2O$:	0,3 g
- Na_2MoSO_4,$2H_2O$:	0,06 g
- $CaCl_2$, $2H_2O$:	2,3 g
- $(NH_4)_2Fe(SO_4)_6$, $6H_2O$:	2,3 g
- H_3BO_3 :	0,3 g
Eau déminéralisée	qsp 100 mL

Solution de vitamines

Les vitamines sont préparées sous forme d'une solution concentrée 400 fois, le volume à ajouter est donc de 2,5 mL par litre de milieu salin. Le pH est ajusté à 6,5 entre chaque vitamine avec de la soude (NaOH). Les solutions de vitamines sont stérilisées sur membrane Minisart 0,2 µm (Sartorius®) et conservées à 4°C.

Composition pour 100 mL de solution concentrée	
- Acide pantothénique :	0,24 g (x400)
- Thiamine :	0,2 g (x400)
- Acide nicotinique :	0,2 g (x400)
- Pyridoxine :	0,2 g (x400)
- Mésoinositol :	5,0 g (x400)
- Acide p-aminobenzoïque :	0,04 g (x400)
Eau déminéralisée	qsp 100 mL

La biotine est préparée séparément, de la même façon mais est concentrée 10 000 fois (un volume de 0,1 mL par litre de milieu salin doit être ajouté).

Composition pour 100 mL de solution concentrée	
- Biotine :	12 mg (x10 000)
Eau déminéralisée	qsp 100 mL

Solution de glucose

Afin de réaliser des apports en sucre de faibles volumes, le glucose est préparé sous forme de solution concentrée à partir de cérélose (glucose monohydraté) à une concentration de 700 $g.L^{-1}$ (limite de solubilité du glucose dans l'eau à 25°C : 910 $g.L^{-1}$). La solution est stérilisée par autoclavage pendant 20 minutes à 121°C. La concentration exacte de la solution de glucose est déterminée par mesure de la masse volumique en fioles jaugées de 10 mL, mesure de la densité relative et corrélation avec la concentration (en $g.L^{-1}$) (Handbook_of_Chemistry_and_Physics 1983 -1984)

II.1.3 Préparation de l'inoculum

A partir de colonies sur milieu solide, la souche est ensemencée dans un tube contenant 3 mL de milieu riche YEPD et mis à incuber à 30°C, sous agitation pendant 10 heures. Cette pré-culture est ensemencée dans 27 mL de milieu minéral complet, placée à 30°C, sous agitation pendant 10 heures. La dernière phase de propagation (levain) est effectuée en introduisant les 30 mL de pré-culture dans un flacon d'erlenmeyer bafflé, contenant 270 mL de milieu minéral complet, placé à 30°C sous agitation (100rpm) pendant 10 heures.

Passé ce temps, le réacteur contenant 2,7 L de milieu minéral complet (sels, glucose, oligo-éléments et vitamines) est ensemencé avec les 300 mL de levain (le taux d'ensemencement choisi est de 10 % (v/v) Absorbance initiale à 620nm = 0,3 UDO soit 0,3 $g_{MS}.L^{-1}$). Chaque étape de la propagation se fait avec un ensemencement à 10% (v/v), ce taux d'ensemencement sera conservé pour des cultures de plus faible volume.

Pour les cultures réalisées à 37°C, les phases de préculture seront également faites à 37°C (pendant 6,5 heures, temps nécessaire pour atteindre 3 $g_{MS}.L^{-1}$).

II.2 Mise en œuvre des bioréacteurs

II.2.1 Culture de *Saccharomyces cerevisiae* en mode discontinu alimenté

Les cultures sont réalisées en mode discontinu alimenté aérobie dans des fermenteurs de 1, 2 ou 3 litres de volume utile. Les réacteurs utilisés sont des réacteurs Sartorius® Stedim Biostat B DCU et B. Braun Biotech International® pilotés par le logiciel BioPAT® MFCS/DA. Les réacteurs sont régulés en température entre 30°C et 39°C en fonction des expérimentations. Le pH des cultures est régulé à 4 par ajout d'ammoniaque (à 14% (v/v) pour les cultures de 2 et 3 litres et à 7% (v/v) pour les cultures de 1 litre). L'agitation et le débit d'air sont tels que la quantité d'oxygène disponible ne soit pas limitante dans le milieu. Les réacteurs sont également équipés de condenseurs en sortie et les gaz de sortie sont analysés par spectrométrie de masse (Ametek – Proline Dycor) ou par mesure acoustique (Innova).

Différentes cultures de *Saccharomyces cerevisiae* ont été faites en mode discontinu alimenté. Des fermentations sont réalisées pour déterminer l'impact des UV. Dans ce cas là, la culture de référence (*i.e.* sans exposition aux UV) et celle avec exposition aux UV sont régulées à 37°C. Pour l'analyse de l'influence de chocs de température, des fermentations sont réalisées à des températures régulées entre 30°C et 34°C pendant la phase de croissance, puis un choc thermique est réalisé dans une gamme de 39°C à 47°C. Des échantillons sont prélevés toutes les heures pendant la phase de croissance puis toutes les 30 minutes après le choc thermique afin de suivre les dynamiques de croissance et de production. Les concentrations en biomasse (DO_{620nm}, masse sèche), la viabilité cellulaire (bleu de méthylène, numération sur boite de pétri, sonde capacitive) et les concentrations en substrat et produits de la fermentation (glucose, éthanol, glycérol et acides organiques) sont déterminées.

Le substrat et les vitamines sont apportés de façon séquencée conformément à Alfenore *et al*. (2002).

II.2.2 Etude de *Saccharomyces cerevisiae* en culture continue

II.2.2.1 Dispositif expérimental : pilote d'obtention de variants

Un pilote a été imaginé pour adapter la souche sauvage et la rendre plus robuste aux fluctuations de température rencontrées en réacteurs industriels. Ce pilote d'obtention de variants fonctionne en continu et couple mutagénèse aux UV et pression de sélection (température).

Les cultures en mode continu ont été réalisées dans le fermenteur contenant 1 litre de milieu liquide. Une boucle de recirculation constituée d'une cellule en quartz permet d'exposer les

cellules aux UV via une source deutérium dont la longueur d'onde est fixée par un filtre à 250 nm ± 4nm, (éclairement = 7 mW/cm^2 à 254 nm). Cette cellule est placée dans une enceinte hermétique pour éviter l'émission des UV vers l'extérieur et protéger l'utilisateur. Le volume de la cellule en quartz est de 3,2 mL et le débit de recirculation dans la boucle est de 130 mL.h^{-1}. Le temps d'exposition aux UV, temps de séjour dans la cuve en quartz est de 1,5 minute et 7,7 heures sont nécessaires à l'exposition aux UV de l'ensemble des cellules contenues dans le réacteur.

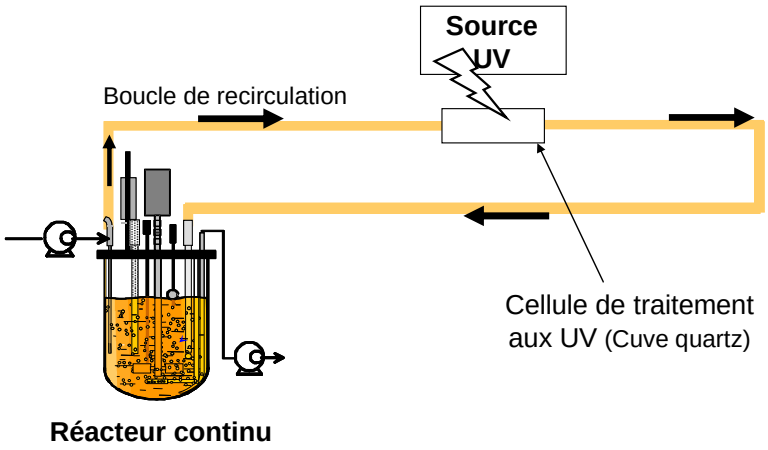


Figure 12. Schéma de l'installation utilisée - Chémostat

II.2.2.2 Conditions et stratégie de culture

La phase batch à 37°C est réalisée comme décrit précédemment. La culture en chémostat est initiée dès que la concentration en éthanol dans le réacteur atteint 50 g.L^{-1}, concentration considérée comme acceptable industriellement sur la base de compromis entre rendement et coût énergétique en post-traitement. Une alimentation continue en milieu salin (pH 4) additionné de vitamines, oligo-éléments et glucose (150 g.L^{-1}) se fait à un taux de dilution contrôlé de D = 0,16 h^{-1} (temps de séjour de 6,25 heures).

La régulation du volume se fait par régulation de niveau ; une canule affleure la surface du liquide et permet le soutirage continu de suspension microbienne dès que le volume dans le réacteur atteint le volume désiré.

Au cours de ces dynamiques, les concentrations en biomasse, glucose, glycérol, acide acétique, éthanol, ainsi que la composition des gaz en entrée et en sortie sont analysées.

Une fois que le régime permanent est stabilisé et caractérisé (6 temps de séjour soit 37,5 heures), la perturbation est appliquée à savoir :

- une rampe de température de 0,03°C/h à partir de 37°C
- des chocs thermiques à 45°C toutes les 12 heures
- une exposition continue aux UV (254 nm) d'une partie de la population microbienne selon le temps de séjour choisi.

II.3 Méthodes analytiques

II.3.1 Caractérisation de la biomasse

II.3.1.1 Dosage de la biomasse totale

Détermination de la densité optique (DO) à 620 nm

L'évolution de la densité cellulaire est mesurée par spectrophotométrie avec une mesure de l'absorbance à 620 nm dans une cuve en verre de 2 mm de trajet optique (spectrophotomètre Libra S4 Biochrom). L'eau est prise comme zéro.

Détermination de la matière sèche totale

La biomasse sèche, exprimée en grammes de matière sèche par litre de milieu de culture, est mesurée par une méthode gravimétrique. Un volume connu de culture est filtré sous vide sur une membrane polyamide de porosité 0,45 µm (Sartorius®) préalablement séchée et pesée. Une fois la suspension cellulaire filtrée, la membrane est rincée à l'eau, séchée à l'étuve à 60°C sous vide (200 mm de Hg) pendant 48 heures, puis pesée. La masse sèche cellulaire en $g.L^{-1}$ est déterminée par différence de masse du filtre avant et après filtration de la suspension. Lorsque le volume de culture est faible il n'est pas possible de prélever de gros volumes pour réaliser une mesure de biomasse sèche sur membrane, 1 mL de suspension est centrifugée (eppendorf pré-pesé sec), le culot est lavé 2 fois à l'eau physiologique pour éliminer le glucose interstitiel sans induire de choc osmotique, le bouchon de l'eppendorf est ensuite percé de 3 trous et le séchage se fait à l'étuve à 60°C sous vide (200 mm de Hg) pendant 72 heures. La mesure de la biomasse sèche est réalisée en triplica.

II.3.1.2 Dénombrement des populations cellulaires et évaluation de la viabilité

Comptage sur cellule de THOMA

Le comptage permet de déterminer le nombre de cellules totales par unité de volume de milieu de culture. La relation suivante permet d'avoir accès à la concentration en cellules totales exprimée en nombre de cellules par mL :

$$\text{Nombre cellules totales/mL} = \frac{\text{nombre de cellules totales}}{\text{nombre de carreaux}} \times \text{dilution} \times 2 \times 2{,}5.10^{5} \quad \textbf{\textit{Équation 2}}$$

La cellule de THOMA est constituée de 16 grands carreaux, chacun divisé en 16 petits carreaux.

Le nombre de cellules compté doit être compris entre 150 et 300 et le nombre minimal de carreaux est 5 pour que l'erreur sur le comptage soit inférieure à 10% (Postgate 1969). Les bourgeons comptent comme une cellule à part entière si leur taille est supérieure ou égale à la moitié de la taille de la cellule mère.

Une coloration de la suspension microbienne au bleu de méthylène permet une estimation de la viabilité et un dénombrement des cellules viables et mortes.

La solution colorante est préparée en diluant 10 mg de bleu de méthylène et 2 g de trisodium citrate dihydraté dans un volume final de 100 mL avant de la filtrer sur membrane Minisart 0,2 µm (Sartorius®). La technique consiste à mélanger 1 volume de solution de bleu de méthylène avec 1 volume de suspension cellulaire diluée. Après homogénéisation et 5 minutes d'incubation à température ambiante, les cellules viables et mortes sont comptées au microscope sur la cellule de THOMA (Microscope Olympus BH-2, objectif x40).

Le bleu de méthylène est une molécule organique, qui peut exister sous deux formes : sa forme oxydée est bleue alors que sa forme réduite est incolore. Sous l'action des oxydoréductases des cellules encore actives cette molécule va réagir et les cellules viables apparaitront blanches alors que les cellules mortes resteront colorées en bleu (Postgate 1967).

Le pourcentage de viabilité est calculé en faisant le rapport entre le nombre de cellules viables et le nombre total de cellules.

$$\text{Viabilité}(\%) = \frac{\text{nombre de cellules viables}}{\text{nombre de cellules totales}} \quad \textit{Équation 3}$$

La concentration en cellules viables et mortes par millilitre de milieu est obtenue par la relation suivante.

$$\text{Nombre cellules viables/mL} = \frac{\text{nombre de cellules blanches}}{\text{nombre de carreaux}} \times \text{dilution} \times 2 \times 2{,}5.10^{5} \quad \textit{Équation 4}$$

L'incertitude sur le comptage au bleu de méthylène a été évaluée. Quinze comptages indépendants d'un même échantillon ont été réalisés et ont montré une erreur de plus ou moins 10% par rapport au nombre de cellules moyen, pour les cellules totales, viables et mortes. Les barres d'erreur représentant ces incertitudes de comptage seront reportées sur les évolutions des populations viables, mortes et totales.

Numération sur géloses : cultivabilité

Cette méthode permet un dénombrement de la biomasse viable cultivable, c'est-à-dire capable de se reproduire et donc pouvant former une colonie. Pour avoir un nombre significatif de colonies et que celles-ci soient bien isolées le nombre de colonies par boite doit être compris entre 30 et 300. Pour cela des dilutions décimales successives de l'échantillon sont faites dans de l'eau physiologique (NaCl : 9 $g.L^{-1}$) jusqu'à la dilution désirée pour l'étalement.

Le milieu gélosé utilisé est un milieu PCA (Plate Count Agar (AES Chemunex)) contenant une faible concentration en glucose ce qui permet une croissance plus lente et donc un meilleur isolement des colonies.

Composition du milieu PCA	
- Tryptone	5 $g.L^{-1}$,
- Extrait autolytique de levure	2,5 $g.L^{-1}$,
- Glucose	1 $g.L^{-1}$,
- Agar	15 $g.L^{-1}$

Les boites sont ensemencées par un ensemenceur spiralé WASP (AES Chemunex). 50 µL de deux dilutions sont déposés en triplicata, les boites sont ensuite incubées 48h à 30°C et le nombre d'unités formant une colonie (UFC) est déterminé par comptage à l'aide du logiciel Easycount 2 (AES Chemunex)

Mesure en ligne de la capacitance

L'évolution des cellules viables est estimée en-ligne à partir de la mesure des propriétés diélectriques des cellules par spectroscopie d'impédance.

Le Biomass system (Fogale Nanotech) mesure la conductivité du milieu de culture en mS/cm, c'est-à-dire la quantité d'ions présents associée à leur mobilité et la capacitance de la suspension de cellules en pF/cm qui est la caractéristique de l'aptitude d'un condensateur à emmagasiner de l'énergie électrique. Sous l'influence d'un champ électrique alternatif entre deux électrodes, les charges contenues dans le milieu et le cytoplasme des cellules se déplacent vers l'électrode de signe opposé tant qu'elles ne rencontrent pas d'obstacle (membrane plasmique intacte). Les cellules sont chargées dans un sens, déchargées puis chargées dans l'autre sens, l'état d'équilibre n'étant jamais atteint. La fréquence du champ électrique va conditionner l'importance de la polarisation des cellules et donc de la capacitance mesurée. Aux basses fréquences, le temps est nécessaire pour que la quasi-totalité des charges rallie la membrane avant l'inversion du champ électrique, la polarisation des cellules est maximale, la capacitance mesurée correspond à

celle du milieu et de la biomasse (C_{milieu} + $C_{biomasse}$). Alors qu'aux hautes fréquences, une faible partie des charges atteint la membrane avant l'inversion du champ électrique, la polarisation est minimale et la capacitance mesurée correspond à celle du milieu (C_{milieu}).

Les capacitances sont mesurées pour des fréquences entre 0,3 et 10 MHz. La capacitance attribuable aux microorganismes est obtenue par différence entre les capacitances mesurées à ces deux fréquences (ΔC) (Figure 13). Toutes les 6 minutes, 30 mesures, espacées de manière logarithmique dans l'intervalle de fréquence de 0,3 à 10 MHz, sont intégrées pour donner une valeur de capacitance. De plus, le signal mesuré est corrigé en fonction de la température du milieu. Le fait de travailler sur une différence de capacitance (ΔC) permet de s'affranchir d'une évolution de la capacitance du milieu au cours du temps.

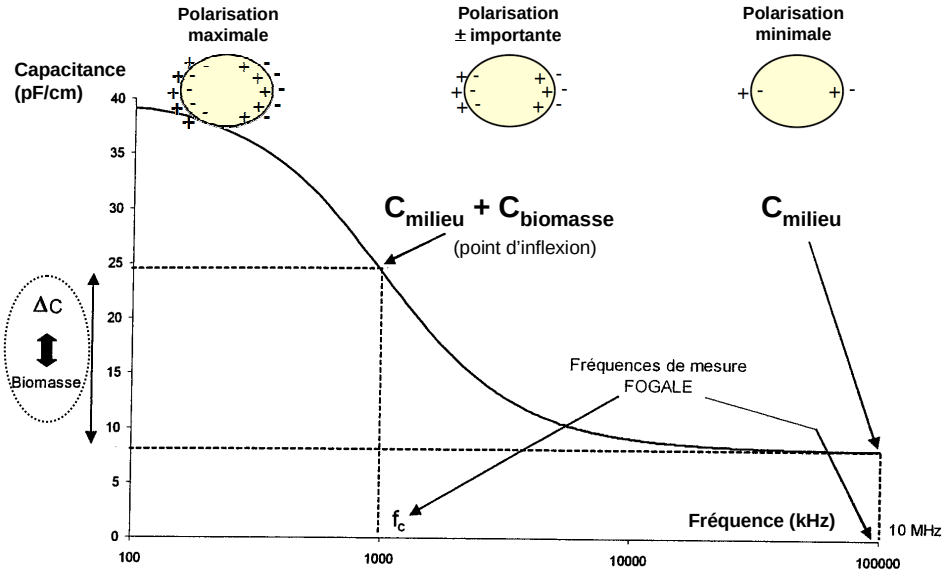


Figure 13. Mesure de la biomasse – Capacitance en fonction de la fréquence (Fogale)

II.3.1.3 Etude physiologique de la biomasse : corrélation sonde capacitive et autres mesures

Ce paragraphe s'attache à déterminer la sous-population cellulaire mesurée par la sonde de capacitance qui a été utilisée lors des différentes cultures réalisées (mode discontinu alimenté et continu, en isotherme et en présence de chocs thermiques).

La spectrométrie d'impédance est un outil permettant une mesure en ligne de la capacitance, cette mesure dépend du potentiel diélectrique des cellules, les cellules mortes n'étant pas chargées du fait de la perte de l'intégrité membranaire, la population théoriquement quantifiée est la biomasse viable.

Nous avons vérifié à quelle population cellulaire correspond la mesure de la sonde sur différentes cultures. Pour cela, différents modes de conduite ont été utilisés avec différentes températures et variation ou non des profils de température appliqués.

Le signal de capacitance obtenu en culture isotherme à 37°C en mode discontinu alimenté a été comparé à la biomasse totale issue de la mesure de la masse sèche et du dénombrement au microscope (Figure 14), aux cellules viables comptées après coloration au bleu de méthylène (Figure 15) et aux cellules cultivables dénombrées sur milieu solide (Figure 16).

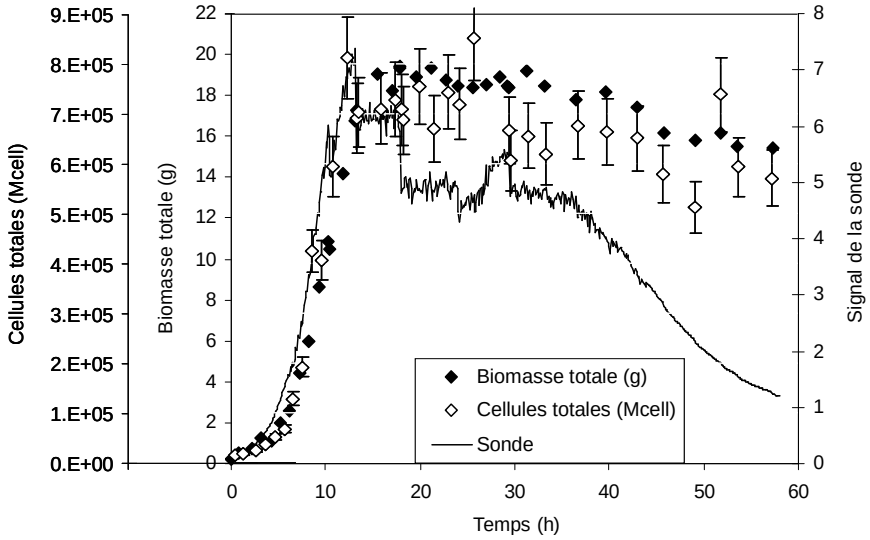


Figure 14. Superposition du signal de la sonde capacitive, de la biomasse totale (en grammes) et des cellules totales (en Mcell) en fonction du temps pour une culture en mode discontinu alimenté de la souche sauvage à 37°C

Le signal mesuré par la sonde diminue en fin de culture pour atteindre une valeur proche de zéro. Cette chute n'est pas retranscrite par les profils de biomasse totale (masse sèche et cellules totales) où seule une faible diminution, attribuable à de la lyse cellulaire, est observée (Figure 14).

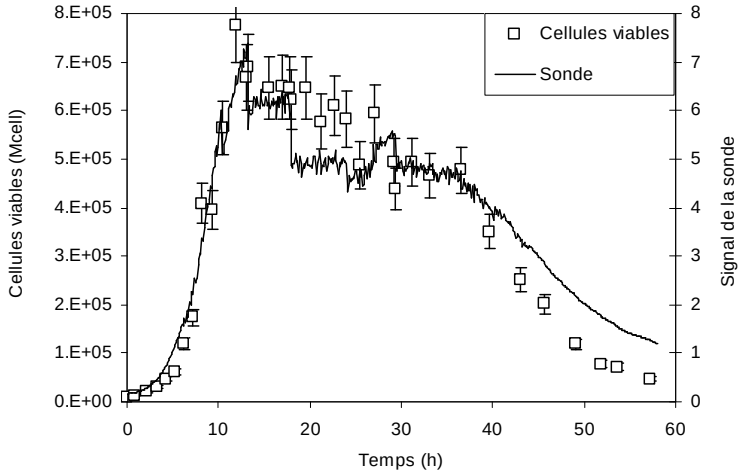


Figure 15. Superposition du signal de la sonde capacitive et des cellules viables (en Mcell) en fonction du temps pour une culture en mode discontinu alimenté de la souche sauvage à 37°C

Le profil de la sonde semble décrire convenablement l'évolution des cellules viables (Figure 15), la diminution du signal à 13, 18 et 30 heures causée par les ajouts de glucose sont également visibles au niveau des cellules viables. Un décalage entre les deux profils est observable en fin de culture et correspond à une modification de la capacitance du milieu par la présence de cellules mortes et par la variation de composition par rapport au milieu initial, sur lequel est initialisé le signal. En fin de culture, le milieu a été centrifugé et la capacitance est contrôlée sur le surnageant, la mesure est alors très proche du zéro initial.

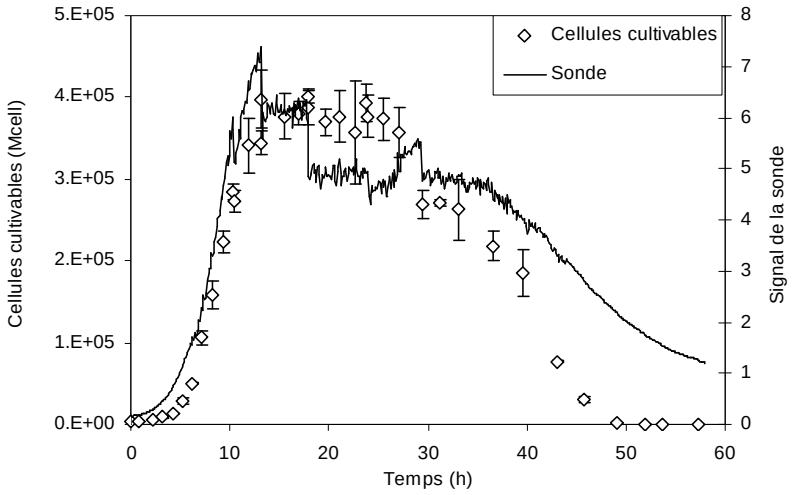


Figure 16. Superposition du signal de la sonde capacitive et des cellules cultivables (en Mcell) en fonction du temps pour une culture en mode discontinu alimenté de la souche sauvage à 37°C

Le signal de la sonde suit le profil des cellules cultivables pendant les 10 premières heures de culture, période durant laquelle la majeure partie des cellules viables sont cultivables, un décrochage s'observe ensuite et la sonde ne traduit plus la cultivabilité des levures (Figure 16).

Le signal de capacitance mesuré par la sonde semble donc traduire la fraction de biomasse viable.

Ces observations ont été vérifiées sur des cultures en mode discontinu alimenté à 37°C avec une exposition aux UV (6 et 25 $W.m^{-2}$) (Figure 17), sur une culture en mode discontinu alimenté à 33°C avec un changement de température à 45°C (Figure 18) et en culture continue (Figure 19).

Pour toutes ces cultures le signal de température suit le profil d'évolution des cellules viables. Un décalage en fin de culture est observable pour trois des fermentations, il est causé par l'accumulation des cellules mortes et par une modification de la composition du milieu.

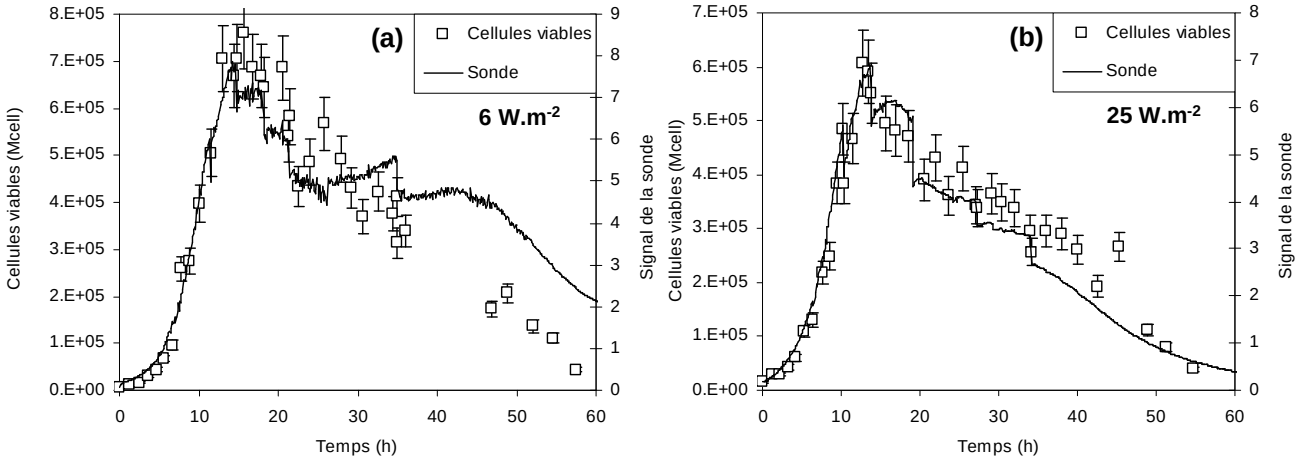


Figure 17. Superposition du signal de la sonde capacitive et des cellules viables (en Mcell) en fonction du temps pour une culture en mode discontinu alimenté de la souche sauvage à 37°C avec exposition aux UV à une puissance de 6 W.m^{-2} (a) et de 25 W.m^{-2} (b)

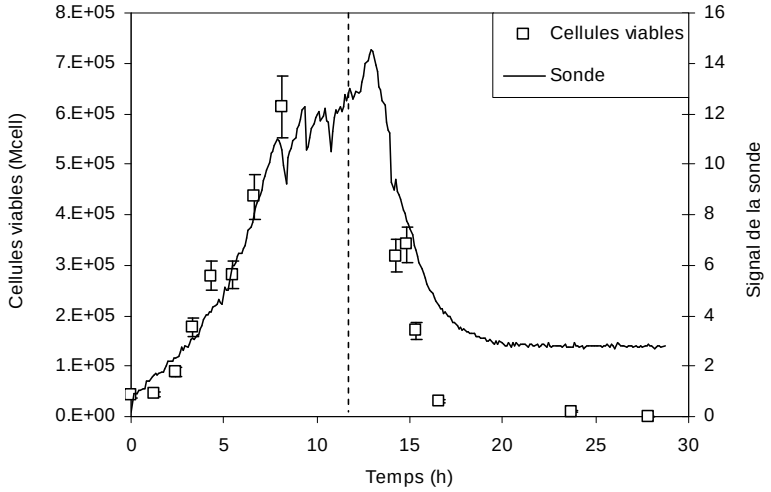


Figure 18. Superposition du signal de la sonde capacitive et des cellules viables (en Mcell) en fonction du temps pour une culture en mode discontinu alimenté de la souche sauvage à 33°C avec un choc de température à 45°C à 11,5 heures (trait pointillé)

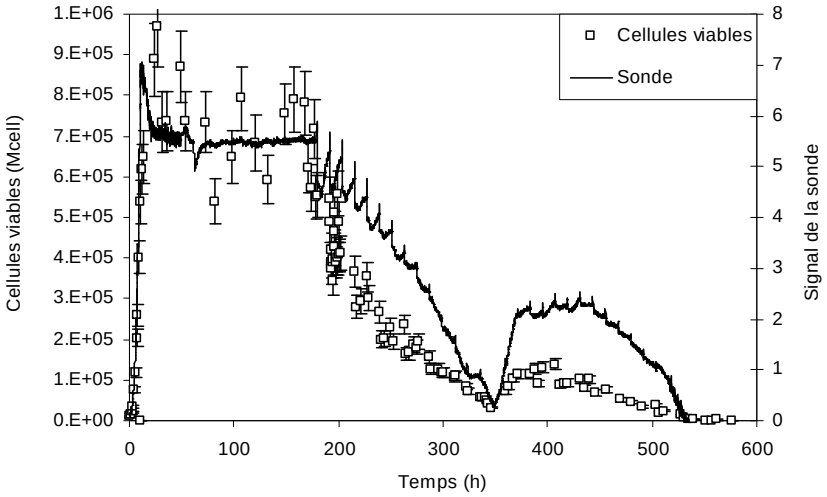
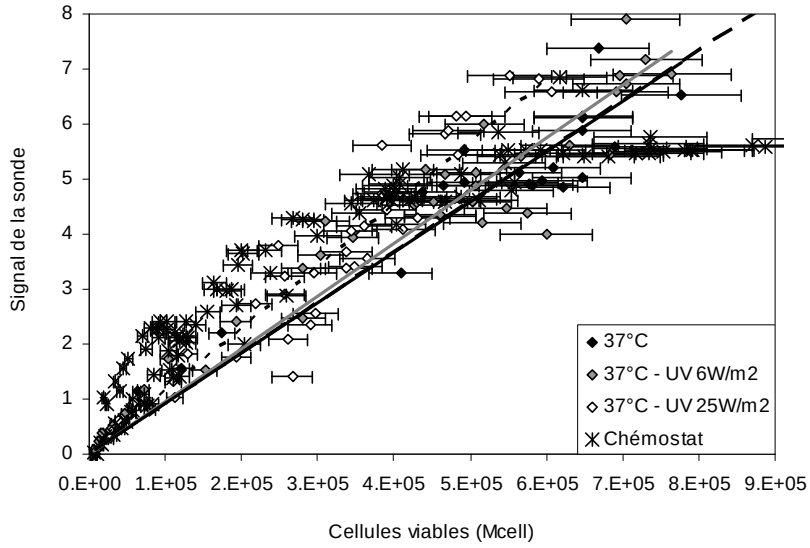


Figure 19. Superposition du signal de la sonde capacitive et des cellules viables (en Mcell) en fonction du temps pour une culture en mode continu

Le signal de capacitance traduit la fraction de biomasse viable et une corrélation peut être établie entre ces deux mesures (Figure 20). La culture à 33°C avec choc thermique à 45°C n'est pas représentée ici car le volume est différent des autres cultures (signal de la sonde et nombre de cellules supérieurs).



Cultures	Facteur de corrélation
37°C	$9{,}14.10^{-6}$
37°C - 6 W.m^{-2}	$9{,}59.10^{-6}$
37°C - 25 W.m^{-2}	$1{,}14.10^{-5}$
Chémostat	$9{,}18.10^{-6}$
33°C	$1{,}01.10^{-5}$
Valeur moyenne	**$9{,}9.10^{-6}$ ± $0{,}9.10^{-6}$**

Figure 20. Corrélation entre le signal de la sonde capacitive et les cellules viables (en Mcell) pour une culture de la souche sauvage en mode discontinu alimenté à 37°C sans et avec exposition aux UV (à 6 et 25 W.m^{-2}) et pour une culture en mode continu – Facteurs de corrélation des régressions linéaires

Le facteur de corrélation entre le signal de la sonde capacitive et les cellules viables (en Mcell) est à peu près constant entre les cultures et égal à environ 10^{-5} ($9{,}9.10^{-6} \pm 0{,}9.10^{-6}$). Un signal de sonde de « 1 » correspond donc approximativement à « 10^5 Mcellules viables ».

La comparaison de mesures hors ligne des populations cellulaires à la mesure de capacitance en ligne a pu montrer que la mesure traduisait de manière rapide et fiable la biomasse viable au sein du réacteur, c'est-à-dire la fraction de cellules conservant leur intégrité membranaire et une activité métabolique. En culture continue, la sonde permet de visualiser des phénomènes rapides difficiles à appréhender par les mesures hors ligne.

L'utilisation de la sonde comme outil de caractérisation des cellules actives a été montré par Tibayrenc *et al.* (2010) qui ont considéré cette méthode adaptée à l'étude de la réponse au stress de *Saccharomyces cerevisiae* au cours d'une fermentation éthanolique (Tibayrenc *et al.* 2010).

Dans ce projet de thèse où l'on souhaite étudier la réponse de *Saccharomyces cerevisiae* à des stress température et à l'exposition aux UV, en termes de viabilité et de décès, l'utilisation de cette technique est donc un choix judicieux. La mesure *in-situ* présente l'avantage d'une fréquence de mesure beaucoup plus élevée que pour les techniques de détermination de la biomasse classiques, *ex-situ*. Une limitation des prélèvements permet de réduire les risques de contamination. De plus, pour visualiser une éventuelle amélioration de la tolérance, en termes de concentration en biomasse viable, et l'impact de chocs thermiques rapides, cette méthode trouve également un grand intérêt.

II.3.2 Mesure de la concentration en glucose, éthanol, glycérol et acides organiques

Le glucose, l'éthanol, le glycérol et les acides organiques (acide acétique, acide pyruvique, acide succinique) sont dosés au cours de la fermentation par chromatographie liquide haute performance (HPLC) (Waters®, Alliance 2690). La colonne utilisée est une colonne Aminex HPX-87H (300 mm × 7,8 mm) placée dans un four dont la température est fixée à 50°C. La phase mobile utilisée est de l'acide sulfurique (H_2SO_4) à 5 mM en mode isocratique à un débit de 0,5 mL.min^{-1}. Un volume de 20 µL de surnageant est injecté et analysé en sortie de colonne par un réfractomètre (Waters® 2414) et un détecteur UV à barrette de diodes (Waters® 996). Le temps d'analyse est de 30 minutes. Le logiciel d'acquisition et de traitement des données est fourni par Waters®.

Remarque : En culture discontinue alimentée, phases biotique (biomasse) et abiotique sont séparées par centrifugation à 10 000 rpm pendant 4 minutes.

En culture continue, le glucose résiduel étant très faible et les cinétiques rapides, le surnageant est directement séparé de la biomasse lors du prélèvement, grâce à une seringue équipée d'un filtre de porosité de 0,45 µm. Ceci afin d'éviter une évolution des concentrations en métabolites entre le moment du prélèvement et l'analyse.

II.3.3 Analyse de la composition des gaz

L'analyse de la composition des gaz d'entrée et de sortie en N_2, O_2 et CO_2 permet de calculer les quantités d'O_2 consommé et de CO_2 produit, en tenant compte des variations de débit d'aération, de la température et du volume du milieu de culture.

Pour les cultures menées en réacteur de volume de 2 et 3 litres, la détermination de la composition de l'air en sortie du réacteur est faite grâce à un spectromètre de masse quadripole (Proline Dycor – Ametek Process Instruments). La calibration est réalisée avec le milieu cristal (Air liquide) qui est composé de 20% de dioxygène, 5% de dioxyde de carbone et 75% d'azote. La ligne de base est faite à l'hélium et la pression en entrée est de 580 mbars. L'acquisition se fait avec le logiciel Dycor Process 2000.

Pour les cultures menées en réacteur de 1 litre, les mesures de composition en gaz sont réalisées par analyse acoustique avec énergie d'excitation infrarouge pour le CO_2 et magnétique pour l'O_2. L'analyseur INNOVA est calibré avec une bouteille étalon à 10% O_2 et 5% CO_2 et l'acquisition est faite grâce au logiciel BZ6009.

II.4 Méthode de traitement des données expérimentales

II.4.1 Détermination des bilans matières en culture en mode discontinu alimenté et continu

II.4.1.1 Notations

Concentrations

X	Concentration en biomasse ($g.L^{-1}$)
S	Concentration en substrat ($g.L^{-1}$)
P	Concentration en produit ($g.L^{-1}$)

Vitesses globales de réaction

r_X	Vitesse de production de biomasse ($g.L^{-1}.h^{-1}$)
r_S	Vitesse de consommation de substrat ($g.L^{-1}.h^{-1}$)
r_P	Vitesse de production de produit ($g.L^{-1}.h^{-1}$)

Vitesses spécifiques de réaction

μ Vitesse spécifique de production de biomasse ou taux de croissance (h^{-1})

q_S Vitesse spécifique de consommation de substrat ($g.g_X^{-1}.h^{-1}$)

q_P Vitesse spécifique de production de produit ($g.g_X^{-1}.h^{-1}$)

II.4.1.2 Bilans de matières

Les bilans de matières sont réalisés sur chacune des phases biotique et abiotique solide, liquide ou gaz. Les vitesses nettes de production sont positives et les vitesses nettes de consommation sont négatives.

ACCUMULATION = ENTREE - SORTIE + CONVERSION

L'équation de bilan de matière pour un composé C exprimé en concentration ($g.L^{-1}$) est la suivante :

$$\frac{dC}{dt} = \frac{Q}{V}C_0 - \frac{Q}{V}C \pm r_c \quad \textbf{\textit{Équation 5}}$$

$$\frac{dCV}{dt} = QC_0 - QC \pm r_c V \quad \textbf{\textit{Équation 6}}$$

$$C\frac{dV}{dt} + V\frac{dC}{dt} = QC_0 - QC \pm r_c V \quad \textbf{\textit{Équation 7}}$$

Culture en chémostat :

En chémostat, le volume étant constant, le bilan de matière sur la biomasse totale s'écrit :

$$\frac{dX}{dt} = \frac{Q}{V}X_0 - \frac{Q}{V}X + r_X \quad \textbf{\textit{Équation 8}}$$

La biomasse en entrée (dans l'alimentation) est nulle et le taux de dilution (en h^{-1}) est défini par $D = \frac{Q}{V}$, d'où : $\boxed{r_X = D\,X + \frac{dX}{dt}}$ ***Équation 9***

X Concentration en biomasse dans le réacteur ($g.L^{-1}$)

X_0 Concentration en biomasse dans l'alimentation ($g.L^{-1}$)

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

r_X Vitesse de production de biomasse ($g.L^{-1}.h^{-1}$)

Pour les substrats et les produits, le bilan matière est le suivant :

$$r_S = D(S_0 - S) - \frac{dS}{dt} \quad \textbf{Équation 10}$$

$$r_P = D\,P + \frac{dP}{dt} \quad \textbf{Équation 11}$$

En régime permanent en chémostat, le terme d'accumulation peut être négligé, les bilans matières deviennent alors :

$$r_X = D\,X \quad \textbf{Équation 12}$$

$$r_S = D(S_0 - S) \quad \textbf{Équation 13}$$

$$r_P = D\,P \quad \textbf{Équation 14}$$

Culture en mode discontinu alimenté :

En mode discontinu alimenté, le volume du réacteur varie. Pour la biomasse, les substrats et les produits, le bilan de matière est le suivant :

$$r_X = \frac{Q}{V}(X - X_0) + \frac{1}{V} \times \frac{d(X\,V)}{dt} \quad \textbf{Équation 15}$$

$$r_S = \frac{Q}{V}(S_0 - S) - \frac{1}{V} \times \frac{d(S\,V)}{dt} \quad \textbf{Équation 16}$$

$$r_P = \frac{Q}{V}(P - P_0) + \frac{1}{V} \times \frac{d(P\,V)}{dt} \quad \textbf{Équation 17}$$

Les expressions des vitesses de consommation de substrat et de production de biomasse et de produit sont les suivantes (r est exprimé en $g.L^{-1}.h^{-1}$) :

$$r_X = \frac{1}{V} \times \frac{d(X\,V)}{dt} \quad \textbf{Équation 18}$$

$$r_S = \frac{Q}{V} S_0 - \frac{1}{V} \times \frac{d(S\,V)}{dt} \quad \textbf{Équation 19}$$

$$r_P = \frac{1}{V} \times \frac{d(P\,V)}{dt} \quad \textbf{Équation 20}$$

Il est donc nécessaire de quantifier la variation du volume dans le réacteur au cours du temps. Le volume de culture est calculé à chaque intervalle de temps à partir de la connaissance du volume initial de culture, des volumes ajoutés des différentes solutions d'alimentation et du

liquide correcteur de pH et des volumes de prélèvement d'échantillon. Les solutions d'alimentation et de base sont sur balances permettant l'acquisition en ligne de l'évolution des alimentations. Chaque prise d'échantillon est mesurée pour connaitre avec précision le volume prélevé.

II.4.2 Analyse des gaz - Vitesses de consommation d'O_2 et de production de CO_2

II.4.2.1 Débit de gaz de sortie (Q_{out})

Le débit de gaz entrant est connu, il est mesuré par un débitmètre massique étalonné. Par contre, le débit de gaz de sortie n'est pas mesuré, il est nécessaire de le calculer pour déterminer les vitesses de consommation d'O_2 et de production de CO_2.

Le débit de gaz de sortie est calculé par rapport à l'azote, gaz inerte, non consommé lors de la réaction (hypothèse : $n_{N_2}^{in} = n_{N_2}^{out}$).

$$Q_{out} = \frac{Q_{in} \times \frac{\%N_{2\,in}}{100} - \frac{dN_{2\,out}}{dt} \times V_{gaz} - \frac{dV_{gaz}}{dt} \times N_{2\,out}}{\frac{\%N_{2\,out}}{100}} \quad \textit{Équation 21}$$

Q_{out}	Débit de gaz sortant du réacteur ($L.h^{-1}$)
Q_{in}	Débit d'air entrant dans le réacteur ($L.h^{-1}$)
$\%N_{2in}$	Pourcentage volumique de N_2 dans les gaz d'entrée
$\%N_{2out}$	Pourcentage volumique de N_2 dans les gaz de sortie
V_{gaz}	Volume du ciel gazeux dans le réacteur (L)

$$\frac{dN_2^{out}}{dt} \times V_{gaz} = \frac{\left(\frac{\%N_{2\,out,t2}}{100} - \frac{\%N_{2\,out,t1}}{100}\right) \times V_{gaz}}{t_2 - t_1} \quad \textit{Équation 22}$$

Le pourcentage volumique de N_2 dans les gaz d'entrée et de sortie est calculé en considérant que $N_2 + O_2 + CO_2 = 100\%$

Les variations du volume gazeux $\left(\frac{dV_{gaz}}{dt}\right)$ sont négligées.

II.4.2.2 Vitesse de consommation d'oxygène (r_{O_2})

À partir des pourcentages volumiques d'O_2 en entrée et en sortie mesurés par le spectromètre de masse, la vitesse de consommation d'O_2 (mol.h^{-1}) peut être déterminée.

$$r_{O_2} = \frac{Q_{in} \times \frac{\%O_{2\,in}}{100} - Q_{out} \times \frac{\%O_{2\,out}}{100} - \frac{dO_{2\,out} \times V_{gaz}}{dt}}{V_m} - \frac{dO_{2\,d} \times V_{liq}}{dt} \quad \textbf{\textit{Équation 23}}$$

r_{O_2} Vitesse de consommation de dioxygène (mol.h^{-1})

Q_{in} Débit d'air entrant dans le réacteur (L.h^{-1})

Q_{out} Débit de gaz sortant du réacteur (L.h^{-1})

$\%O_{2\,in}$ Pourcentage volumique d'O_2 dans les gaz d'entrée

$\%O_{2\,out}$ Pourcentage volumique d'O_2 dans les gaz de sortie

$O_{2\,d}$ O_2 dissous dans le milieu (mg.L^{-1})

V_{gaz} Volume du ciel gazeux dans le réacteur (L)

V_{liq} Volume de milieu dans le réacteur (L)

V_m Volume molaire à la température T (L.mol^{-1})

- La conversion d'oxygène est déterminée par l'expression suivante :

$$\frac{dO_2^{out}}{dt} = \left(\frac{\%O_2^{out,t_2} - \%O_2^{out,t_1}}{t_2 - t_1} \right) \quad \textbf{\textit{Équation 24}}$$

- L'oxygène dissous O_{2d} est déterminé par l'expression suivante :

$$O_{2d} = \frac{pO_2}{100} \times \text{solubilité } O_2 \times \frac{1}{P(atm)} \times \frac{1}{1000 \times 32} \quad \textbf{\textit{Équation 25}}$$

La pression partielle d'oxygène dissous (pO_2) est mesurée par la sonde en pourcentage par rapport à la saturation (100% - air).

La solubilité de l'oxygène décroit avec la température selon la loi :

solubilité (mg.L^{-1}) = A.T(°C) + B (Fyferling 2007).

II.4.2.3 Vitesse de production de dioxyde de carbone (r_{CO_2})

De la même manière, à partir des pourcentages volumiques de CO_2 entrant et sortant mesurés par le spectromètre de masse, il est possible de calculer la vitesse de production de CO_2 en $mol.h^{-1}$.

$$r_{CO_2} = \frac{Q_{out} \times \%CO_{2\,out} - Q_{in} \times \%CO_{2\,in} + \frac{dCO_{2\,out}}{dt} \times V_{gaz}}{V_m} \quad \textit{Équation 26}$$

Suivant le pH du milieu, le CO_2 se trouve sous formes dissoute (CO_{2d}) ou dissociées (HCO_3^-, CO_3^{-2}) (Figure 21). L'accumulation des ions carbonates dans le milieu peut alors sous-estimer le bilan sur le CO_2 produit. Les cultures en mode continu et discontinu alimenté sont toutes réalisées à pH 4, pH auquel la quantité de HCO_3^- dissous représente moins de 0,1 % du CO_2 dissous est peut donc être négligée (Guillou 1996).

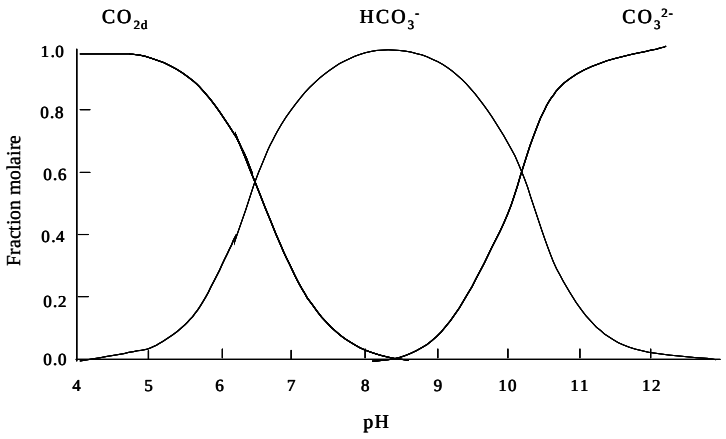


Figure 21. Effet du pH sur la distribution des carbonates en solution

II.4.2.4 Quotient respiratoire (Q_R)

A partir du calcul des vitesses de consommation d'O_2 et de production de CO_2, le quotient respiratoire est calculé.

$$Q_R = \left| \frac{r_{CO_2}}{r_{O_2}} \right| \quad \textit{Équation 27}$$

II.4.3 Lissage des données

Les données sont lissées et réconciliées pour la détection d'erreurs expérimentales et ajustement des données afin de satisfaire à des critères de qualité sur les bilans carbone et élémentaire.

Pour les expériences réalisées en mode discontinu alimenté, le volume réactionnel étant variable, les résultats sont convertis en grandeurs massiques.

Les différentes données brutes sont traitées avec le logiciel LIREC, logiciel de lissage et de réconciliation des données développé au sein de l'Equipe. Ce logiciel permet de traiter les incertitudes expérimentales, d'ajuster les profils obtenus par des régressions polynomiales afin de pouvoir interpoler les points expérimentaux et calculer les grandeurs dérivées nécessaires aux calculs des vitesses réactionnelles.

Pour la partie lissage, les points expérimentaux sont estimés par ajustement de polynômes avec minimisation du critère des moindres carrés. Le calcul des vitesses en chaque point est obtenu sur la base de la dérivée des polynômes d'ajustement du lissage. Chaque variable est traitée indépendamment des autres. À partir des données lissées et des dérivées $\left(\frac{dC}{dt}\right)$, il est possible de calculer les vitesses spécifiques de production et de consommation, seules vitesses considérées comme vraies en mode discontinu alimenté où le volume réactionnel varie.

$$\mu = \frac{1}{X_{liss}} \cdot r_X = \frac{1}{X_{liss}} \cdot \frac{dX_{liss}}{dt}$$ ***Équation 28*** ($\frac{dX_{liss}}{dt}$ dérivée de X au temps t)

$$q_S = \frac{1}{X_{liss}} \cdot r_S$$ ***Équation 29***

$$q_P = \frac{1}{X_{liss}} \cdot r_P$$ ***Équation 30***

II.4.4 Bilans carbone et élémentaires

De manière à vérifier la qualité et la cohérence des mesures expérimentales et des données traitées, il est important de vérifier les bilans carbone et les degrés de réduction généralisés.

II.4.4.1 Bilan carbone

Pour le bilan carbone, seuls interviennent les composés carbonés et tout le carbone consommé en entrée doit se retrouver en sortie : consommation = production, avec $\sum r_{Substrats}^{net} < 0$ et $\sum r_{\Pr oduits}^{net} > 0$

Le bilan carbone est défini par l'équation suivante :

$$\sum r_{Substrats}^{net} + r_{Biomasse}^{net} + r_{CO_2}^{net} + \sum r_{\Pr oduits}^{net} = 0$$

$$r_S = r_X + r_{ethanol} + r_{acétate} + ... + r_{CO2} \quad \textbf{\textit{Équation 31}}$$

$$\textbf{\textit{d'où}} \ \frac{r_X + r_{ethanol} + r_{acétate} + ... + r_{CO2}}{r_S} = 100\% \quad \textbf{\textit{Équation 32}}$$

Les vitesses globales sont exprimées en Cmol.h^{-1}. La Cmole d'un composé correspond à la formule brute du composé ramenée à une mole de carbone. Par exemple, le glucose $C_6H_{12}O_6$ devient CH_2O soit une masse molaire de 30 g.Cmol^{-1}.

II.4.4.2 Bilan élémentaire

Pour le bilan élémentaire, chaque composé carboné ou non est pris en compte avec son degré de réduction γi :

$$\sum r_{Substrats}^{net} \cdot \gamma_S + r_X^{net} \cdot \gamma_X + r_{CO_2}^{net} \cdot \gamma_{CO2} + \sum r_{\Pr oduits}^{net} \cdot \gamma_P = 0$$

$$\gamma_S \times r_S + \gamma_{O2} \times r_{O2} = \gamma_X \times r_X + \gamma_{éthanol} \times r_{éthanol} + \gamma_{acétate} \times r_{acétate} + ... \textbf{\textit{Équation 33}}$$

$$\textbf{\textit{d'où}} \ \frac{\gamma_X \times r_X + \gamma_{éthanol} \times r_{éthanol} + \gamma_{acétate} \times r_{acétate} + ...}{\gamma_S \times r_S + \gamma_{O2} \times r_{O2}} = 100\% \quad \textbf{\textit{Équation 34}}$$

Le degré de réduction de chaque composé est donné par la formule suivante :

$$\gamma = \text{nombre de C} \times \lambda_C + \text{nombre de H} \times \lambda_H + \text{nombre de O} \times \lambda_O + \text{nombre de N} \times \lambda_N$$

avec $\lambda_C = 4$

$\lambda_H = 1$

$\lambda_O = -2$

$\lambda_N = -3$

Tableau 9. Masse molaire et coefficient γi□ des principaux composés en fermentation alcoolique (Cmol)

Composé	Formule en Cmol	Masse molaire en g.Cmol^{-1}	Degré de réduction généralisé γ
Glucose	CH_2O	30	4
Biomasse	$CH_{1.79}O_{0.64}N_{0.16}$	26,27	4,03
Ethanol	$CH_3O_{0.5}$	23	6
Acétate	CH_2O	30	4
Glycérol	$CH_{2.67}O$	30,7	4,67
Succinate	$CH_{1.5}O$	29,5	3,5
Pyruvate	$CH_{1.33}O$	29,33	3,33
CO_2	CO_2	44	0
O_2	O_2	32	-4
Ammoniaque	NH_3	17	0
Eau	H_2O	18	0

II.4.5 Rendements globaux

- Rendement global de conversion du substrat en l'élément C :

$$R_{C/S} = \frac{r_C}{r_S} = \frac{q_C}{q_S} \text{ (en } g_C.g_{substrat}^{-1}) \quad \textit{Équation 35}$$

- Rendement global de conversion du substrat en l'élément C par 1g de biomasse :

$$R_{C/X} = \frac{r_C}{r_X} = \frac{q_C}{q_X} \text{ (en } g_C.g_{biomasse}^{-1}) \quad \textit{Équation 36}$$

Les rendements globaux sont obtenus graphiquement et correspondent à la pente des régressions des vitesses volumiques (r_c) ou spécifiques (q_c) de production de l'élément C en fonction des vitesses volumiques ou spécifiques de consommation du substrat (r_s, q_s) ou de production de biomasse (r_s, μ).

II.4.6 Cas particulier de l'éthanol

Au cours de la fermentation, une fraction de l'éthanol produit est évaporée. L'efficacité du condenseur des gaz de sortie ainsi que la température de culture sont responsables de cette perte d'éthanol. L'évaporation d'éthanol peut représenter plus de 20% de la production totale et a pour conséquence l'obtention de bilans carbone et élémentaire erronés (Duboc and Von Stockar 1998).

II.4.6.1 Estimation de la quantité d'éthanol évaporée

La détermination de l'évaporation de l'éthanol a été réalisée afin de l'intégrer aux calculs des cinétiques de production d'éthanol, des rendements, de la productivité et des bilans. Pour cela, des expériences d'évaporation ont été menées en fermenteur sur un volume de 1 litre de milieu complet auquel de l'éthanol a été ajouté à une concentration aux alentours de 100 $g.L^{-1}$. Des débits d'aération de 0,1 $L.min^{-1}$, 0,5 $L.min^{-1}$, 1 $L.min^{-1}$ et 1,5 $L.min^{-1}$ ont été utilisés, la température était régulée à 37 °C et la vitesse d'agitation fixée à 200 rpm.

L'estimation de la quantité d'éthanol évaporée à 37°C, en fonction du temps, pour les différents débits d'aération est présentée Figure 22.

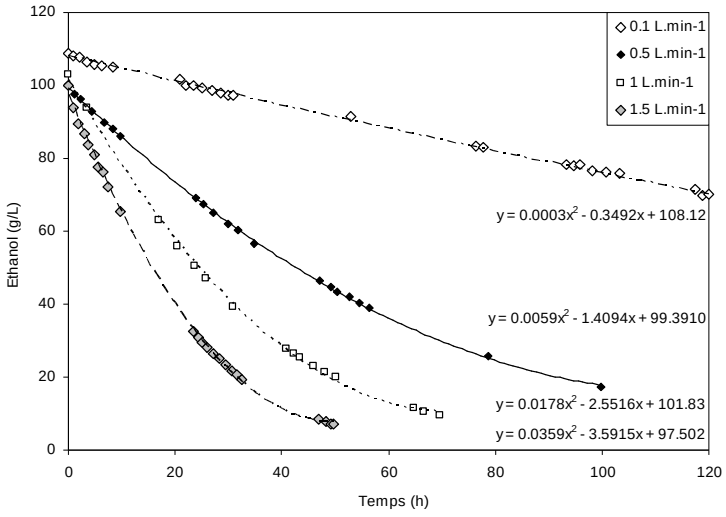


Figure 22. Concentration en éthanol résiduel en fonction du temps pour les différents débits d'aération (0,1 L.min-1, 0,5 L.min-1, 1L.min-1, 1,5 L.min-1) à 37°C et sous une agitation de 200 rpm

Ces expériences ont permis d'obtenir les vitesses d'évaporation et par suite les polynômes reliant l'évaporation à la concentration en éthanol dans le milieu (Figure 23).

vitesses d'évaporation (en $g.L^{-1}.h^{-1}$) : $r_{\text{évaporation}} = \frac{d\,C_{\text{Ethanol résiduel}}}{d\,t}$ ***Équation 37***

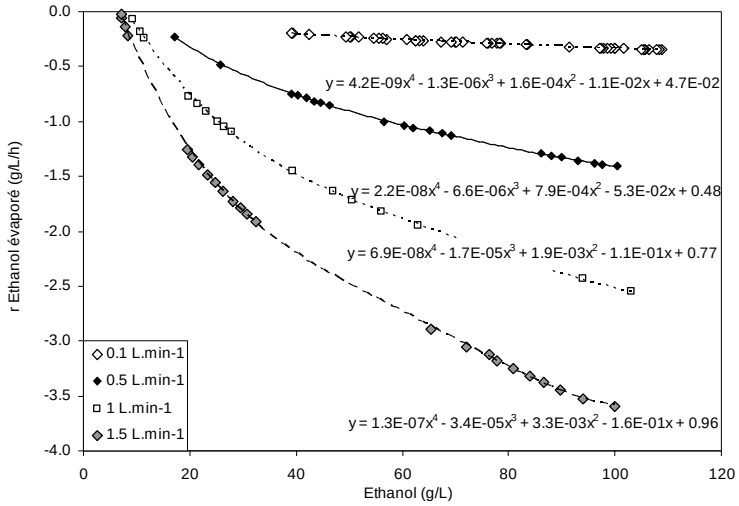


Figure 23. Vitesse d'évaporation de l'éthanol en fonction de la concentration en éthanol pour les différents débits d'aération (0,1 L.min^{-1}, 0,5 L.min^{-1}, 1L.min^{-1}, 1,5 L.min^{-1}) à 37°C et sous une agitation de 200 rpm

Pour chaque débit l'expression suivante est obtenue :

$$r_{évaporation} = a\ (C_{Ethanol})^4 + b\ (C_{Ethanol})^3 + c\ (C_{Ethanol})^2 + d\ (C_{Ethanol}) + e \quad \textit{Équation 38}$$

Les coefficients a, b, c, d et e sont fonction du débit d'aération et peuvent être intégrés à l'expression suivante : $a = (AQ_{aération}^{\ 2} + BQ_{aération} + C)$ ***Équation 39***

Après détermination des valeurs des coefficients (A, B, C, A', B', …), une équation d'expression de la vitesse d'évaporation en fonction de la concentration en éthanol dans le milieu et du débit d'aération est déduite.

$$r_{évaporation} = (AQ_{aération}^{\ 2} + BQ_{aération} + C)\ (C_{Ethanol})^4 + (A'Q_{aération}^{\ 2} + B'Q_{aération} + C')\ (C_{Ethanol})^3$$
$$+ (A''Q_{aération}^{\ 2} + B''Q_{aération} + C'')\ (C_{Ethanol})^2 + (A'''Q_{aération}^{\ 2} + B'''Q_{aération} + C''')\ (C_{Ethanol})$$
$$+ (A''''Q_{aération}^{\ 2} + B''''Q_{aération} + C'''') \quad \textit{Équation 40}$$

Cette équation sera utilisée pour reconstituer l'éthanol évaporé pour les cultures réalisées en mode discontinu alimenté et en continu.

II.4.6.2 Correction des vitesses de production d'éthanol, des rendements et des bilans

La fraction d'éthanol évaporée doit être corrigée dans toutes les relations où intervient l'éthanol selon la relation : $r_{Ethanol\ vrai} = r_{Ethanol} + r_{Ethanol\ évaporé}$.

Chapitre III :

Modélisation des cinétiques de croissance, de décès et de production :

Simulation de conduite de réacteur pour l'obtention de variants robustes à des fluctuations thermiques

Chapitre III : Modélisation des cinétiques de croissance, de décès et de production : Simulation de conduite de réacteur pour l'obtention de variants robustes à des fluctuations thermiques

Dans notre étude, l'objectif est d'obtenir une souche de *Saccharomyces cerevisiae* plus tolérante au stress choisi (ici la température). La stratégie élaborée consiste en un réacteur fonctionnant en mode continu couplé à une boucle externe de mutagénèse aléatoire (génération de modifications des souches au niveau génétique). La conduite du réacteur impose une pression de sélection (ici un gradient de température couplé à des chocs thermiques) qui est contrôlée selon un profil établi par l'opérateur. Les phénomènes mis en jeu dans cette stratégie sont complexes : évolution de la croissance en fonction de la température, probabilité de génération d'une souche « mutée », caractéristiques de croissance et de décès des deux souches,… Aussi, il est indispensable de prédire en premier lieu le comportement de ou des souches présentes dans le réacteur en fonction des facteurs extérieurs et leur évolution phénotypique induite par la mutagénèse aux UV.

Ce chapitre propose donc un modèle phénoménologique dynamique permettant de simuler la réponse du micro-organisme à des chocs thermiques et de déterminer des conditions de mutagénèse propices à la génération d'un nouveau variant avec de « nouvelles » capacités phénotypiques. Sur la base de paramètres obtenus expérimentalement ou dans la littérature, ce modèle cinétique a permis de définir les conditions de culture à mettre en œuvre dans un réacteur continu, couplant chocs thermiques et traitement aux UV, afin d'obtenir des variants plus tolérants à des stress de température que la souche sauvage.

Des études par simulation ont été réalisées pour estimer la sensibilité de certains paramètres tels que le gradient de température appliqué, la température nominale, les paramètres relatifs au taux de décès et le taux de mutations. Un mode de conduite du pilote a ainsi pu être obtenu.

III.1 Principe et description du procédé d'obtention de variants

III.1.1 Principe de l'obtention de variants

Le travail envisagé repose sur l'hypothèse suivante **: l'obtention par mutagénèse aléatoire aux UV d'un mutant plus tolérant au stress température que la souche sauvage est basée sur le fait qu'<u>à une température donnée le taux de croissance apparent du mutant est supérieur à celui de la souche sauvage car son taux de décès est inférieur à celui de la souche sauvage</u>** (Figure 24).

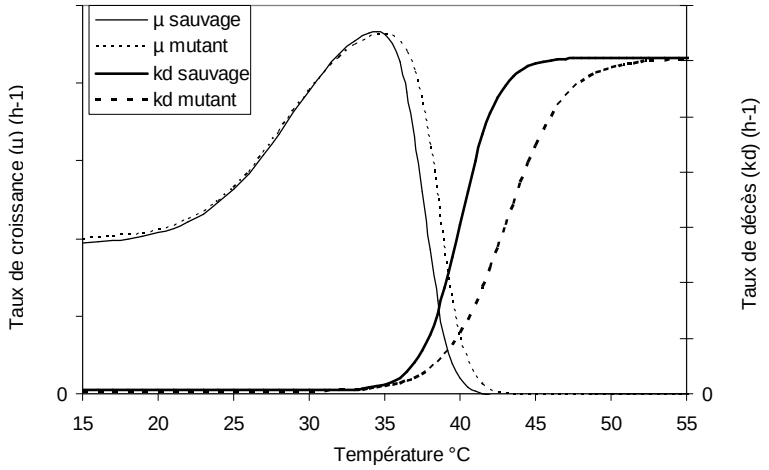


Figure 24. Représentation théorique du taux de croissance et du taux de décès de la souche sauvage et du mutant tolérant en fonction de la température

Pour l'obtention de variants plus tolérants vis-à-vis de variations de température au cours de la fermentation alcoolique, le concept est de coupler mutagénèse aléatoire (par exposition aux UV) et pression de sélection sur une culture de levure menée en fermentation alcoolique au sein d'un même réacteur fonctionnant en mode continu. Cette pression de sélection consiste à appliquer une rampe de température dans le réacteur entre la température de départ et une température de sélection à définir (Figure 25). De plus, à intervalles de temps réguliers, des chocs thermiques de quelques dizaines de minutes à une température discriminante ou sélective donnée permettent une sélection sévère visant à éliminer tous les « individus » les moins robustes aux variations brutales de température.

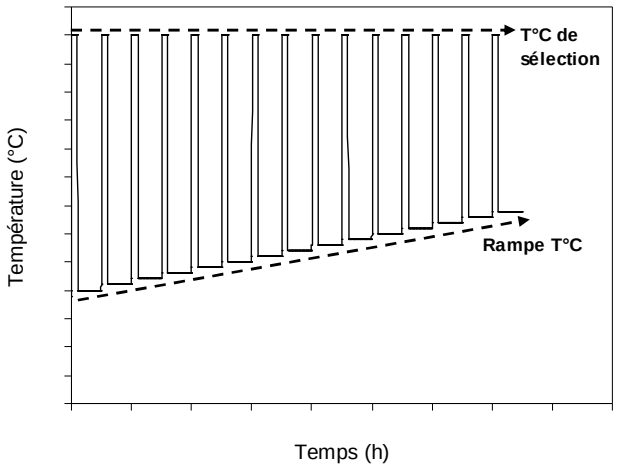


Figure 25. Exemple de paliers de température réalisés pour la sélection du mutant

III.1.2 Représentation schématique du procédé d'adaptation

Un dispositif expérimental du procédé continu d'adaptation a été imaginé pour satisfaire aux critères énoncés précédemment. Il est constitué d'un réacteur principal (réacteur 1 (R1)) agité et aéré qui fonctionne en mode continu. Ce réacteur est alimenté en milieu complet avec un débit d'entrée Q_e. Le débit de soutirage (sortie) noté Q_s est égal au débit d'entrée pour maintenir un volume constant dans le réacteur. Une boucle de recirculation est installée sur le réacteur 1 (Figure 26). Les cellules contenues dans le réacteur 1, passent dans la boucle de recirculation et traversent une cuve en quartz (réacteur 2 (R2)) exposée aux UV, lieu de la mutagénèse. Les cellules « retournent » ensuite dans le réacteur 1 où elles subissent la pression de sélection (ici la température).

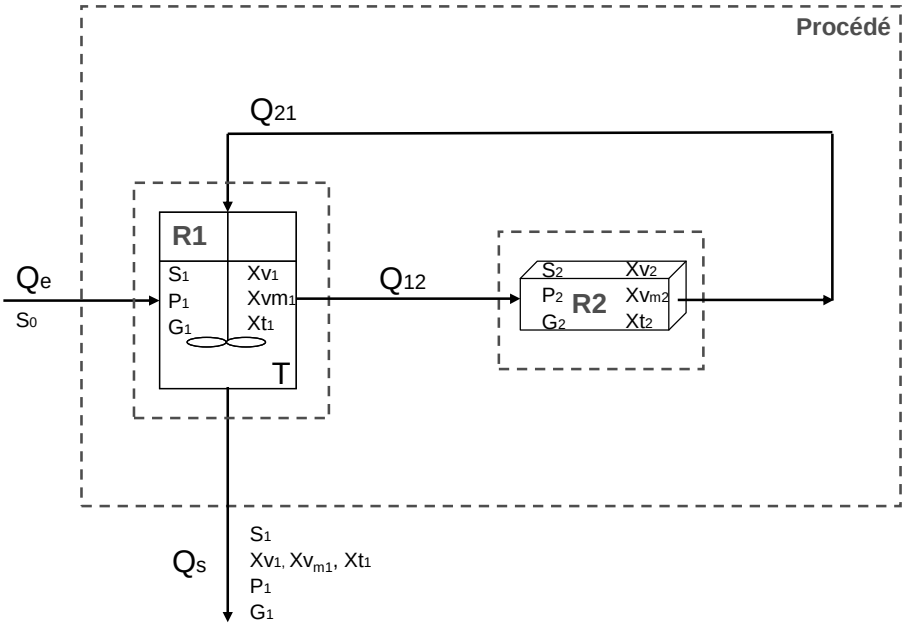


Figure 26. Schéma du procédé d'adaptation – Composés et flux intervenants dans le modèle

III.2 Formulation du modèle cinétique d'obtention de variants

Le modèle cinétique développé est un modèle non structuré, c'est-à-dire qu'il s'intéresse aux cinétiques macroscopiques sans prendre en considération la composition intracellulaire de la biomasse. L'objectif de ce modèle est de décrire l'évolution des concentrations des différents composés (bilans de matière) ainsi que les lois cinétiques intervenant dans le procédé en fonction de l'environnement dans lequel se trouvent les micro-organismes. Le modèle intègre des paramètres sur lesquels il est possible d'agir (concentration en substrat, profil d'alimentation, température). L'effet de la température et de l'exposition aux UV sur les cinétiques de croissance, consommation de substrat et production d'éthanol et de glycérol sera pris en compte.

III.2.1 Nomenclature des variables et paramètres du modèle cinétique

Le tableau suivant liste les variables et paramètres utilisés dans les expressions des bilans de matière et des équations cinétiques (Tableau 10).

Tableau 10. Variables et paramètres intervenants dans les bilans de matière et équations cinétiques

Variables du modèle		**Réacteur 1**	**Réacteur 2**
Biomasse sauvage viable		Xv_1	Xv_2
Biomasse mutante viable		Xv_{m1}	Xv_{m2}
Biomasse totale		Xt_1	Xt_2
Substrat		S_1	S_2
Ethanol		P_1	P_2
Glycérol		G_1	G_2
Paramètres cinétiques			
Taux de croissance de la souche sauvage		μ_1	μ_2
Taux de croissance du mutant		μ_{m1}	μ_{m2}
Taux de décès de la souche sauvage		k_{d1}	k_{d2}
Taux de décès du mutant		k_{dm1}	k_{dm2}
Vitesse spécifique de consommation de glucose		q_{s1}	q_{s2}
Vitesse spécifique de production d'éthanol		q_{p1}	q_{p2}
Vitesse spécifique de production de glycérol		q_{G1}	q_{G2}
Paramètres de conduite du procédé			
Volume		V_1	V_2
Débit	d'entrée (alimentation)	Q_e	
	de sortie (soutirage)	Q_s	
	du réacteur 1 vers 2	Q_{12}	
	du réacteur 2 vers 1	Q_{21}	
Paramètres de mutagénèse			
Taux de mutations	spontanées	mut spont	
	induites par les UV	mut UV	
Taux de décès induit par l'exposition aux UV		k_{dmut}	

La biomasse totale (Xt) correspond à la somme de la biomasse viable sauvage (Xv) et mutante (Xv_m) et de la biomasse morte (sauvage et mutante).

III.2.2 Bilans de matière sur les différents composés

Les bilans de matière expriment le principe fondamental de conservation de la matière, par conséquent les équations sont communes à tous les modèles cinétiques. Les bilans de matière sont énoncés ci-dessous pour chaque réacteur.

ACCUMULATION = ENTREE - SORTIE + CONVERSION

III.2.2.1 Bilans de matière sur les différents composés dans le Réacteur 1

En considérant le volume de liquide dans le réacteur comme constant, les équations du bilan de matière s'écrivent :

Bilans de matière sur la biomasse viable sauvage et « mutante » et la biomasse totale dans le réacteur 1

$$\frac{dXv_1}{dt} = \frac{Q_{21}}{V_1} \times Xv_2 - \frac{Xv_1}{V_1} \times (Q_{12} + Q_s) + (\mu_1 - k_{d1}) \times Xv_1 - Xv_1 \times \text{mut spont} \quad \textbf{\textit{Équation 41}}$$

$$\frac{dXv_{m1}}{dt} = \frac{Q_{21}}{V_1} \times Xv_{m2} - \frac{Xv_{m1}}{V_1} \times (Q_{12} + Q_s) + (\mu_{m1} - k_{dm1}) \times Xv_{m1} + Xv_1 \times \text{mut spont} \quad \textbf{\textit{Équation 42}}$$

$$\frac{dXt_1}{dt} = \frac{Q_{21}}{V_1} \times Xt_2 - \frac{Xt_1}{V_1} \times (Q_{12} + Q_s) + \mu_1 \times Xv_1 + \mu_{m1} \times Xv_{m1} \quad \textbf{\textit{Équation 43}}$$

Bilan de matière sur le substrat dans le réacteur 1

$$\frac{dS_1}{dt} = \frac{Q_e}{V_1} \times S_0 + \frac{Q_{21}}{V_1} \times S_2 - \frac{S_1}{V_1} \times (Q_{12} + Q_s) - q_{S1} \times (Xv_1 + Xv_{m1}) \quad \textbf{\textit{Équation 44}}$$

Bilan de matière sur les produits dans le réacteur 1 (éthanol et glycérol)

$$\frac{dP_1}{dt} = \frac{Q_{21}}{V_1} \times P_2 - \frac{P_1}{V_1} \times (Q_{12} + Q_s) + q_{P1} \times (Xv_1 + Xv_{m1}) \quad \textbf{\textit{Équation 45}}$$

$$\frac{dG_1}{dt} = \frac{Q_{21}}{V_1} \times G_2 - \frac{G_1}{V_1} \times (Q_{12} + Q_s) + q_{G1} \times (Xv_1 + Xv_{m1}) \quad \textbf{\textit{Équation 46}}$$

III.2.2.2 Bilans de matière sur les différents composés dans le Réacteur 2 : lieu de la mutagénèse

Bilans de matière sur la biomasse viable sauvage et « mutante » et la biomasse totale dans le réacteur 2

$$\frac{dXv_2}{dt} = \frac{Q_{12}}{V_2} \times Xv_1 - \frac{Q_{21}}{V_2} \times Xv_2 + (\mu_2 - k_{d2} - k_{d\,mut}) \times Xv_2 - Xv_2 \times (\text{mut spont} + \text{mut UV}) \quad \textbf{\textit{Équation 47}}$$

$$\frac{dXv_{m2}}{dt} = \frac{Q_{12}}{V_2} \times Xv_{m1} - \frac{Q_{21}}{V_2} \times Xv_{m2} + (\mu_{m2} - k_{d\,m2} - k_{d\,mut}) \times Xv_{m2} + Xv_2 \times (\text{mut spont} + \text{mut UV})$$

Équation 48

$$\frac{dXt_2}{dt} = \frac{Q_{12}}{V_2} \times Xt_1 - \frac{Q_{21}}{V_2} \times Xt_2 + \mu_2 \times Xv_2 + \mu_{m2} \times Xv_{m2} \quad \textbf{\textit{Équation 49}}$$

Bilan de matière sur le substrat dans le réacteur 2

$$\frac{dS_2}{dt} = \frac{Q_{12}}{V_2} \times S_1 - \frac{Q_{21}}{V_2} \times S_2 - q_{S2} \times (Xv_2 + Xv_{m2}) \quad \textbf{\textit{Équation 50}}$$

Bilan de matière sur les produits dans le réacteur 2 (éthanol et glycérol)

$$\frac{dP_2}{dt} = \frac{Q_{12}}{V_2} \times P_1 - \frac{Q_{21}}{V_2} \times P_2 + q_{P2} \times (Xv_2 + Xv_{m2}) \quad \textbf{\textit{Équation 51}}$$

$$\frac{dG_2}{dt} = \frac{Q_{12}}{V_2} \times G_1 - \frac{Q_{21}}{V_2} \times G_2 + q_{G2} \times (Xv_2 + Xv_{m2}) \quad \textbf{\textit{Équation 52}}$$

III.2.2.3 Bilans volumiques

Les volumes des réacteurs 1 et 2 sont maintenus constants tout au long de la mise en œuvre du procédé.

Bilan volumique dans le réacteur 1

$Q_e + Q_{21} = Q_s + Q_{12}$ ***Équation 53***

Bilan volumique sur le procédé

$Q_e = Q_s$ ***Équation 54***

III.2.3 Equations cinétiques du procédé

Les lois cinétiques expriment l'évolution des vitesses spécifiques avec la composition du milieu (substrat, éthanol, …) et les variations des facteurs environnementaux (température, …). La température joue un rôle essentiel dans l'enrichissement en levures tolérantes mais affecte également les cinétiques de croissance et de production. Les équations cinétiques doivent prendre en compte ce paramètre afin que le modèle cinétique traduise fidèlement le comportement microbien réel.

III.2.3.1 Equation cinétique du taux de croissance (μ)

L'équation cinétique du taux de croissance intègre la limitation par le substrat et l'inhibition par l'éthanol.

$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{K_s + S} \left(1 - \frac{P}{P_{critique}}\right) \quad \textit{Équation 55}$$

L'équation cinétique du taux de croissance tient compte de la limitation en substrat, basée sur le modèle de Monod, $\mu = \mu_{max} \frac{S}{K_s + S}$ (Monod 1942), qui est la loi la plus utilisée pour décrire la cinétique de croissance. Elle suppose que le substrat S peut être un composé limitant du taux de croissance. Si S >> K_s alors le taux de croissance est proche du taux de croissance maximal. La valeur de Ks déterminée expérimentalement est de 0,1 $g.L^{-1}$.

L'inhibition par le produit est également intégrée avec le paramètre $P_{critique}$, concentration en éthanol critique, qui est la concentration en éthanol pour laquelle un arrêt de la croissance est observé.

Le taux de croissance maximal et le $P_{critique}$ sont des paramètres très affectés par la température. Peu de modèles tiennent compte de l'influence de la température sur les différentes cinétiques. Le taux de croissance maximal est exprimé en fonction de la température par une forme modifiée de l'équation de Ratkowsky (Ratkowsky *et al.* 1982; Zwietering *et al.* 1991). Cette équation est mieux adaptée à la croissance microbienne que la loi d'Arrhénius plus adaptée aux réactions chimiques.

$$\mu_{max} = \left[(a.(T - \theta_1)) \times (1 - \exp(b.(T - \theta_2)))\right]^2 \quad \textit{Équation 56}$$

La concentration critique en éthanol est exprimée en fonction de la température par une relation de type sigmoïde.

$$P_{critique} = a_2 \ / \ (1 - \exp(-(T - \theta_3) \cdot b_2)) \quad \textit{Équation 57}$$

III.2.3.2 Equation cinétique de la vitesse spécifique de consommation de glucose (qs)

La vitesse spécifique de consommation de glucose est décrite par l'équation classique de répartition du glucose pour la formation de biomasse et de produits.

$$q_S = \frac{\mu}{Y_{X/S}} + \frac{q_P}{Y_{P/S}} + \frac{q_G}{Y_{G/S}} \quad \textit{Équation 58}$$

$Y_{X/S}$, $Y_{P/S}$ et $Y_{G/S}$ sont les rendements théoriques limites en biomasse, éthanol et glycérol par rapport au substrat.

$Y_{X/S} = 0{,}53\ g.g^{-1}$

$Y_{P/S} = 0{,}51\ g.g^{-1}$ (P, représente l'éthanol)

$Y_{G/S} = 0{,}86\ g.g^{-1}$ (G, représente le glycérol)

III.2.3.3 Equation cinétique des vitesses spécifiques de production

Les équations cinétiques de la vitesse spécifique de production d'éthanol (q_P) et de glycérol (q_G) sont prises comme couplées à la croissance.

$$q_P = \alpha_P\, \mu + \beta_P \quad \textit{Équation 59}$$

$$q_G = \alpha_G\, \mu + \beta_G \quad \textit{Équation 60}$$

avec $\beta_P = \gamma_1 \exp\left(-\frac{A_{P1}}{T}\right) - \gamma_2 \exp\left(-\frac{A_{P2}}{T}\right)$ ***Équation 61***

et $\beta_G = \gamma_3 \exp\left(-\frac{A_{G1}}{T}\right) - \gamma_4 \exp\left(-\frac{A_{G2}}{T}\right)$ ***Équation 62***

Un facteur de proportionnalité α est introduit pour traduire le couplage de la croissance et de la production d'éthanol et de glycérol dans la première phase de la fermentation.

Lorsque la croissance s'arrête ($\mu = 0$) un découplage entre croissance et production intervient, la production d'éthanol continue et q_p est différent de zéro jusqu'à une certaine concentration en éthanol, de même pour le glycérol. Ce phénomène de découplage est intégré avec le terme β, qui est fonction de la température et tient compte de l'activation et de l'inhibition par la température.

III.2.3.4 Equation cinétique du taux de décès en fonction de la température (kd)

Les levures sont exposées à un stress température induisant du décès cellulaire (Fintan Walton and Pringle 1980; Gervais and Martínez De Marañón 1995; Martínez De Marañón *et al.* 1999; Guyot *et al.* 2005). Dans nos travaux, l'obtention d'un mutant plus tolérant au stress température que la souche sauvage repose sur le fait qu'à une température donnée le taux de croissance apparent du mutant est supérieur à celui de la souche sauvage car son taux de décès est inférieur à celui de la souche sauvage (Figure 27). L'expression du taux de décès en relation avec la température doit donc être déterminée, sa représentation théorique est représentée ci-dessous.

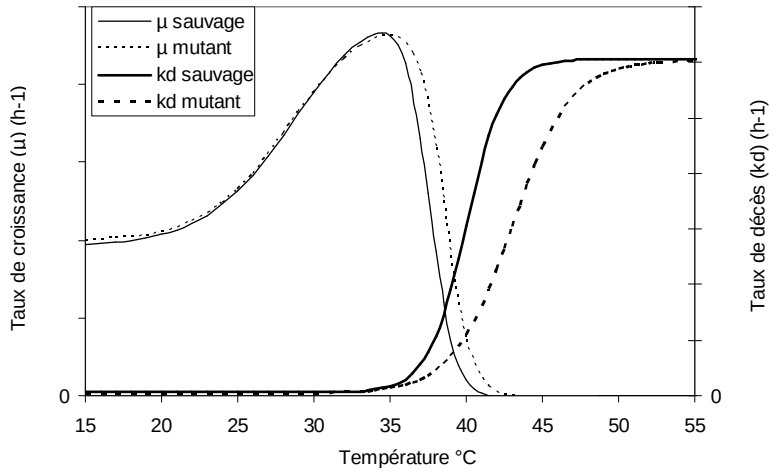


Figure 27. Représentation théorique du taux de croissance et du taux de décès de la souche sauvage et du mutant tolérant en fonction de la température

Les modèles de décès - d'autant plus en fonction de la température – sont peu nombreux dans la littérature, une expression du décès a été déduite d'observations des experiences réalisées au sein de l'équipe. La représentation du taux de décès induit par la température (k_d) est posée comme la somme d'un taux de décès basal (taux de décès « naturel » de la souche) et d'un taux de décès causé par la température. Le taux de décès est mathématiquement décrit par une expression de type sigmoïde, où le taux de décès basal (k_d b), le taux de décès maximal induit par la température (k_d t), la température au point d'inflexion (tpc en °C) et la pente de la sigmoïde (pente) sont à déterminer.

$$k_d = k_d\, b + \frac{k_d\, t}{1 + e^{(-(T - tpc) * pente)}} \qquad \textit{Équation 63}$$

III.2.3.5 Modèle cinétique retenu

En résumé, les lois cinétiques qui seront intégrées au modèle de simulation de l'obtention de variants sont les suivantes (Tableau 11) :

Tableau 11. Lois cinétiques utilisées dans le modèle cinétique

	Expression des lois cinétiques	**Expression des paramètres**
Taux de croissance	$\mu = \mu_{max} \frac{S}{K_s + S} \left(1 - \frac{P}{P_{critique}}\right)$	$\mu_{max} = \left[(a.(T-\theta_1)) \times (1-\exp(b.(T-\theta_2)))\right]^2$ $P_{critique} = a_2 \ / \ (1-\exp(-(T-\theta_3)\cdot b_2))$ Ks = 0,1 g.L-1
Taux de décès	$k_d = k_d\ b + \frac{k_d\ t}{1+e^{(-(T-tpc)*pente)}}$	k_d b, k_d t, tpc, pente → à déterminer
Vitesse spécifique de consommation de glucose	$q_S = \frac{\mu}{Y_{X/S}} + \frac{q_P}{Y_{P/S}} + \frac{q_G}{Y_{G/S}}$	$Y_{X/S}$ = 0,53 $g.g^{-1}$ $Y_{P/S}$ = 0,51 $g.g^{-1}$ $Y_{G/S}$ = 0,86 $g.g^{-1}$
Vitesse spécifique de production d'éthanol	$q_P = \alpha_P\ \mu + \beta_P$	$\beta_P = \gamma_1 \exp\left(-\frac{A_{P1}}{T}\right) - \gamma_2 \exp\left(-\frac{A_{P2}}{T}\right)$
Vitesse spécifique de production de glycérol	$q_G = \alpha_G\ \mu + \beta_G$	$\beta_G = \gamma_3 \exp\left(-\frac{A_{G1}}{T}\right) - \gamma_4 \exp\left(-\frac{A_{G2}}{T}\right)$

III.2.4 Résolution des équations des bilans de matière

III.2.4.1 Résolution des équations différentielles

Le modèle a été réalisé avec le logiciel de programmation Matlab (version 7.5.0 (MathWorks®)). Les concentrations des différents composés sont obtenues par résolution du système d'équations différentielles des bilans de matière. Ces équations différentielles sont résolues par intégration par la méthode de Runge-Kutta d'ordre quatre (« ode 113 » ordinary differential equations sous Matlab). Cette méthode d'approximation de solution d'équations différentielles d'ordre 1 repose sur le principe de l'itération et nécessite donc la connaissance des valeurs initiales.

III.2.4.2 Initialisation des variables

L'initialisation des variables étant nécessaire à la résolution du système d'équations différentielles, des valeurs initiales de biomasse, substrat et produit sont fixées.

A la fin d'une phase « batch », avant le démarrage du mode continu, la concentration en éthanol désirée dans le réacteur (P1) est de 50 $g.L^{-1}$, concentration considérée comme acceptable industriellement sur la base d'un compromis entre rendement et coût énergétique en post-traitement. Pour le glucose, la concentration initiale (avant le « batch ») est de 100 $g.L^{-1}$ et lorsque 50 $g.L^{-1}$ d'éthanol ont été produits tout le substrat a été consommé ($M_{glucose}$ = 180 $g.mol^{-1}$, $M_{Ethanol}$ = 46 $g.mol^{-1}$), la concentration résiduelle est donc fixée à 0,1$g.L^{-1}$, proche de la valeur du Ks théorique (en oxydatif). Pour la biomasse « mutante », sa concentration est nulle au temps initial, vu qu'il n'y a pas de mutagénèse. Les concentrations en biomasse viable sauvage et totale sont les mêmes, la totalité des cellules étant viables au moment du démarrage du chémostat. Les concentrations en biomasse sont fixées à 13 $g.L^{-1}$, concentration en biomasse totale atteinte pour une culture de référence à 37°C en mode discontinu à 50 $g.L^{-1}$ d'éthanol. Pour la même culture de référence, la concentration en glycérol est proche de 5 $g.L^{-1}$, la concentration initiale sera donc fixée à cette valeur.

Une boucle permettant la recirculation entre les réacteurs 1 et 2, au temps initial, les concentrations de chaque composé sont égales dans les deux réacteurs. Les valeurs initiales (à t0) de biomasse, substrat et produits sont les suivantes :

Réacteur 1 :	Xv_1= 13 $g.L^{-1}$	Réacteur 2 : Xv_2= 13 $g.L^{-1}$
	Xv_{m1}= 0 $g.L^{-1}$	Xv_{m2}= 0 $g.L^{-1}$
	Xt_1 = 13 $g.L^{-1}$	Xt_2 = 13 $g.L^{-1}$
	S_1 = 0,1 $g.L^{-1}$	S_2 = 0,1 $g.L^{-1}$
	P_1 = 50 $g.L^{-1}$	P_2 = 50 $g.L^{-1}$
	G_1 = 5 $g.L^{-1}$	G_2 = 5 $g.L^{-1}$

III.3 Cultures cellulaires pour l'obtention des grandeurs du modèle

Lors de la mise en œuvre du pilote d'obtention de variants, du décès va être généré d'une part par la température (rampe et chocs thermiques) et d'autre part par l'exposition aux UV. Le taux de décès dans nos conditions expérimentales de température et d'exposition aux UV doit être déterminé. Le décès intervient dans le modèle cinétique au niveau des bilans de matière sur la biomasse viable. Le taux de croissance apparent correspond au taux de croissance des levures auquel sont retranchés les différents taux de décès (k_d et $k_{d\ mut}$). Des cultures en mode discontinu alimenté ont été réalisées afin de déterminer les valeurs expérimentales des taux de décès induits soit par la température soit par les radiations UV et de les intégrer au modèle.

III.3.1 Calcul des taux de décès

Le taux de décès est déterminé selon différentes méthodes. Un taux de décès moyen peut être défini sur l'ensemble de la phase de perte de biomasse viable et un taux de décès instantané est calculé à chaque instant permettant d'obtenir un profil d'évolution du taux de décès en fonction du temps et en fonction d'autres paramètres comme la concentration en éthanol dans le milieu.

III.3.1.1 Calcul du taux de décès moyen

En phase exponentielle de croissance $\mu = \frac{\ln\left(\frac{X}{X_0}\right)}{\Delta t}$ et le taux de croissance peut être déterminé graphiquement. Le taux de décès moyen peut être déterminé de la même manière. La représentation du nombre de cellules viables en fonction du temps en échelle semi-logarithmique permet d'obtenir un profil linéaire de perte de cellules viables. Le taux de décès moyen est calculé sur les cellules viables dénombrées au bleu de méthylène, après le choc, entre le début de la perte de biomasse et le point final. La pente obtenue correspond au taux de décès moyen et l'erreur est donnée par la déviation standard.

$$k_{d\,moy} = \frac{\ln\left(\frac{X_{viable\ 1}}{X_{viable\ 2}}\right)}{t_2 - t_1} \qquad \textit{Équation 64}$$

III.3.1.2 Calcul du taux de décès instantané

Les cellules totales représentent l'ensemble des cellules viables et mortes. En réacteur discontinu alimenté, le bilan matière sur les cellules mortes, à volume constant, s'écrit de la façon suivante :

$$\frac{dX_{morte}}{dt} = \frac{dX_{totale}}{dt} - \frac{dX_{viable}}{dt} \qquad \textit{Équation 65}$$

$$\frac{dX_{morte}}{dt} = \mu X_{viable} - (\mu - k_d) \cdot X_{viable} \qquad \textit{Équation 66}$$

De cette expression le taux de décès instantané (k_d en h^{-1}) peut être déduit. Le taux de croissance pris en compte est celui calculé à partir de la masse sèche, les X_{viable}, X_{totale}, X_{morte} sont les nombres de cellules viables, totales et mortes obtenus par comptage cellulaire.

$$k_d = \frac{1}{X_{viable}} \frac{dX_{morte}}{dt} \qquad \textit{Équation 67}$$

Une représentation graphique du taux de décès en fonction du temps permettra d'obtenir le taux de décès maximal induit par la température ou par les radiations UV.

III.3.2 Obtention des taux de décès induits par la présence de chocs thermiques (k_{d1}, k_{d2})

L'influence de chocs de température sur les cinétiques de croissance, de décès et de production de la souche industrielle est étudiée au cours de cultures réalisées en réacteur instrumenté, en mode discontinu alimenté sans limitation en oxygène. La température est régulée entre 32°C et 33°C pendant la phase de croissance. Lorsque la concentration en éthanol atteint 50 à 60 g L^{-1} dans le réacteur, la température est augmentée brutalement pour induire un choc thermique respectivement à 42°C et 45°C. Des échantillons sont prélevés toutes les heures pendant la phase de croissance puis toutes les 30 minutes après le choc thermique afin de caractériser précisément les dynamiques de croissance, de décès et de production. L'objectif est d'obtenir les valeurs expérimentales des taux de décès induit par les chocs de température afin de les intégrer au modèle cinétique.

III.3.2.1 Analyse des variables et des paramètres cinétiques des fermentations à 32°C et 33°C avec un choc thermique à 42°C et 45°C

Dans le cas de la fermentation à 32°C, le choc thermique à 42°C est réalisé à 12,7 heures de culture, à une concentration en éthanol de 58 g.L^{-1} (Figure 28). Pour la fermentation à 33°C, le choc thermique à 45°C a lieu après 11,6 heures de culture, lorsque la concentration en éthanol dans le réacteur atteint 60 g.L^{-1} (Figure 29). Les graphes suivants représentent l'évolution des masses des différents composés au cours de la fermentation.

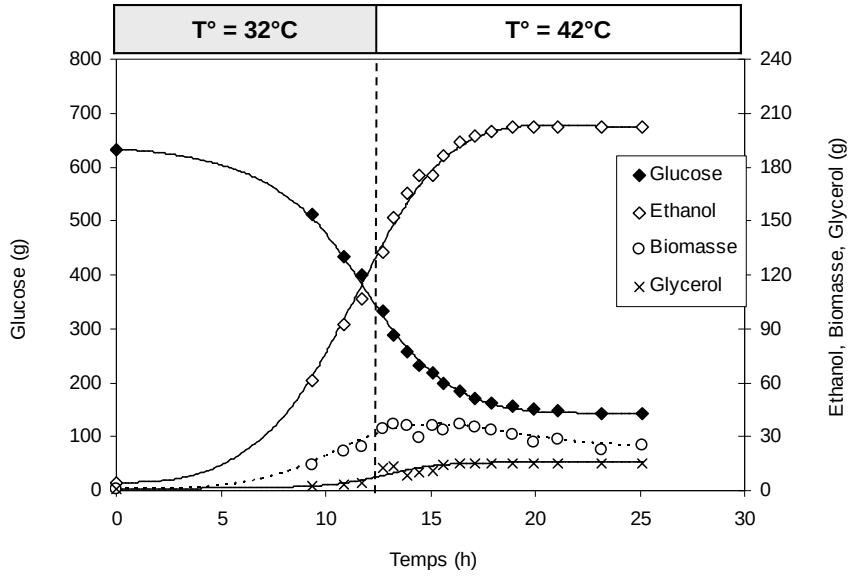


Figure 28. Evolution des masses de glucose consommées et des masses d'éthanol, de biomasse (masse sèche) et de glycérol produites au cours de la fermentation de la souche sauvage, phase de croissance à 32°C puis choc thermique à 42°C à 12,7 heures de culture (le changement de température est représenté par le trait pointillé)

Avec un choc à 42°C, la biomasse totale (masse sèche) cesse alors de croître mais reste stable pendant 5 heures avant de chuter. La consommation de glucose et la production de métabolites s'arrêtent 6 heures après le choc.

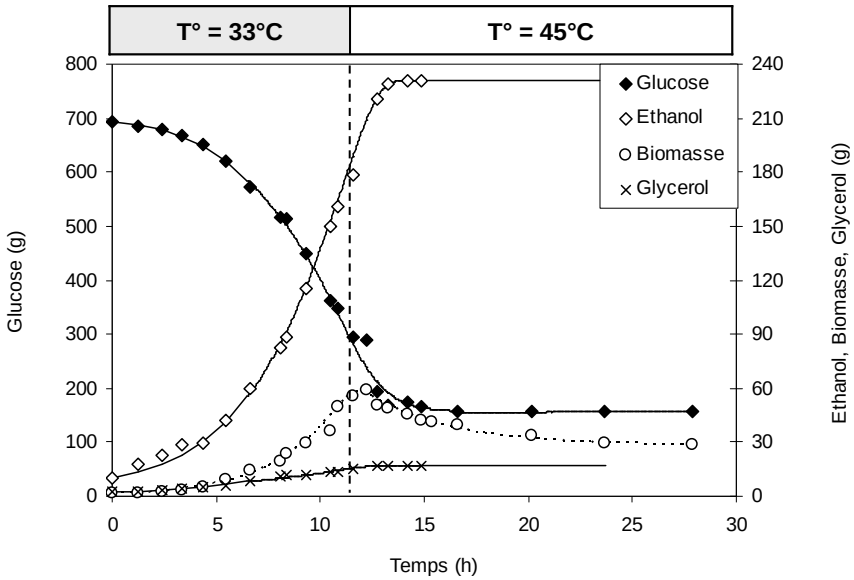


Figure 29. Evolution des masses de glucose consommées et des masses d'éthanol, de biomasse (masse sèche) et de glycérol produites au cours de la fermentation de la souche sauvage, phase de croissance à 33°C puis choc thermique à 45°C à 11,6 heures de culture (le changement de température est représenté par le trait pointillé)

Après le choc thermique à 45°C, la biomasse (masse sèche) cesse de croître et on observe une chute immédiate de la concentration en biomasse. La consommation de glucose et la production de métabolites s'arrêtent 2 heures après le choc.

Le principal impact du choc thermique se situe au niveau de la biomasse. Il apparaît alors comme prépondérant de caractériser l'impact de ce paramètre sur la population microbienne afin de définir les conditions opératoires optimales pour l'obtention d'un mutant présentant des capacités de tolérance accrues face à un stress température.

En calculant l'évolution du taux de croissance apparent en fonction de la concentration en éthanol dans le milieu (Figure 30), des profils quasi-similaires sont observés à 32°C et 33°C. Les taux de croissance obtenus sont de 0,45 h^{-1} à 32°C et 33°C. Le taux de croissance à 33°C se maintient à une valeur supérieure à 0,3 h^{-1} jusqu'à 50 $g.L^{-1}$ d'éthanol contre 40 $g.L^{-1}$ pour les cellules cultivées à 32°C. Les chocs thermiques diminuent la tolérance à l'éthanol avec une concentration critique, concentration pour laquelle il n'y a plus de croissance, observée à 67 $g.L^{-1}$ à 45°C et à 80 $g.L^{-1}$ à 42°C contre 88,5 $g.L^{-1}$ pour une culture en isotherme à 37°C.

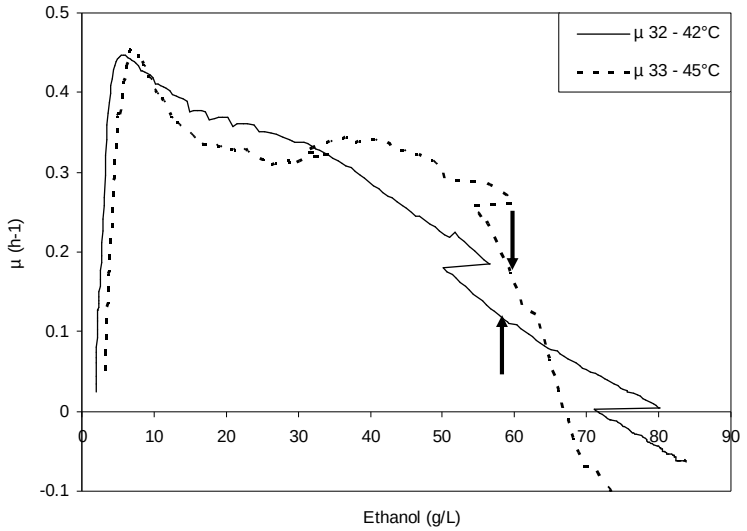


Figure 30. Taux de croissance apparent de la souche sauvage pour les fermentations avec phase de croissance à 32°C ou 33°C puis choc thermique à 42°C ou 45°C en fonction de la concentration en éthanol (le changement de température est représenté par une flèche)

Au niveau de la vitesse spécifique de production d'éthanol (Figure 31), elles sont égales à 1,9 $g.g^{-1}.h^{-1}$ à 32°C et 33°C, par contre, la vitesse spécifique de production d'éthanol diminue plus lentement en fonction de la concentration en éthanol dans le réacteur pour la culture 33°C - 45°C.

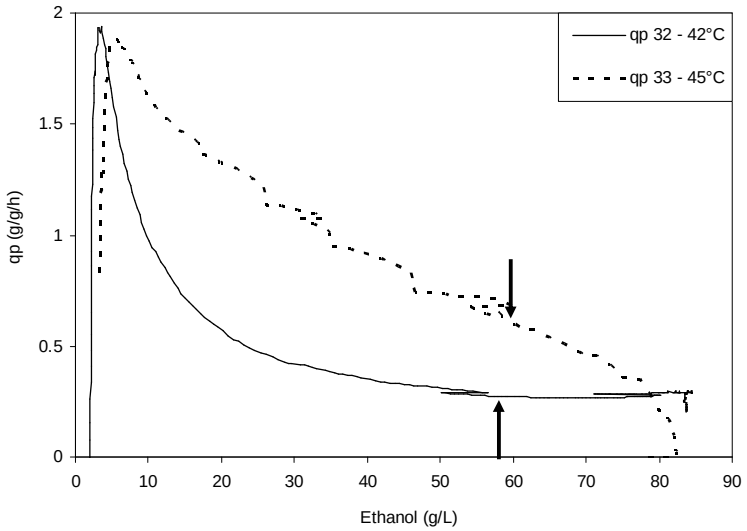


Figure 31. Vitesse spécifique de production d'éthanol de la souche sauvage pour les fermentations avec phase de croissance à 32°C ou 33°C puis choc thermique à 42°C ou 45°C en fonction de la concentration en éthanol (le changement de température est représenté par une flèche)

La croissance de la souche est optimale pour les deux températures testées, par contre la production d'éthanol est plus importante à 33°C. Il est connu que les températures optimales de *Saccharomyces cerevisiae* sont différentes entre croissance et production (Watson 1987).

III.3.2.2 Analyse des sous populations cellulaires au cours des cultures à 32°C et 33°C avec un choc thermique à 42°C et 45°C

Evolution de la biomasse totale

Les 2 fermentations ayant été réalisées avec des volumes de culture différents initialement, l'analyse de l'évolution des populations se fera en concentration, en million de cellules par millilitre plutôt qu'en nombre de cellules dans le réacteur.

La biomasse totale est déterminée par masse sèche, densité optique et dénombrement des cellules totales. En fonction du temps (Figure 32), l'évolution de la concentration en cellules totales montre un fort impact des chocs thermiques à 42°C et 45°C. De plus, une diminution de la concentration en cellules totales est observée ce qui traduit une lyse cellulaire après le changement brutal de température. La décroissance des cellules totales est immédiate après le changement de température à 42°C et 45°C et un peu plus rapide à 45°C. Le choc à 42°C est donc moins drastique, ce qui a également été observé sur les profils de biomasse totale, obtenus par détermination de la masse sèche (Figure 29 et Figure 28) où la lyse à 42°C est faible par rapport à 45°C.

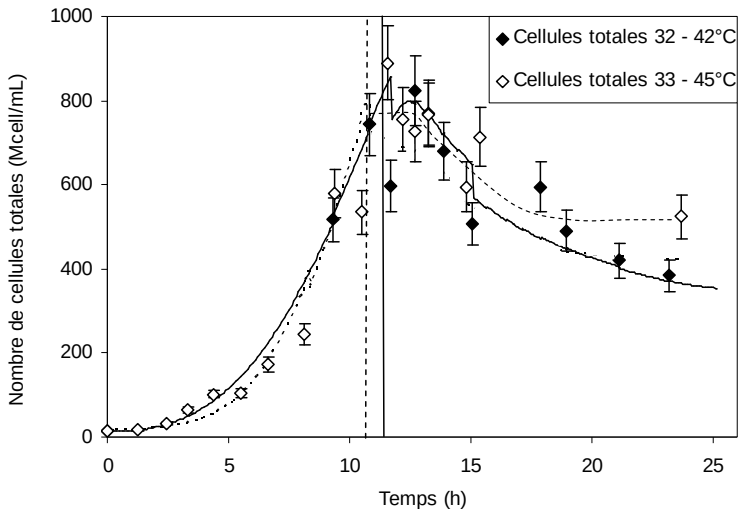


Figure 32. Evolution de la concentration en cellules totales (en million de cellules/mL) dénombrées par comptage pour la souche sauvage avec phase de croissance à 32°C ou 33°C puis choc thermique à 42°C (représenté par un trait plein) ou 45°C (représenté par un trait pointillé) en fonction du temps

Evolution de la biomasse viable

La biomasse viable est déterminée par dénombrement après coloration au bleu de méthylène et par suivi en ligne de la capacitance.

La présence des chocs de température entraîne une diminution nette de la concentration en cellules viables dénombrées après coloration au bleu de méthylène (Figure 33). Cette décroissance des cellules viables est immédiate après le changement de température à 45°C. L'élévation de température à 42°C affecte également la viabilité des levures mais de manière moins drastique qu'à 45°C.

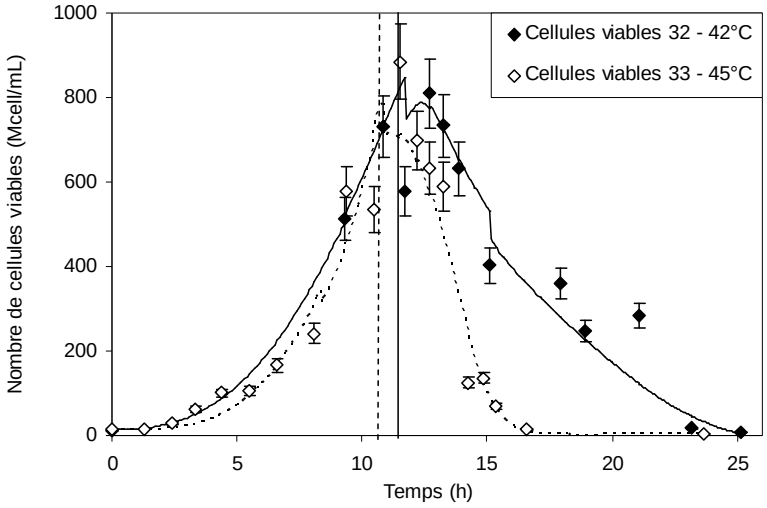


Figure 33. Evolution de la concentration en cellules viables (en million de cellules/mL) dénombrées par comptage pour la souche sauvage avec phase de croissance à 32°C ou 33°C puis choc thermique à 42°C (représenté par un trait plein) ou 45°C (représenté par un trait pointillé) en fonction du temps

D'autre part, la mesure en ligne de capacitance par la sonde biomasse permet de suivre la fraction de cellules dont la membrane est intègre et donc les cellules viables (cf. Chapitre II.3.1.3) (Tibayrenc *et al.* 2010). De plus, cet outil a l'avantage d'effectuer une analyse en ligne et fournit par sa fréquence élevée de mesure (intégration du signal toutes les 6 minutes) un profil continu de l'évolution des cellules viables dans le milieu, qui n'est pas accessible par le comptage cellulaire.

Bien que la sonde de capacitance donne un signal correspondant à la fraction de cellules viables, la valeur intrinsèque du signal peut être différente d'une culture à l'autre pour une même concentration en cellules viables. Aussi, pour pouvoir comparer les mesures de capacitances entre les cultures, les signaux sont normalisés par rapport à la valeur maximale obtenue pour chaque culture, selon la formule suivante :

$$\text{Signal}_{\text{sonde}}\ \text{normalisé} = \frac{\text{signal}_{\text{sonde}}\ \text{intantané}}{\text{signal}_{\text{sonde}}\ \text{max mesuré}} \qquad \textit{Équation 68}$$

Les mesures normalisées de capacitance obtenues pour les cultures à 32°C et 33°C avec une élévation de la température à 42°C et 45°C sont présentées Figure 34.

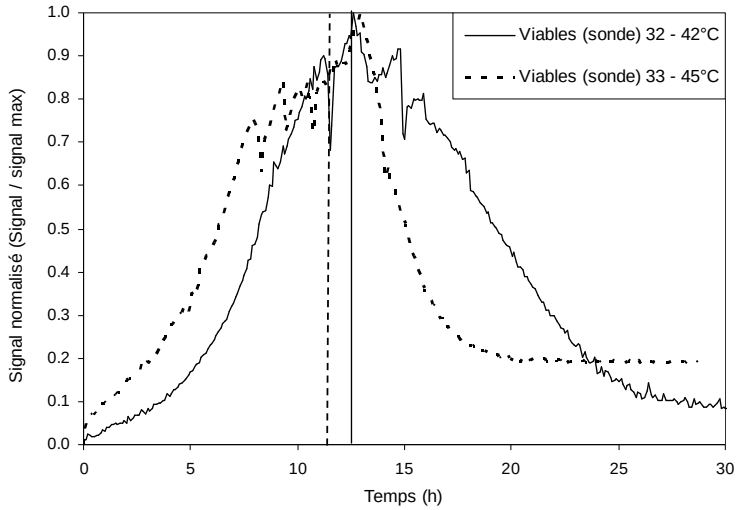


Figure 34. Signal normalisé de la sonde capacitive pour la souche sauvage avec phase de croissance à 32°C ou 33°C puis choc thermique à 42°C (représenté par un trait plein) ou 45°C (représenté par un trait pointillé) en fonction du temps en fonction du temps

Malgré une correction du signal par le volume de culture, une diminution du signal due aux ajouts de glucose est observable. Pour les deux cultures, une chute de la fraction de cellules viables est observée, cette diminution de viabilité traduite par la mesure de capacitance corrobore les résultats obtenus par le comptage cellulaire. De plus, ces résultats permettent également de voir l'impact beaucoup plus rapide du choc à 45°C sur la fraction de cellules viables que le choc à 42°C.

III.3.2.3 Taux de décès pour la fermentation à 32°C et 33°C avec un choc thermique à 42°C et 45°C

Taux de décès moyens à 42°C et 45°C

En supposant une décroissance logarithmique du nombre de cellules viables, le taux de décès moyen est calculé suivant cette expression :

$$k_{d\,moy} = \frac{\ln\left(\frac{X_{viable\ 1}}{X_{viable\ 2}}\right)}{t_2 - t_1} \quad \textit{Équation 69}$$

Le nombre de cellules viables est représenté en échelle semi-logarithmique afin d'obtenir un profil linéaire de perte des cellules viables (Figure 35), le taux de décès est calculé sur la pente de perte de cellules.

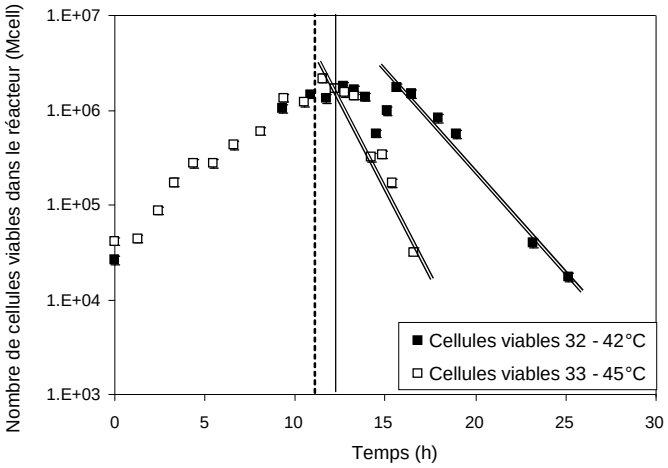


Figure 35. Représentation semi-logarithmique de l'évolution des cellules viables (en million de cellules) dénombrées par comptage pour la souche sauvage avec phase de croissance à 32°C ou 33°C puis choc thermique à 42°C (représenté par un trait plein) ou 45°C (représenté par un trait pointillé) en fonction du temps. La perte de cellules se fait selon un profil linéaire (double trait)

Les taux de décès moyens, correspondant aux pentes moyennes de perte de cellules obtenues, sont de 0,51 h^{-1} à 42°C et de 1 h^{-1} à 45°C (Tableau 12).

Tableau 12. Taux de décès moyens à 42°C et 45°C

	42°C	45°C
$k_{d\ moy}$ (h^{-1})	0,51 ± 0,03	1,00 ± 0,11

Taux de décès instantanés à 42°C et 45°C

L'évolution de la viabilité (Figure 36) déterminée d'après les dénombrements des cellules viables et mortes montre que pour les deux cultures, le choc thermique entraîne une chute importante de la viabilité. De plus, l'impact est beaucoup plus important sur les cellules ayant subit un choc à 45°C que pour celles ayant été exposées à une température de 42°C. En effet, 10 heures après le choc à 42°C, la viabilité est inférieure à 10%, alors que la même viabilité est atteinte dès 3,5 heures après le choc à 45°C.

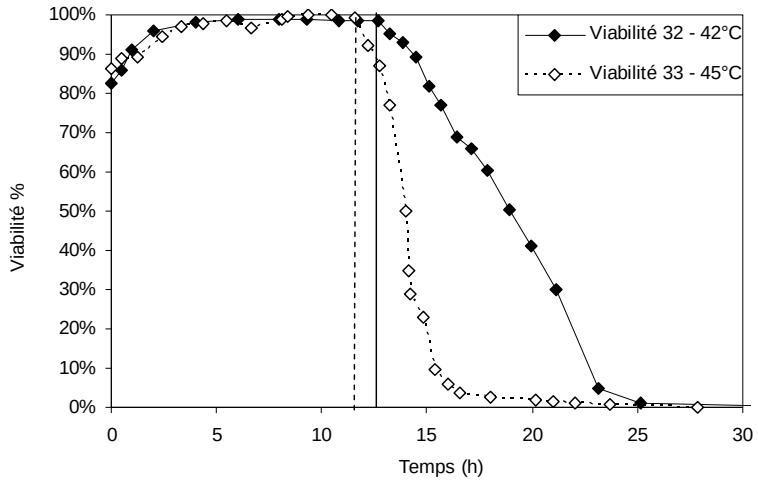


Figure 36. Pourcentage de viabilité de la souche sauvage en mode discontinu alimenté à 32°C ou 33°C puis choc thermique à 42°C (représenté par un trait plein) ou 45°C (représenté par un trait pointillé) en fonction du temps

La biomasse morte est déterminée par dénombrement après coloration au bleu de méthylène (Figure 37). Dès que les chocs thermiques sont appliqués, le nombre de cellules mortes augmente, quelle que soit la température et la biomasse morte s'accroît beaucoup plus rapidement après le choc à 45°C qu'à 42°C.

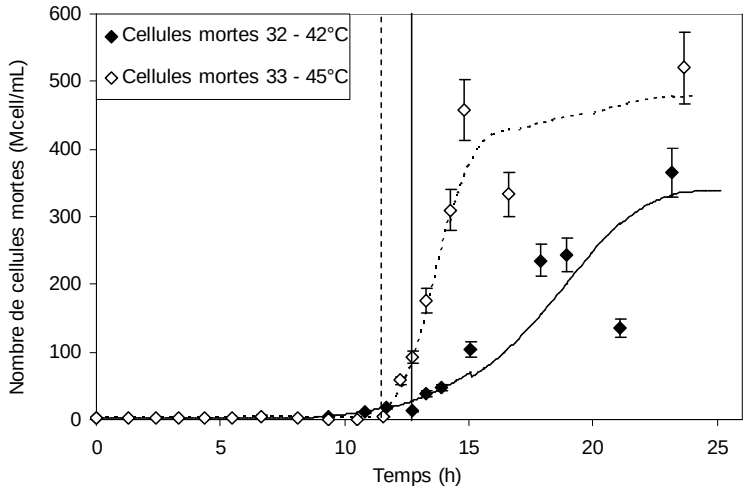


Figure 37. Evolution de la concentration en cellules mortes (en million de cellules/mL) dénombrées par comptage pour la souche sauvage avec phase de croissance à 32°C ou 33°C puis choc thermique à 42°C (représenté par un trait plein) ou 45°C (représenté par un trait pointillé) en fonction du temps

Le graphe suivant (Figure 38) présente le taux de décès induit par la température pour les fermentations à 32°C et 33°C avec une variation de la température à 42°C et 45°C.

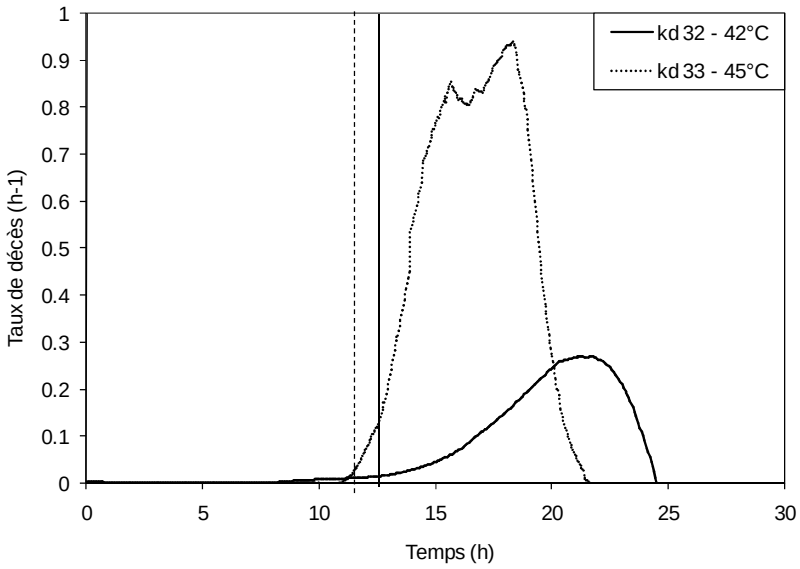


Figure 38. Taux de décès de la souche sauvage en mode discontinu alimenté à 32°C ou 33°C puis choc thermique à 42°C (représenté par un trait plein) ou 45°C (représenté par un trait pointillé) en fonction du temps

Pour la fermentation à 32°C avec une élévation de température à 42°C, l'évolution du taux de décès en fonction du temps (Figure 38) montre que le nombre de cellules mortes augmente peu pendant 3 heures, les cellules restent actives sur cette période et produisent encore 25 $g.L^{-1}$ d'éthanol. Le k_d augmente nettement 3 heures après le choc à 42°C pour atteindre un taux de décès instantané maximal de 0,27 h^{-1}. Puis une diminution causée par le ralentissement de la vitesse de décès est observée, le nombre de cellules mortes tendant vers le nombre de cellules totales. A 32°C, le taux de décès basal (k_d b) de la souche est compris entre 0 et 0,02 h^{-1}, soit une valeur moyenne de 0,01 h^{-1} ± 0,01 h^{-1}. Le taux de décès à 33°C est de 0,02 h^{-1} et est donc égal au taux de décès basal (k_d b) déterminé à 32°C. Par contre, lors du passage à 45°C le k_d augmente très rapidement, ce qui traduit un décès immédiat des cellules jusqu'à une valeur maximale de 0,94 h^{-1}, atteinte après 18 heures de culture, soit 6,5 heures après le choc thermique.

III.3.2.4 Détermination du taux de décès induit par la température

Détermination des taux de décès à différentes températures pour la souche sauvage

Au vu des résultats précédents, le taux de décès basal (k_d b) a été déterminé pour les cultures à 32°C et 33°C entre 0 et 0,02 h^{-1}, sa valeur est donc fixée à 0,01 h^{-1} ± 0,01 h^{-1} pour la souche sauvage.

Les taux de décès moyens et instantanés ont été déterminés à 42°C et 45°C (Tableau 13). Les k_d moyens sont calculés sur la perte de cellules viables et les k_d instantanés dépendent à la fois

du taux de croissance et de la vitesse d'apparition des cellules mortes. Une valeur de taux de décès moyen et instantané à 37°C a pu être obtenue sur une fermentation de référence réalisée en mode discontinu alimenté en isotherme à 37°C, cette culture est détaillée dans la partie suivante (III.3.3).

Tableau 13. Taux de décès moyens et instantanés (maximal) de 32°C à 45°C

	32°C	33°C	37°C	42°C	45°C
$k_{d\ moy}$ (h^{-1})	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,120 ± 0,004	0,51 ± 0,03	1,00 ± 0,01
$k_{d\ inst}$ (h^{-1})	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,124	0,27	0,94

Comme attendu, les taux de décès moyens et instantanés augmentent avec la température. Selon la méthode de calcul utilisée les valeurs sont légèrement différentes. Cela est dû aux valeurs expérimentales choisies et à leur incertitude associée. L'ordre de grandeur reste correct. Une étude de sensibilité sur le modèle dynamique permettra d'en mesurer l'impact.

Par ailleurs, d'autres cultures à 30, 32, 33 et 34°C avec des chocs thermiques respectivement à 39, 42, 45 et 47°C ont été réalisées (graphes non présentés) pour compléter les données de taux de décès en fonction de la température. Les taux de décès moyens déterminés sur les cellules viables sont les suivants (Tableau 14) :

Tableau 14. Taux de décès moyens à 39°C, 42°C, 45°C et 47°C

	39°C	42°C	45°C	47°C
$k_{d\ moy}$ (h^{-1})	0,34 ± 0,04	0,590 ± 0,008	0,92 ± 0,09	1,05 ± 0,09

Taux de décès issus de la littérature pour différentes températures

Peu de travaux définisent des taux de décès pour différentes températures, seules quelques valeurs de k_d en fonction de la température ont pu être trouvées dans la littérature pour différentes souches de *Saccharomyces cerevisiae* (Tableau 15) (Ling *et al.* 1995; Oliveira *et al.* 1999; Phisalaphong *et al.* 2006).

Tableau 15. Taux de décès à 30°C, 33°C, 35°C et 39°C issus de la littérature

	Taux de décès k_d (h^{-1})		
Température (°C)	Ling *et al.* (1995)	Oliveira *et al.* (1999)	Phisalaphong *et al.* (2006)
30	0,021	0,0048	0,0009
33	0,038	-	0,0013
35	0,13	-	0,0018
39	-	-	0,005
42	-	-	0,01

Les valeurs de k_d données par Oliveira *et al.* (1999) et Phisalaphong *et al.* (2006) sont plus faibles que celles déterminées dans nos conditions respectivement d'un facteur 2 et 10 à 100. Les valeurs déterminées par Ling *et al.* (1995) sont quant à elles plus élevées d'un facteur 2 à 3. Les différences observées entre les valeurs de kd calculées à partir des fermentations en mode fed-batch avec chocs thermiques et les valeurs trouvées dans la littérature peuvent être expliquées en partie par les conditions de culture employées par les différents auteurs. Les cultures réalisées par Ling *et al.* (1995) et Phisalaphong *et al.* (2006) ont été mises en œuvre en isotherme en mode batch alors qu'Oliveira *et al.* (1999) ont travaillé en mode continu avec recyclage cellulaire.

Détermination des paramètres caractérisant le k_d en fonction de la température : température au point d'inflexion, pente, et taux de décès maximal induit par la température

Les valeurs des taux de décès obtenues sont tracées en fonction de la température. L'allure obtenue peut être modélisée par une fonction sigmoïde représentant l'évolution du taux de décès en fonction de la température. Cette fonction est paramétrée en introduisant un taux de décès basal (k_d b) et maximal induit par la température (k_d t), une température au point d'inflexion (tpc) et une pente.

$$k_d = k_d\ b + \frac{k_d\ t}{1 + e^{(-(T - tpc) * pente)}} \quad \textbf{\textit{Équation 70}}$$

A partir des k_d moyens issus de nos résultats expérimentaux, des k_d de Ling *et al.* (1995) et connaissant le taux de décès basal (k_d b en h^{-1}), il est possible d'estimer la température au point d'inflexion (tpc en °C), la pente (en $°C^{-1}.h^{-1}$) et le taux de décès maximal dû à la température (k_d t en h^{-1}).

La méthode de minimisation du critère des moindres carrés est utilisée pour l'identification des paramètres tpc, pente et k_d t et consiste à minimiser la somme des carrés des écarts entre la valeur estimée et la valeur mesurée. Le carré de l'écart est utilisé pour éviter la compensation des écarts positifs et négatifs. Les valeurs sont déterminées de telle sorte que le modèle rende compte au mieux des valeurs expérimentales de k_d et servent d'initialisation à la minimisation de la somme des carrés des écarts (somme de $(k_d\ exp - k_d)^2$).

L'évolution du taux de décès estimé en fonction de la température est représentée sur le graphe suivant (Figure 39), les paramètres entrant dans l'expression du k_d sont déduits du k_d simulé.

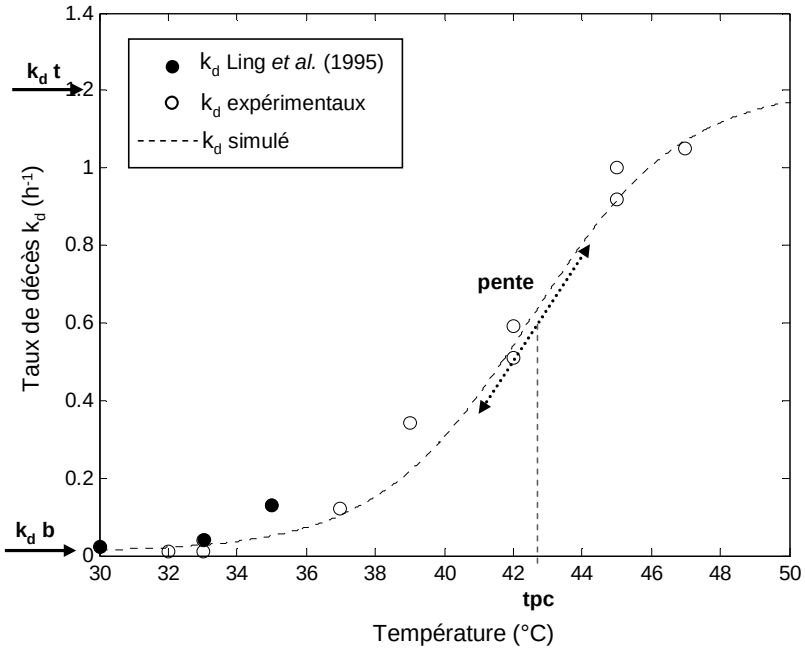


Figure 39. Représentation du taux de décès de la souche sauvage en fonction de la température. Les k_d expérimentaux sont représentés par des cercles vides (○), les kd issus de la littérature (Ling et al. 1995) sont représentés par des cercles pleins (●), et le k_d estimé est représenté par la courbe en pointillés

Les valeurs des paramètres obtenues sont intégrées dans le modèle cinétique pour décrire l'évolution du kd induit par la température pour la souche sauvage utilisée dans cette étude.

$$k_d = k_d\ b + \frac{k_d\ t}{1 + e^{(-(T - tpc) * pente)}}$$

avec : $k_d\ b = 0{,}01\ h^{-1}$
$k_d\ t = 1{,}2\ h^{-1}$
$tpc = 42{,}5°C$
$pente = 0{,}449\ °C^{-1}.h^{-1}$

Taux de décès induits par la température (k_d) pour la souche sauvage et la souche « mutante » : les paramètres

Les valeurs des paramètres définissant le taux de décès induit par la température ont été calculées pour la souche sauvage. Le modèle cinétique intègre ces mêmes paramètres pour la souche mutante, or il n'est pas possible de les déterminer a priori expérimentalement. Ces paramètres sont donc choisis en fonction de ceux déterminés pour la souche sauvage (Tableau 16), de manière à ce que pour une température donnée le taux de décès du mutant soit inférieur à celui de la souche sauvage.

La valeur du taux de décès basal (k_d b) est fixée à $0{,}01\ h^{-1} \pm 0{,}01\ h^{-1}$ pour la souche sauvage et la même valeur est donnée au mutant tolérant. Le taux de décès maximal induit par la

température de la souche sauvage (k_d t) est issu de l'estimation et est fixé à 1,2 h^{-1}, celui du mutant est choisi égal.

De plus, les fermentations avec chocs de température ont mis en évidence que 45°C était une température induisant un arrêt immédiat de la croissance et un décès quasi-instantané des cellules, contrairement aux effets observés à 42°C où la perte de viabilité est importante mais plus lente après le choc thermique. La température de 42°C étant moins sélective, 45°C sera donc choisie comme température de choc pour le chémostat d'obtention de variants et interviendra dans le modèle cinétique (T_{max}). La température au point d'inflexion choisie pour la souche « mutante » susceptible d'avoir acquis une meilleure « résistance » à ce facteur et donc « mourant » moins vite à cette température de sélection sera de 44°C (au lieu de 42,5°C estimé pour la souche sauvage).

De même, la pente traduisant cette tolérance sera prise plus faible que pour la souche sauvage (0,4 $°C^{-1}.h^{-1}$ contre 0,449 $°C^{-1}.h^{-1}$) pour paramétrer la dynamique du mutant.

Tableau 16. Paramètres définissant le taux de décès en fonction de la température, déterminés pour la souche sauvage et estimés pour la souche « mutante »

Souche sauvage		Souche mutante	
k_d b (h^{-1})	0,01 ± 0,01	k_d b_m (h^{-1})	0,01 ± 0,01
k_d t (h^{-1})	1,2	k_d t_m (h^{-1})	1,2
tpc (°C)	42,5	tpc_m (°C)	44
pente ($°C^{-1}.h^{-1}$)	0,449	$pente_m$ ($°C^{-1}.h^{-1}$)	0,4
T_{min}	33	T_{min}	33
T_{max}	45	T_{max}	45

A partir de ces valeurs, l'évolution du taux de décès en fonction de la température est calculée pour chaque souche et représentée sur le graphe suivant (Figure 40).

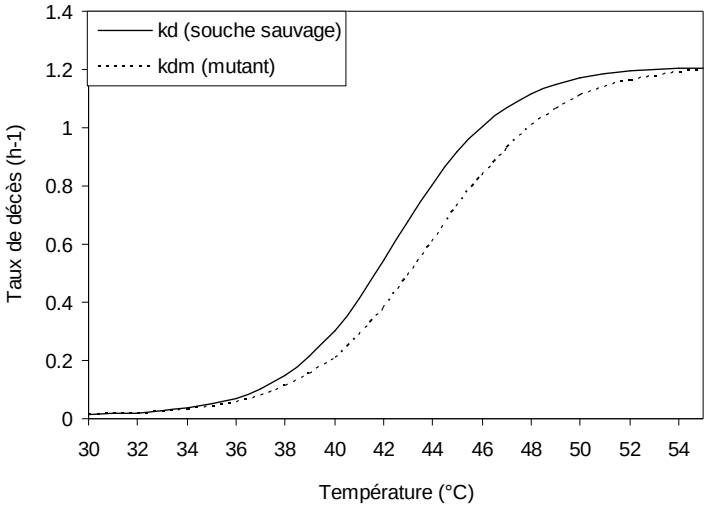


Figure 40. Représentation du taux de décès de la souche sauvage et du mutant tolérant en fonction de la température

En conclusion, la température et les élévations de température affectent les cinétiques de croissance et de production et altèrent drastiquement la viabilité cellulaire et la cultivabilité. La température induit également du décès cellulaire et le k_d augmente avec la température selon un profil sigmoïdal. Pour paramétrer la cinétique de décès dans le modèle, les paramètres définissant le décès ont été estimés pour la souche sauvage à partir de nos résultats expérimentaux et ont été « choisis » pour la souche mutante. Pour mémoire ce modèle rend compte de la stratégie et des phénomènes « imaginés » dans cette étude.

III.3.3 Obtention des taux de décès induits par l'exposition des cellules à un rayonnement UV (k_{dmut})

L'évolution naturelle des micro-organismes est un phénomène lent, qui peut être accéléré par l'exposition aux UV, d'où l'utilisation d'un chémostat couplé à une mutagénèse aux UV. Cependant en plus de leur rôle mutagène (Resnick 1969; Witkin 1969), les UV ont un effet sur les cinétiques de la levure, altèrent ses performances (James and Nasim 1987) et entrainent du décès cellulaire (Del Carratore *et al.* 2002; Burhans *et al.* 2003). Il est donc nécessaire de caractériser ce phénomène de décès qui interviendra dans l'obtention d'un mutant plus robuste au stress température que la souche sauvage. Les paramètres obtenus seront intégrés au modèle cinétique afin d'ajuster les profils d'apparition de mutants.

Des cultures de *Saccharomyces cerevisiae* ont été réalisées en mode discontinu alimenté en isotherme à 37°C sans limitation en oxygène, pour déterminer l'impact des UV sur les cinétiques de croissance, de production et surtout de décès de la souche sauvage. Différentes puissances d'irradiation des cellules ont été testées et les résultats obtenus sont comparés à ceux d'une culture de référence à 37°C sans exposition aux UV. Les cinétiques de croissance et de décès cellulaire ont été établies afin d'obtenir les constantes de décès induites par la mutagénèse et de les intégrer au modèle développé.

Les levures sont exposées aux UV lors de leur passage dans une cuve en quartz installée sur une boucle de recirculation externe au réacteur. L'impact du débit dans la boucle de recirculation et donc du passage devant les UV a été testé en fioles d'erlenmeyer afin d'avoir un volume réduit et donc une exposition aux UV importante (durée et fréquence). Plusieurs débits ont été testés (60, 130 et 200 $mL.h^{-1}$) et le débit de 130 $mL.h^{-1}$ a été choisi comme débit de recirculation du chémostat d'adaptation. Le volume de la cuve en quartz (réacteur 2) étant de 3,2 mL, la durée d'exposition des cellules aux UV sera de 1,5 minute (89 secondes).

III.3.3.1 Etude de l'influence de la puissance d'exposition aux UV

La puissance (en Watt) est l'énergie (en joules) délivrée par unité de temps (1 W = 1 $J.s^{-1}$). La puissance donnée par le constructeur pour la lampe UV utilisée est de 7$mW.cm^{-2}$ (70 $W.m^{-2}$ ou 70 $J.m^{-2}.s^{-1}$) à 254 nm (longueur d'onde permettant la mutagénèse).

Différentes puissances ont été testées en cultures discontinues alimentées. La puissance d'exposition des UV est modulée par variation de la distance source UV/cellules (cuve en quartz). Des distances de 2,25 cm et 9 cm ont été utilisées. Grâce à un puissance-mètre, la puissance reçue (en $mW.cm^{-2}$) est mesurée après la cuve en quartz lorsque celle-ci est remplie de milieu salin non inoculé ou d'une culture contenant $1,5.10^8$ $cellules.mL^{-1}$ (Tableau 17). La mesure sur le milieu seul permet de s'affranchir de la puissance absorbée par celui-ci.

Tableau 17. Puissance de radiations UV mesurée après la cuve en quartz en fonction de la distance source UV/ cellules et de la concentration cellulaire

	Puissance ($mW.cm^{-2}$)	
Distance UV-levures	2,25 cm	9 cm
0 $cellules.mL^{-1}$ (DO = 0)	**2.52**	**0.57**
$1,5.10^8$ $cellules.mL^{-1}$ (DO = 4)	0.14	0.04

DO mesurée dans une cuve de 2 mm de trajet optique à 620 nm

Sans levures, diviser la distance source UV/cellules par 4, revient à multiplier la puissance reçue par 4,5.

Le graphe suivant présente la puissance reçue, après la cuve en quartz, en fonction de la concentration en cellules dans la cuve pour les deux distances de la source UV testées (2,25 cm et 9 cm) (Figure 41). Cinq concentrations cellulaires, comprises entre 0 et $1,5.10^8$ $cellules.mL^{-1}$, ont été utilisées.

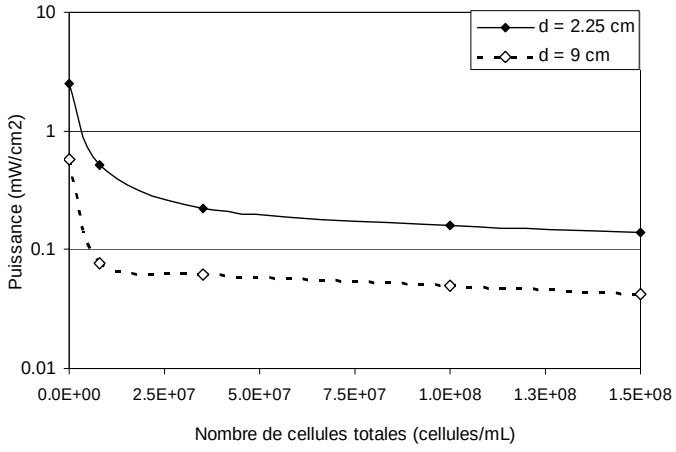


Figure 41. Puissance reçue (en $W.m^{-2}$), après la cuve en quartz, à une distance de 2,25 cm et 9 cm de la source UV en fonction de la concentration en cellules dans la cuve (en $cellules.mL^{-1}$)

La puissance mesurée après la cuve en quartz diminue de façon exponentielle en fonction de la concentration en cellules. Ceci montre une absorption des rayonnements UV par les levures pouvant supposer d'éventuelles apparitions de mutations. A une concentration de $1{,}5.10^{8}$ cellules.mL^{-1}, la puissance absorbée par les cellules à 2,25 cm est de 2,38 mW.cm^{-2} (94,5 %) et de 0,53 mW.cm^{-2} (92,6 %) à 9 cm.

À 2,25 cm de distance source UV/cellules, la puissance reçue est de 2,52 mW.cm^{-2} soit 25,2 W.m^{-2} ou 25,2 J.m^{-2}.s^{-1}. Le temps de séjour dans la cuve en quartz de 3,2 mL est de 89 secondes à un débit de 130 mL.h^{-1}, ce qui correspond à leur temps de contact avec les rayonnements UV. En passant dans la cuve les cellules sont donc exposées à une dose de 2215 J.m^{-2}.

À 9 cm de distance source UV/cellules, la puissance reçue est de 0,57 mW.cm^{-2} soit 5,7 W.m^{-2} ou 5,7 J.m^{-2}.s^{-1}, soit une dose totale de 505 J.m^{-2} en 89 secondes.

Les cultures réalisées à une distance de la source UV de 2,25 cm et 9 cm seront donc exposées respectivement à une puissance d'environ 25 W.m^{-2} et 6 W.m^{-2}.

Dans la littérature, les cellules sont irradiées à des puissances comprises entre 0,1 W.m^{-2} et 5 W.m^{-2} (Kelner 1949; Patrick and Haynes 1964; Resnick and Setlow 1972; Torres-Ramos *et al.* 2002). L'irradiation se fait à une distance source UV/échantillon de 20 à 30 cm généralement, en boite de pétri (en milieu liquide – 0,9% (w/v) NaCl). Dans le pilote, la source UV utilisée fournit une puissance supérieure due à la proximité de la lampe par rapport à la cuve en quartz exposée, 6 W.m^{-2} à 9 cm et 25 W.m^{-2} à 2,25 cm. Une telle puissance est nécessaire vu que l'ensemble de la population n'est pas exposé en même temps, le volume de la cuve en quartz représente seulement 0,3% du réacteur et 7,7 heures de temps de séjour sont nécessaires à l'irradiation complète du volume total de culture.

III.3.3.2 Analyse des paramètres cinétiques des fermentations à 37°C sans et avec exposition aux UV

Les graphes suivants présentent l'évolution des taux de croissance des fermentations en fonction du temps (Figure 42 (a)) et de la concentration en éthanol dans le milieu (Figure 42 (b)).

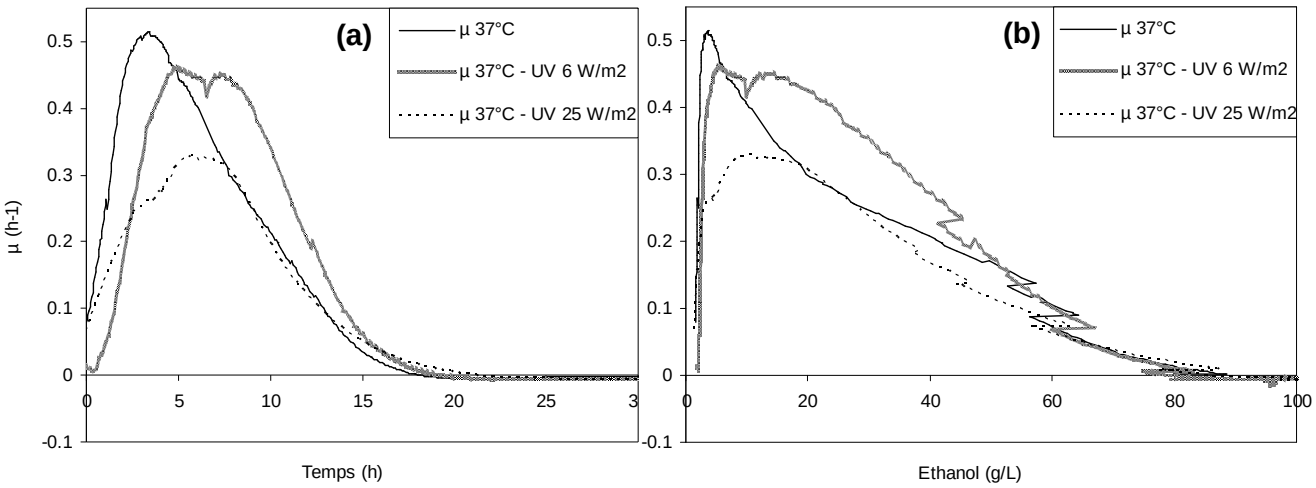


Figure 42. Taux de croissance apparent de la souche sauvage en mode discontinu alimenté à 37°C sans et avec exposition aux UV (6 et 25 W.m^{-2}) en fonction du temps (a) et en fonction de la concentration en éthanol dans le milieu (b)

L'évolution des taux de croissance des trois cultures (Figure 42 (a)) montre que l'exposition aux UV entraîne une diminution du taux de croissance maximal des levures. Plus la source est proche, plus la puissance d'irradiation est intense et plus le taux de croissance diminue. En effet, le taux de croissance maximal est de 0,5 h^{-1} à 37°C sans UV, de 0,45 h^{-1} avec une exposition aux UV à une puissance de 6 W.m^{-2} et de 0,33 h^{-1} à une puissance de 25 W.m^{-2}. La phase de croissance s'arrête à 18,3 heures pour la culture à 37°C et à 19,3 heures et 21,2 heures avec une exposition à une puissance de 6 et 25 W.m^{-2} respectivement. La croissance qui est ralentie lors d'une exposition aux UV se prolonge donc quelques heures alors qu'elle est stoppée pour la culture de référence non exposée. Par ailleurs, la tolérance à l'éthanol est peu affectée (Figure 42 (b)) puisque la concentration critique en éthanol, concentration pour laquelle la croissance s'arrête, est de 88,5 g.L^{-1}, 83 g.L^{-1} et 87 g.L^{-1} respectivement pour la fermentation à 37°C sans UV, et avec une irradiation UV à une puissance de 6 et 25 W.m^{-2}.

La production d'éthanol est également affectée (Figure 43). Pour la souche sauvage à 37°C, la production d'éthanol est proportionnelle à la consommation en glucose. Par contre, avec une exposition aux UV, moins d'éthanol est produit pour le même avancement de réaction.

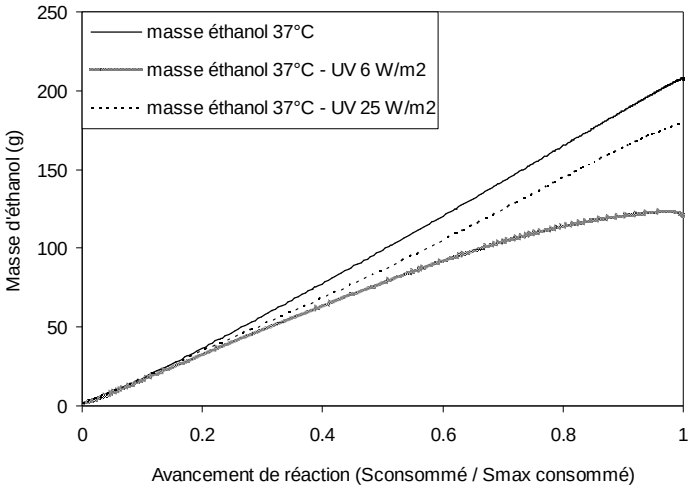


Figure 43. Masse d'éthanol produite en fonction de l'avancement de la réaction (fraction de substrat consommé) en mode discontinu alimenté à 37°C sans et avec exposition aux UV (6 et 25 W.m^{-2})

III.3.3.3 Analyse des sous populations cellulaires lors des cultures à 37°C sans et avec exposition aux UV

Evolution de la biomasse totale

Le graphe suivant (Figure 44) représente l'évolution de la biomasse totale déterminée par comptage cellulaire.

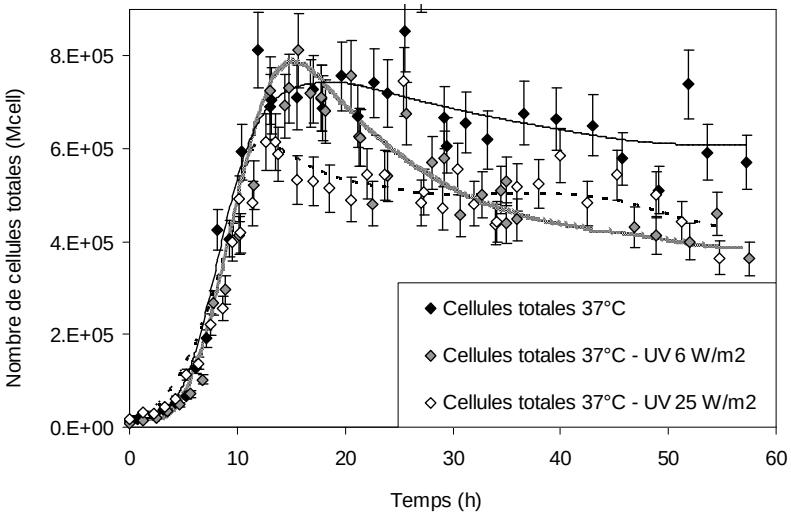


Figure 44. Evolution des cellules totales (en million de cellules) dénombrées par comptage pour la souche sauvage à 37°C sans (trait plein) et avec exposition aux UV à une puissance de 6 W.m^{-2} (trait épais) ou 25 W.m^{-2} (trait pointillé) en fonction du temps

En fonction du temps, l'évolution du nombre de cellules totales montre un effet des UV. A 37°C le nombre de cellules est constant après 12 heures de cultures, par contre avec une exposition aux UV une diminution du nombre de cellules totales est observé ce qui traduit une lyse des levures. De plus, le nombre de cellules totales produites lors d'une puissance d'UV de 25 $W.m^{-2}$ est plus faible que sans la présence d'UV (6.10^5 au lieu de $7{,}5.10^5$ millions de cellules totales). L'exposition à une puissance de 25 $W.m^{-2}$ a un impact immédiat par rapport à une puissance de 6 $W.m^{-2}$, avec la génération d'un nombre plus faible de cellules qui traduit des problèmes plus présents au niveau du cycle cellulaire. Par contre, il existe un effet à plus long terme de la puissance la plus faible (6 $W.m^{-2}$) qui provoque une lyse cellulaire plus importante que celle observée pour la culture de référence. L'exposition aux UV des cellules entraîne donc une diminution de la production de biomasse totale (à 25 $W.m^{-2}$) et une lyse cellulaire (à 6 et 25 $W.m^{-2}$).

Evolution de la biomasse viable

La biomasse viable est déterminée à la fois par dénombrement après coloration au bleu de méthylène (Figure 45) et par mesure en-ligne de la capacitance (Figure 46).

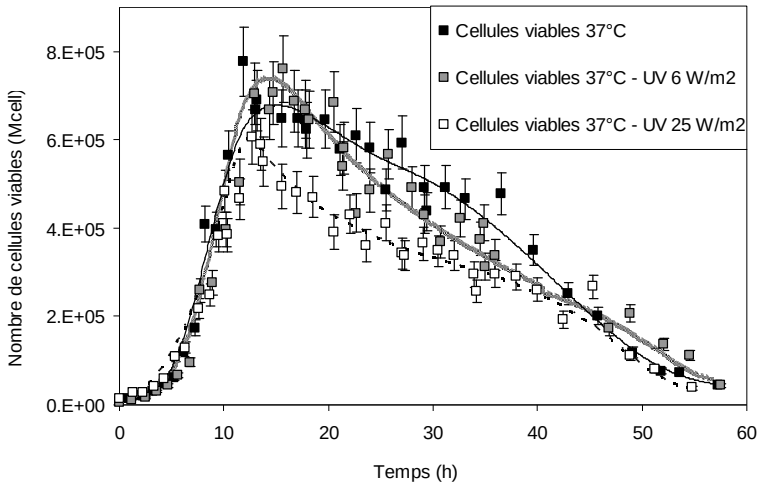


Figure 45. Evolution des cellules viables (en million de cellules) dénombrées par comptage pour la souche sauvage à 37°C sans (trait plein) et avec exposition aux UV à une puissance de 6 $W.m^{-2}$ (trait épais) ou 25 $W.m^{-2}$ (trait pointillé) en fonction du temps

L'exposition des levures à une puissance de radiations UV de 25 $W.m^{-2}$, la puissance la plus élevée testée, conduit à une diminution du nombre total de cellules viables dans le réacteur par rapport à la culture de référence sans UV (Figure 45). Ce nombre réduit de cellules est dû au fait qu'en présence d'UV (25 $W.m^{-2}$) le nombre de cellules totales est plus faible. De plus, à cette même puissance d'exposition, le signal normalisé de capacitance (Figure 46) décroit plus tôt, ce qui montre un impact important des UV sur la fraction de cellules viables.

Par contre les cultures sans UV et avec une exposition aux UV à une puissance plus faible de 6 $W.m^{-2}$ ont des profils similaires de nombre de cellules viables obtenus par comptage. Au niveau de la capacitance, les profils sont superposables jusqu'à 35 heures puis le signal traduit un meilleur maintien des cellules viables à une puissance d'irradiation de 6 $W.m^{-2}$ que pour les cellules non exposées. Ceci doit être dû à un faible ralentissement de la fermentation observé en présence d'UV.

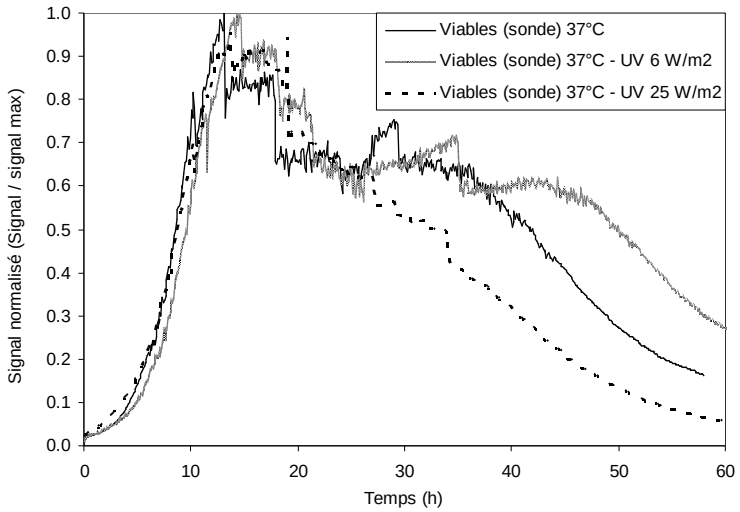


Figure 46. Signal normalisé de la sonde capacitive pour la souche sauvage à 37°C sans (trait plein) et avec exposition aux UV à une puissance de 6 $W.m^{-2}$ (trait épais) ou 25 $W.m^{-2}$ (trait pointillé) en fonction du temps

La superposition des mesures normalisées de capacitance obtenues pour les 3 cultures montre que jusqu'à 25 heures, les profils normalisés d'évolution de la fraction viable sont superposables (Figure 46). Une diminution du signal due à une dilution du milieu lors des ajouts de glucose est observable malgré la correction par le volume de culture. Comme pour l'analyse issue des comptages, les dynamiques de perte de viabilité semblent identiques mais les nombres de cellules viables sont affectés (signaux plus faibles lorsque la puissance UV augmente).

Evolution de la biomasse cultivable

La biomasse cultivable correspond au nombre de cellules isolées et dénombrées sur milieu solide, ramené en million de cellules cultivables totales (Figure 47).

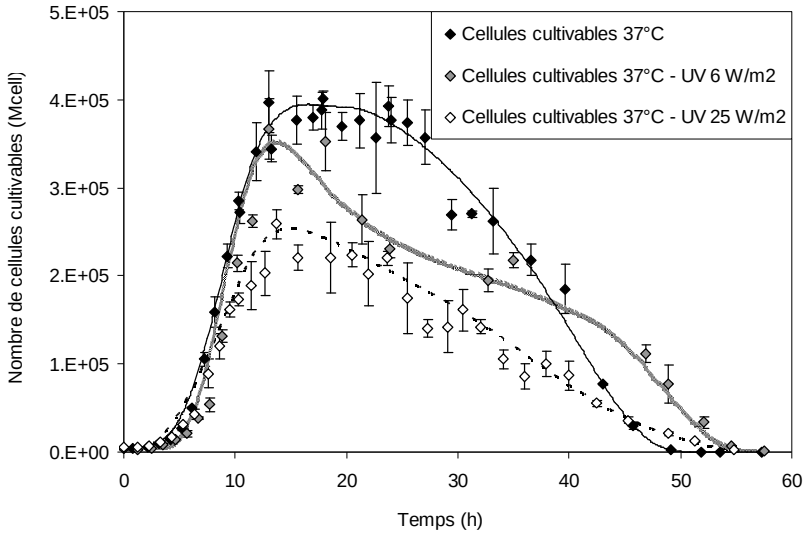


Figure 47. Evolution des cellules cultivables (en million de cellules) dénombrées sur milieu solide pour la souche sauvage à 37°C sans (trait plein) et avec exposition aux UV à une puissance de 6 W.m^{-2} (trait épais) ou 25 W.m^{-2} (trait pointillé) en fonction du temps

Sans UV, le nombre de cellules cultivables atteint 4.10^5 millions de cellules, lorsque les cellules sont exposées à une puissance d'UV de 6 W.m^{-2} le nombre de cellules est du même ordre de grandeur avec 3,5.10^5 millions et lorsque la puissance des UV est de 25 W.m^{-2} il est seulement de 2,5.10^5 millions. Les UV affectent donc de façon drastique la cultivabilité des cellules. En plus du maximum atteint les profils sont différents, sans UV le nombre maximal de cellules cultivables se maintient plus de 10 heures alors qu'en présence d'UV ce nombre chute immédiatement.

A notre connaissance, aucun résultat de l'effet des UV sur la cultivabilité des cellules n'est disponible dans la littérature. Ces résultats renvoient à l'effet même des UV au niveau du cycle cellulaire qui n'a pas pu être exploré faute de temps et est hors des objectifs initiaux de ces travaux.

Evolution de la biomasse morte

Le nombre de cellules mortes augmente dès 8 heures de culture quelles que soient les conditions de mise en œuvre (Figure 48).

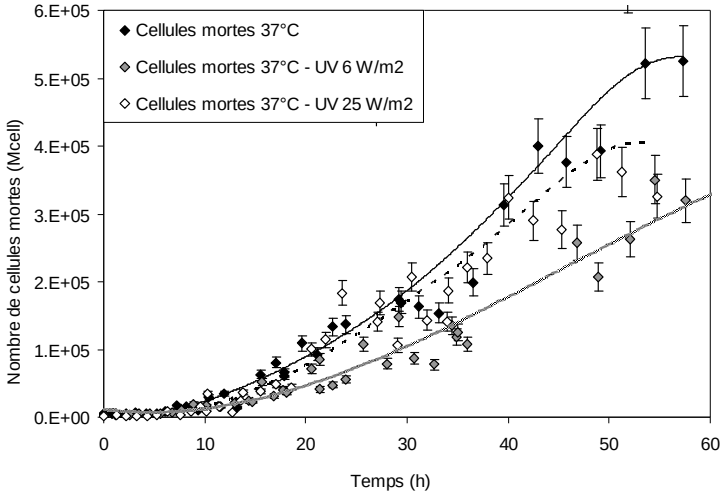


Figure 48. Evolution des cellules mortes (en million de cellules) dénombrées par comptage pour la souche sauvage à 37°C sans (trait plein) et avec exposition aux UV à une puissance de 6 W.m^{-2} (trait épais) ou 25 W.m^{-2} (trait pointillé) en fonction du temps

Néanmoins, le nombre de cellules mortes n'est pas plus important lors des expositions aux UV que pour la culture de référence. En effet, le nombre de cellules mortes est quasiment deux fois plus élevé en fin de culture sans UV qu'avec une exposition aux UV à une puissance de 6 W.m^{-2} alors que le nombre de cellules totales est proche pour ces deux cultures. L'impact majeur des UV semble donc intervenir exclusivement sur le phénomène de croissance et affecte principalement la cultivabilité réduisant ainsi le taux de croissance et donc le nombre de cellules totales ou viables possible. Les UV n'entrainent pas de décès supplémentaire au décès « naturel » observable pour une culture de référence.

III.3.3.4 Taux de décès des fermentations à 37°C sans et avec exposition aux UV

Taux de décès moyens à 37°C sans et avec exposition aux UV

Les taux de décès moyens sont calculés sur les cellules viables, sur la phase de perte de viabilité, pour les fermentations à 37°C sans et avec exposition aux UV (Tableau 18).

Tableau 18. Taux de décès moyens à 37°C sur des cultures exposées à différentes puissance d'UV (0, 6 et 25 W.m-2)

	37°C sans UV	37°C – UV 6 W.m^{-2}	37°C – UV 25 W.m^{-2}
$k_{d\ moy}$ (h^{-1})	0,120 ± 0,004	0,090 ± 0,008	0,11 ± 0,01

Le k_d n'augmente pas avec l'exposition aux UV. Les k_d moyens avec UV sont proches du k_d à 37°C sans UV. L'évolution du nombre de cellules mortes a montré qu'il n'y a pas plus de biomasse morte en présence d'UV ce qui explique qu'il n'y ait pas plus de décès que le décès naturel induit principalement par l'éthanol.

Taux de décès instantanés à 37°C sans et avec exposition aux UV

D'après un bilan matière sur les cellules mortes, le taux de décès instantané est obtenu par l'expression :

$$k_d = \frac{1}{X_{viable}} \frac{d X_{morte}}{dt} \qquad \textit{Équation 71}$$

Comme pour les taux de décès moyens, l'évolution des taux de décès instantanés (Figure 49) montre des profils relativement proches entre la culture de référence à 37°C sans exposition aux UV et celles avec UV. Jusqu'à 40 heures de culture, le k_d des cellules exposées à une puissance de 25 $W.m^{-2}$ est légèrement supérieur aux autres, par contre, au delà de 40 heures, alors que les phases de production sont terminées, le k_d le plus élevé est observé pour la culture sans UV. Le k_d maximal obtenu à 37°C est de 0,124 h^{-1}. L'exposition aux UV ne semble pas avoir d'impact sur le taux de décès de la souche.

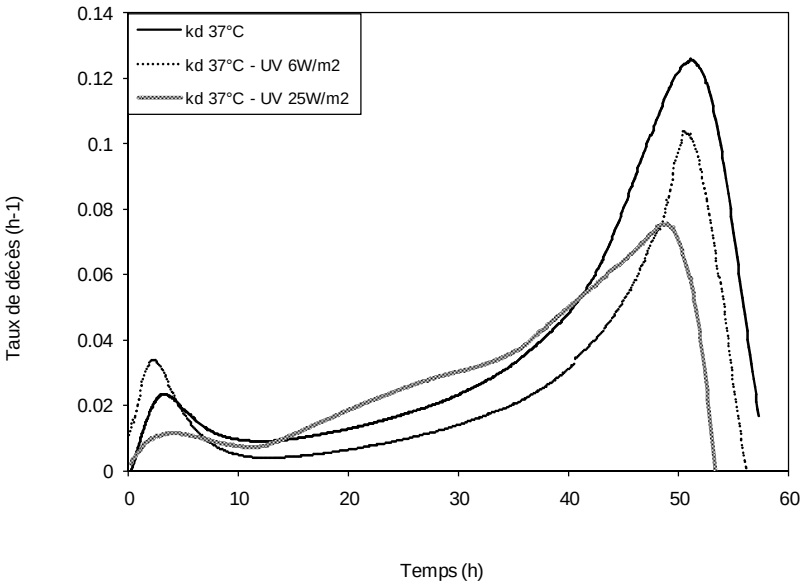


Figure 49. Taux de décès de la souche sauvage en mode discontinu alimenté sans et avec exposition aux UV (puissance de 6 et 25 $W.m^{-2}$) en fonction du temps

Le graphe des taux de décès en fonction de la concentration en éthanol dans le réacteur (Figure 50) met en évidence que les UV accentuent l'impact de l'éthanol sur le décès cellulaire. En présence d'UV le décès maximal survient à une concentration en éthanol un peu plus faible, 95 $g.L^{-1}$ à une puissance de 6 $W.m^{-2}$ et 103 $g.L^{-1}$ à 25 $W.m^{-2}$, contre 105 $g.L^{-1}$ sans UV. Par contre,

jusqu'à 85 $g.L^{-1}$ d'éthanol le taux de décès est compris entre 0 et 0,02 h^{-1} qu'il y ait une exposition aux UV ou non, il est donc égal au taux de décès basal moyen de 0,01 h^{-1} ± 0, 01 h^{-1}. Le taux de décès induit par les UV est éthanol dépendant, à 50 $g.L^{-1}$ d'éthanol le k_d est égal au k_d basal, il n'y a donc pas d'effet des UV sur le taux de décès à 50 $g.L^{-1}$ d'éthanol, concentration de fonctionnement du chémostat. Les k_d instantanés ne montrent pas de décès dû à l'irradiation UV.

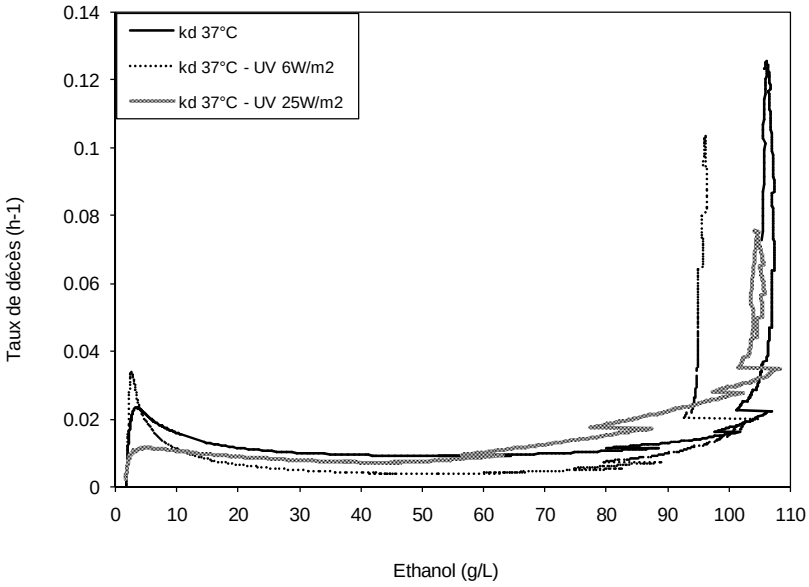


Figure 50. Taux de décès de la souche sauvage en mode discontinu alimenté sans et avec exposition aux UV (puissance de 6 et 25 $W.m^{-2}$) en fonction de la concentration en éthanol

Dans la configuration du pilote utilisée, avec une exposition des cellules aux UV au niveau du réacteur 2, le taux de décès induit par les radiations UV (k_{dmut}) sera considéré négligeable face au décès basal de la souche (k_d b) et prendra comme valeur zéro dans le modèle cinétique.

En conclusion, l'irradiation des levures aux UV affecte principalement le taux de croissance, la production d'éthanol et les populations cellulaires. Les cellules totales, viables et cultivables sont touchées et l'effet est d'autant plus important que la puissance des UV est élevée. Le nombre de cellules totales et viables est diminué de 25% et 20% à 25 $W.m^{-2}$ et le nombre de cellules cultivables est diminué de 12% à 6 $W.m^{-2}$ et de 37% à 25 $W.m^{-2}$. Par contre, aux puissances testées, les UV n'affectent pas le taux de décès ou le nombre de cellules mortes, puisque les maximums sont atteints pour la culture sans exposition aux UV, soit pour un décès « naturel » des levures.

III.4 Résultats des simulations du chémostat

III.4.1 Paramètres cinétiques

III.4.1.1 Estimation paramétrique

Les paramètres intervenants dans l'expression du μ_{max}, du $P_{critique}$, du q_P et du q_G (a, a_2, b, b_2, θ_1, θ_2, θ_3, α_P, α_G, γ_1, γ_2, γ_3, γ_4, A_{P1}, A_{P2}, A_{G1}, A_{G2}) ont été estimés à partir des données expérimentales des cultures en mode discontinu en isotherme à 37°C et en présence d'une variation de température (30-39°C, 33-45°C et 34-47°C) (Estimation paramétrique 1).

L'estimation paramétrique est réalisée par une méthode globale d'optimisation (PSO : Particle Swarm Optimization algorithm ou Optimisation par Essaims Particulaires) dont le but est de trouver la solution se rapprochant de l'optimum global (Trigueros *et al.* 2010). Cet algorithme permet la résolution d'équations linéaires et non linéaires en atteignant la convergence en quelques itérations. Il est basé sur la simulation du comportement social des animaux.

La fonction à optimiser a été formulée comme suit (Donoso-Bravo *et al.* 2011) :

$$J(\chi) = \min \sum_{t=1}^{N} \left(\frac{\nu_{\exp}(t) - \nu_{sim}(t,\chi)}{\max\left(\nu_{\exp}(t)\right)} \right)^2 \quad \textbf{\textit{Équation 72}}$$

Avec $L_p \leq \chi_p \leq U_p$, p = 1, …, 22.

Où χ_p sont les paramètres cinétiques et L_p et U_p sont les bornes inférieure et supérieures. Ces bornes évitent la présence de valeurs qui n'ont pas de signification biologique (valeurs négatives).

Le Tableau 19 présente les valeurs des différents paramètres intervenant dans l'expression du μ_{max}, du $P_{critique}$, du q_P et du q_G estimées par la méthode globale d'optimisation PSO.

Tableau 19. Valeur des paramètres estimés

Paramètre	Valeur estimée	Unité
a	0.023 ± 0.034	$°C^{-1}.h^{-0,5}$
b	0.08 ± 0.39	$°C^{-1}$
a_2	50.3 ± 25.5	$g.L^{-1}$
b_2	0.07 ± 0.11	$°C^{-1}$
A_{P1}	6.0 ± 550.3	°C
A_{P2}	20.3 ± 616.7	°C
A_{G1}	2.4 ± 78.3	°C
A_{G2}	3.66 ± 5.66	°C
α_G	0.34 ± 8.63	-
α_P	4.5 ± 63.4	-
β_1	0.38 ± 29.47	$g.g_X^{-1}.h^{-1}$
β_2	0.29 ± 8.73	$g.g_X^{-1}.h^{-1}$
β_3	0.21 ± 0.44	$g.g_X^{-1}.h^{-1}$
β_4	0.20 ± 5.30	$g.g_X^{-1}.h^{-1}$
θ_1	4.34 ± 17.6	°C
θ_2	65.5 ± 59.0	°C
θ_3	24.7 ± 23.5	°C

Les valeurs des paramètres définissant le k_d ont été ré-estimées (Tableau 16) par la méthode de minimisation du critère des moindres carrés (méthode locale : Estimation paramétrique 2) à partir des valeurs expérimentales des taux de décès déterminées à différentes températures et des valeurs issues de la littérature (Ling *et al.* 1995).

III.4.1.1 Paramètres cinétiques du modèle

Le tableau suivant liste les différents paramètres intervenant dans le modèle de prédiction développé dans cette étude pour traduire l'implantation du mutant tolérant (Tableau 20). Les valeurs sont issues de la bibliographie, de l'expérience du laboratoire, déduites des expérimentations (Exp.) réalisées dans cette thèse et de l'estimation paramétrique ou imposées à priori sur la base d'hypothèses formulées dans ce travail.

Le temps de séjour dans le réacteur 1 de 1 litre avec un débit d'alimentation et de sortie de 0,16 $L.h^{-1}$ est de 6,25 heures. Celui des cellules dans la cuve en quartz de mutagénèse aux UV de 3,2 mL avec un débit de recirculation de 0,13 $L.h^{-1}$ est de 1,5 minute.

Tableau 20. Paramètres intervenant dans le modèle cinétique

Paramètres				Valeurs	Source
Paramètres cinétiques	Décès du sauvage (température)	Taux décès de base Taux décès température	k_d b (h^{-1}) k_d t (h^{-1})	0,01 1,2	Estimation paramétrique 2
		temp au pt d'inflexion	tpc (°C)	42,5	Est. param. 2
		pente	pente	0,449	Est. param. 2
	Décès du mutant (température)	Taux décès de base Taux décès température	k_d b_m (h^{-1}) k_d t_m (h^{-1})	0,01 1,2	Est. param. 2 Fixé
		temp au pt d'inflexion	tpc_m (°C)	44	Fixé
		pente	$pente_m$	0,4	Fixé
	Croissance et production		Ks1	0,1	Exp
			Ksm1	0,1	Exp
			$Y_{X/S}$ ($g.g^{-1}$)	0,53	Théorique
			$Y_{P/S}$ ($g.g^{-1}$)	0,51	Théorique
			$Y_{G/S}$ ($g.g^{-1}$)	0,86	Théorique
			a, a_2, b, b_2	Tableau 19	Estimation paramétrique 1
			θ_1, θ_2, θ_3		
			α_P, α_G		
			γ_1, γ_2, γ_3, γ_4		
			A_{P1}, A_{P2}, A_{G1}, A_{G2}		
Paramètres de température	Température nominale (°C)		T_{min}	33	Exp.
	Température choc (°C)		T_{max}	45	Exp.
	Durée choc (h)		d_{choc}	0,3	Exp
	Période des chocs (h)		p_{choc}	12	Exp
	Gradient température ($°C.h^{-1}$)		grad	0,03	Exp
Paramètres de mutagénèse aux UV	Taux de décès UV (h^{-1})		k_{dmut}	0	Exp
	Taux de mutations spontanées		mut spont	5.10^{-8}	Fixé
	Taux de mutations induites par les UV		mut UV	3.10^{-4}	Fixé
Paramètres de conduite du réacteur	Concentration alimentation ($g.L^{-1}$)		S_0	150	Exp
	Débits ($L.h^{-1}$)		Q_e	0,16	Exp
			Q_s	0,16	
			Q_{12}	0,13	Exp
			Q_{21}	0,13	Exp
	Volumes (L)		V1 V2	1 0,0032	Exp

III.4.2 Application du modèle cinétique

Un premier profil de température est retenu pour les premiers tests de simulation par le modèle cinétique développé (Figure 51). La température de choc de 45°C a été choisie du fait de sa sélectivité et de son impact immédiat sur les populations cellulaires.

Température de départ :	**33 °C**
Température des chocs :	**45 °C**
Gradient de température :	**0,03 °C.h^{-1}**
Période des chocs :	**12 h**
Durée du choc :	**0,3 h**

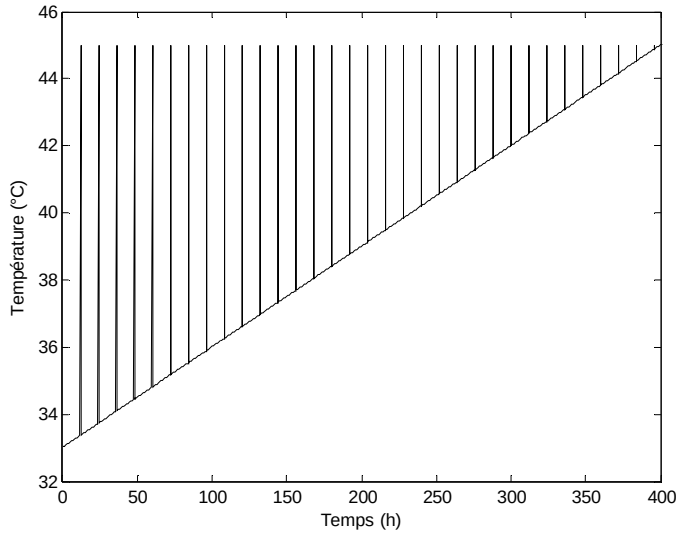


Figure 51. Profil de température imposé pour les premiers tests de simulation

La figure suivante (Figure 52 (a)) représente l'évolution des concentrations (en g.L^{-1}) en biomasse viable sauvage, biomasse viable mutante et biomasse totale. La biomasse totale correspond à la somme des concentrations en biomasse viable sauvage, viable mutante et morte.

Dans les conditions testées, une diminution de la concentration en biomasse de la souche sauvage est observée au cours du temps, alors que la température augmente selon une rampe de 0,03°C.h^{-1} et que des chocs à 45°C sont réalisés toutes les 12 heures. La Figure 52 (b) représente le détail des concentrations sur la période [0 – 350 heures] où la concentration en biomasse est faible entre 0 et 1,5 g.L^{-1}. Il est possible d'observer vers 180 heures de culture, l'implantation d'une souche tolérante dans le réacteur, par contre, la concentration en biomasse viable mutante (0,5 g.L^{-1}) est assez faible et ne garantit pas de récupérer et d'isoler cette population.

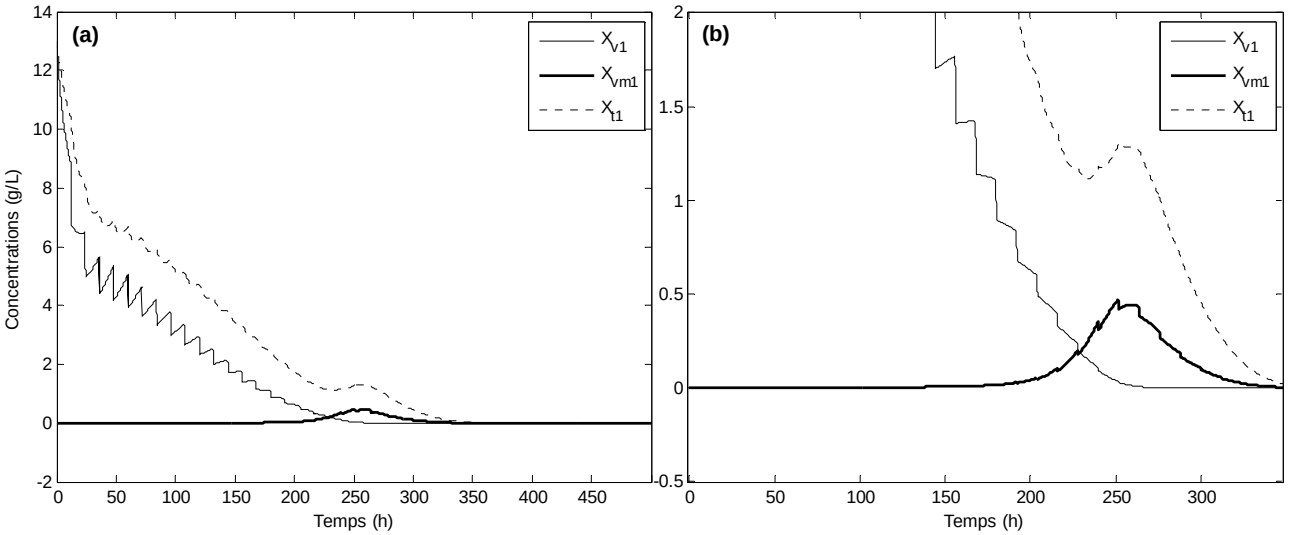


Figure 52. Simulation des concentrations en biomasse viable sauvage (trait plein), en biomasse viable mutante (trait plein épais) et en biomasse totale (trait pointillé) obtenues avec le modèle cinétique selon les conditions décrites dans le Tableau 20 avec une rampe de température de 0,03°C.h^{-1} (a). Résultat de la simulation sur une gamme de concentration en biomasse de 0 à 2 g.L^{-1} (b)

Sur la base de cette simulation, une étude de sensibilité est menée sur les paramètres jugés significatifs, à savoir :

- le gradient de température appliqué
- la température nominale
- le taux de décès (induit par la température et l'exposition aux UV)

Une étude de sensibilité est également réalisée, sur des paramètres conditionnant l'apparition ou non de variants, sans possibilité de les mesurer ou de les vérifier :

- le taux de mutations (spontanées et induites par les UV)
- le taux de croissance maximal du mutant

Remarque : chaque paramètre est étudié indépendamment des autres.

III.4.3 Etude de sensibilité de différents paramètres

III.4.3.1 Etude de sensibilité du gradient de température (grad)

À une température donnée, le taux de croissance apparent du mutant ($\mu - k_d$) est supérieur à celui de la souche sauvage. C'est sur ce principe que la souche améliorée sera sélectionnée, par contre, en augmentant encore la température le mutant mourra à son tour. Afin d'observer l'apparition du mutant la rampe de température imposée ne doit donc pas être trop importante pour permettre son implantation et un enrichissement suffisant avant sa disparition. Si, comme observé Figure 52, le gradient fixé à 0,03°C.h^{-1} est rapide et ne permet d'atteindre qu'une concentration faible, l'utilisation de gradients de température plus faibles permettront sans doute un meilleur maintien dans le réacteur du mutant obtenu, maintien nécessaire à sa récupération.

La figure suivante (Figure 53) présente les résultats obtenus pour une rampe de température de 0,01°C.h^{-1}, 0,02°C.h^{-1} et 0,03°C.h^{-1}.

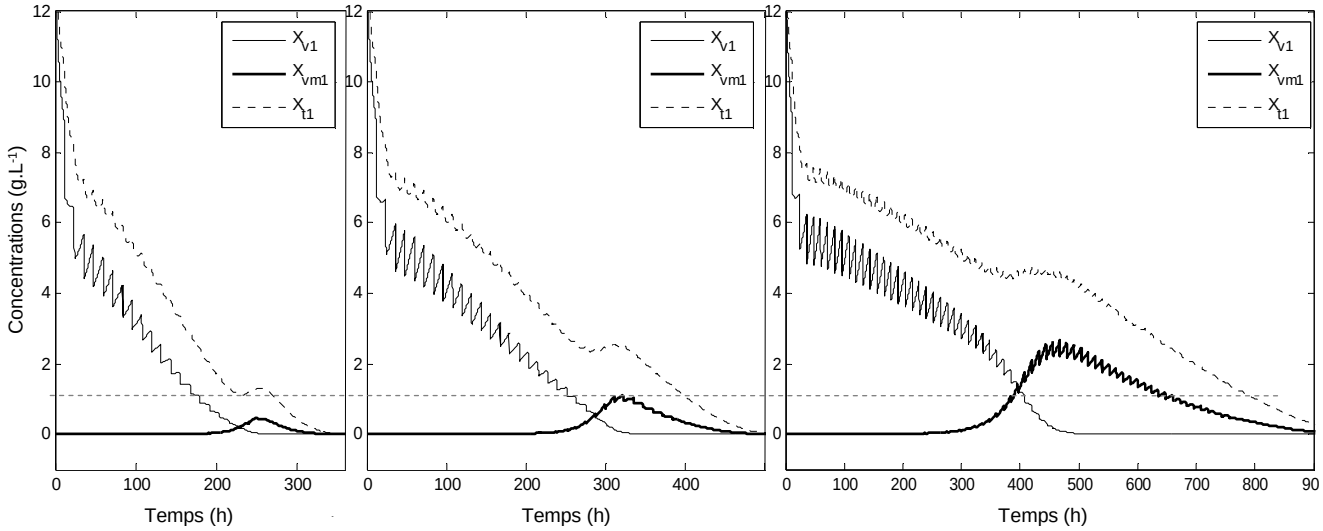


Figure 53. Etude de sensibilité du gradient de température (grad : 0,01 ; 0,02 ; 0,03°C.h^{-1})

A 0,03°C.h^{-1}, premier gradient simulé, la souche sauvage est lessivée et le mutant apparaît vers 180 heures, mais le gradient étant important il disparaît rapidement (100 heures après) et sa concentration maximale atteint 0,5 g.L^{-1}. Lorsque le gradient est diminué l'augmentation de température est plus progressive, ce qui se traduit par une concentration en cellules totales et en biomasse mutante dans le réacteur plus importante. Par contre, des gradients plus faibles induisent des temps de culture plus longs. A 0,02°C.h^{-1}, 220 heures sont nécessaires pour l'apparition d'un

mutant tolérant à une concentration de l'ordre de 1 $g.L^{-1}$ et 300 heures à 0,01°C.h^{-1} pour l'obtention d'une concentration de 2,5 $g.L^{-1}$.

Un compromis entre concentration en biomasse mutante et temps d'apparition du mutant tolérant doit être trouvé. Le gradient de 0,03°C.h^{-1} ne permet d'obtenir qu'une concentration faible en biomasse viable mutante et le gradient de 0,01°C.h^{-1} nécessite une durée de fonctionnement trop importante, le gradient de température de 0,02°C.h^{-1} pourrait être un bon compromis (Xv_m deux fois plus élevée qu'à 0,03°C.h^{-1}).

III.4.3.2 Etude de sensibilité de la température nominale (Tmin)

Il est intéressant de réduire les durées de fermentation, pour cela la culture peut être initiée à une température plus élevée. Des simulations à différentes températures nominales ont été réalisées pour déterminer l'influence de ce paramètre sur les concentrations. La Figure 54 présente l'évolution des concentrations en biomasses viable sauvage, viable mutante et totale pour des températures initiales de 33°C, 35°C et 37°C.

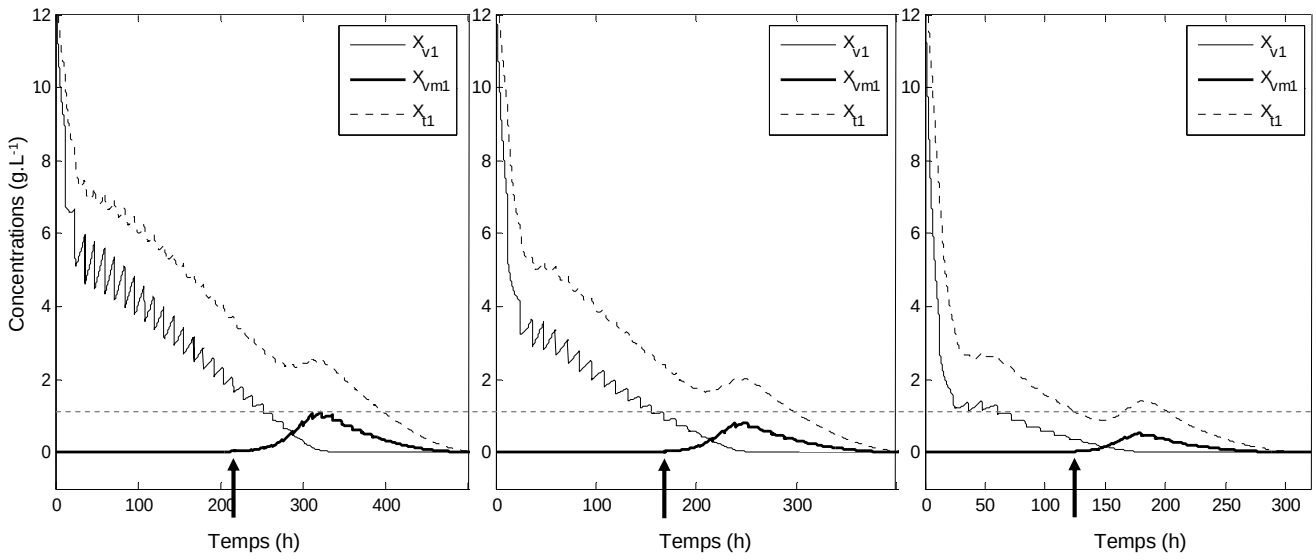


Figure 54. Etude de sensibilité de la température nominale (Tmin : 33, 35 et 37°C)

Comme attendu, plus la température de départ est élevée plus la biomasse sauvage est affectée rapidement. La souche sauvage disparaît peu à peu, laissant s'implanter le mutant tolérant. La température influence donc le temps de fonctionnement du pilote pour l'apparition d'un mutant tolérant. Plus la température est élevée, plus l'apparition du mutant est rapide, la

disparition de la souche sauvage ayant lieu plus tôt (température sélective atteinte plus rapidement) et permettant ainsi une implantation du mutant, par contre la concentration en biomasse mutante est diminuée. Il est nécessaire de trouver le bon compromis entre l'obtention rapide d'un variant plus tolérant que la souche sauvage et une concentration suffisante à sa récupération. La température de 33°C est la température de croissance optimale pour la souche industrielle étudiée. Cependant, afin de minimiser la durée de mise en œuvre du chémostat d'adaptation (pour limiter les risques de contaminations), une température supérieure est préférable.

La température de départ sélectionnée pour la réalisation du chémostat d'obtention de variants est **37°C**. Ce qui permet une apparition du mutant après 110-120 heures de culture au lieu de 220 heures pour une température initiale de 33°C. L'apparition du mutant intervient 100 heures plus tôt pour une élévation de la température initiale de 4°C. Par contre à cette température là, la concentration Xv_m atteinte est un peu plus faible (0,6 $g.L^{-1}$). La réalisation préalable d'une culture en mode discontinu alimenté à 37°C a permis de vérifier les bonnes performances de la souche à cette température.

Le profil de température : température initiale de 37°C et gradient de température de 0,02°C.h^{-1} ayant été retenu, les études de sensibilité des autres paramètres seront faites pour des simulations réalisées dans ces conditions.

III.4.3.3 Etude de sensibilité des taux de décès

Etude de sensibilité du taux de décès induit par la température (k_d)

Les paramètres du taux de décès ont été estimés par la méthode des moindres carrés à partir des valeurs de k_d calculées pour les différentes températures testées. Le taux de décès induit par la température (k_d) est décrit par la fonction sigmoïde suivante :

$$k_d = k_d\,b + \frac{k_d\,t}{1+e^{(-(T-tpc)*pente)}} \quad \textbf{\textit{Équation 73}}$$

k_d b	Taux de décès basal (h^{-1})
k_d t	Taux de décès maximal induit par la température (h^{-1})
tpc	Température au point d'inflexion de la fonction sigmoïde (°C)
pente	Pente de la fonction sigmoïde ($°C^{-1}.h^{-1}$)

L'intervalle de confiance a été évalué pour chacun des paramètres définissant le k_d, pour une variation des paramètres de 1%, à partir du Jacobien $\frac{\partial k_d}{\partial \theta_i}$ (avec θ = paramètre considéré et i = 1, 2, 3, 4) (Tableau 21). Les intervalles de confiance obtenus sont larges, une variation d'un des paramètres dans cet intervalle n'affectera pas les cinétiques obtenues car l'écart sera compensé par la variation des autres paramètres. Afin d'éviter que des valeurs négatives soient attribuées aux paramètres, ceux-ci ont été bornés.

Tableau 21. Intervalle de confiance des paramètres définissant le k_d

Paramètre	Valeur	Unité
k_d b	0,01 ± 1,28	h^{-1}
k_d t	1,2 ± 6,6	h^{-1}
tpc	42,5 ± 460,5	°C
pente	0,449 ± 4,580	$°C^{-1}.h^{-1}$

Avec les valeurs ci-dessus les simulations prédisent une apparition du mutant vers 110-120 heures et Xv_m atteint 0,6 $g.L^{-1}$.

L'influence du taux de décès sur l'apparition d'un mutant est présentée au Tableau 22 pour une variation des paramètres définissant le taux de décès de 3,5% à 100% (k_db ± 100%, k_dt ± 50%, tpc ± 3,5%, pente ± 5%).

Tableau 22. Simulation du temps d'apparition (t) d'un mutant tolérant et de la concentration (Xv_m) atteinte pour différents pourcentages de variation des paramètres définissant le k_d

	Valeur	k_db ± 100%	k_dt ± 50%	tpc ± 3,5%	pente ± 5%
Souche sauvage	**modèle**	**0,01 h^{-1}**	**1,2 h^{-1}**	**42,5°C**	**0,449°$C^{-1}.h^{-1}$**
	<	k_db = 0 h^{-1} t = 110 h Xv_m = 0,4 $g.L^{-1}$	k_dt = 0,6 h^{-1} Pas d'apparition d'un mutant	tpc = 41°C t = 60 h Xv_m = 1,8 $g.L^{-1}$	pente = 0,43°$C^{-1}.h^{-1}$ t = 80 h Xv_m = 0,7 $g.L^{-1}$
	>	k_db = 0,02 h^{-1} t = 100 h Xv_m = 0,65 $g.L^{-1}$	k_dt = 1,8 h^{-1} t = 60 h Xv_m = 1,6 $g.L^{-1}$	tpc = 44 °C Pas d'apparition d'un mutant	pente = 0,47°$C^{-1}.h^{-1}$ t = 120 h Xv_m = 0,4 $g.L^{-1}$
Souche mutante	**modèle**	**0,01 h^{-1}**	**1,2 h^{-1}**	**44°C**	**0,4°$C^{-1}.h^{-1}$**
	<	k_db = 0 h^{-1} t = 80 h Xv_m = 0,7 $g.L^{-1}$	k_dt = 0,6 h^{-1} t = 60 h Xv_m = 3 $g.L^{-1}$	tpc = 42,5°C Pas d'apparition d'un mutant	pente = 0,38°$C^{-1}.h^{-1}$ t = 110 h Xv_m = 0,3 $g.L^{-1}$
	>	k_db = 0,02 h^{-1} t = 110 h Xv_m = 0,35 $g.L^{-1}$	k_dt = 1,8 h^{-1} Pas d'apparition d'un mutant	tpc = 45,5°C t = 80h Xv_m = 2,5 $g.L^{-1}$	pente = 0,42°$C^{-1}.h^{-1}$ t = 80 h Xv_m = 0,8 $g.L^{-1}$

L'étude de l'impact des différents paramètres définissant le k_d montre qu'un même pourcentage de variation n'à pas le même impact sur le k_d. En effet, une augmentation de tpc de

3,5% à le même impact sur l'apparition d'un variant (pas d'apparition) qu'une réduction du k_dt de 50%. Une variation de k_db de 100% affecte la concentration en biomasse mutante atteinte, mais l'impact est relativement faible par rapport au pourcentage de variation appliqué. La valeur de tpc a par contre un impact très important sur les cinétiques d'apparition de variants même si les variations testées sont faibles (± 3,5%).

Etude de sensibilité du taux de décès induit par la mutagénèse (k_d mut)

L'analyse de l'évolution du taux de décès sans et avec une irradiation aux UV à différentes puissances a montré que le taux de décès induit par les UV est négligeable face au décès « naturel » de la souche (induit par l'éthanol), sa valeur est donc fixée à zéro.

Des simulations ont été faites avec des valeurs de k_d mut non nulles afin de voir l'effet de ce paramètre sur l'apparition d'un mutant. L'étude de sensibilité du taux de décès induit par la mutagénèse est présentée Figure 55.

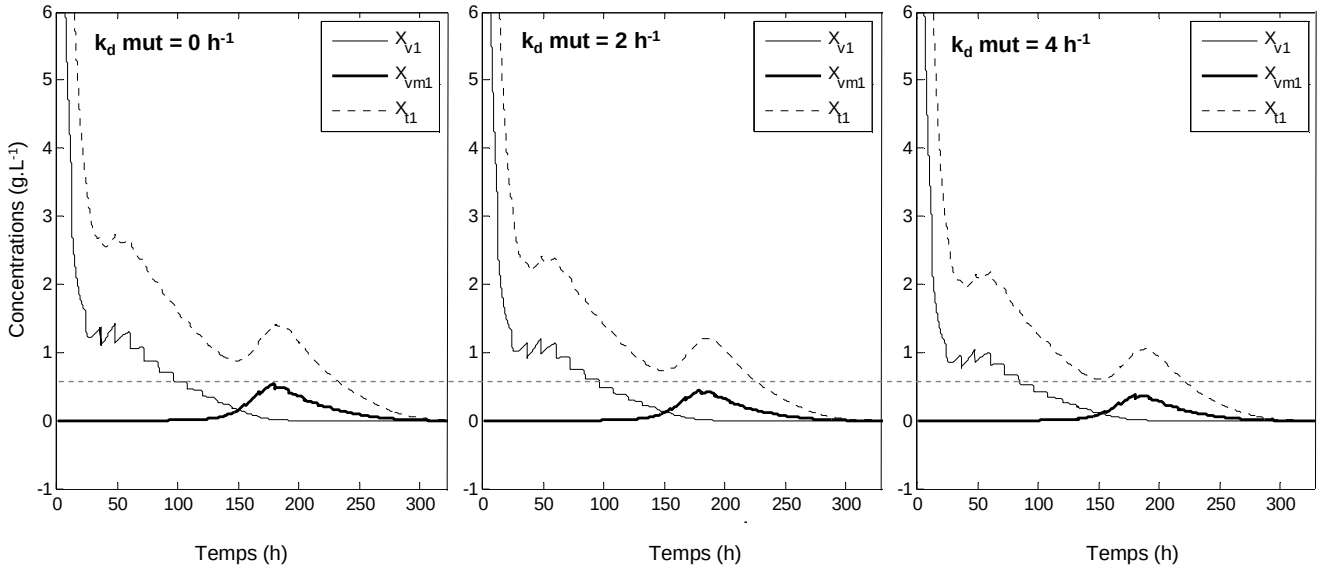


Figure 55. Etude de sensibilité du taux de décès induit par la mutagénèse ($k_{d\ mut}$: 0, 2 et 4 h^{-1})

La simulation avec des valeurs de k_d mut de 0, 2 et 4 h^{-1} montre que l'augmentation du taux de décès induit par la mutagénèse conduit à un moins bon maintien du mutant et à une concentration atteinte plus faible, le taux de croissance apparent étant diminué. Ce paramètre ne semble pas avoir d'impact sur le temps d'apparition du mutant. De plus le k_d mut n'est pas un paramètre prépondérant au vu du faible impact observé pour des valeurs de taux de décès très élevées.

III.4.3.4 Etude de sensibilité du taux de mutations

Le taux de mutations introduit dans le modèle est un paramètre contrôlant l'apparition de mutants. Deux taux de mutations sont pris en compte dans les équations bilan : le taux de mutations spontanées (réacteurs 1 et 2) et le taux de mutations induites par les UV (réacteur 2 : lieu de la mutagénèse UV). L'exposition aux UV accélère artificiellement la mutagénèse spontanée et le taux de mutations induites par les UV est donc plus important que le taux de mutations spontanées.

Il n'y a pas de moyen de déterminer la valeur réelle des taux de mutations, des valeurs ont donc été déduites des données de la littérature (Magni and Von Borstel 1962; Hashimoto *et al.* 2005) mais seront sous-estimées ou sur-estimées. Il ne sera possible de remonter au taux de mutations réel que par le calcul, lors de l'obtention d'un mutant.

Dans la littérature, les valeurs données par division, sont transformées en taux de mutations par heure, en divisant par le temps de génération $\left(\frac{\ln 2}{\mu}\right)$.

$$\text{taux mutation} = \frac{\mu_g}{\left(\frac{\ln 2}{\mu}\right)}$$

μ_g Taux de mutation du génome par division (mutations.division^{-1})

μ Taux de croissance : taux de dilution en continu pendant le régime permanent (h^{-1})

La souche industrielle de *Saccharomyces cerevisiae* utilisée est une souche diploïde, les valeurs extrêmes des taux de mutations des souches diploïdes issues de la bibliographie sont sélectionnées (Tableau 23).

Tableau 23. Taux de mutations spontanées et induites par les UV chez des souches diploïdes de *Saccharomyces cerevisiae*

Taux de mutations	Diploïdes (mutation /div)	mutation / heure	Valeur sélectionnée	Références
spontanées	**$2{,}7.10^{-4}$**	**$6{,}2.10^{-5}$**	**$\underline{5.10^{-8}}$**	(Hall *et al.* 2008)
	2.10^{-7} à 4.10^{-7}	**$4{,}6.10^{-8}$**		(Magni and Von Borstel 1962)
UV	**5.10^{-4}** à **2.10^{-3}**	**$1{,}2.10^{-4}$** à **$4{,}6.10^{-4}$**	**$\underline{3.10^{-4}}$**	(Hashimoto *et al.* 2005)

Pour le taux de mutations UV la valeur choisie correspond à la moyenne des valeurs données par Hashimoto *et al.* (2005) pour une souche diploïde de *Saccharomyces cerevisiae* ; soit 3.10^{-4} mutation par heure. Pour les mutations spontanées, les taux de mutations pour des souches diploïdes ne sont pas concordants (10^{-8} à 10^{-5}), le taux de mutations choisi est 5.10^{-8} mutation par heure, valeur proche du taux minimal donné par Magni et Von Borstel (1962) afin d'être très inférieur au taux induit par les UV (ce qui n'est pas le cas avec la valeur de Hall *et al.*(2008) de $6{,}2.10^{-5}$).

Afin de vérifier que les choix réalisés sont judicieux la simulation avec les taux de mutations spontanées/UV de $5.10^{-8}/3.10^{-4}$ a été comparé à d'autres taux de mutations (Figure 56). Tout d'abord nous avons fait varier le taux de mutations spontanées en lui donnant la valeur extrême la plus élevée **$6{,}2.10^{-5}$** (Hall *et al.* 2008) le taux de mutations UV restant fixé à 3.10^{-4}. Puis, alors que le taux de mutations spontanées était fixé à sa valeur initatiale (5.10^{-8}), le taux de mutation UV a été remplacé par **3.10^{-3}** taux de mutation pour une souche haploïde (Haefner 1967) 10 fois supérieur à celui pris initialement dans le modèle (Hashimoto *et al.* 2005).

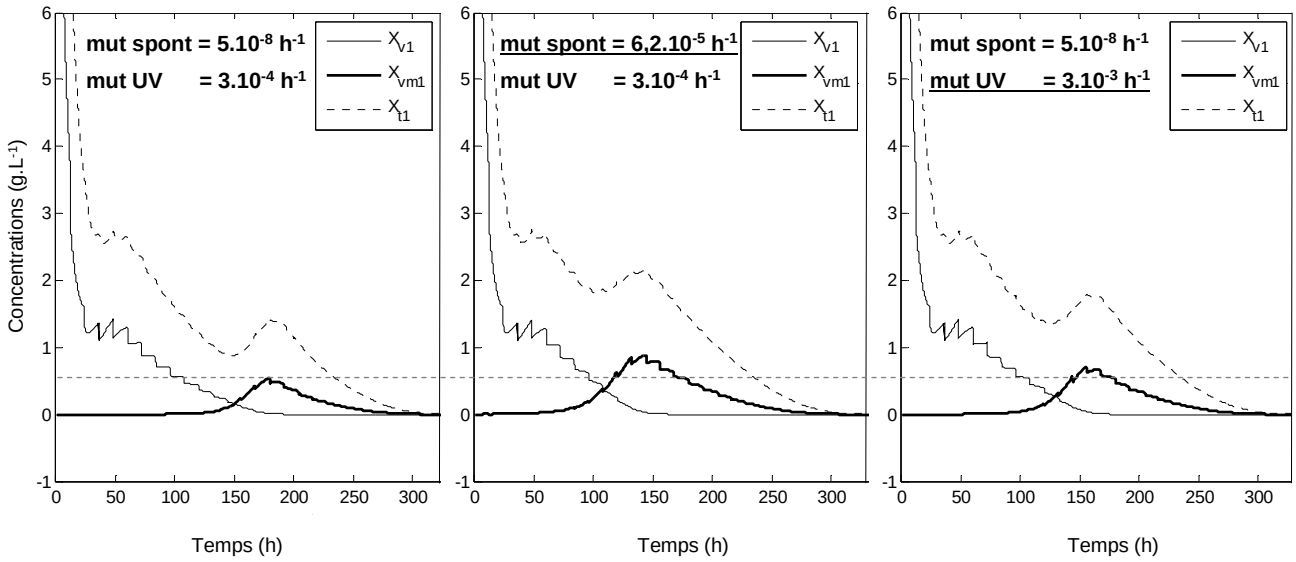


Figure 56. Etude de sensibilité du taux de mutations spontanés et induites par les UV

Lorsque le taux de mutations spontanées est augmenté d'un facteur 1000 ($6{,}2.10^{-5}$ au lieu de 5.10^{-8}) ou le taux de mutations induites par les UV augmenté d'un facteur 10 (3.10^{-3} au lieu de 3.10^{-4}), le temps d'apparition du mutant est légèrement diminué (respectivement de 110-120 heures à 75 heures et 100 heures). Pour ces nouvelles valeurs de taux de mutations la concentration en biomasse viable mutante est augmentée de 0,6 $g.L^{-1}$ à respectivement 0,9 $g.L^{-1}$ (+ 50%) et 0,7 $g.L^{-1}$ (+ 16%). Même si ce paramètre semble prépondérant dans l'apparition du mutant tolérant, en restant dans des gammes de valeurs de taux de mutations identifiées dans la bibliographie, les différences en termes de concentrations ne sont pas très importantes

III.4.3.5 Etude de sensibilité du taux de croissance maximal du mutant

Pour qu'il y ait apparition d'un mutant plus tolérant, son taux de croissance apparent à une température donnée doit être supérieur à celui de la souche sauvage : le taux de croissance doit être supérieur et/ou le taux de décès doit être inférieur. Pour cela, une constante a été ajoutée au taux de croissance maximal de la souche sauvage et sa valeur est 0,02 ($\mu_{max\ mutant} = \mu_{max\ souche\ sauvage} + 0{,}02$). Des simulations ont été réalisées avec d'autres valeurs (0 et 0,05) afin de voir l'influence de ce paramètre sur l'apparition d'un variant (Figure 57).

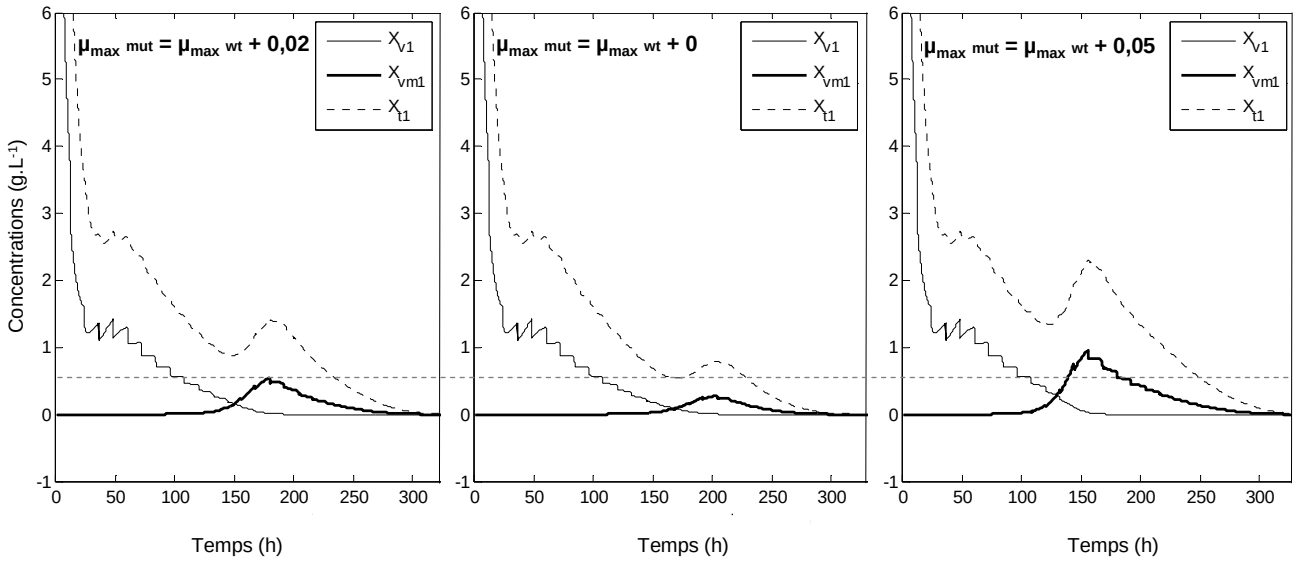


Figure 57. Etude de sensibilité du taux de croissance maximal du mutant (μ_{max} mut= μ_{max} wt + 0 ; 0,02 ou 0,05)

Comme attendu plus le taux de croissance est élevé par rapport à celui de la souche sauvage plus le mutant apparaît rapidement et la concentration atteinte est plus élevée. La simulation avec la valeur « zéro », soit un taux de croissance maximal identique pour les deux souches, montre l'apparition d'un mutant, l'enrichissement se faisant par le plus faible décès de cette souche améliorée. Ceci tend à montrer qu'une différence de taux de décès seule est suffisante à l'enrichissement préférentiel d'une souche par rapport à l'autre.

III.4.4 Choix des paramètres de conduite du chémostat d'obtention de variants

L'obtention d'un mutant plus tolérant aux fluctuations de température que la souche sauvage doit être réalisée :

- En minimisant le temps de fermentation pour l'obtention du mutant
- En obtenant le mutant en quantité suffisante à sa récupération
- En conservant le mutant pendant une durée permettant sa récupération

Suite à l'étude de l'impact des différents paramètres sur l'apparition de variants, les paramètres de conduite adaptés aux conditions recherchées ont été déterminés. Le profil de température optimal pour le chémostat d'adaptation est décrit par les paramètres suivants et est représenté à la Figure 58 :

Température de départ :	**37 °C**
Température des chocs :	**45 °C**
Gradient de température :	**0,02 °C.h^{-1}**
Période des chocs :	**12 h**
Durée du choc :	**0,3 h**

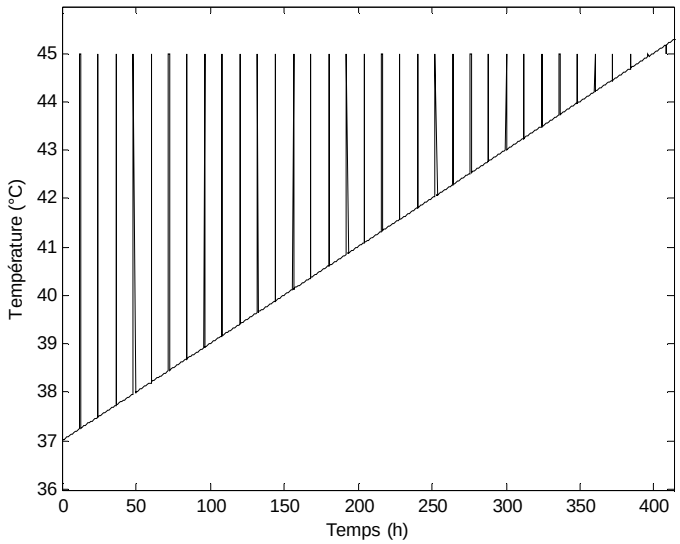


Figure 58. Profil de température réalisé pour la sélection du mutant dans le modèle cinétique

Les résultats d'une simulation obtenue par le modèle cinétique sont présentés aux graphes suivants (Figure 59 et Figure 60). La Figure 59 et la Figure 60 montrent que la diminution de biomasse totale, provoquée par la rampe de température et les chocs thermiques, s'accompagne de l'augmentation de la concentration en substrat et de la diminution de la concentration en éthanol et glycérol dans le réacteur. Puis, vers 110 heures (à 39,2°C), le mutant plus tolérant que la souche sauvage apparaît, sa concentration en biomasse viable atteint 0,6 g.L^{-1} à 180 heures (biomasse

totale 1,4 $g.L^{-1}$). Dès l'apparition du mutant le glucose est reconsommé (-15 $g.L^{-1}$) et la concentration en éthanol et en glycérol augmente (respectivement à 18 $g.L^{-1}$ et 1,4 $g.L^{-1}$). Enfin, alors que la température continue d'augmenter, la souche mutante disparaît à son tour vers 300 heures, la température est alors de 43°C. Le mutant se sera maintenu dans le réacteur pendant 200 heures environ.

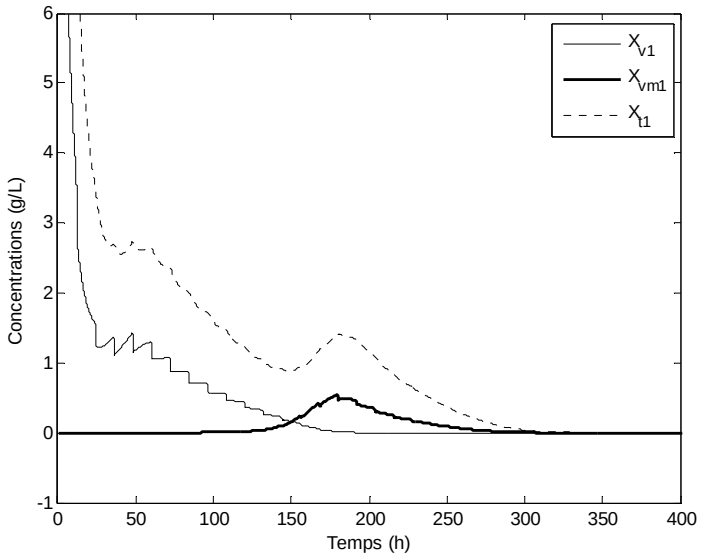


Figure 59. Simulation de l'évolution des concentrations en biomasse dans le réacteur 1 obtenues grâce au modèle cinétique pour les paramètres choisis

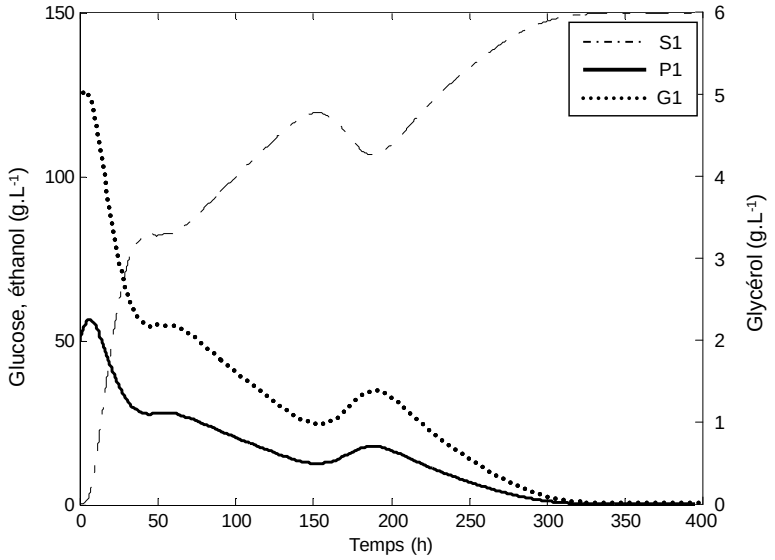


Figure 60. Simulation de l'évolution des concentrations en substrat, en éthanol et en glycérol dans le réacteur 1 obtenues grâce au modèle cinétique pour les paramètres choisis

III.5 Conclusion

Dans la littérature peu de modèles mathématiques prennent en compte l'impact de la température sur les paramètres cinétiques de la fermentation alcoolique (Atala *et al.* 2001; Phisalaphong *et al.* 2006; Rivera *et al.* 2006; Andrade *et al.* 2007; Rivera *et al.* 2007).

A partir de certains travaux, prenant en compte la température ainsi que l'inhibition par l'éthanol et la limitation en substrat (Ratkowsky *et al.* 1982; Zwietering *et al.* 1991), des équations cinétiques ont été utilisées et adaptées à nos conditions expérimentales en réacteur continu avec pression de sélection et mutagénèse.

A partir de ces lois cinétiques proposées pour la croissance, la consommation de glucose et la production d'éthanol et de glycérol, un modèle dynamique traduisant l'impact de la température sur les différents composés a été développé. Par ailleurs, le modèle cinétique intègre les taux de mutations spontanées et induites par les UV. Ce modèle original permet donc de prédire l'apparition de mutants plus robustes aux fluctuations de température que la souche sauvage, en réacteur continu grâce à la présence d'une mutagénèse aux UV et d'une pression de sélection (température).

Des données de la littérature et issues de l'expérience du laboratoire ont été intégrées au modèle, tandis que d'autres cultures avec chocs thermiques et irradiation aux UV ont été réalisées pour déterminer les données manquantes.

Le décès des souches est un paramètre très important à intégrer afin de rendre compte de la disparition de la souche sauvage au profit de l'implantation de la souche « mutante ». L'obtention par mutagénèse aléatoire aux UV d'un mutant plus tolérant que la souche sauvage au stress température est basée sur le fait qu'à une température donnée le taux de croissance apparent du mutant est supérieur à celui de la souche sauvage car son taux de décès est inférieur à celui de la souche sauvage. Certains auteurs considèrent la viabilité et le décès cellulaire en faisant intervenir une constante k_d (Phisalaphong *et al.* 2006), mais très peu de travaux ont établi une expression du taux de décès en fonction de la température (Atala *et al.* 2001; Costa *et al.* 2001). Des cultures dédiées à l'étude du comportement de la souche sauvage en mode isotherme et en présence de chocs thermiques ont été réalisées et ont révélé un impact de la température sur la viabilité et sur le décès cellulaire comme montré par Torija *et al.* (2003b) et Aldiguier *et al.* (2004). La viabilité diminue et le taux de décès augmente lorsque la température est augmentée. Des variations de température quasi-instantanées ont été réalisées et il est connu qu'un changement brutal de température a un impact beaucoup plus important sur le métabolisme des levures qu'une variation progressive (Gervais and Martínez De Marañón 1995; Marechal *et al.* 1999; Martínez De Marañón *et al.* 1999; Beney *et al.* 2000; Guyot *et al.* 2005). Les résultats expérimentaux ont permis d'obtenir les taux de décès à différentes températures et d'établir une relation de type sigmoïde entre le k_d et la température. Les paramètres de décès de la souche sauvage définissant la courbe sigmoïde ont été déterminés pour la souche sauvage et à partir de l'expression établie, les paramètres de décès

ont été estimés pour le mutant afin que, pour une température donnée, son taux de décès soit inférieur à celui de la souche sauvage.

D'autres cultures ont également permis d'obtenir les taux de décès induits par la présence d'UV pour la souche sauvage et d'observer l'impact de différentes puissances d'exposition sur les levures. L'irradiation des levures aux UV affecte le taux de croissance, la production d'éthanol et les différentes populations cellulaires (totales, viables et cultivables). L'effet observé s'accentue lorsque la puissance des UV est élevée. Des travaux ont montré une perturbation de la division cellulaire et un retard de croissance causés par les UV (Resnick and Setlow 1972; James and Nasim 1987) conformément aux observations faites sur les populations cellulaires viables, cultivables et totales. Par contre, contrairement à ce qui pouvait être attendu, aux puissances testées, les UV n'induisent pas plus de décès que le décès « naturel » induit par l'éthanol, le taux de décès induit par la mutagénèse aux UV (k_d mut) a donc été fixé à zéro.

Les expériences ont montré qu'il pouvait y avoir, en fonction de la température et des UV, une lyse cellulaire mais ce phénomène n'a pas été pris en compte dans le modèle.

Une étude de sensibilité a pu être réalisée à partir des simulations sur différents paramètres afin de voir leur impact sur la cinétique d'apparition du mutant. Le gradient et la température de départ sont des paramètres prépondérants puisqu'ils agissent à la fois sur le temps d'apparition et la concentration atteinte. Une augmentation de température de 4°C décale de 100 heures l'apparition du mutant. La variation du taux de mutations (spontanées et induites par les UV) lorsqu'il reste dans des gammes de valeurs trouvées dans la littérature affecte plus faiblement l'apparition du variant que ce que nous pouvions penser. Le taux de décès induit par la température impacte quant à lui beaucoup plus la cinétique d'apparition de variants que celui causé par la mutagénèse aux UV.

Pour la mise en œuvre de cultures pour l'obtention de mutants, l'objectif est de minimiser le temps de fermentation, d'obtenir le mutant en quantité suffisante et de le conserver pendant une durée suffisante permettant sa sélection. Le modèle cinétique développé permet de simuler et prédire les résultats expérimentaux qui seront obtenus lors de la mise en œuvre du chémostat d'obtention de variants ceci afin d'optimiser le procédé en recherchant les conditions de conduite optimales. Un profil de température, facteur de sélection du mutant, a pu être défini :

- Température de départ : 37 °C
- Température des chocs : 45 °C
- Gradient de température : 0,02 °C.h^{-1}
- Période des chocs : 12 h
- Durée du choc : 0,3 h

Une simulation avec les paramètres choisis prédit une diminution de la biomasse sauvage et l'apparition d'un mutant tolérant entre 110 et 120 heures. Un suivi en ligne de la biomasse viable par la sonde capacitive permettra de détecter en ligne la décroissance de la souche sauvage et l'augmentation de la concentration en biomasse viable mutante, plus tolérante que la souche sauvage aux fluctuations de température.

Après mise en œuvre du chémostat, il sera possible de tester la validité du modèle cinétique.

Chapitre IV :

Mise en œuvre d'un réacteur continu dédié à l'obtention de variants robustes à des fluctuations thermiques

Chapitre IV : Mise en œuvre d'un réacteur continu dédié à l'obtention de variants robustes à des fluctuations thermiques

Le modèle de simulation décrit au chapitre précédent a fourni les conditions optimales de fonctionnement du réacteur continu pour l'obtention de mutants tolérants. Un profil de température adapté à la sélection du mutant a été établi et va être appliqué en chémostat couplé à une mutagénèse aux UV. La stratégie employée d'exposition aux UV permettra de générer des mutants et le profil de température sélectionnera les clones les plus robustes alors que la souche sauvage sera lessivée.

Ce chapitre présente l'élaboration et la mise en œuvre du pilote d'obtention de variants ainsi que l'analyse du comportement des levures en régime permanent et vis-à-vis des perturbations appliquées, en termes de croissance, de performances fermentaires, de viabilité et d'évolution des différentes populations.

IV.1 Mise en œuvre du pilote de génération de mutants

Un pilote visant l'obtention de variants d'une souche industrielle de *Saccharomyces cerevisiae* plus résistants à des variations de température que la souche sauvage a été développé.

Sur les cultures en mode continu, une mutagénèse aux UV est réalisée pour accélérer l'apparition de mutants et une rampe de température et des chocs à 45°C agissent comme pression de sélection. Une boucle de recirculation comprenant une cellule en quartz pour l'exposition aux UV d'une partie de la culture est ajoutée au réacteur. La culture est exposée à une source au deutérium à une longueur d'onde de 250 nm ± 4 nm ; 254 nm étant la longueur d'onde absorbée (au maximum) par l'ADN et susceptible d'induire des mutations. La puissance émise par la lampe UV est de 70 $W.m^{-2}$ à 254 nm.

Le modèle cinétique développé préalablement et décrit au chapitre précédent a permis de simuler des conditions expérimentales susceptibles d'induire l'apparition de variants. Pour des raisons expérimentales (limitation de la durée du chémostat pour éviter des contaminations

parasites) les conditions simulées ont été légèrement modifiées notamment le gradient de température fixé à 0,03°C.h^{-1} plutôt qu'à 0,02°C.h^{-1} dans la première phase de perturbation (un gradient de 0,02°C.h^{-1} a été imposé lors de la dernière phase de perturbation). Le profil de température retenu est le suivant :

- Température de départ = 37 °C
- Température des chocs = 45 °C
- Gradient de température = 0,02°C.h^{-1} → 0,03°C.h^{-1} appliqué
- Période des chocs = 12 h
- Durée du choc = 0,3 h

IV.1.1 Puissance d'exposition aux UV

Des cultures en mode discontinu alimenté ont préalablement été réalisées, à différentes puissances d'irradiation aux UV (6 et 25 W.m^{-2}) correspondant à différentes distances de la source UV (9 et 2 cm), afin d'étudier l'impact de la puissance d'irradiation sur les cinétiques et les populations cellulaires. Il est connu que l'irradiation aux UV entraîne une perturbation de la division cellulaire et un retard de croissance (Resnick and Setlow 1972; James and Nasim 1987), qui peut conduire à un décès cellulaire lorsque l'exposition aux UV est trop forte (James and Nasim 1987; Del Carratore *et al.* 2002). Une amplification du décès ou du nombre de cellules mortes n'a pas été observée à 6 ou 25 W.m^{-2}, par contre une réduction du taux de croissance a été mise en évidence à ces deux puissances et l'impact est d'autant plus important que la puissance est élevée. De plus, une puissance d'exposition de 25 W.m^{-2} a montré que les différentes populations cellulaires (cellules totales, viables et cultivables) étaient fortement impactées alors que seul le nombre de cellules cultivables diminue à 6 W.m^{-2}.

Ainsi, en choisissant pour la culture en mode continu la puissance d'irradiation la plus faible testée, 6 W.m^{-2}, correspondant à un positionnement de la source UV à une distance de 9 cm de la cuve en quartz, un impact trop drastique sur les cellules totales et viables dû aux UV sera limité et l'effet de la température pourra être étudié sans interaction due aux UV. À cette distance, la puissance reçue par les cellules est de 6 W.m^{-2} ou 6 J.m^{-2}.s^{-1} et le temps de séjour des levures dans la cuve en quartz (V = 3,2 mL, Q = 130 mL.h^{-1}) est de 89 secondes, soit une exposition des cellules à une dose d'environ 500 J.m^{-2}.

IV.1.2 Taux de dilution du chémostat

Une concentration de 50 g.L^{-1} en éthanol est volontairement choisie dans le réacteur, cette concentration étant considérée comme acceptable industriellement sur la base d'un compromis entre rendement et coût énergétique en post-traitement. Ce critère est choisi pour contrôler le chémostat. Le taux de dilution du réacteur a donc été déterminé à partir de la courbe d'inhibition de l'éthanol sur la croissance de la souche sauvage industrielle en mode discontinu alimenté en

isotherme à 37°C (Figure 61), température choisie pour le régime permanent de la culture continue. Pour une concentration en éthanol de 50 $g.L^{-1}$, le taux de croissance et par suite le taux de dilution du chémostat doit être régulé à 0,16 h^{-1} (la fenêtre obtenue expérimentalement est de (0,155 h^{-1} ± 0,005 h^{-1}).

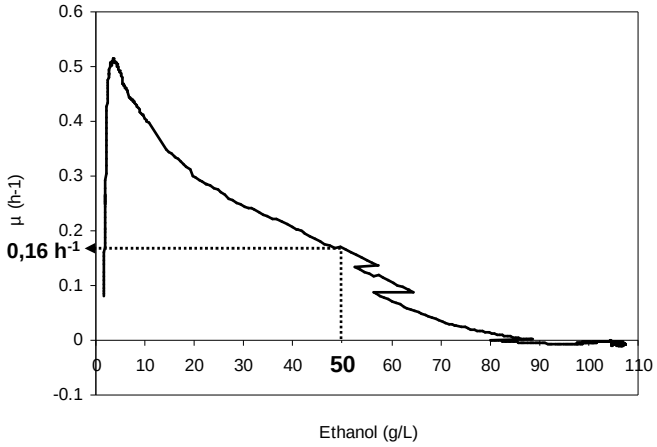


Figure 61. Taux de croissance de la souche industrielle de *Saccharomyces cerevisiae* en culture en mode discontinu alimenté à 37°C *en* fonction de la concentration en éthanol

IV.1.3 Conditions d'aération du chémostat

Un régime de micro-aération permet d'être en métabolisme respiro-fermentaire favorisant la production d'éthanol et limitant les phénomènes de stress des cellules qui pourraient être dus à une limitation en oxygène. Les conditions d'analyse de gaz en sortie du réacteur détectables par l'analyseur de gaz (CO_2 < 10%) imposent un débit d'aération élevé. La limitation en oxygène dans le réacteur est donc contrôlée par l'agitation.

Les conditions initialement fixées sont une vitesse d'agitation de 400 rpm et un débit d'aération de 1,1 $L.min^{-1}$ (1,1 VVM), la pression partielle d'oxygène dissous (pO_2) est alors de 1% à 2%.

Le chémostat sera donc mis en œuvre en micro-aérobie avec un taux de dilution imposé de 0,155 h^{-1} ± 0,005 h^{-1}, permettant de contrôler le fonctionnement du réacteur par l'inhibition éthanol à une concentration voisine de 50 $g.L^{-1}$. Le profil de température à appliquer a été déduit des simulations déterminées par le modèle cinétique (modification du gradient de température). De plus, le débit de recirculation dans la boucle de passage devant les UV avait été choisi à 0,13 $L.h^{-1}$, et la puissance d'exposition sera de 6 $W.m^{-2}$.

IV.2 Mode de conduite du chémostat

La culture est initiée en mode batch à une température de 37°C, avec une concentration en glucose initiale de 100 $g.L^{-1}$, en condition non limitante en oxygène, avec un pH régulé à 4 et ajout exponentiel de vitamines. Puis, lorsqu'une concentration en éthanol de 50 $g.L^{-1}$ est atteinte dans le réacteur, le réacteur est alimenté en milieu neuf stérile à un taux de dilution de 0,155 h^{-1} ± 0,005 h^{-1}. L'alimentation contient le milieu complet, c'est-à-dire, les sels, les oligo-éléments et les vitamines à une concentration identique à celle du milieu utilisé pour le batch ainsi que du glucose à une concentration de 150 $g.L^{-1}$. Une concentration en glucose de 150 $g.L^{-1}$ est choisie afin que le chémostat ne soit pas limité par le substrat mais seulement contrôlé par l'inhibition éthanol et afin de ne pas être à une concentration en glucose résiduel nulle pour limiter un stress éventuel dû à la carence en substrat et favoriser l'enrichissement d'un mutant éventuel.

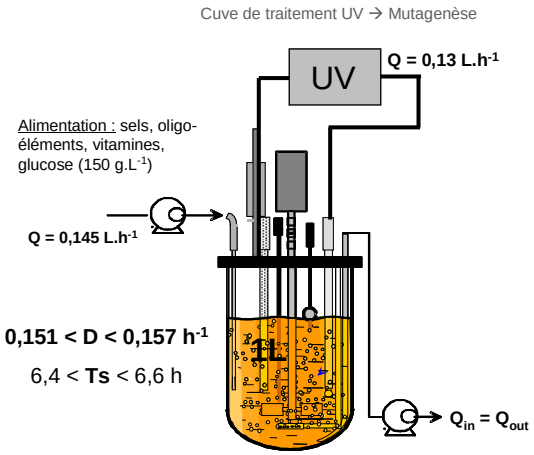


Figure 62. ***Schéma global du réacteur continu***

Lorsque le régime permanent est atteint, après 97 heures de culture, il est caractérisé pendant 80 heures puis une première perturbation est appliquée (« perturbation 1 »). La température du réacteur est augmentée suivant un gradient de 0,03°C.h^{-1}, parallèlement, des chocs à 45°C sont réalisés pendant 20 minutes toutes les 12 heures. La population est alors exposée aux UV avec un débit de recirculation de 130 $mL.h^{-1}$. Après 180 heures environ, la température atteinte dans le réacteur est de 42°C, la concentration en biomasse totale est alors très faible (1,5 $g.L^{-1}$). Afin de concentrer à nouveau le milieu en biomasse, le gradient est interrompu et le réacteur est maintenu à une température plus permissive de 40,5°C, température au-delà de celle où une faible récupération des cellules après le choc est observée (40,3°C). Cette phase à 40,5°C sera appelée « perturbation 2 ». Le gradient de température est arrêté, mais les chocs à 45°C toutes les 12 heures ainsi que la mutagénèse sont maintenus. Lorsque la concentration en biomasse augmente à nouveau et se stabilise une rampe de température plus faible de 0,02°C.h^{-1} est

appliquée en plus des chocs à 45°C et de la mutagénèse. Cette phase est appelée « perturbation 3 ». A la fin de ce second gradient, la température atteint 43,1°C.

Lors des chocs thermiques la température atteint une valeur supérieure à la consigne et peut atteindre 47°C maximum avant de se stabiliser à 45°C.

Les caractéristiques des différentes phases du chémostat sont rappelées dans le tableau suivant, et le profil de température (gradient et chocs thermiques) est représenté Figure 63.

Tableau 24. Caractérisation de durée, profil de température et mutagénèse aux UV pour les différentes phases du chémostat

	Batch	Régime permanent	Perturbation 1	Perturbation 2	Perturbation 3
Temps	0 h 11 h	97 h 179 h		359 h 435 h	577 h
D (h^{-1})	0	0,151 h^{-1} ± 0,001		0,153 h^{-1} ± 0,002	0,157 h^{-1} ± 0,001
Température	37°C	37°C	37°C – 42,06°C	40,5°C	40,5°C – 43,14°C
Gradient	isotherme	isotherme	0,03°C.h^{-1}	isotherme	0,02°C.h^{-1}
Chocs	isotherme	isotherme	45°C – 1/12h	45°C – 1/12h	45°C – 1/12h
UV	0	0	6 W.m^{-2}	6 W.m^{-2}	6 W.m^{-2}

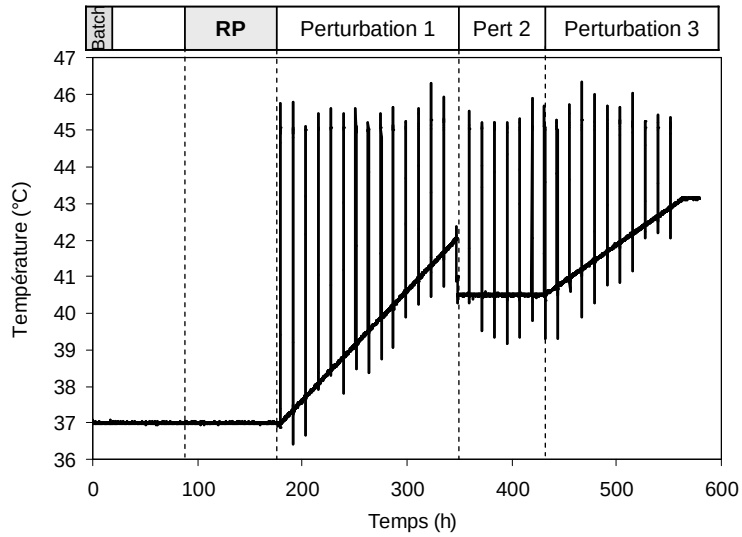


Figure 63. Représentation du profil de température du chémostat d'obtention de variants

IV.3 Caractérisation du régime permanent

Une fois le régime permanent atteint, il est caractérisé pendant 80 heures de culture entre 97 et 177 heures. L'évolution des masses de substrat et produits est représentée sur le graphe suivant (Figure 64). Les valeurs de concentrations moyennes sont calculées et l'erreur correspond à l'écart-type calculé sur toutes les concentrations obtenues pendant le régime permanent (Tableau 25).

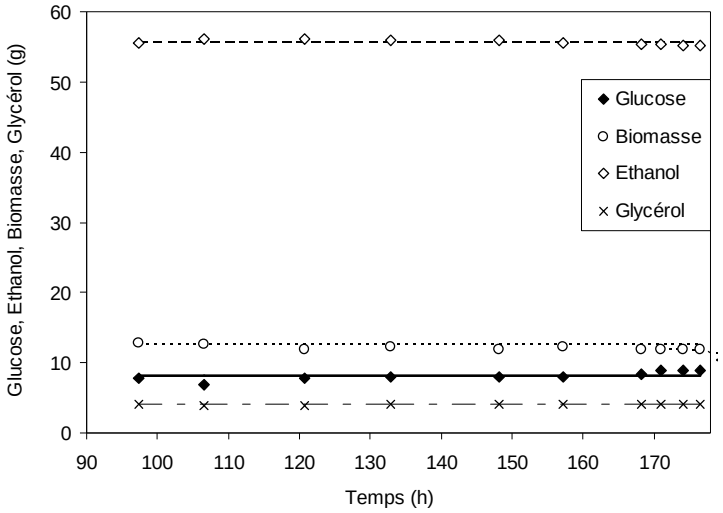


Figure 64. Evolution des masses de glucose consommées et des masses d'éthanol glycérol et biomasse produites au cours de la fermentation de la souche sauvage en culture continue – Régime permanent

Tableau 25. Tableau récapitulatif des concentrations, des paramètres cinétiques et des rendements obtenus pour le régime permanent à 37°C

Concentration en Ethanol ($g.L^{-1}$)	58,5 ± 0,4
Concentration en Biomasse ($g.L^{-1}$)	12,7 ± 0,3
Concentration résiduelle en Glucose ($g.L^{-1}$)	8,59 ± 0,66
Concentration en Glycérol ($g.L^{-1}$)	4,02 ± 0,03
Productivité Ethanol ($g.L^{-1}.h^{-1}$)	8,83 ± 0,05
Taux de croissance (h^{-1}) = Taux de dilution	0,151 ± 0,004
Vitesse spécifique de production d'éthanol ($g.g_X^{-1}.h^{-1}$)	0,55 ± 0,004
Vitesse spécifique de consommation de glucose ($g.g_X^{-1}.h^{-1}$)	1,67 ± 0,008
Rendement Ethanol/Glucose ($g.g^{-1}$)	0,41 ± 0,01
Rendement Biomasse/Glucose ($g.g^{-1}$)	0,09 ± 0,002
Rendement Glycérol/Glucose ($g.g^{-1}$)	0,028 ± 0,0003
Rendement Glycérol/Biomasse ($g.g^{-1}$)	0,32 ± 0,005

Les profils d'évolution des masses des différents composés sont très stables. Pendant le régime permanent, le taux de croissance est égal au taux de dilution soit 0,151 h^{-1} ± 0,001. La concentration en éthanol obtenue est de 58,5 $g.L^{-1}$, soit une concentration supérieure à celle visée (50 $g.L^{-1}$). Néanmoins, la culture de référence en mode discontinu alimenté à 37°C (Figure 61) donne pour ce taux de dilution une concentration en éthanol de 55 $g.L^{-1}$ proche de la concentration réelle obtenue. Comme désiré, la concentration en glucose résiduel n'est pas nulle (8,6 $g.L^{-1}$). Le rendement éthanol/glucose de 0,41 $g.g^{-1}$ est relativement proche de celui obtenu en fermentation en mode discontinu à 37°C (0,43 $g.g^{-1}$). Par ailleurs, le rendement biomasse/glucose de 0,09 $g.g^{-1}$ en régime permanent à 37°C est identique à celui obtenu en mode discontinu alimenté à 37°C.

IV.4 Analyses dynamiques des paramètres de fermentation en mode continu

Les masses de substrat et produits sont analysées sur toute la durée de la culture continue. Le graphe suivant présente l'évolution en fonction du temps de la masse de glucose consommée et des masses d'éthanol et biomasse (masse sèche) produites au cours du chémostat (Figure 65).

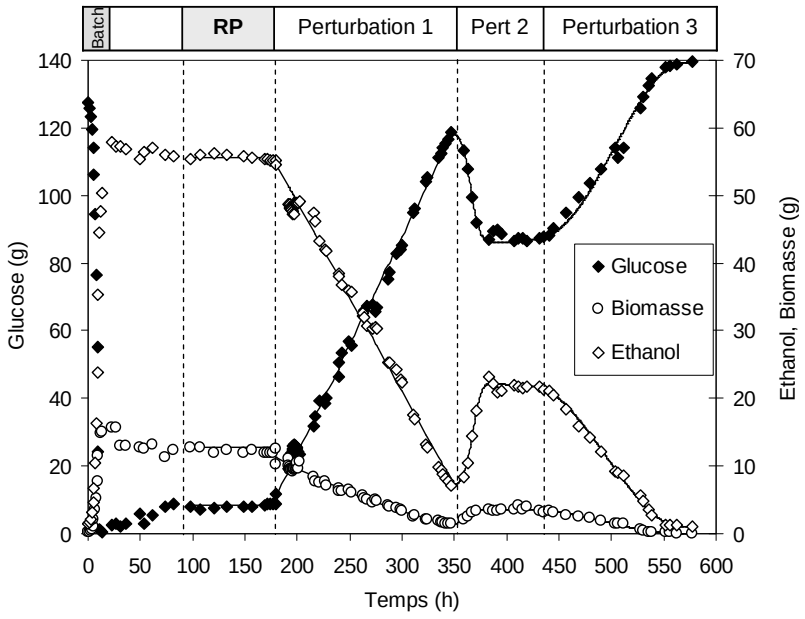


Figure 65. Evolution des masses de glucose consommées et des masses d'éthanol et biomasse (masse sèche) produites au cours de la fermentation de la souche sauvage en culture continue

Pendant le régime permanent, les masses en substrat et produits sont constantes, puis lors du démarrage de la première perturbation elles diminuent. Le gradient de température couplé à des chocs thermiques à 45°C induit une chute importante de la concentration en biomasse, qui

s'accompagne d'une diminution de la concentration en éthanol produite et d'une augmentation du glucose résiduel dans le réacteur. Les chutes de la consommation de substrat et de la production d'éthanol suivent un profil linéaire pour la perturbation 1, les concentrations en glucose consommé et en éthanol qui étaient de 141 $g.L^{-1}$ et 58,5 $g.L^{-1}$ pendant le régime permanent chutent à 25 $g.L^{-1}$ et 7,4 $g.L^{-1}$. La concentration en biomasse totale décroit de 12,7 $g.L^{-1}$ à 1,5 $g.L^{-1}$. Le profil de température imposé a un impact négatif sur les cinétiques de consommation, de croissance et de production.

La deuxième perturbation consiste en une température constante de 40,5°C couplée à des chocs à 45°C et à de la mutagénèse aux UV. Malgré les chocs à 45°C, les masses produites et consommées des différents composés sont stables, ce qui montre qu'après chaque choc de température les cellules semblent « récupérer », les cellules se maintiennent à une concentration constante de 3,7 $g.L^{-1}$ dans le réacteur et sont donc capables de croître à un taux de croissance de 0,153 $h^{-1} \pm 0,002$ à 40,5°C en présence de chocs thermiques. La concentration en éthanol et en glucose résiduel se stabilisent à 22,8 $g.L^{-1}$ et 91 $g.L^{-1}$.

Lors de la troisième perturbation les mêmes effets que ceux observés sur la perturbation 1 sont observés sur la biomasse, l'éthanol et le glucose. Les concentrations finales mesurées sont 0,04 $g.L^{-1}$ pour la biomasse, 1,2 $g.L^{-1}$ pour l'éthanol et 139 $g.L^{-1}$ de glucose résiduel.

Le gradient de température a un très fort impact sur les cinétiques. Néanmoins, les cellules montrent une adaptabilité et une résistance intéressante. Ainsi, lorsqu'il n'y a plus de gradient et que la température est fixée à 40,5°C, la biomasse recommence à croître à un taux de croissance supérieur à 0,15 h^{-1} (jusqu'à 0,2 h^{-1}) et atteint son régime stationnaire après 400 heures de culture.

Au changement de température, le système réagit instantanément, la vitesse de consommation de substrat augmente ainsi que celles de production d'éthanol et de croissance.

Le profil du glycérol dans le réacteur est très différent de ceux observés pour l'éthanol et la biomasse (Figure 66). Dès le début de la première perturbation, alors que les masses de biomasse et d'éthanol chutent rapidement, la masse de glycérol augmente pendant les 100 premières heures de 4 $g.L^{-1}$ jusqu'à une concentration de 5,7 $g.L^{-1}$. Cette concentration est atteinte à une température de 39,8°C et représente une augmentation de 42% de la concentration en glycérol par rapport au régime permanent. Au-delà de cette température, la masse de glycérol chute jusqu'à 2,8 $g.L^{-1}$. Puis lors de la deuxième perturbation, alors que la température est maintenue à 40,5°C et que des chocs à 45°C sont réalisés, la concentration en glycérol augmente et se stabilise vers 5 $g.L^{-1}$. Une concentration très proche (5,05 $g.L^{-1}$) avait été atteinte à la même température (40,5°C) pendant la première perturbation. Enfin, dès que le gradient de température reprend pendant la troisième perturbation, la masse de glycérol chute aussitôt, en parallèle à la chute de biomasse.

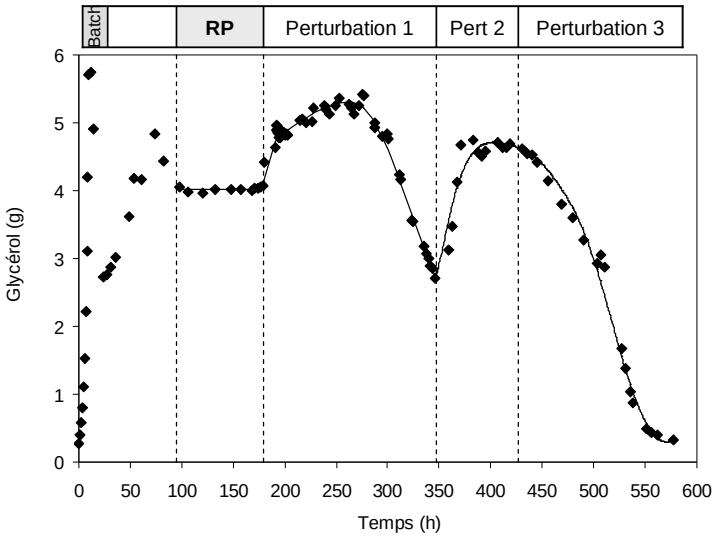


Figure 66. Evolution de la concentration en glycérol au cours du temps en culture continue

L'augmentation du glycérol avec la température, observée pendant les 100 premières heures de perturbation, traduit certainement une réponse au stress subi (gradient de température et chocs à 45°C). Une augmentation de la production de glycérol lorsque la température augmente a été rapportée en condition isotherme (Torija *et al.* 2003b; Aldiguier *et al.* 2004) et lors de la réalisation de chocs de température (Omori *et al.* 1996). Un rôle thermoprotecteur du glycérol a été proposé par ces auteurs et semble se justifier. La perte de glycérol observée par la suite est due à une perte de biomasse trop importante la température étant trop drastique.

Concernant les acides organiques, les profils de production observés sont différents suivant les acides (Figure 67).

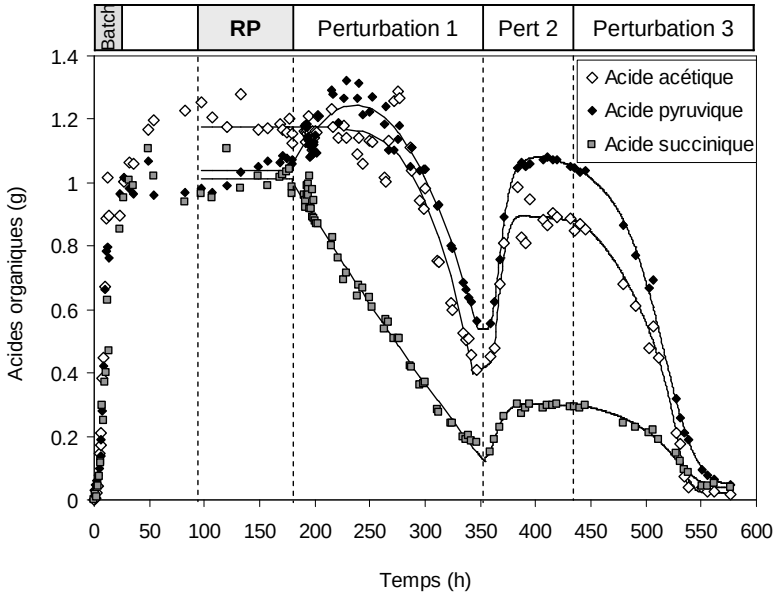


Figure 67. Evolution des concentrations en acides pyruvique, acétique et succinique au cours du temps

L'acide succinique a un profil semblable à l'éthanol ou la biomasse, avec une diminution immédiate de la masse dans le réacteur lors de la première et la troisième perturbation. L'acide acétique reste à une concentration assez faible, la culture étant limitée en oxygène. Sa concentration suit le profil de la biomasse et de l'éthanol sauf que sa chute n'est pas instantanée mais ne débute que 50 heures environ après le démarrage de la perturbation, soit pour l'apport de NADPH pour la croissance, soit pour la synthèse d'éthanol. Enfin, l'acide pyruvique suit le même profil d'évolution que le glycérol et est accumulé dès le début de la perturbation.

IV.5 Analyse des paramètres cinétiques en mode continu

A partir du lissage des masses obtenues sur l'ensemble de la durée du chémostat, le taux de croissance et les vitesses spécifiques de consommation de glucose, de production d'éthanol et de glycérol ont été calculés (Figure 68 et Figure 69).

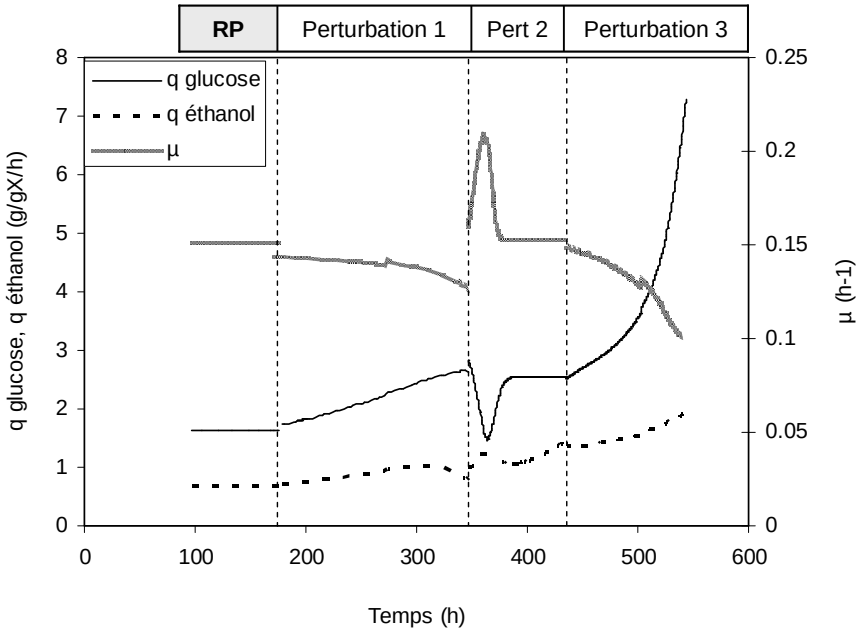


Figure 68. Taux de croissance apparent, vitesses spécifiques de consommation de glucose et de production d'éthanol au cours du temps en culture continue

Le taux de croissance apparent est égal au taux de dilution (0,150 h^{-1} ± 0,005 h^{-1}) pendant le régime permanent puis il diminue et devient inférieur au taux de dilution ce qui se traduit par une perte de biomasse (lessivage du réacteur). Il augmente à nouveau et sa valeur est supérieure au taux de dilution lorsque la température est ramenée à 40,5°C (perturbation 2). Le taux de croissance atteint une valeur maximale de 0,21 h^{-1} permettant d'enrichir à nouveau le réacteur en biomasse et se stabilise à 0,153 h^{-1} qui est le taux de dilution appliqué à cette phase du chémostat.

La concentration en éthanol dans le réacteur est alors de 18 $g.L^{-1}$ et non plus de 58,5 $g.L^{-1}$ comme lors du premier régime permanent. A cette température (40,5°C), l'inhibition de la croissance par l'éthanol est beaucoup plus forte qu'à 37°C et donc la concentration critique plus faible pour le même taux de croissance souhaité. Ces résultats sont cohérents avec ceux des fermentations en mode discontinu alimenté à 37°C avec ou sans choc thermique : les taux de croissance à une concentration de 18 $g.L^{-1}$ d'éthanol sont de 0,32 h^{-1} en isotherme à 37°C et 0,13 h^{-1} à 37°C en présence de chocs thermiques à 45°C toutes les 2 heures. En chémostat, à 40,5°C en présence de chocs à 45°C toutes les 12 heures le taux de croissance est de 0,153 h^{-1}, imposé par le taux de dilution hydraulique. Pendant la troisième perturbation le taux de croissance décroît immédiatement. La croissance est donc fortement perturbée par les chocs thermiques.

Les vitesses spécifiques de consommation de glucose et de production d'éthanol quant à elles augmentent faiblement pendant les perturbations, la quantité en biomasse et la concentration en éthanol étant plus faibles les vitesses spécifiques sont supérieures. En effet, la vitesse spécifique de production d'éthanol est de 0,7 $g.g_X^{-1}.h^{-1}$ pendant le régime permanent à 37°C et augmente jusqu'à un maximum de 1,4 $g.g_X^{-1}.h^{-1}$ lors de la stabilisation à 40,5°C (perturbation 2), à ce moment là, la concentration en éthanol n'est plus que de 18 $g.L^{-1}$ contre 58,5 $g.L^{-1}$ pendant le régime permanent.

La vitesse spécifique de production de glycérol est de 0,05 $g_{Glycérol}.g_X^{-1}.h^{-1}$ pendant le régime permanent à 37°C (Figure 69).

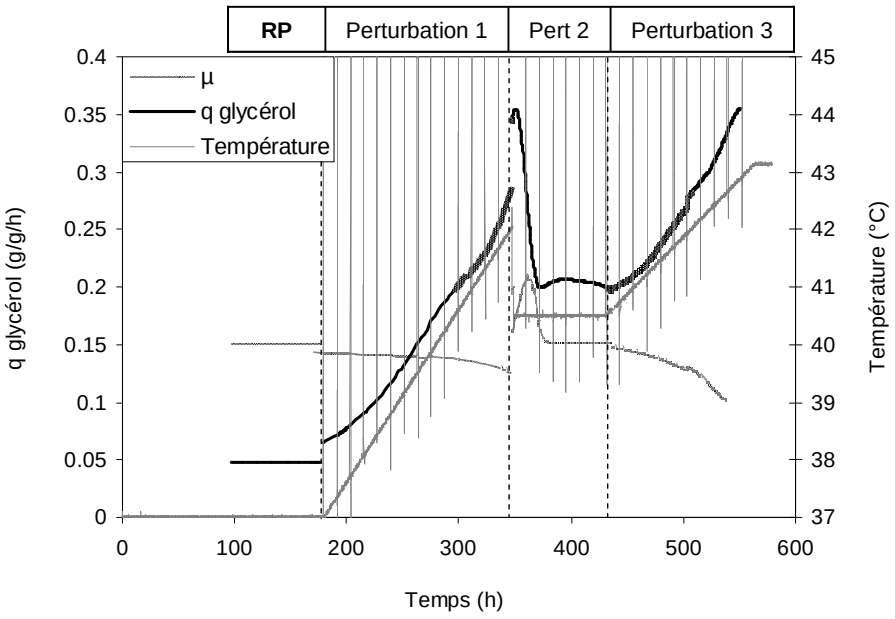


Figure 69. Température, taux de croissance apparent et vitesse spécifique de production de glycérol au cours du temps en culture continue

Elle augmente dès le début de la perturbation et atteint 0,3 $g_{Glycérol}.g_X^{-1}.h^{-1}$ lors de l'arrêt de la rampe. L'élévation de la température de 3,5°C (de 37°C à 40,5°C) entraine une augmentation

de la vitesse spécifique de production de glycérol d'un facteur 6. Concernant les vitesses spécifiques de production de glycérol, on constate qu'elles sont identiques dans la même gamme de température, pour des perturbations indépendantes. Pour les perturbations 1 et 3, la vitesse spécifique de production de glycérol varie entre 0,2 et 0,28 $g_{Glycérol}.g_X^{-1}.h^{-1}$ pour une température comprise entre 40,5 et 42°C avec la présence de chocs à 45°C toutes les 12 heures.

De plus une évolution de la vitesse spécifique de production de glycérol en fonction de la température (Figure 70) montre une proportionnalité, $q_{glycérol}$ augmente lorsque la température augmente.

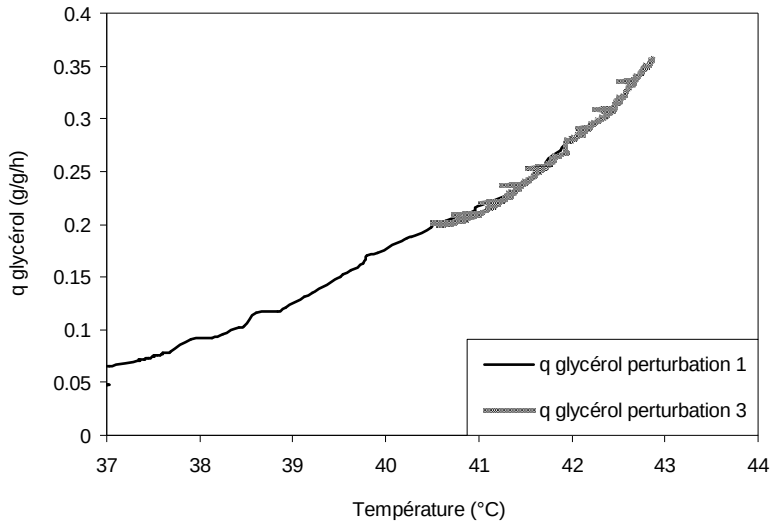


Figure 70. Vitesse spécifique de production de glycérol en fonction de la température pendant la PERTURBATIONS 1 (trait fin) et 3 (trait gras)

Ces résultats montrent non seulement un rôle thermoprotecteur du glycérol et un couplage direct production de glycérol-température (Omori *et al.* 1996; Torija *et al.* 2003b; Aldiguier *et al.* 2004), mais également que le système microbien, ici la levure, a un fonctionnement qui semble réversible par rapport à la température. Pour deux perturbations indépendantes (perturbations 1 et 3) la vitesse spécifique de production de glycérol est la même à température identique.

Les cultures en mode discontinu alimenté réalisées à 37°C ont montré un faible découplage entre la vitesse spécifique de production de glycérol et le taux de croissance. Par contre à 37°C en présence de chocs thermiques à 45°C, un découplage beaucoup plus important se produit qui montre que pour un même taux de croissance, la vitesse spécifique de production de glycérol est plus élevée en présence de chocs. Ce phénomène de découplage a été rapporté par Aldiguier *et al.* (2004) chez la souche CBS8066 à partir de 36°C. En chémostat, la vitesse spécifique de production de glycérol est représentée en fonction du taux de dilution pour les différentes perturbations (Figure 71).

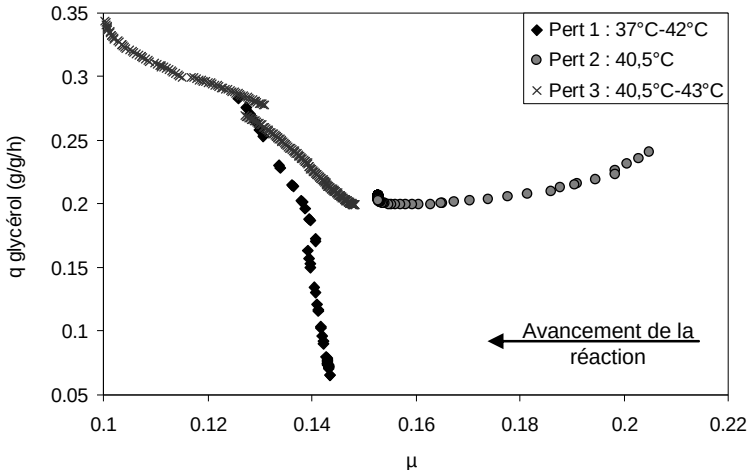


Figure 71. Vitesse spécifique de production de glycérol en fonction du taux de croissance pendant les PERTURBATIONS 1, 2 et 3

Pour les perturbations 1 et 3, la vitesse spécifique de production de glycérol augmente alors que le taux de croissance diminue (évolution inverse de celle observée en culture discontinue). En effet, le taux de croissance diminue suite au gradient et aux chocs de température et cette élévation de température entraîne une surproduction de glycérol. Pour ces deux perturbations, la tendance est la même, mais les valeurs sont différentes. Par contre pour la perturbation 2, lorsque seule la phase stabilisée est représentée, la vitesse spécifique de production de glycérol augmente lorsque le taux de croissance augmente et un phénomène de découplage s'observe avec un facteur de découplage de 0,13.

Les vitesses spécifiques de production d'acides organiques augmentent pendant la première perturbation (Figure 72).

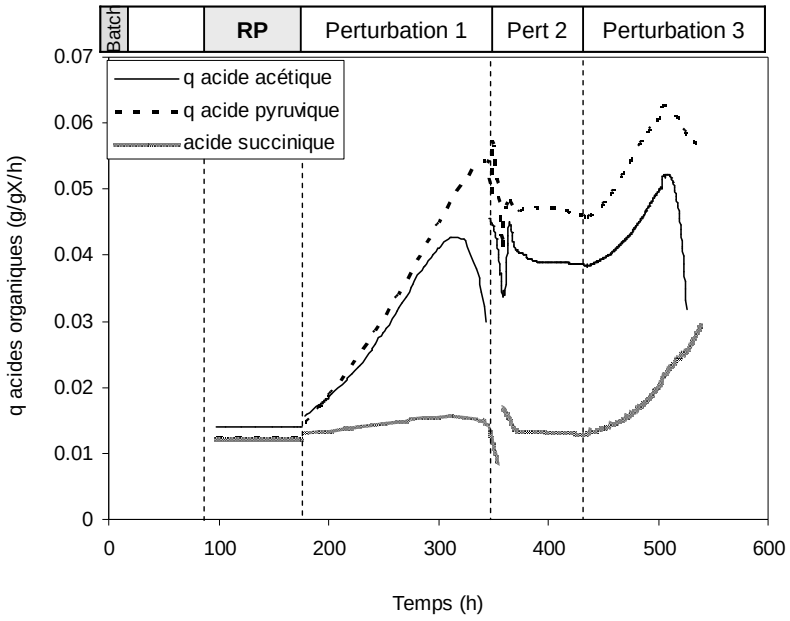


Figure 72. Vitesses spécifiques de production d'acides pyruvique, acétique et succinique au cours du temps en culture continue

L'augmentation est faible pour l'acide succinique et importante pour les acides acétique et pyruvique. Lors de la stabilisation à 40,5°C (perturbation 2) les vitesses spécifiques de production d'acides organiques se stabilisent, celle de l'acide succinique reste proche de celle déterminée pendant le régime permanent à 37°C, par contre, celles obtenues pour l'acide acétique et l'acide pyruvique sont respectivement 2,8 et 4 fois plus importantes à 40,5°C. Enfin lors de la troisième perturbation les vitesses spécifiques augmentent à nouveau jusqu'à un maximum avant de chuter lorsque la biomasse atteint une concentration très faible dans le réacteur.

Aucune des évolutions des vitesses spécifiques de production des métabolites (éthanol, glycérol, acides organiques) ne suit le taux de croissance. Toutes les vitesses spécifiques augmentent alors que le taux de croissance diminue lors des perturbations. A part pour le glycérol, où l'augmentation est induite par les chocs thermiques afin de protéger la cellule, ce profil d'évolution des vitesses spécifiques des autres métabolites n'était pas attendu. Ceci peut être dû à des changements métaboliques importants au niveau anabolique, catabolique ou sur la balance oxydo-réductive. Des réarrangements métaboliques sont probables, induisant une répartition du carbone dans la levure différente entre les différents métabolites. Néanmoins par manque de temps, une étude spécifique des flux métaboliques n'a pas pu être réalisée. Elle serait à mener pour une meilleure compréhension des phénomènes induits sous stress thermique.

IV.6 Analyse des gaz en mode continu

Les compositions en oxygène et en dioxyde de carbone, en entrée et dans les gaz de sortie du fermenteur, sont mesurées tout au long de la culture. Les vitesses de consommation d'O_2 et de production de CO_2 sont calculées (Figure 73).

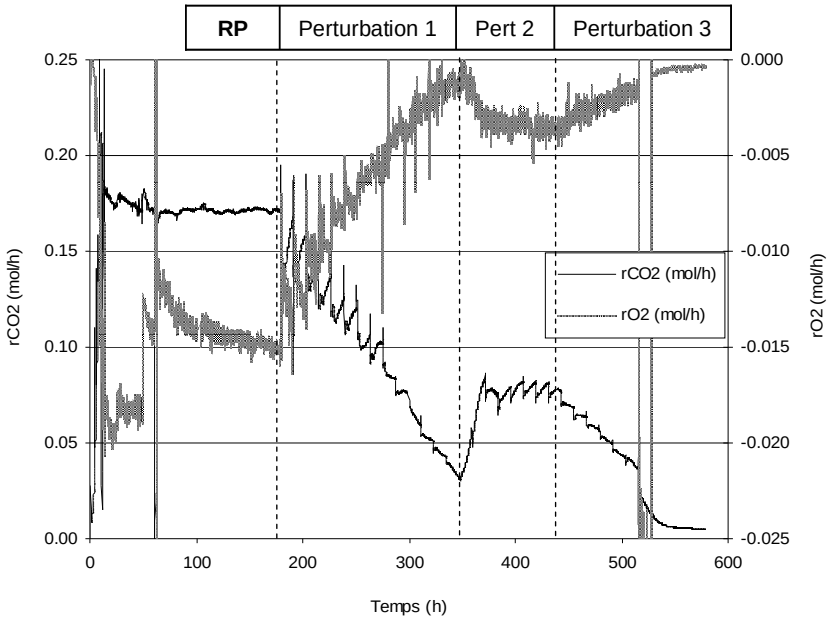


Figure 73. Vitesses de consommation d'O_2 et de production de CO_2 au cours du temps

Pendant le régime permanent, la vitesse de consommation d'oxygène est de 0,015 mol.h^{-1} et la vitesse de production de CO_2 est de 0,17 mol.h^{-1}. Dès le début de la première perturbation une chute des vitesses est observable lors de l'augmentation de température. Les mesures des compositions des gaz de sortie sont réalisées en ligne toutes les 5 minutes. Ainsi, il est possible d'observer que les diminutions de vitesses s'accompagnent d'oscillations qui correspondent aux chocs de température successifs à 45°C. Lorsque le gradient est interrompu et que la température est régulée à 40,5°C (avec chocs à 45°C), les vitesses se stabilisent à 0,004 mol.h^{-1} pour l'O_2 et 0,08 mol.h^{-1} pour le CO_2, la vitesse de consommation d'O_2 est donc 4 fois plus faible à 40,5°C qu'à 37°C et celle de production de CO_2 est réduite d'un facteur 2. Les chocs à 45°C étant conservés, des oscillations sont visibles sur les vitesses. Ces analyses semblent montrer également une réponse très rapide des cellules aux changements de température. La troisième perturbation entraîne une diminution des vitesses jusqu'à des valeurs proches de zéro, la biomasse dans le réacteur étant alors très faible (0,04 g.L^{-1}).

L'analyse de la vitesse spécifique de production de CO_2 (Figure 74) montre pendant la première perturbation une augmentation de q_{CO2} qui évolue de la même manière que les vitesses

spécifiques de consommation de glucose et de production d'éthanol, de glycérol et d'acides organiques et ne suit pas non plus l'évolution du taux de croissance. L'analyse de la vitesse spécifique de consommation d'O_2 montre que q_{O2} est constante dans un premier temps puis diminue comme le taux de croissance (perturbation 1).

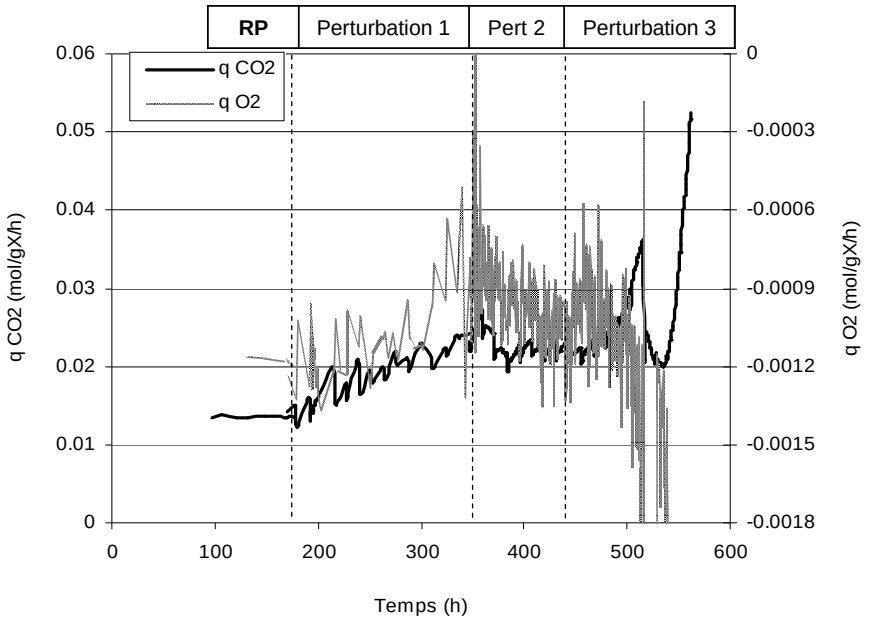


Figure 74. Vitesses spécifiques de consommation d'O_2 et de production de CO_2 au cours du temps en culture continue

Le quotient respiratoire est stable (Q_R = 13) pendant le régime permanent (Figure 75).

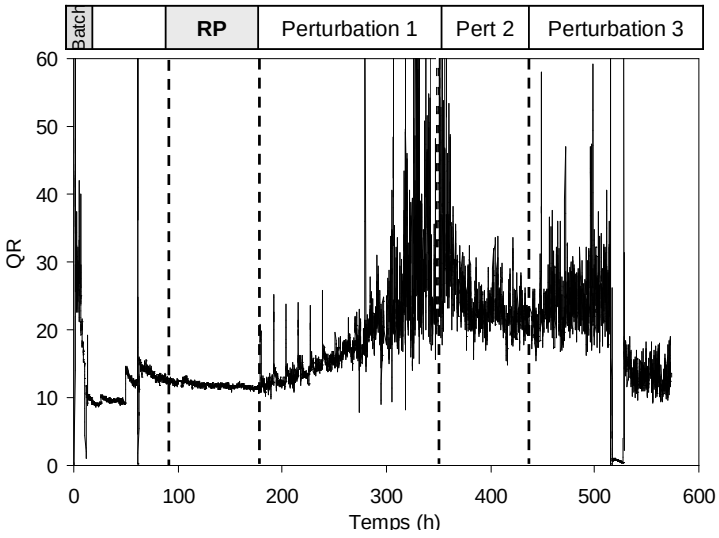


Figure 75. Quotient respiratoire (q_{CO2} / q_{O2}) au cours du temps en culture continue

L'application de la première perturbation (gradient de température de 37°C à 42°C) entraîne une augmentation du Q_R (vers 30) qui s'explique par une augmentation du catabolisme par rapport à l'anabolisme (la vitesse spécifique de production de CO_2 augmente alors que la vitesse spécifique de respiration diminue). Après les perturbations 2 et 3, le Q_R tend vers une valeur

moyenne constante (environ 25). Dans ces deux régimes de culture, les vitesses spécifiques de production de CO_2 et de consommation d'O_2 varient dans le même sens, elles augmentent de la même manière en fin de perturbation 3.

L'analyse stoechiométrique des rendements (Figure 76) montre des « modifications » métaboliques comme suggéré lors de l'analyse des vitesses spécifiques de production des principaux métabolites.

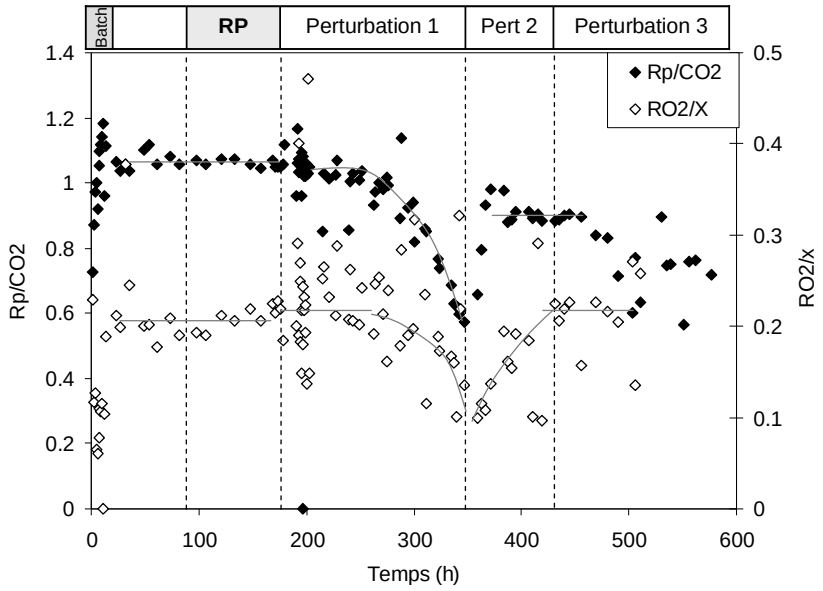


Figure 76. Rendement global en éthanol sur CO_2 et en O_2 sur biomasse au cours du temps en culture continue

Le régime permanent montre que le $R_{P/CO2}$ est de 1,06 ± 0,01 $g.g^{-1}$ et le $R_{O2/X}$ est égal à 0,20 ± 0,02 $g.g^{-1}$. Lors de la première perturbation, ces rendements restent constants (pendant 80 heures) puis chutent à 0,6 $g.g^{-1}$ pour $R_{P/CO2}$ et à 0,1 $g.g^{-1}$ pour $R_{O2/X}$. Lors de la perturbation 2 (isotherme à 40,5°C + chocs à 45°C), le catabolisme semble être récupéré plus vite que l'anabolisme, le $R_{P/CO2}$ est de 0,90 ± 0,02 $g.g^{-1}$; cette valeur se stabilise après 30 heures de régime semi-isotherme. Concernant le rendement $R_{O2/X}$ il augmente plus lentement pour retrouver sa valeur nominale à 0,20 ± 0,02 $g.g^{-1}$. L'analyse de la perturbation 3 est plus délicate au vu de la dispersion des résultats.

IV.7 Analyse de la viabilité, du décès et des sous-populations cellulaires

IV.7.1 Viabilité cellulaire

La viabilité est calculée à partir des comptages des cellules après coloration au bleu de méthylène (Figure 77). Elle est supérieure à 95% pendant le régime permanent, elle chute pendant la première perturbation mais reste supérieure à 88% puis ré-augmente au-delà de 95%.

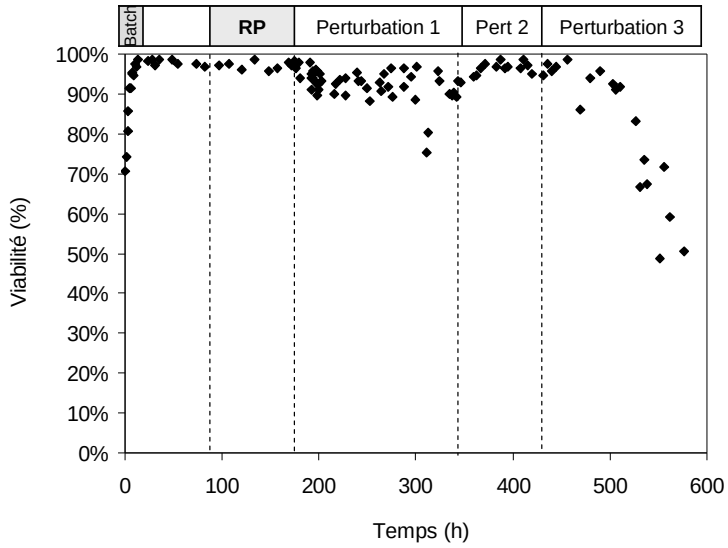


Figure 77. Evolution de la viabilité de la biomasse en fonction du temps en culture continue

La viabilité est peu affectée par la présence de chocs thermiques à 45°C et le gradient de température. Les cellules mortes sont lessivées au fur et à mesure de leur apparition. La viabilité chute en dessous de 80% à partir de 535 heures alors que la température atteint 42,6°C. L'impact le plus drastique est observé lors de la troisième perturbation lorsque la température est entre 42°C et 43,1°C.

IV.7.2 Evolution des sous-populations

IV.7.2.1 Analyse de la biomasse totale, viable et morte obtenue par comptage cellulaire

Les cellules totales, viables et mortes sont dénombrées par comptage après coloration au bleu de méthylène. L'évolution des populations cellulaires (Figure 78) montre que le nombre de cellules totales et viables diminue pendant les perturbations 1 et 3 alors que le nombre de cellules mortes reste faible du début à la fin de la culture.

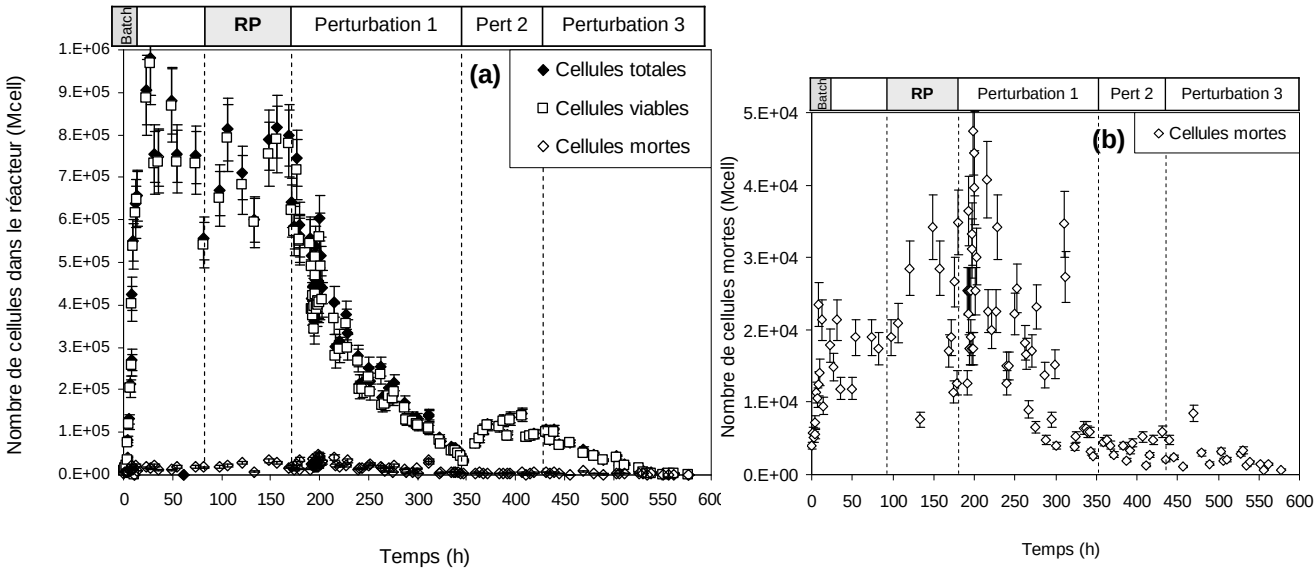


Figure 78. Evolution des cellules totales, viables et mortes (en million de cellules) en fonction du temps en culture continue (a), évolution des cellules mortes (b)

Pendant le régime permanent, la concentration en cellules totales est de $7{,}5.10^8$ cellules.mL^{-1} soit 7.10^{11} cellules dans le réacteur. Les cellules viables représentent 96 à 99% des cellules totales soit environ $7{,}3.10^8$ cellules.mL^{-1}, et la concentration en cellules mortes est de 2.10^7 cellules.mL^{-1}.

Pendant la première perturbation, les concentrations en cellules totales et viables diminuent Les cellules totales chutent de $7{,}5\ 10^8$ cellules.mL^{-1} en régime permanent à 4.10^7 cellules.mL^{-1} à la fin de la première phase de perturbation. Les cellules viables suivent le même profil car le pourcentage de viabilité est élevé, supérieur à 90%. Le nombre de cellules totales et viables est diminué d'un facteur 20. La concentration maximale en cellules mortes atteinte est de 4.10^7 cellules.mL^{-1}, soit le double de la population initiale.

Pendant la seconde perturbation, la stabilisation à une température de 40,5°C permet de concentrer à nouveau le milieu en biomasse. La viabilité augmente grâce à la croissance (augmentation des cellules totales et viables, dilution des mortes).

Enfin, pendant la troisième perturbation, les populations cellulaires chutent jusqu'à $1{,}5.10^6$ cellules totales.mL^{-1}, $7{,}5.10^5$ cellules viables.mL^{-1} et $7{,}5.10^5$ cellules mortes.mL^{-1}, ce qui correspond à une concentration en biomasse totale en fin de chémostat de 0,04 g.L^{-1}.

L'évolution du nombre de cellules totales et viables montre un fort impact du gradient de température et des chocs thermiques. Le nombre très faible de cellules mortes ainsi que le pourcentage de viabilité supérieur à 90% (Figure 77) jusqu'à 500 heures montre un taux de décès relativement faible, durant la culture continue, qui peut être négligé.

IV.7.2.2 Analyse de la biomasse viable cultivable

Le graphe suivant représente les cellules viables dénombrées par comptage après coloration au bleu de méthylène et le nombre de cellules cultivables issu du dénombrement sur milieu solide (Figure 79). L'évolution des populations cellulaires montre que le nombre de cellules viables et cultivables diminue.

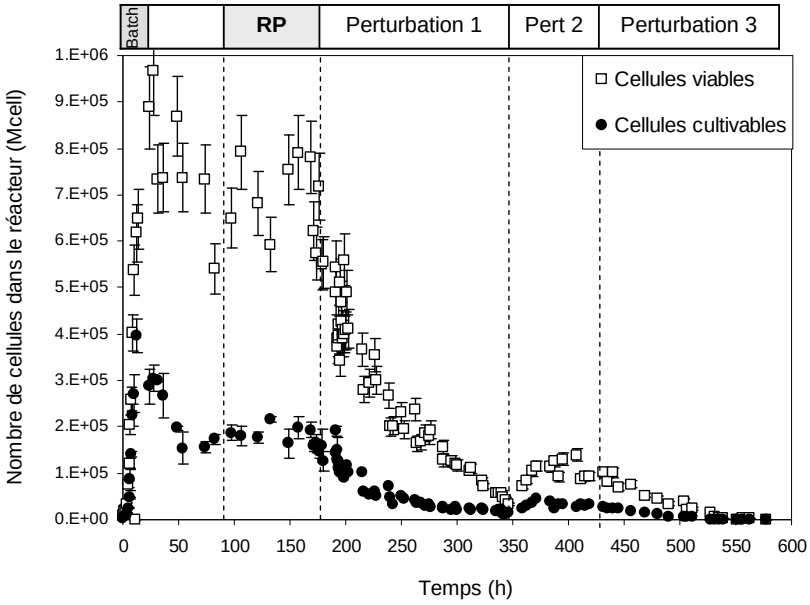


Figure 79. Evolution des cellules viables et cultivables (en million de cellules) en fonction du temps en culture continue

Le pourcentage de cellules cultivables par rapport aux cellules viables est faible puisque dès 23 heures de culture la proportion de cellules cultivables ne représente que 20 à 40% des viables. Ceci s'explique en partie par le fait que lorsque les cellules sont en croissance la majorité des cellules sont bourgeonnantes et le bourgeon est compté comme une cellule à part entière lorsque sa taille atteint la moitié de celle de la cellule mère. Deux cellules sont dénombrées au microscope alors qu'en culture sur milieu solide la cellule mère et son bourgeon peuvent ne former qu'une seule colonie. D'où un nombre de cellules cultivables représentant 50% des cellules viables lorsque toutes les cellules sont en division. Cependant, ici, la fraction de cellules viables est inférieure à 50%, même en régime permanent lorsqu'il n'y a ni gradient de température, ni chocs thermiques, ni UV, la cultivabilité des cellules est donc encore plus réduite par la présence d'éthanol dans le milieu à une concentration de 58,5 $g.L^{-1}$.

IV.7.2.3 Analyse de la biomasse viable obtenue par mesure en-ligne de la capacitance

Il a été déterminé précédement que la dynamique de la sonde caractérise la fraction de cellules dont la membrane est intègre et donc les cellules viables. Cet outil de suivi en ligne de la fraction de cellules viables est très utile dans ces conditions où la durée importante de la fermentation ne permet pas une fréquence élevée des mesures hors-ligne.

La capacitance mesurée par la sonde biomasse (Figure 80) confirme les chutes de la biomasse observées sur les cellules viables dénombrées après marquage au bleu de méthylène. De plus, des oscillations du signal sont observées et leur fréquence correspond à celle des chocs de température. Ces oscillations avaient été prédites par la simulation du chémostat grâce au modèle cinétique mais non visibles sur les profils de biomasse obtenus par masse sèche et comptage.

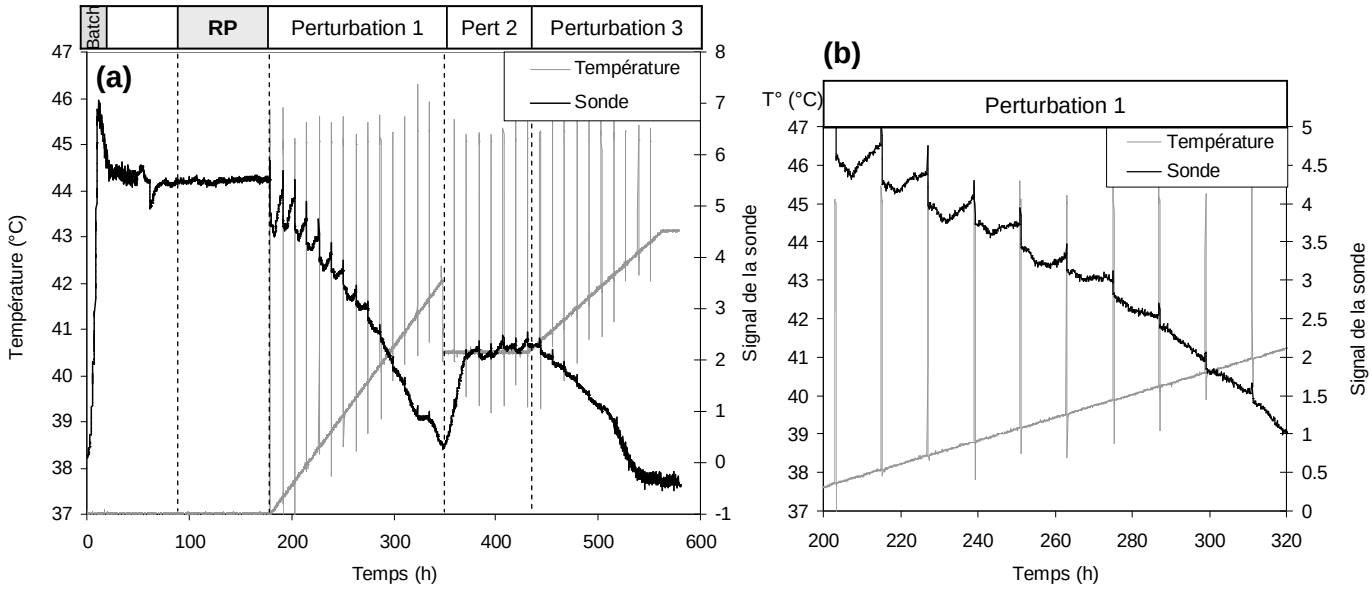


Figure 80. Evolution de la capacitance et de la température au cours du temps en culture continue, sur l'ensemble de la fermentation (a) et pour la perturbation 1 (b).

Après le premier choc à 45°C, il y a une chute immédiate de la fraction en cellules viables mesurée par la sonde. Le profil de température a été superposé à celui de la capacitance et permet de voir qu'après chaque choc thermique la fraction de cellule viable chute puis augmente à nouveau avant que le prochain choc ne soit imposé. A partir de 290 heures de culture, soit pour une température de 40,3°C, les cellules ne récupèrent plus entre 2 chocs (Figure 80 (b)), le signal ne réaugmente pas et ne fait que diminuer. La sonde capacitive montre un impact important des chocs thermiques sur la fraction de cellules viables. A 40,5°C les cellules se maintiennent ce qui se traduit par un signal moyen de 2,3, soit une chute de 60% par rapport au signal (5,5) obtenu en régime permanent. De plus, l'effet des chocs est nettement visible par la sonde alors que seul un effet global moyen était observable sur les cellules viables dénombrées au microscope. Cet outil est bien adapté à l'analyse de l'impact de chocs thermiques sur la fraction de cellules viables.

A partir du signal de la sonde, un taux de croissance instantané est calculé (Figure 81 (a) et (b)).

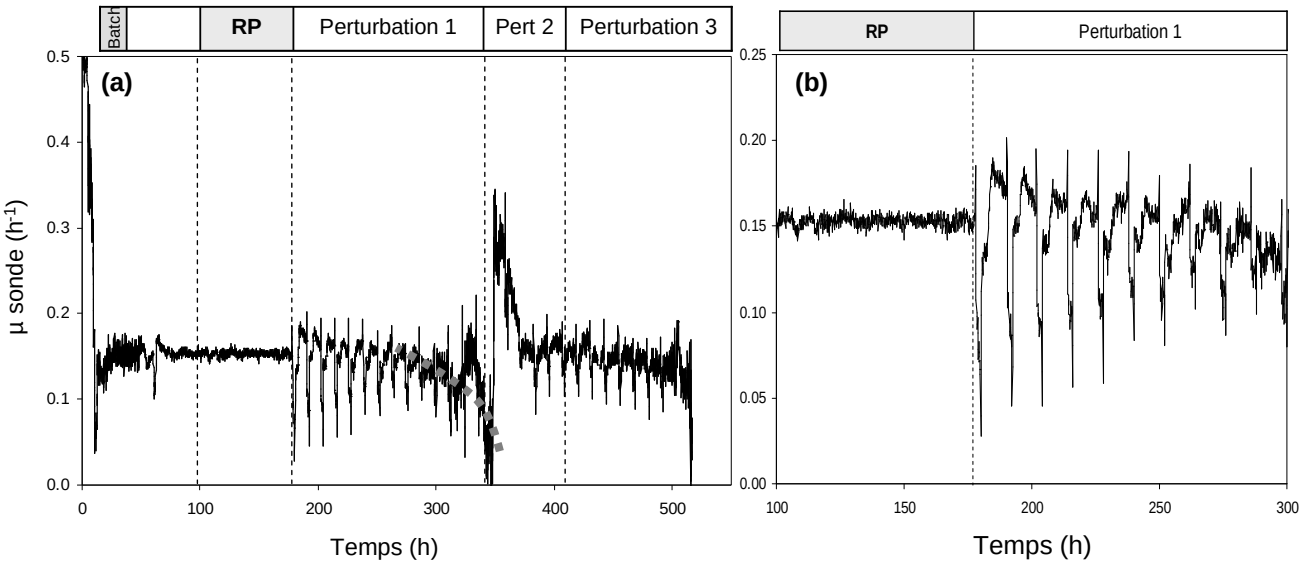


Figure 81. Taux de croissance de la souche en fonction du temps en culture continue à partir du signal de capacitance, sur l'ensemble de la fermentation (a) et pour le régime permanent et la perturbation 1 (b)

Pendant le régime permanent, le taux de croissance est égal au taux de dilution de 0,151 h^{-1} ± 0,005 h^{-1}, puis après le premier choc à 45°C le taux de croissance chute à 0,025 h^{-1} avant de réaugmenter jusqu'à un taux de croissance supérieur au taux de dilution (0,19 h^{-1}) ce qui permet un réenrichissement en biomasse entre deux chocs (Figure 81 (b)). Les chocs entrainent une chute du taux de croissance suivi d'une augmentation dès la fin du choc. Au cours de la perturbation 1, le taux de croissance maximal atteint après chaque choc diminue progressivement au fur et à mesure des chocs à 45°C.

L'observation du taux de croissance apparent calculé sur les mesures hors ligne de biomasse totale montrait une diminution de celui-ci (Figure 68). Or, le taux de croissance réel calculé sur la biomasse viable, à partir de données obtenues en ligne à une fréquence de mesure importante montre un profil différent, plus précis, avec une chute du taux de croissance après chaque choc et une augmentation après le choc jusqu'à une valeur supérieure au taux de dilution jusqu'à 274 heures, c'est-à-dire à 39,9°C. Au-delà de cette température, le taux de croissance est inférieur au taux de dilution. Lors de la stabilisation à 40,5°C le taux de croissance augmente à une valeur de 0,26 h^{-1} à 0,3 h^{-1} puis se stabilise vers 0,153 h^{-1}, taux de dilution du chémostat imposé pour cette phase d'avancement. La valeur maximale du taux de croissance calculé sur la biomasse totale est de 0,21 h^{-1}. Le taux de croissance calculé sur les valeurs de la sonde est nettement supérieur (0,28 h^{-1} ± 0,02 h^{-1}) à celui obtenu à partir des valeurs de masses sèches car il est calculé par rapport à la fraction de cellules viables. Les valeurs instantanées du taux de croissance montrent des capacités intéressantes de cette population à une température pourtant élevée (40,5°C).

Les mesures réalisées ont montré que la mesure de capacitance en ligne, traduisant la fraction de biomasse viable, est parfaitement corrélée aux profils de vitesses de production de CO_2 (Figure 82) et de consommation d'O_2 (Figure 83), calculables aussi en ligne et pouvant traduire les capacités cataboliques des cellules en fonction des perturbations subies.

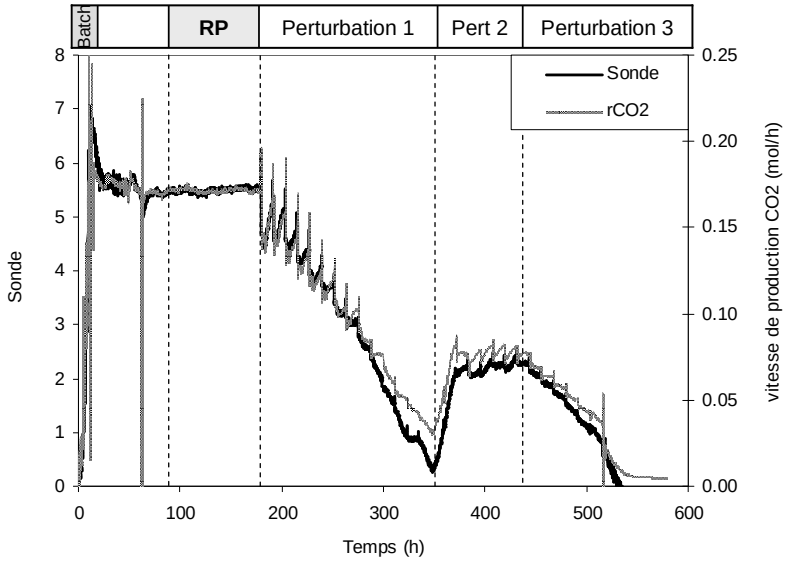


Figure 82. Superposition du signal de capacitance et de la vitesse de production de CO_2

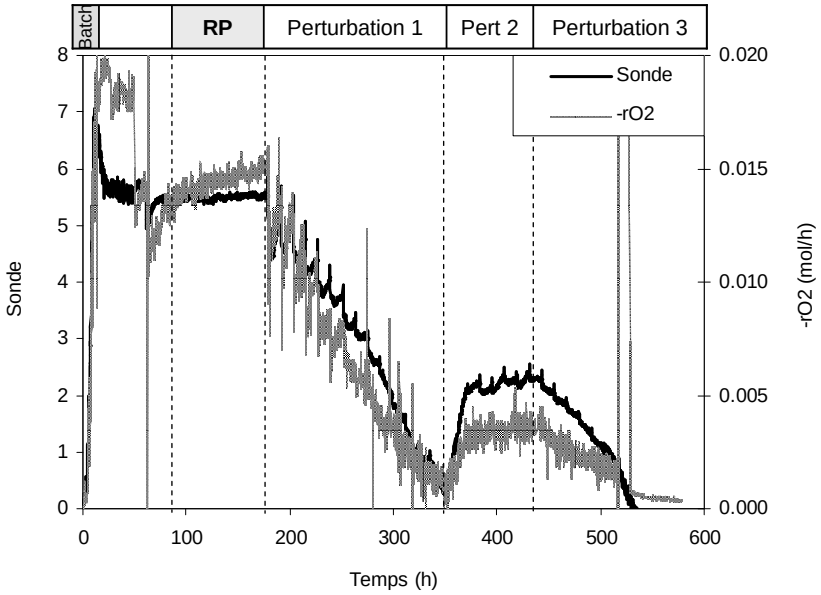


Figure 83. Superposition du signal de capacitance et de la vitesse de production d'O_2

L'évolution de la capacitance reflète donc bien l'état physiologique des cellules et une chute de viabilité réelle existe pendant les chocs suivie d'une reprise après le choc et ainsi de suite jusqu'à ce que la température devienne trop élevée et le taux de croissance trop faible pour permettre à la souche de se maintenir dans le réacteur.

Les réponses physiologiques et cinétiques mesurées par les capacités cataboliques (r_{CO2}), anaboliques (r_{O2}) ou physiologiques (sonde) semblent indiquer des capacités d'adaptation et de réponses rapides au stress température. Par ailleurs, les phénomènes observés semblent réversibles, les cellules étant capables de « récupérer » leurs capacités lorsque la température devient plus permissive.

IV.7.3 Analyse du décès

Le décès cellulaire est quantifié. Ici, un taux de décès moyen ne peut pas être calculé sur la perte de cellules viables, ce calcul prendrait en compte le lessivage en plus du taux de décès.

Le taux de décès instantané est donc calculé, selon l'expression suivante qui tient compte de la vitesse d'apparition des cellules mortes (k_d en h^{-1}) (Figure 84).

$$r_X = D\,X + \frac{d\,X}{dt} \qquad \textit{Équation 74}$$

$$r_{décès} = D\,X_{morte} + \frac{d\,X_{morte}}{dt} \qquad \textit{Équation 75}$$

$$\textit{avec} \quad r_{décès} = k_d \times X_{viable} \qquad \textit{Équation 76}$$

$$k_d = \frac{D\,X_{morte} + \frac{d\,X_{morte}}{dt}}{X_{viable}} \qquad \textit{Équation 77}$$

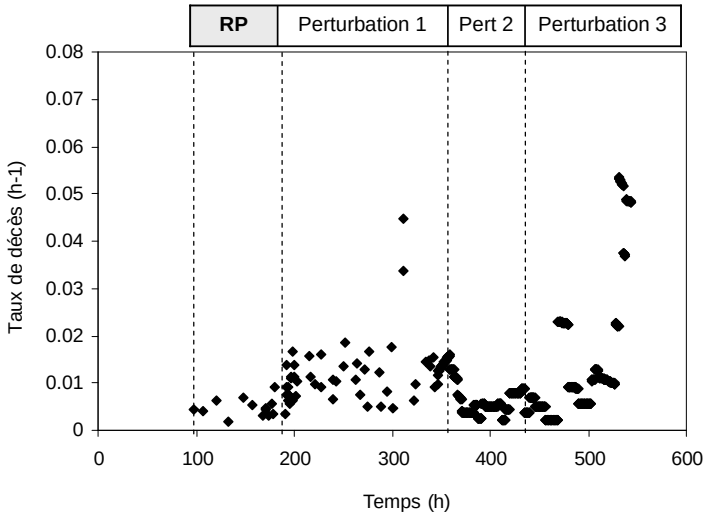


Figure 84. Taux de décès de la souche en fonction du temps en culture continue

Les cellules mortes sont lessivées au fur et à mesure de la diminution du taux de croissance par rapport au taux de dilution. Le nombre de cellules mortes dans le réacteur est relativement faible d'où un taux de décès très faible en comparaison à la culture de référence en mode discontinu alimenté à 37°C. Par ailleurs, le décès induit par l'éthanol est relativement négligeable, la concentration en éthanol étant seulement de 58,5 $g.L^{-1}$ en régime permanent puis très inférieure pendant les perturbations. Il est donc normal d'observer un décès plus faible que pour la culture de référence. L'effet de la température sur le décès cellulaire semble assez faible tout comme celui des UV, avec un taux de décès maximum de 0,012 h^{-1} ± 0,004 h^{-1} pendant la première perturbation (température de 37°C à 42°C) et de 0,003 h^{-1} ± 0,001 h^{-1} à 40,5°C. Le taux de décès augment fortement en fin de fermentation, lorsque la température augmente de 42°C à 43,1°C.

IV.8 Simulation des variables de fermentations dans les conditions mises en œuvre lors du chémostat d'obtention de variants

Un second modèle phénoménologique étudie l'impact de la température en conditions de production intensive d'éthanol sur la production de biomasse totale et viable, d'éthanol et de glycérol. Ce modèle a fait l'objet d'une publication présentée en annexe (Annexe 1, p.235). Contrairement au modèle de simulation de l'apparition de variants au sein du pilote, la mutagénèse n'est pas considérée, seule la biomasse sauvage (viable et totale) existe au sein du réacteur et un seul réacteur est pris en compte. Les équations cinétiques dépendent de la température et les constantes qui s'y rapportent ont été estimées par une méthode d'optimisation globale (Trigueros *et al.* 2010; Donoso-Bravo *et al.* 2011) d'après les résultats expérimentaux de cultures indépendantes en mode discontinu alimenté. Différentes températures ont été testées, en mode isotherme (37°C) ou avec des variations de température (30°C-39°C, 33°C-45°C, 34°C-47°C). Le modèle a ensuite été validé sur la culture en mode discontinu à 32°C avec un choc à 42°C et sur le chémostat, à la fois sur le batch, le régime permanent et les perturbations.

Le modèle proposé fournit des simulations satisfaisantes (Figure 85) de l'évolution des dynamiques de la biomasse et des produits en culture continue (batch, régime permanent, perturbation 1).

Les coefficients de corrélation (R^2) obtenus par l'analyse statistique sont supérieurs à 0,96 pour l'éthanol et le glycérol pour la plupart des cultures et les meilleurs résultats ont été obtenus pour la culture à 37°C en mode discontinu et en chémostat (régime permanent).

Au niveau du profil de biomasse totale, dès le début de la perturbation, le profil expérimental et simulé décroissent selon des pentes différentes, la simulation surestimant la

concentration en biomasse totale dans le réacteur. Sur la simulation des cultures en mode discontinu (Annexe 1 p.244 à 246) le même phénomène est observé. La biomasse totale simulée reste constante en fin de culture alors que la biomasse totale décroît. Ceci peut donc être expliqué par de la lyse cellulaire, non prise en compte dans le modèle cinétique. La concentration supérieure en biomasse totale simulée se répercute sur les autres variables et la consommation de glucose et la production d'éthanol sont également surestimées.

Par contre, un phénomène inverse est observé sur les profils de biomasse viable et de glycérol.

La biomasse viable, obtenue par l'expérience, est supérieure à celle simulée, ce qui signifie que la viabilité est meilleure que celle prédite. Une adaptation de la souche par mutagénèse aux UV et par le profil de température pourrait expliquer cette différence.

Pour le glycérol, dès le début de la perturbation, une augmentation de la concentration est observée alors que pour tous les autres composés, la concentration diminue. Il y a également une augmentation de la vitesse spécifique de production de glycérol (facteur 6). Ce phénomène pourrait traduire une réponse au stress température subi (gradient et chocs à 45°C) comme rapporté dans la littérature en conditions isothermes (Torija *et al.* 2003b; Aldiguier *et al.* 2004) et lors de la réalisation de chocs thermiques (Omori *et al.* 1996) et suggèrerait le rôle thermoprotecteur du glycérol, proposé par ces auteurs. D'autre part, la lyse cellulaire est certainement provoquée par les chocs thermiques, il est possible de penser que le glycérol intracellulaire est libéré dans le milieu de culture lors de la lyse des cellules.

Après 270 heures de culture, la température est de 39,7°C et la concentration en glycérol est proche du maximum atteint avec 5,5 $g.L^{-1}$. La concentration simulée est alors seulement de 2,75 $g.L^{-1}$. Pour la biomasse totale, au même instant la concentration simulée est de 7 $g.L^{-1}$ et la concentration expérimentale est réduite à 5 $g.L^{-1}$ par la lyse cellulaire. Le rendement glycérol/biomasse a été évalué pour la souche sauvage, à 37°C en mode discontinu alimenté (0,49 $g_{Gly}.g_X^{-1}$) et en culture continue (0,32 $g_{Gly}.g_X^{-1}$ en régime permanent). En posant l'hypothèse que la différence observée entre la concentration en glycérol extracellulaire simulée et expérimentale (+ 2,75 $g.L^{-1}$) provient uniquement de la lyse (de 2 $g.L^{-1}$ de masse sèche) nous pouvons nous demander quelle serait la concentration en glycérol intracellulaire des levures qui entraînerait une libération de 2,75 $g.L^{-1}$ supplémentaires. Une concentration de 2,75 $g.L^{-1}$ de glycérol est libérée par 2 $g.L^{-1}$ de biomasse totale lysée, soit 1,37 $g_{Gly}.g_X^{-1}$. Les levures étant constituées de 75% d'eau (25% matière sèche : 3 $g_{H2O}.g_X^{-1}$) (Russell 2003) il y a 0,38 $g_{Gly}.mL_{H2O}^{-1}$ soit 380 $g.L^{-1}$ de glycérol. Ce qui correspond à une concentration en glycérol intracellulaire de 4 M, qui est fortement improbable d'un point de vue biologique. Une concentration maximale de 1,2 M a pu être mesurée chez *Saccharomyces cerevisiae* et d'autres levures en condition de stress osmotique (50 $g.L^{-1}$ de NaCl), la concentration basale étant de l'ordre de 0,01 M - 0,05 M (Reed *et al.* 1987; Olz *et al.* 1993).

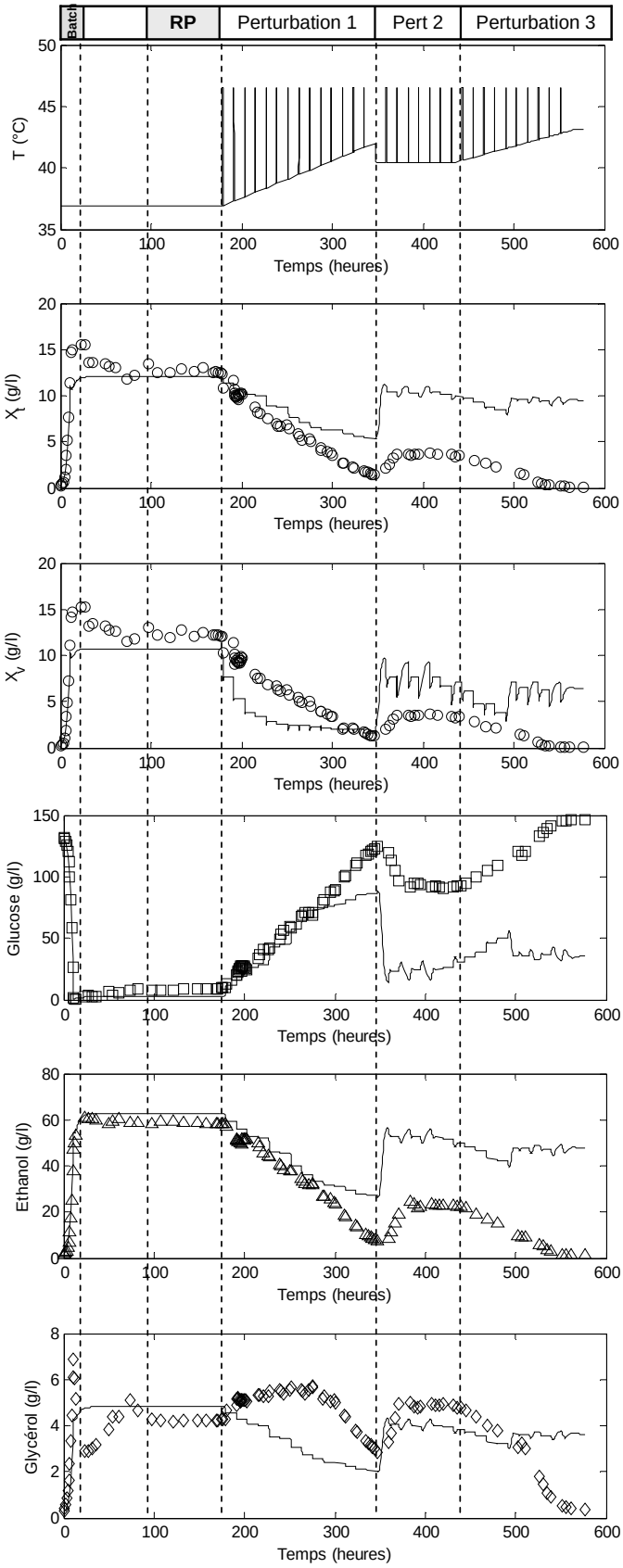


Figure 85. Simulations des profils de biomasse totale (b ●) et viable (c ○), de substrat (d ■), d'éthanol (e ▵) et de glycérol (f ♦) en culture continue soumise à un profil croissant de température (a). Les données expérimentales sont représentées par des symboles et les simulations par des traits continus.

Cette différence ne peut pas s'expliquer totalement par la libération du glycérol intracellulaire lors de la lyse et donc une réelle surproduction serait provoquée par les chocs de température afin de protéger les cellules.

Il se produit donc un changement de stoechiométrie. Le glycérol ne suit plus la cinétique établie dans le modèle phénoménologique même si une évolution de la production de glycérol avec la température a été prise en compte. Ceci est également visible sur les rendements glycérol/biomasse (Figure 86).

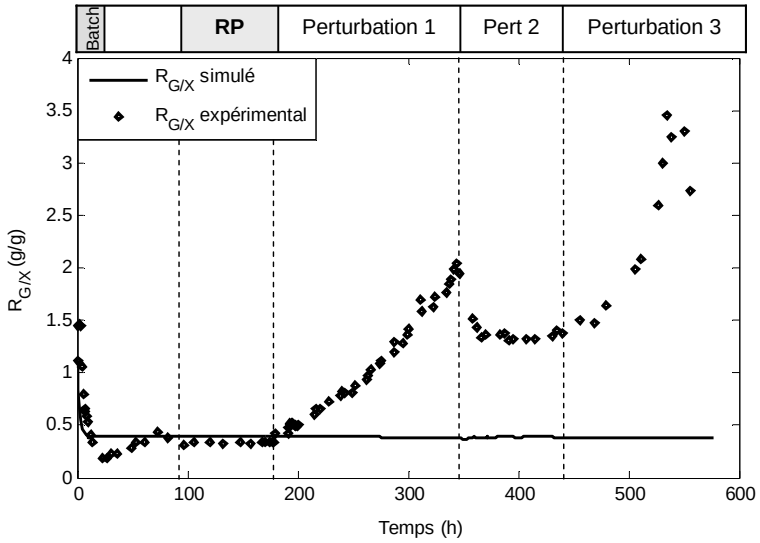


Figure 86. Rendement glycérol/biomasse en fonction du temps en culture continue calculé à partir des valeurs expérimentales et simulées par le modèle

A la fin du régime permanent, dès le départ de la perturbation 1 le rendement expérimental augmente alors que celui calculé à partir des valeurs simulées reste constant.

Dès la première perturbation la stoechiométrie est modifiée, il y a une production de glycérol accrue, non décrite par le modèle. Et ce malgré la prise en compte de la température dans l'évolution de la vitesse spécifique de production de glycérol et bien que le modèle ait été validé sur différentes fermentations (avec différents températures, différents profils de variation de température et différents modes de culture).

IV.9 Conclusion

Ce chapitre a présenté les résultats obtenus lors de la mise en œuvre du réacteur continu dédié à l'obtention de variants plus tolérants que la souche sauvage à des fluctuations de température. L'obtention de variants reposait sur une stratégie de génie microbiologique originale basée sur un couplage entre cultures en mode continu de la souche industrielle de *Saccharomyces cerevisiae* et mutagénèse aux UV, sous l'effet d'une pression de sélection contrôlée (la température). Les conditions de mise en œuvre de ce pilote avaient été définies au chapitre précédent d'après le modèle cinétique développé prenant en compte l'impact de la température et de l'exposition aux UV sur les cinétiques de croissance, de décès et de production de la souche sauvage ainsi que les probabilités d'apparition d'un variant. Lors de la réalisation de la culture continue, après stabilisation du régime permanent, des perturbations sont appliquées avec à la fois une exposition aux UV, des chocs de température successifs à 45°C toutes les 12 heures et un gradient croissant de température (gradient non appliqué lors de la perturbation 2) (pression de sélection).

Les résultats issus des simulations par le modèle développé ont montré que les perturbations affectaient de façon importante les cinétiques de croissance et de production. Dès le démarrage des perturbations (gradient de température, chocs thermiques et exposition aux UV), ce phénomène se vérifie et une forte diminution de la concentration en biomasse est observée dans le réacteur. La diminution de biomasse totale, viable et cultivable s'accompagne d'une chute des concentrations des différents métabolites et d'une augmentation du glucose résiduel. Par contre, contrairement à ce qui est observé pour les autres composés, au démarrage de la première perturbation la concentration en glycérol ainsi que la vitesse spécifique de production de glycérol augmentent. Cette augmentation pourrait provenir de la libération du glycérol intracellulaire lors de la lyse des cellules. Cependant, la lyse cellulaire ne pouvant pas expliquer à elle seule cette augmentation de la concentration en glycérol, il ya bien une production accrue de ce composé qui agit comme protecteur vis-à-vis du stress thermique subi, comme suggéré dans la littérature pour différents stress (Omori *et al.* 1996; Aldiguier *et al.* 2004).

D'autre part, la biomasse viable a pu être évaluée en ligne par la sonde capacitive. La fréquence élevée de mesures a révélé des oscillations du profil de biomasse viable en parallèle avec les variations de température appliquées au sein du réacteur. Dès le début du choc à 45°C, une perte de biomasse viable apparaît puis dès la fin du choc les cellules semblent « récupérer », elles retrouvent leur cultivabilité et leur concentration augmente à nouveau. Le modèle cinétique développé a également la capacité de décrire ces phénomènes. Du fait de la correction du signal de capacitance par la température, le phénomène observé est bien biologique. Le signal de la sonde est parfaitement corrélé à la vitesse de production de CO_2 qui traduit, elle, la capacité catabolique des cellules. Ces résultats confirment le fait que les oscillations observées sont d'ordre biologique. La récupération des cellules est importante au départ puis au fur et à mesure de la

perturbation les cellules récupèrent de moins en moins, jusqu'à ce que la température soit trop élevée pour permettre un maintien des levures dans le réacteur. Le fait que les levures retrouvent leur capacité à se reproduire après un stress thermique a été montré par Tibayrenc *et al.* (2011). Pour des stress de 0 à 1 heure à 43°C, les cellules sont à nouveau cultivables et possèdent un temps de latence plus ou moins long pouvant aller jusqu'à 4 jours suivant la sévérité du stress. Ces auteurs ont également montré que plus la durée du stress thermique est importante, plus la distribution de taille des colonies est grande (Tibayrenc *et al.* 2011). Cette hétérogénéité de population au niveau de la taille des colonies a été mise en évidence dans notre culture continue, en fin de fermentation pour des incubations sur milieu solide à 37°C, 39°C et 41°C (Figure 87). La dispersion de taille est importante, les durées de reprise de croissance étant différentes. Les colonies, les plus grosses, celles qui ont les temps de latence les plus courts suggèrent des cellules plus tolérantes, les incubations des boites ayant été réalisées à des températures plus élevées que dans l'étude de Tibayrenc *et al.* (2011) (30°C).



Figure 87. Photographie d'une culture sur milieu solide à 39°C – hétérogénéité de taille des colonies

Par ailleurs, dans le pilote d'adaptation, la viabilité est peu affectée et reste supérieure à 90% pendant la quasi-totalité de la fermentation, ce qui se traduit par un faible décès. Le phénomène de décès étant négligeable devant la perte de cellules par lessivage du réacteur.

Les cellules récupérées au cours de la culture ont subi un stress important et celles ayant conservé leur cultivabilité, c'est-à-dire capables de se reproduire, sont les plus robustes. Il se peut qu'elles possèdent des phénotypes différents de celui de la souche sauvage et que parmi les clones générés certains soient, comme recherché, plus robustes aux fluctuations de température. Sur le profil de capacitance obtenu, aucune augmentation de la fraction en biomasse viable n'est apparue, contrairement aux profils établis par les simulations issues du modèle, une augmentation du signal était théoriquement attendue dans le cas de l'apparition et de l'implantation d'un clone plus tolérant. Il se peut donc qu'il n'y ait pas eu de mutation et/ou d'adaptation et que les souches isolées soient identiques à la souche sauvage initiale. Cependant, il se peut également que les souches obtenues aient été améliorées sans pour autant qu'il y ait un enrichissement suffisant pour observer une augmentation du signal de capacitance.

L'hypothèse avancée de l'existence de clones possédant un phénotype amélioré au sein des populations récupérées va être vérifiée au chapitre suivant grâce à la caractérisation de différents

clones et la comparaison de leurs performances à celles de la souche initiale. Pour cela, tout au long de la culture continue, des échantillons des populations microbiennes ont été prélevés et conservés en milieu riche additionné de glycérol, puis stockés à -80°C en attente de la phase de caractérisation. Une première étape de criblage sur milieu solide sera réalisée sur certaines des populations cellulaires échantillonnées et permettra de tester le comportement des souches en termes de croissance en comparaison à la souche sauvage. Les clones les plus performants seront ensuite caractérisés en milieu liquide selon différentes méthodes pour une évaluation des performances en termes de viabilité, de décès et sur la base de critères d'intérêt industriel (titre en éthanol, productivité, rendement).

Plusieurs faits marquants ont été observés lors de la mise en œuvre de la stratégie d'adaptation en chémostat dans le pilote développé.

Tout d'abord, une réponse rapide du signal de capacitance et de l'analyse de composition des gaz (CO_2) qui rendent compte de l'état physiologique (viabilité) et de l'activité catabolique des levures. Ces outils d'analyse sont parfaitement adaptés pour retranscrire l'évolution des dynamiques de réponses au stress température en fermentation alcoolique.

Ces outils ont mis en évidence un fonctionnement de la levure qui semble réversible par rapport à la température. Les cellules « récupèrent » leurs capacités après chaque choc thermique, lorsque la température est plus permissive. De plus, les vitesses spécifiques (μ, $q_{glycérol}$, …) à une température donnée sont identiques pour des perturbations indépendantes, quels que soient les stress subis. Il y a donc une adaptabilité des cellules par rapport à la température.

Enfin, le décès cellulaire déterminé, en condition de stress thermique en culture continue, est faible.

Chapitre V :

Caractérisation phénotypique de variants issus du chémostat

Chapitre V : Caractérisation phénotypique de variants issus du chémostat

Le chapitre précédent a présenté la mise en œuvre du chémostat d'adaptation de la souche sauvage selon les conditions de fonctionnement et le profil de température fournis par le modèle cinétique. Des populations de « variants » potentiels ont été échantillonnées au sein du pilote et conservées en vue de leur caractérisation.

Ce chapitre (i) présente la stratégie de criblage afin de (ii) sélectionner les « meilleurs » clones parmi les populations cellulaires obtenues, (iii) caractériser les clones sélectionnés d'un point de vue phénotypique en termes de performances de croissance, de moindre décès, de rendements et de productivité pour (iv) obtenir si possible un ou des mutants améliorés par rapport à la souche sauvage.

V.1 Stratégie de caractérisation des variants

Des échantillons de populations cellulaires issus du pilote ont été prélevés à différents moments de la culture et conservés à -80°C. Chaque échantillon contient plus d'un million de levures par millilitre de milieu, possédant ou non un phénotype différent de la souche sauvage. L'étalement de ces suspensions cellulaires sur milieu solide a montré une hétérogénéité de population en termes de croissance avec l'apparition de colonies de tailles très différentes, pour différentes conditions d'incubation (variation du temps et de la température).

Parmi les populations cellulaires conservées, des échantillons ont été sélectionnés au hasard pour le criblage. Les échantillons à caractériser sont annotés : 86, 96, 109, 113 et ont été prélevés respectivement à 359, 416, 527 et 551 heures de culture, correspondant à différentes phases de culture du chémostat représentées sur la Figure 88.

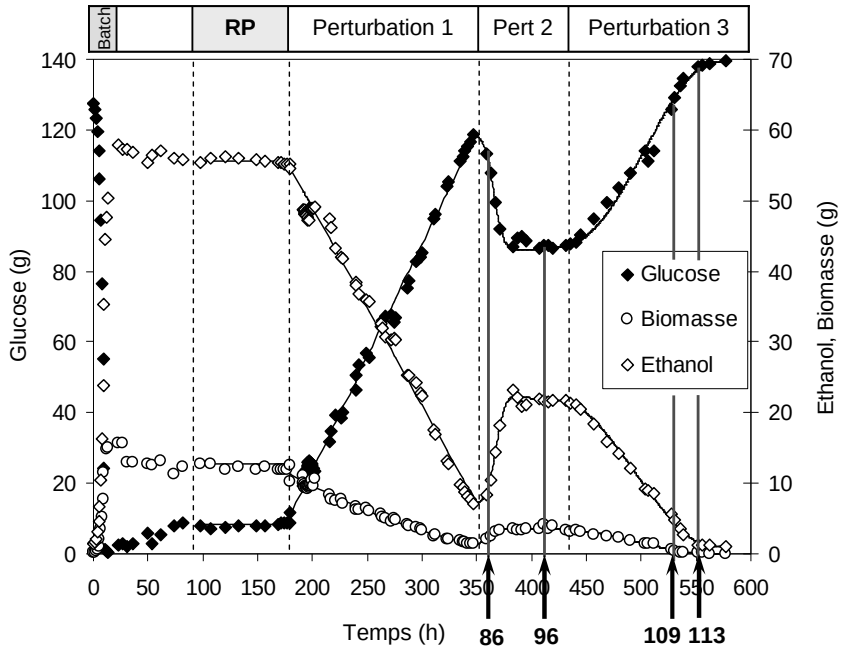


Figure 88. Positionnement des échantillons sélectionnés pour le criblage

Les échantillons issus du chémostat, stockés à -80°C, sont ensemencés sur milieu gélosé (PCA) en boites QTray, afin d'isoler les colonies pour le criblage. Ces clones vont être comparés à la souche sauvage (wt) ainsi qu'à une souche nommée « EMS ». La souche EMS est issue d'un traitement de la souche sauvage avec l'agent mutagène chimique éthyl-méthane sulfonate (EMS) qui provoque des substitutions de nucléotides (Lawrence *et al.* 1991). Ces souches sont également ensemencées sur milieu solide.

La première étape de caractérisation concerne le paramètre de croissance, par la taille des colonies obtenues, elle est réalisée sur milieu solide. Pour cela, les colonies ensemencées sur milieu solide vont être incubées à différentes températures. Afin de garantir que la colonie sélectionnée sera la même d'un test température à un autre et en fonction du temps d'incubation, plusieurs boites gélosées doivent être ensemencées à l'identique, c'est-à-dire que chaque clone sélectionné aura le même positionnement (x, y) sur chaque boite.

L'exacte réplication des boites initiales est réalisée par un robot de piquage de colonies Qpix (Genetix) du plateau technique ICEO (Ingénierie et Criblage d'Enzymes Originales), en 3 étapes nommées picking, replicating et griding (Figure 89). Les colonies issues du chémostat qui se sont développées sur milieu solide en boites QTray sont transférées en milieu liquide, cette étape est appelée « picking ». 96 colonies prélevées au hasard par le robot sont déposées dans les différents puits d'une microplaque de 96 puits (1 colonie par puits) contenant 200 µL de milieu synthétique complet. Les microplaques sont incubées 24 heures à 37°C sous agitation (200 rpm). Afin de garantir une homogénéité de concentration entre les puits de la microplaque, une seconde étape de préculture en milieu liquide est réalisée. Le « replicating » consiste en une reproduction exacte du contenu de la microplaque, un passage de milieu liquide à milieu liquide. A l'aide d'une

tête de 96 aiguilles, le robot plonge dans une microplaque 96 puits et vient ensemencer une seconde microplaque. Les levures sont ainsi transférées dans du milieu neuf et incubées 24 heures dans les mêmes conditions. Les cultures étant supposées homogènes dans chaque puits, le « gridding » est réalisé. Il consiste en un dépôt des précultures des 96 puits sur milieu gélosé (QTray), pour cela, une empreinte est effectuée grâce à une tête de 96 aiguilles qui plonge dans la microplaque puis dépose les microlitres prélevés sur la gélose. Il est possible de déposer les empreintes de 12 microplaques sur une même QTray. Le nombre de copies nécessaire est réalisé et toutes les boites obtenues sont identiques.

Deux microplaques contenant 96 mutants, soit 192 clones issus de la population d'un même échantillon, sont déposés de façon isolée sur une partie (1/6ème) d'une boite QTray, les clones issus des 5 autres populations seront déposés sur les 5 sixièmes restants de la boite QTray.

Le schéma suivant (Figure 89) résume la stratégie de criblage développée.

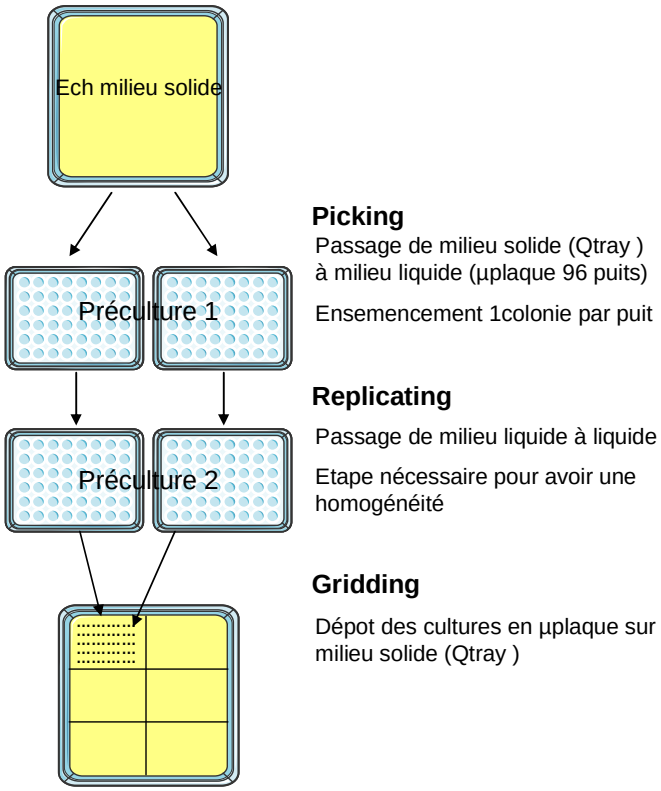


Figure 89. Méthode de repiquage de clones sur boite gélosée QTray

Les boites ainsi répliquées à l'identique seront incubées à différentes températures. Les clones les plus performants en termes de croissance seront sélectionnés pour une caractérisation de la croissance, du décès et de leurs performances en milieu liquide.

V.2 Caractérisation de la croissance des variants

V.2.1 Caractérisation de la croissance sur milieu solide

L'ensemble des boites ensemencées à l'identique sont incubées pendant différentes durées à différentes températures. Ainsi, cinq températures d'incubation sont utilisées pour le criblage de clones dits « performants » : **41°C** ± 0,4°C ; **43°C** ; **44°C** ; **45°C** ± 0,4°C et **46°C** ± 0,1°C. Les durées d'incubation sont fixées à 3 heures, 14 heures ou 3 jours. Au bout de ces temps d'incubation les boites sont incubées à 30°C jusqu'à apparition de colonies. Ainsi 15 boites QTray ont été réalisées et analysées. Chaque boite est divisée en six zones, chacune contenant une population cellulaire « cible » (86, 96, 109, 113, EMS et wt), le fait que les différentes populations soient sur une même boite garantit un traitement (température et temps d'incubation) parfaitement identique d'une population à l'autre.

Les températures les plus marquantes ont été sélectionnées et sont présentées dans cette partie. Les photographies suivantes représentent les résultats obtenus après 3 heures et 14 heures d'incubation à 41°C (Figure 90) et 45°C (Figure 91) (et incubation à 30°C jusqu'à apparition des colonies). Les photographies des boites incubées aux autres températures sont présentées en annexe (Annexe 3 p.257).

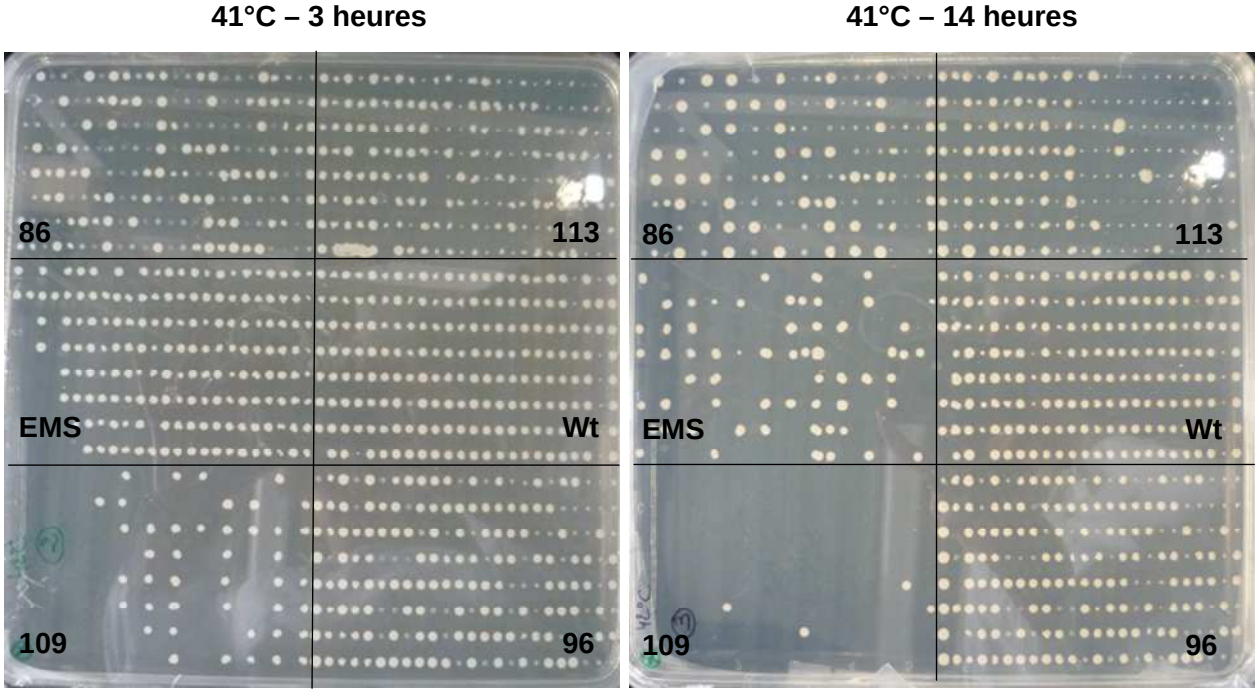


Figure 90. Photographie des boites de pétri QTray incubées à 41°C pendant 3 heures et 14 heures puis à 30°C jusqu'à apparition des colonies

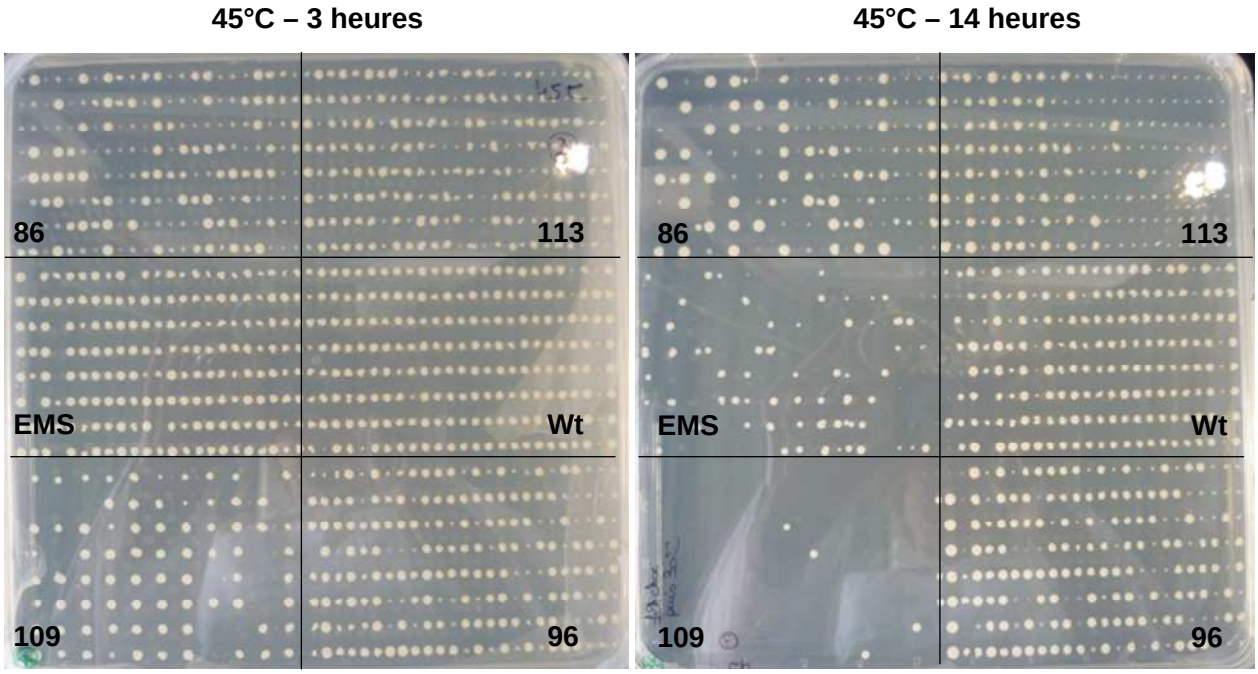


Figure 91. Photographie des boites de pétri QTray incubées à 45°C pendant 3 heures et 14 heures puis à 30°C jusqu'à apparition des colonies

Les colonies observées pour la souche sauvage apparaissent très homogènes sur toutes les boites quelle que soit la température d'incubation.

Par ailleurs, pour tous les échantillons issus du chémostat, la population étalée apparaît hétérogène, révélant que les cellules sont affectées de manières différentes et qu'il existe des différences entre les « individus ». Ceci pourrait être dû à des modifications phénotypiques attendues à savoir une meilleure résistance à la température ou une augmentation des cinétiques de croissance sur ces variants. Ces critères seront évalués ultérieurement.

De plus, certains clones issus du chémostat donnent des colonies de taille plus importante que celles observées pour la souche sauvage. Après 14 heures à 45°C les colonies observées pour les levures issues de l'échantillon 86, plus grosses que celle obtenues pour la souche sauvage. Ces résultats pourraient aussi traduire une efficacité de la mutagénèse et du test de sélection. Ces clones seront caractérisés en milieu liquide.

D'autre part, la souche ayant subi des mutations chimiques à l'EMS montre également une population hétérogène. Par contre, elle se révèle moins robuste en termes de nombre de colonies visibles, pour une incubation de 14 heures ou plus et ce quelle que soit la température. En effet, le nombre de colonies se développant est plus faible pour le traitement par EMS que pour les clones obtenus dans le pilote. Après 3 heures d'incubation, quelle que soit la température, la population traitée à l'EMS ne semble pas significativement différente de la population sauvage, alors que des

effets discriminants peuvent être vus sur les échantillons issus du chémostat, quel que soit l'échantillon considéré.

Quels que soient la température et le temps d'incubation et bien que des re-ensemencements en milieu liquide soient effectués afin « d'homogénéiser » la population, tous les échantillons issus du chémostat montrent des hétérogénéités de croissance des colonies qui pourraient indiquer des clones plus ou moins performants sur ce critère.

Après 3 jours d'incubation aux différentes températures, des colonies sont observées seulement sur la boite incubée à la température la plus faible : 41°C, les plus grosses sont encerclées sur la Figure 92. Pour l'échantillon 86B, les colonies de plus grosse taille étaient également plus grosses aux autres températures et temps d'incubation.

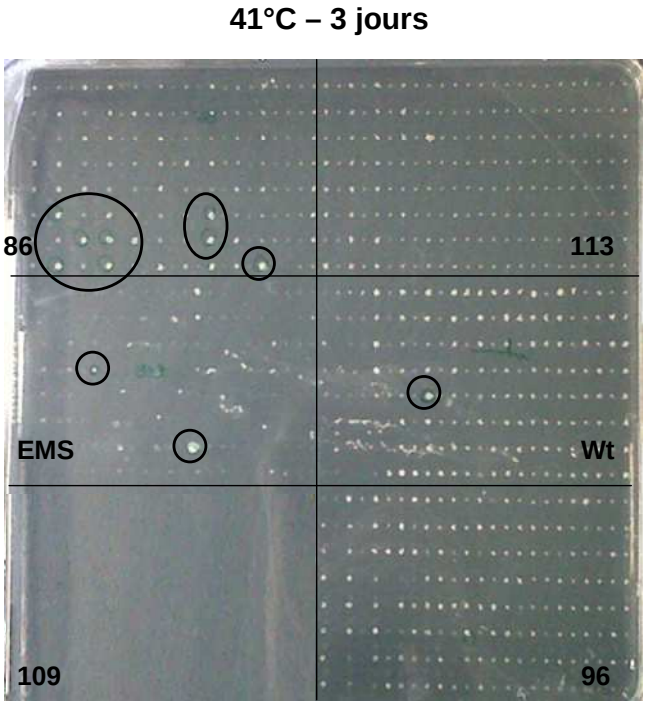


Figure 92. Photographie de la boite de pétri QTray incubée à 41°C pendant 3 jours puis à 30°C jusqu'à apparition des colonies

L'existence de colonies plus grosses pourrait être attribuée à d'autres effets qu'une meilleure croissance comme un encombrement stérique moindre, un ensemencement plus important ou une phase de latence plus courte. L'hypothèse d'un plus faible encombrement stérique autour des colonies les plus grosses peut être avancée, or pour la souche sauvage pour laquelle une homogénéité est observée, après 14 heures, certaines colonies sont plus grosses malgré la présence d'autres colonies autour. Ceci est donc révélateur d'une hétérogénéité de population (pour les échantillons du chémostat) plutôt que d'un réel effet d'encombrement.

D'autre part, l'ensemencement, réalisé par des aiguilles qui plongent dans le liquide et déposent sur la gélose des microlitres de préculture, est automatisé et donc présumé uniforme. Une croissance plus rapide et/ou une phase de latence plus courte sont retenues pour les colonies les plus grosses, dans les deux cas une amélioration étant obtenue. Cette méthode sert de crible pour la sélection de **cellules susceptibles de croître plus vite** (lors d'un stress thermique), afin de réaliser par la suite une caractérisation sur d'autres critères.

Les souches issues du chémostat sont capables de croître sur milieu solide après exposition à une température de 46°C pendant 14 heures (température la plus élevée testée) (Annexe 3 p.257). Certaines colonies formées sont de taille plus importante que celles obtenues pour la souche sauvage, ce qui indique une croissance plus rapide à température élevée. Les clones (ainsi que la souche sauvage) ne sont pas capables de croitre après 3 jours à une température supérieure à 41°C. L'objectif étant d'obtenir des souches tolérantes à des fluctuations de température et non pas capables de se développer à température élevée, les essais d'exposition des boites pendant 3 et 14 heures aux différentes températures fournissent plus d'information que les essais d'incubation de 3 jours, trop drastiques. La durée d'incubation de 14 heures à températures élevées est quant à elle bien discriminante alors que l'incubation de 3 heures n'apporte que peu de différences entre les souches.

Cette méthode de criblage sur milieu solide permet une caractérisation rapide d'un nombre important de clones puisque plus de 1000 cellules ont été déposées par boites (768 clones issus du chémostat, 192 levures mutées à l'EMS et 192 exemplaires de la souche sauvage). De plus, par ce criblage haut débit une amélioration de la croissance des clones obtenus par rapport à la souche sauvage a été montrée. Parmi les clones les plus performants en termes de croissance, c'est-à-dire les plus grosses colonies formées, trois sont sélectionnés pour réaliser un suivi de la cinétique de croissance en milieu liquide et pouvoir obtenir leur taux de croissance. Ces trois clones proviennent de l'échantillon 86 et seront nommés 86A, 86B et 86C. La Figure 93 illustre le positionnement des clones sélectionnés sur la boite QTray gélosée.

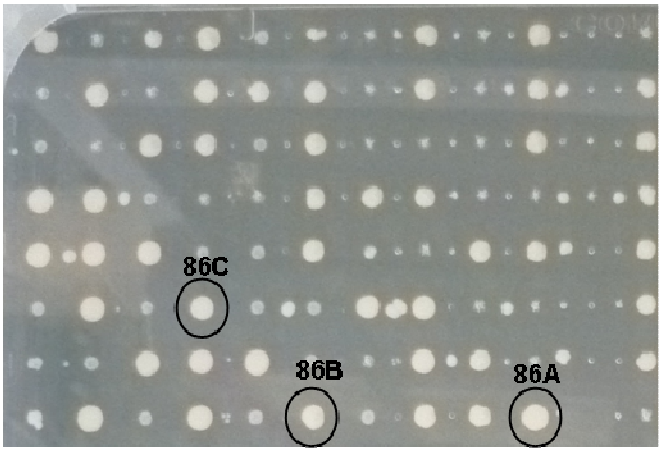


Figure 93. Clones de l'échantillon 86 sélectionnés pour le criblage en milieu liquide

V.2.2 Caractérisation de la croissance des variants en microplaque

Afin de caractériser les cinétiques de croissance des clones et de la souche sauvage, la croissance est suivie par mesure de la densité optique à 620 nm en microplaque 24 puits grâce à un lecteur de microplaques (BIOTEK Synergy HT). Les trois clones issus du chémostat sélectionnés (86A, 86B, 86C) sont comparés à la souche sauvage.

La même souche est mise en culture dans quatre puits différents afin d'obtenir une moyenne des mesures d'absorbance et une incertitude (barres d'erreur). Différentes conditions de volumes de culture par puits (700, 800, 900 µL et 1, 1.5, 2 mL) et de vitesses d'agitation du lecteur de microplaque (faible, moyenne, rapide, variable) ont été testées. Selon les conditions, un phénomène de décantation des levures et d'accumulation sur les bords du puits est observé. Les conditions retenues pour limiter ce phénomène et avoir une homogénéité correcte du contenu des puits sont un volume de culture de 1 mL et une vitesse d'agitation moyenne.

Les cultures en microplaques ont été réalisées en isotherme à 37°C, température de départ du chémostat (Figure 94 (a)) et à 39°C, température plus discriminante (cinétiques non présentées). La souche sauvage et les clones 86A, 86B, 86C ont des profils de croissance semblables. Les barres d'incertitude associées permettent de conclure que les cinétiques ne sont pas significativement différentes, seule une différence significative est observée entre le clone 86C et la souche sauvage sur les 6 premières heures la cinétique, lorsque l'écart-type calculé sur les quatre puits est faible (Figure 94 (b)).

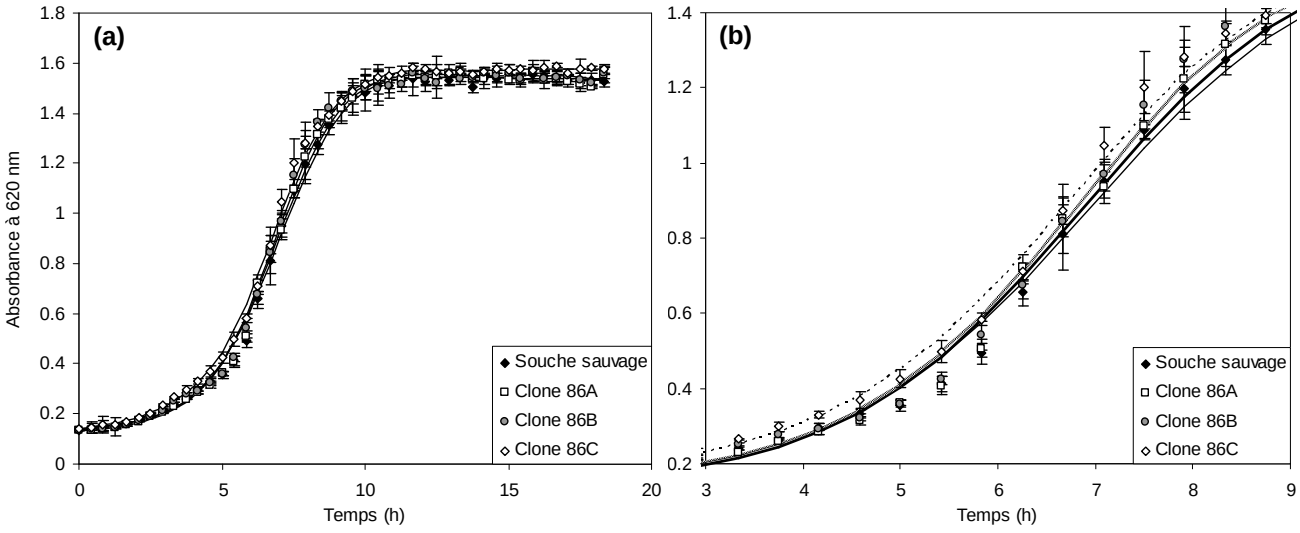


Figure 94. Evolution de l'absorbance de la souche sauvage (trait fin) et de 3 clones issus du chémostat (86A (trait épais), 86B (trait épais gris), 86C (trait pointillé)) déterminés en microplaque à 37°C sur la durée totale de fermentation (a) et sur les premières heures de culture (entre 3 et 9 heures) (b)

Une légère différence peut être observée sur les taux de croissance maximum de chacune des souches (Figure 95 et

Tableau 26). A 37°C, le clone 86A possède un taux de croissance supérieur à celui de la souche sauvage, par contre, à 39°C, le 86B est plus performant en termes de croissance. Néanmoins, l'intervalle de confiance et les incertitudes de mesure associés n'ont pas pu être déterminés.

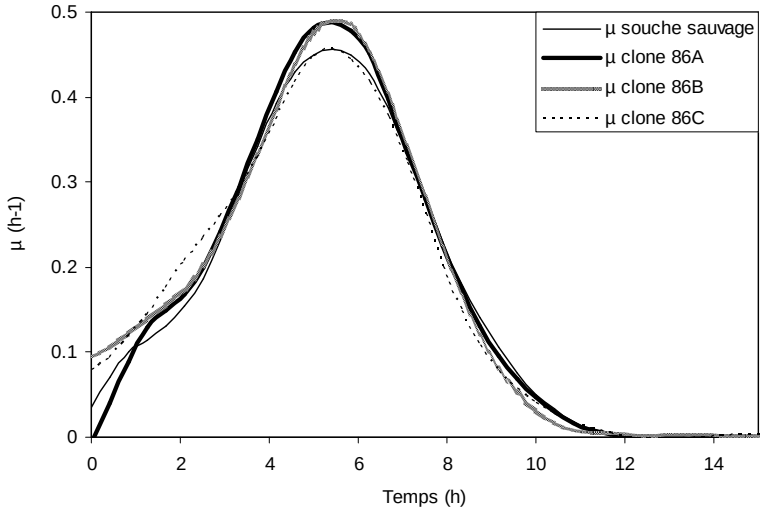


Figure 95. Evolution du taux de croissance de la souche sauvage et de 3 clones issus du chémostat (86A, 86B, 86C) déterminés en microplaque à 37°C

Tableau 26. Taux de croissance maximal de la souche sauvage et des clones en isothermes à 37°C et 39°C

μmax (h^{-1})	37°C	39°C
Souche sauvage	0,46	0,39
Clone 86A	0,485	0,4
Clone 86B	0,485	0,41
Clone 86C	0,45	0,36

L'objectif étant d'obtenir une souche plus résistante que la souche sauvage en condition de stress et plus particulièrement tolérante aux fluctuations de température, il est intéressant de réaliser un suivi de croissance en présence de chocs thermiques. Pour cela, des cinétiques à 37°C avec chocs à 45°C pendant 20 minutes toutes les 1,5 heures sont mises en œuvre en microplaques afin de valider la notion de résistance des variants vis-à-vis de stress induits (Figure 96 (a) et (b)).

L'absence de continuité dans le profil d'absorbance est due au fait que les chocs thermiques se font à l'extérieur du lecteur de plaques, dans une étuve à 45°C sous agitation, par conséquent, il n'y a pas d'acquisition d'absorbance en ligne pendant les chocs, contrairement à l'étude en isotherme. Les valeurs présentées correspondent à la moyenne calculée sur les quatre répétitions

(4 puits), des barres d'erreur traduisant les incertitudes de mesure sur les différents puits permettent de déduire la significativité des résultats.

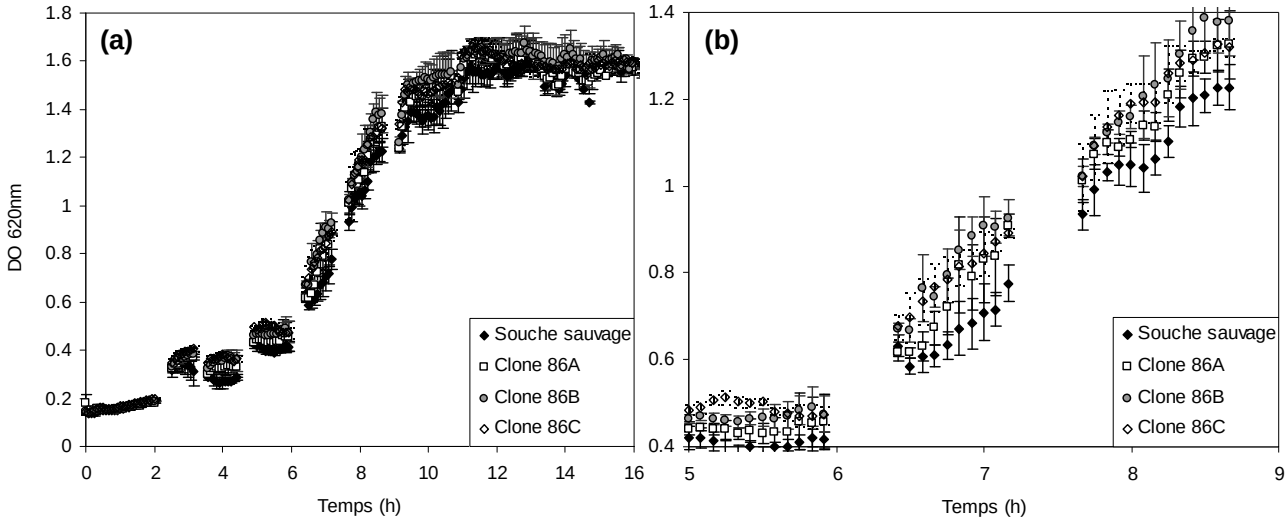


Figure 96. Evolution de la souche sauvage et de 3 clones issus du chémostat (86A, 86B, 86C) déterminés en microplaque à 37°C en présence de chocs thermiques à 45°C sur la durée totale de fermentation (a) et entre 5 et 9 heures de culture (b)

En présence de chocs à 45°C, les trois clones 86 semblent être un peu moins sensibles que la souche sauvage et la différence observée est significative pour les clones 86B et 86C. Au départ de la culture la mesure d'absorbance était identique pour les quatre souches.

Ce criblage préliminaire en milieu liquide, en isotherme et en présence de chocs thermiques, révèle des différences en termes de croissance entre les variants issus du pilote et la souche sauvage parentale. Sur la base de ces résultats en termes de croissance, les clones 86A, 86B et 86C ont été choisis pour une caractérisation de leurs performances en fermentation alcoolique.

V.3 Caractérisation des performances fermentaires des variants

Les variants sélectionnés ont tout d'abord été criblés sur des critères de croissance sur milieu solide puis en milieu liquide. A partir de ce criblage, trois clones particuliers (86A, 86B et 86C) ont été sélectionnés et caractérisés phénotypiquement pour évaluer leurs performances en termes de production d'éthanol (titre et productivité).

Les cinétiques de production d'éthanol sont réalisées en batch en flacons stériles scellés en milieu minéral complet à pH 4 avec une concentration initiale en glucose de 100 $g.L^{-1}$ dans un volume de 11 mL. La température est régulée à 37°C et des chocs thermiques de 30 minutes à 45°C sont réalisés toutes les 2 heures (1h30 entre 2 chocs) (premier choc après 2 heures de culture).

La production d'éthanol est évaluée simultanément pour les différents clones en flacons stériles par le suivi de leur perte de masse. La perte de masse correspond au dégagement de CO_2. Une seringue surmontée d'un filtre 0,2 µm transperce le septum pour laisser échapper les gaz et le suivi de perte de masse est réalisé par pesée. Lors de la libération d'une mole de CO_2 une mole d'éthanol est également libérée, il est donc possible de calculer la concentration en éthanol (en équivalent CO_2) produite par chaque souche d'après l'évolution de la masse (Sablayrolles and Barre 1989).

$$Ethanol\,(g.L^{-1}) = \frac{masseCO_2\,(g)}{V_{culture} \cdot M_{CO_2}\,(g.mol^{-1})} \cdot M_{Ethanol}\,(g.mol^{-1}) \quad \textbf{\textit{Équation 78}}$$

Le graphe suivant (Figure 97) représente l'évolution de la concentration en éthanol en équivalent CO_2, obtenue en flacons. Chaque « clone » et la souche sauvage ont été cultivés en flacons stériles en triplicat, les résultats présentés sont les moyennes et écart-types obtenus. La souche sauvage et les clones 86A, 86B, 86C ont des profils de production similaires, cependant la souche 86B semble se détacher et être un peu plus robuste que la souche sauvage même si la différence n'est pas significative sur tous les points.

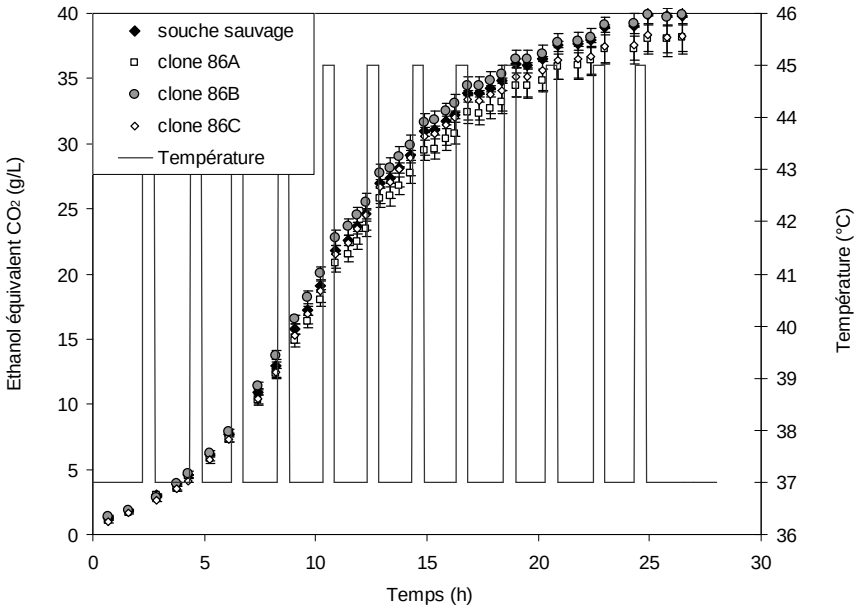


Figure 97. Evolution de la concentration en éthanol produite par la souche sauvage et les clones 86A, 86B, 86C à 37°C en présence de chocs à 45°C

De plus, l'analyse par HPLC en fin de culture (Tableau 27) montre une production d'éthanol légèrement supérieure pour la souche 86B par rapport à la souche sauvage et aux autres clones.

Tableau 27. Concentrations finales en éthanol déterminées par HPLC produites par la souche sauvage et les clones 86A, 86B, 86C à 37°C en présence de chocs à 45°C, et productivité maximale atteinte (en éthanol équivalent CO_2 par heure)

Souche	Concentration en éthanol finale ($g.L^{-1}$)	Productivité maximale ($g.L^{-1}.h^{-1}$)
Souche sauvage	36,2 ± 0,2	4,19 ± 0,03
Clone 86A	35,5 ± 0,27	4,31 ± 0,15
Clone 86B	36,8 ± 0,43	4,22 ± 0,18
Clone 86C	35,3 ± 0,71	4,21 ± 0,25

Les concentrations en éthanol obtenues par mesure en HPLC sont inférieures à celles calculées par la perte de masse due au CO_2 dégagé (38 à 40 $g.L^{-1}$). Cette différence est due à l'évaporation de l'éthanol qui a lieu principalement lors de l'exposition des flacons à 45°C et qui n'a pas été corrigée en première approximation.

Des différences en termes de production d'éthanol ont été déterminées entre les variants issus du pilote et la souche sauvage. Le clone 86B a été choisi pour une caractérisation complète du décès et de ses performances en fermentation alcoolique.

V.4 Caractérisation phénotypique du variant 86B

La caractérisation phénotypique est complétée en réacteur en condition de production intensive d'éthanol pour la souche 86B qui semble être plus performante que la souche sauvage à la fois pour sa croissance sur milieu solide et liquide et éventuellement pour sa production d'éthanol (en flacons stériles). Cette caractérisation va être basée sur des critères d'évolution des différentes populations cellulaires, de viabilité et de décès (paramètre essentiel de la stratégie d'obtention de variants) ainsi que sur la production de métabolites (titres, productivité, rendements, tolérance). Ce paragraphe présente les résultats obtenus et l'analyse des cultures.

L'échantillon 86 correspond au premier prélèvement après l'arrêt de la rampe de température de la perturbation 1 (après 359 heures de culture à 40,5°C), la population a donc subi des conditions très drastiques.

La souche sauvage et le clone 86B sont cultivés en mode discontinu alimenté en bioréacteur instrumenté. Les fermentations sont mises en œuvre en milieu minéral complet dans un volume total de 3 litres à pH régulé à 4 (NH_3 14% v/v), avec une concentration initiale en glucose de 100 $g.L^{-1}$ et une alimentation exponentielle en vitamines. L'aération est réalisée en surface afin de reproduire les conditions de non aération utilisées en flacons stériles (et pour simuler des conditions de mise en œuvre industrielle). La température est régulée à 37°C et des chocs thermiques de 30 minutes à 45°C sont réalisés toutes les 2 heures (1h30 entre 2 chocs), comme appliqué en flacons (Figure 98). Le premier choc à lieu après 4 heures de culture afin d'atteindre une concentration en biomasse suffisante pour visualiser l'impact des chocs. L'arrêt de la séquence de chocs est intervenu à 40 heures de culture, après arrêt de la production d'éthanol (à 39 heures de culture), la viabilité est alors de 12%. Cet arrêt n'a donc pas d'impact sur l'analyse des résultats.

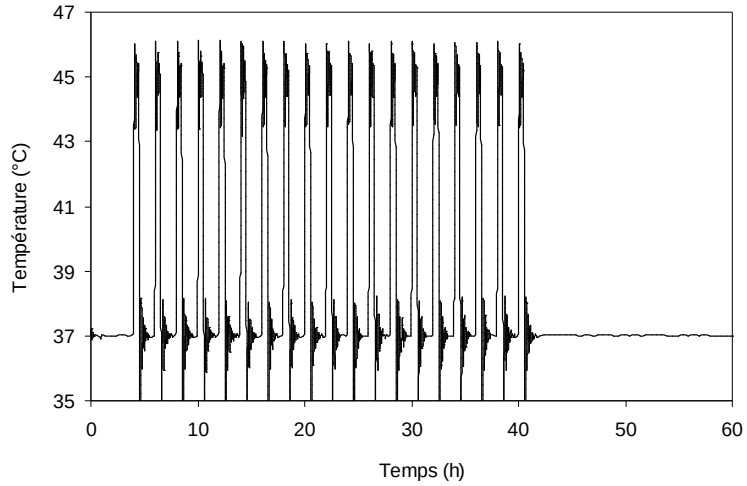


Figure 98. Evolution de la température au cours de la fermentation de la souche sauvage et du clone 86B à 37°C en présence de CHOCS à 45°C

V.4.1 Analyse de la croissance

V.4.1.1 Evolution de la biomasse totale

La biomasse totale est déterminée par mesure de la Densité Optique, de la masse sèche cellulaire et par dénombrement des cellules totales. L'impact de chocs thermiques sur la biomasse totale est analysé sur les cellules totales dénombrées par comptage (Figure 99).

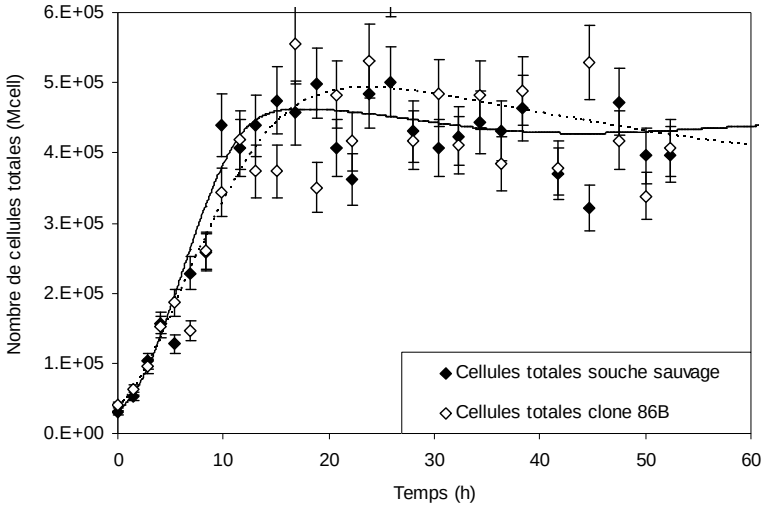


Figure 99. Evolution des cellules totales (en million de cellules) dénombrées par comptage en fonction du temps pour la souche sauvage (trait plein) et le clone 86B (trait pointillé) à 37°C en présence de CHOCS à 45°C

En fonction du temps, les profils de cellules totales sont comparables pour les deux souches. L'évolution du nombre de cellules totales montre un fort impact des chocs thermiques. En effet la concentration maximale en cellule atteinte est de $1,7.10^8$ cellules.mL^{-1} en présence de chocs thermiques pour les deux souches, alors que la concentration était quatre fois plus élevée (7.10^8 cellules.mL^{-1}) pour la culture de référence en isotherme à 37°C.

V.4.1.2 Evolution de la biomasse viable

La biomasse viable est déterminée par dénombrement après coloration au bleu de méthylène et par mesure en-ligne de la capacitance.

Analyse de la biomasse viable par dénombrement après coloration au bleu de méthylène

Comme pour les cellules totales, les profils de cellules viables sont très proches pour les deux souches (Figure 100). La concentration maximale atteinte est de $1,5.10^8$ cellules viables.mL^{-1} ($3,8.10^{11}$ cellules dans le réacteur) alors que pour la culture de référence sans choc (isotherme à 37°C) la concentration s'élevait à 7.10^8 cellules.mL^{-1}.

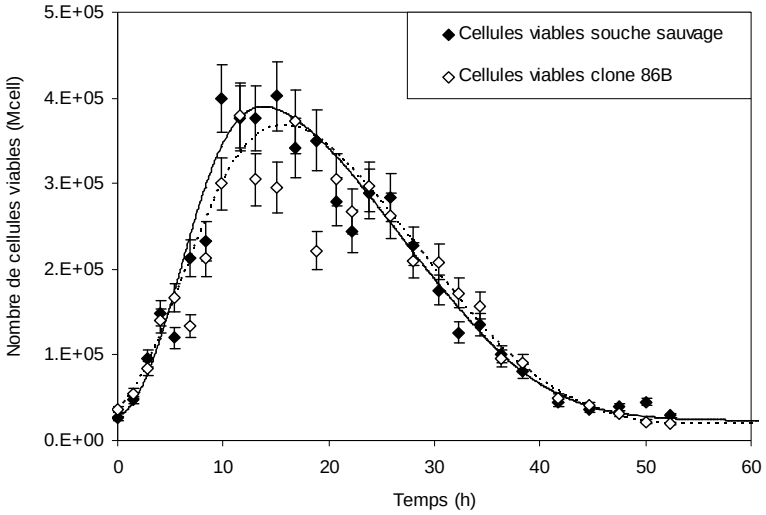


Figure 100. Evolution des cellules viables (en million de cellules) en fonction du temps pour la souche sauvage (trait plein) et le clone 86B (trait pointillé) à 37°C en présence de CHOCS à 45°C

Analyse de la biomasse viable par mesure en-ligne de la capacitance

La mesure de capacitance qui permet une détermination *in-situ* de la fraction de biomasse viable a également été utilisée pour l'analyse de cette population cellulaire. La fréquence élevée de mesure de cet outil d'analyse permet d'observer précisément l'effet des stress thermiques sur les cellules viables.

Le signal de capacitance ne pouvant pas être directement corrélé à une concentration en cellules et afin de comparer les mesures de capacitances entre les deux fermentations, les signaux sont normalisés par rapport à la valeur maximale de capacitance (Figure 101).

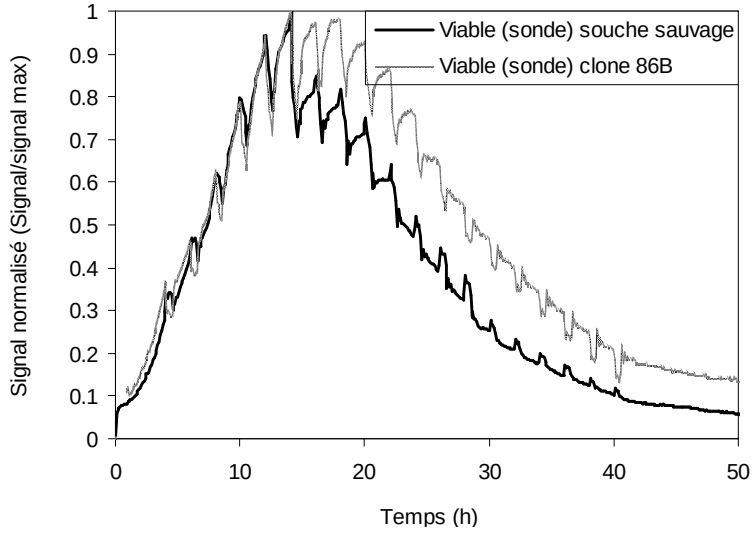


Figure 101. Signal normalisé de la sonde capacitive en fonction du temps pour la souche sauvage et le clone 86B à 37°C en présence de CHOCS à 45°C

Les mesures de capacitance obtenues pour les deux souches montrent des profils de croissance superposables jusqu'à 15 heures de culture, au-delà le signal normalisé de capacitance décroit fortement (Figure 101). Les chocs thermiques ont un impact important sur la fraction de cellules viables. En effet, ils affectent fortement la viabilité puisque avant la fin de la phase de croissance la biomasse viable décroit. Les profils de perte de viabilité ont la même allure cependant le clone 86B semble se maintenir plus longtemps que la souche sauvage qui présente un affaiblissement plus précoce dès 15 heures, alors qu'il ne survient qu'à 20 heures pour le clone 86B. Le mutant semble être amélioré, en termes de maintien de la biomasse viable, par rapport à la souche sauvage.

La Figure 102 représente le signal normalisé de la sonde en fonction de la concentration en éthanol dans le milieu (a) et de l'avancement de la réaction (consommation du substrat) (b).

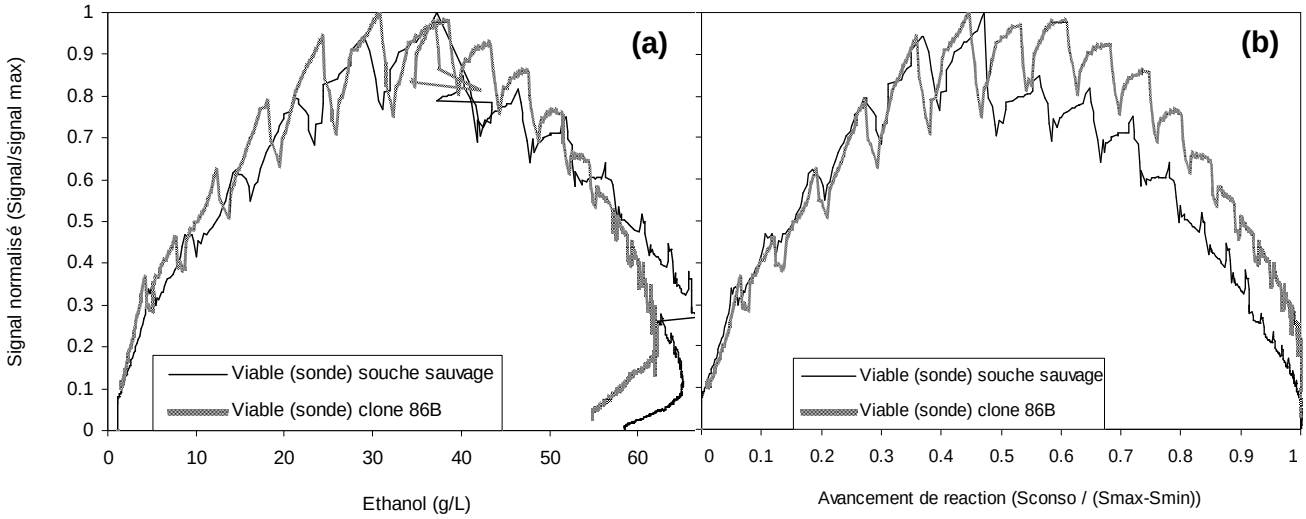


Figure 102. Signal normalisé de la sonde de la souche sauvage et du clone 86B à 37°C en présence de CHOCS à 45°C capacitive en fonction de la concentration en éthanol dans le milieu (a) et en fonction de l'avancement de la réaction (consommation du substrat) (b)

En fonction de la concentration en éthanol dans le milieu, le signal de la sonde indique une fraction de cellules viables légèrement plus importante pour le clone 86B que pour la souche sauvage jusqu'à 55 $g.L^{-1}$ d'éthanol. Au-delà de cette concentration, la souche sauvage semble plus tolérante avec une concentration en biomasse viable plus élevée (Figure 102 (a)). L'arrêt de la croissance se produisant à 50,5 $g.L^{-1}$, il peut en être déduit que le clone 86B se maintient mieux pendant la phase de croissance couplée à la production, par contre, la souche sauvage est plus tolérante en phase de production pure.

La littérature rapporte qu'à une concentration en éthanol donnée, la capacité des levures à résister à l'effet inhibiteur de l'éthanol sur la croissance diminue lorsque la température augmente (Lee *et al.* 1980; Casey and Ingledew 1986). Ce phénomène est observable en présence de chocs

thermiques à 45°C, dès une concentration en éthanol de 38 $g.L^{-1}$, la fraction en cellules viables diminuant pour les deux souches.

En représentant le signal normalisé de capacitance en fonction de l'avancement de réaction (S consommé / Smax consommé) (Figure 102 (b)), il est possible d'observer que durant la consommation de la première moitié du substrat (48% d'avancement de la réaction), les signaux normalisés de capacitance sont superposables. Par contre, pour la consommation de la seconde partie du glucose la fraction de cellules viables des deux souches diminue en restant bien supérieure pour le clone 86B.

Le mutant semble donc être amélioré par rapport à la souche sauvage.

Les taux de croissance ont été calculés à partir des mesures de la sonde sur le signal brut (Figure 103 (a)) et le signal lissé (Figure 103 (b)) afin d'avoir un profil continu.

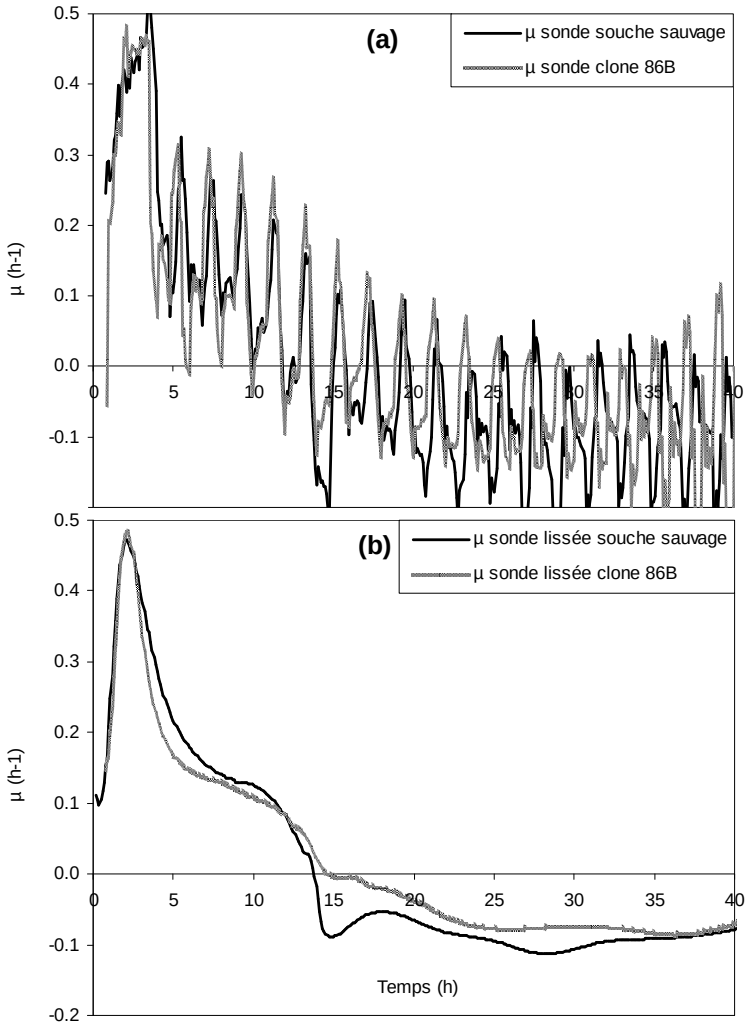


Figure 103. Taux de croissance en fonction du temps de la souche sauvage et du clone 86B à 37°C en présence de CHOCS à 45°C à partir du signal de capacitance brut (a) et lissé (b)

Une chute du taux de croissance à 0,07 h^{-1} apparaît pour les deux souches dès le premier choc après 4 heures de culture (Figure 103 (a)). Les taux de croissance maximaux atteints sont respectivement de 0,5 h^{-1} et 0,48 h^{-1} pour la fermentation de la souche sauvage et du clone 86B, alors qu'ils apparaissent identiques (0,48 h^{-1}) sur le signal lissé (Figure 103 (b)). La diminution du taux de croissance ne se fait pas de manière continue mais suit les chocs de température. Les taux de croissance chutent après chaque choc thermique puis augmentent lorsque la température est à nouveau régulée à 37°C. La valeur moyenne tend vers zéro autour de 20 heures, lors de la fin de la phase de croissance. A partir du signal lissé de la sonde, il est également possible d'observer que le clone 86B se maintient légèrement mieux que la souche sauvage vu que la diminution de biomasse viable apparait à 13,5 heures pour la souche sauvage et à 14,5 heures pour le mutant. Lors de l'arrêt de la croissance ($\mu \leq 0$), le taux de croissance est toujours supérieur pour le clone, ce qui montre son meilleur maintien.

La présence de chocs thermiques à 45°C altère la tolérance à l'éthanol en termes de croissance chez les deux souches. Les concentrations en éthanol critiques sont de 35 $g.L^{-1}$ pour la souche sauvage et 34 $g.L^{-1}$ pour le clone 86B (Figure 104).

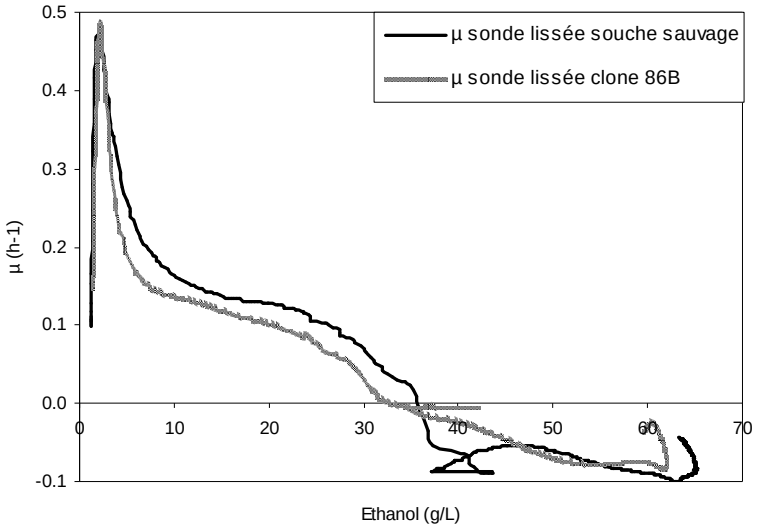


Figure 104. Taux de croissance en fonction de la concentration en éthanol de la souche sauvage et du clone 86B à 37°C en présence de CHOCS à 45°C à partir du signal de capacitance lissé

Le meilleur maintien lors d'un stress thermique avancé pour le clone 86B par rapport à la souche sauvage suggère un moindre décès. Ceci va être vérifié au paragraphe suivant qui présente l'analyse du décès des deux souches en condition de stress et de production intensive d'éthanol.

V.4.2 Analyse du décès

V.4.2.1 Evolution de la viabilité

La viabilité est calculée à partir des comptages cellulaires après coloration au bleu de méthylène. La Figure 105 représente l'évolution de la viabilité pour les deux souches en fonction du temps (a) et de la concentration en éthanol dans le milieu (b).

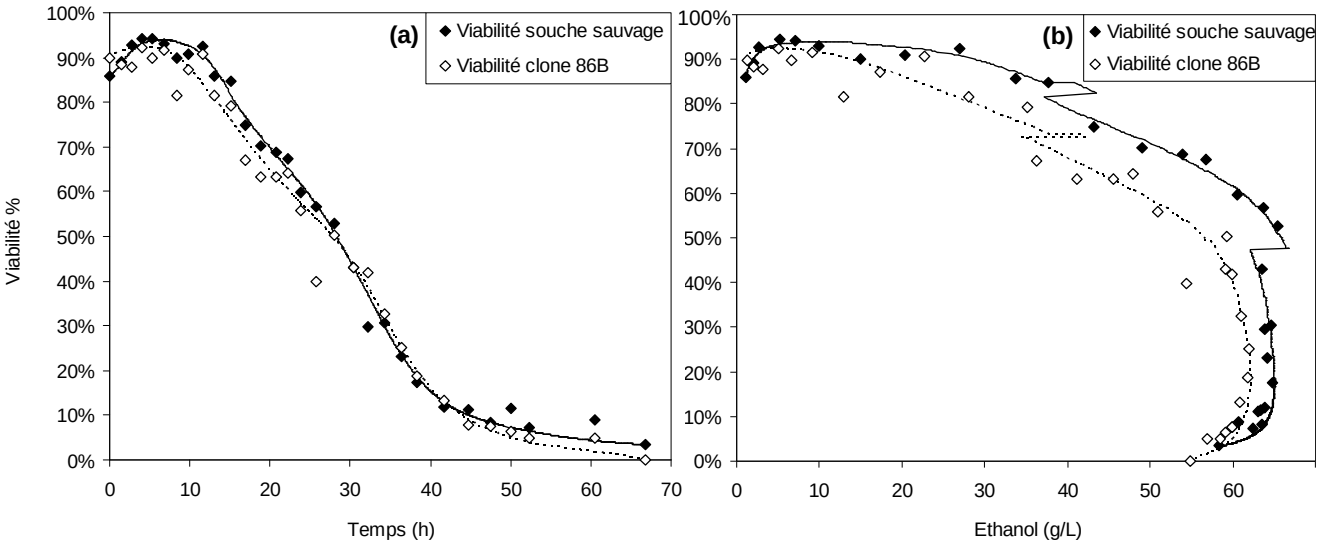


Figure 105. Evolution de la viabilité de la souche sauvage (trait plein) et du clone 86B (trait pointillé) à 37°C en présence de CHOCS à 45°C en fonction du temps (a) et en fonction de la concentration en éthanol dans le milieu (b)

Les profils de viabilité des deux souches en mode discontinu alimenté en présence de chocs thermiques sont semblables (Figure 105 (a)). Pour les deux souches, la viabilité chute plus rapidement lors des chocs, dès 12 heures de culture la viabilité devient inférieure à 90%. Ce qui correspond à une concentration en éthanol de 28 $g.L^{-1}$ pour la souche sauvage et de 16 $g.L^{-1}$ pour le clone 86B (Figure 105 (b)). En fonction du temps, la perte de viabilité se fait de la même façon pour les deux souches. En fonction de l'éthanol, la viabilité chute progressivement dès 30 $g.L^{-1}$ et jusqu'à 60 $g.L^{-1}$ d'éthanol pour la souche sauvage, avant une chute brutale jusqu'à 4% de viabilité. Pour le clone, la chute de viabilité est observable dès 15 $g.L^{-1}$ et s'accélère à partir de 58 $g.L^{-1}$. La tolérance à l'éthanol en termes de viabilité est plus faible pour le clone 86B que pour la souche sauvage. En effet, pour une viabilité inférieure à 10% la concentration en éthanol est de 65 $g.L^{-1}$ pour la souche sauvage contre 62 $g.L^{-1}$ pour le mutant. Les chocs thermiques accentuent l'effet létal de l'éthanol (Lee *et al.* 1980; Casey and Ingledew 1986) pour les deux souches.

V.4.2.2 Evolution de la biomasse morte

La biomasse morte est déterminée par dénombrement après coloration au bleu de méthylène (Figure 106). Le nombre de cellules mortes est semblable pour les deux souches. La différence observable est inférieure aux incertitudes de mesures déterminées sur les comptages.

Les fermentations ont été menées jusqu'à atteindre un pourcentage de viabilité inférieur à 5%, en fin de culture la concentration en cellules mortes tend vers la concentration en cellules totales.

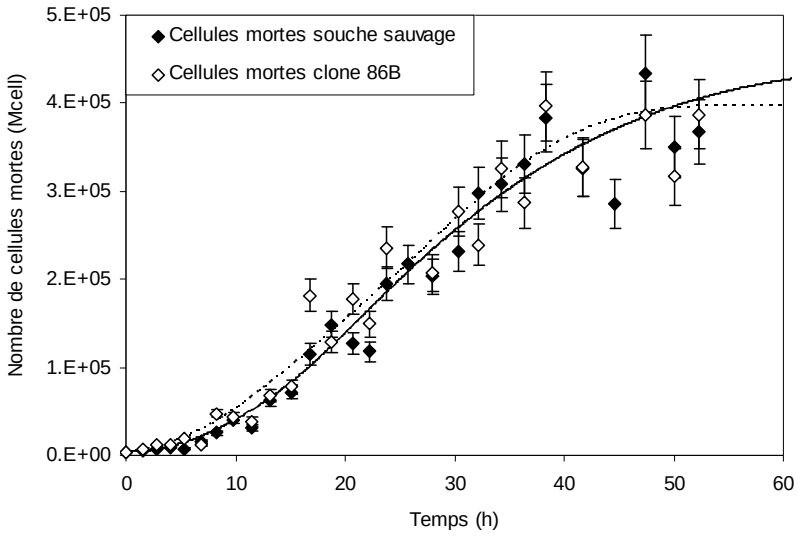


Figure 106. Evolution des cellules mortes (en million de cellules) en fonction du temps pour la souche sauvage (trait plein) et le clone 86B (trait pointillé) à 37°C en présence de CHOCS à 45°C

Les analyses des populations cellulaires totales, viables et mortes obtenues par comptage n'ont pas montré de réelles différences entre les souches. Par contre, l'analyse de la biomasse viable par mesure de la capacitance a révélé un meilleur maintien du clone 86B en présence de chocs thermiques à 45°C par rapport à la souche sauvage. La détermination du taux de décès de ces deux souches permettra de compléter cette caractérisation du variant obtenu.

V.4.2.3 Taux de décès moyens de la souche sauvage et du clone 86B à 37°C en présence de chocs à 45°C

Le taux de décès moyen est calculé sur la phase de perte de cellules viables (Figure 107). La représentation graphique en échelle semi-logarithmique montre que la perte de cellules viables suit un profil linéaire où le taux de décès correspond à la pente.

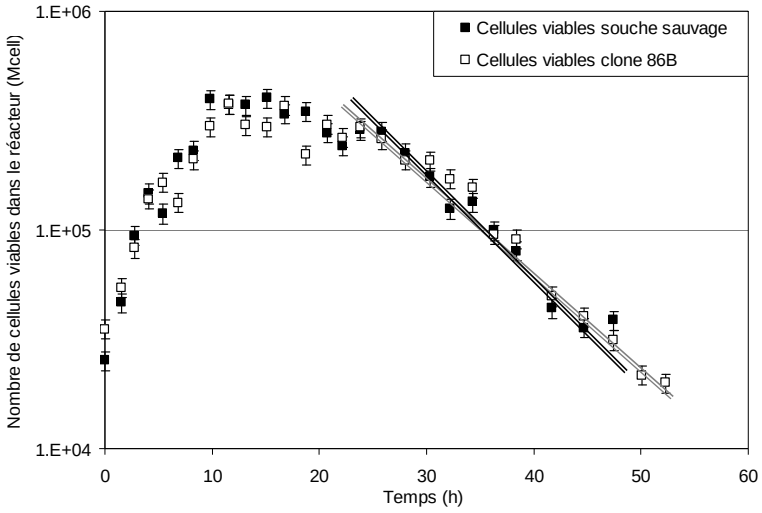


Figure 107. Représentation semi-logarithmique de l'évolution des cellules viables (en million de cellules) dénombrées par comptage pour la souche sauvage et le clone 86B à 37°C en présence de chocs à 45°C. La perte de cellules se fait selon un profil linéaire (double trait)

Les taux de décès moyens déterminés pour les fermentations en présence de chocs thermiques à 45°C est de 0,110 h^{-1} ± 0,006 h^{-1} pour la souche sauvage et de 0,100 h^{-1} ± 0,004 h^{-1} pour le clone 86B. Ces k_d moyens sont proches, mais il existe une trop grande variabilité pour pouvoir conclure à une éventuelle amélioration du décès. D'où la nécessité d'obtenir des mesures plus précises et plus nombreuses (mesure en ligne) pour calculer un taux de décès (instantané).

V.4.2.4 Taux de décès instantanés de la souche sauvage et du clone 86B à 37°C en présence de chocs à 45°C

En réacteur discontinu alimenté, le taux de décès instantané (k_d en h^{-1}) est calculé par l'expression suivante :

$$k_{décès} = \frac{1}{X_{viable}} \frac{d\,X_{morte}}{dt} \qquad \textit{Équation 79}$$

Les valeurs de X_{viable} et X_{morte} prises en compte correspondent aux nombres de cellules viables et mortes obtenus par comptage cellulaire (Figure 108 (a)) ou de la mesure de capacitance (Figure 108 (b)).

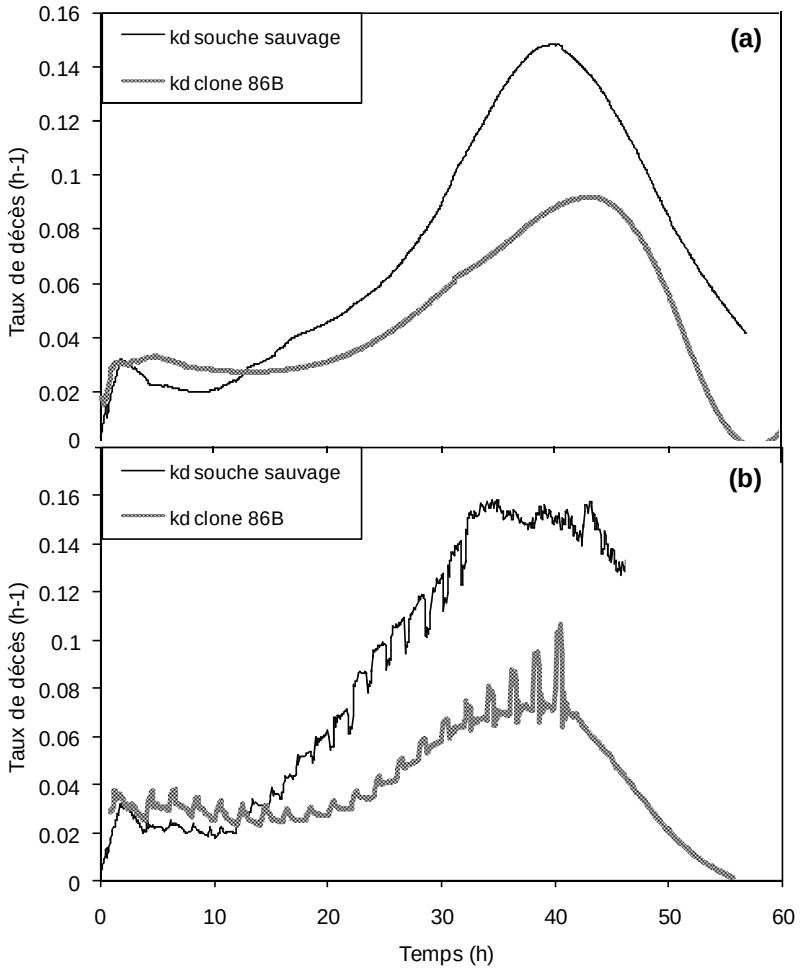


Figure 108. Taux de décès instantané (k_d) de la souche sauvage et du clone 86B en fonction du temps à 37°C en présence de chocs à 45°C. k_d calculé à partir du X_{viable} du comptage cellulaire (a) et du X_{viable} du signal de la sonde capacitive (b)

La représentation de l'évolution des taux de décès en fonction du temps (Figure 108 (a)) fournit une valeur de k_d maximale de 0,148 h^{-1} pour la souche sauvage et de 0,092 h^{-1} pour le clone 86B, soit une réduction du décès de 38% pour le clone. Un taux de décès non nul apparaît dès le début de la culture pour le clone et se maintient à une valeur de 0,03 h^{-1}, proche du taux de décès basal déterminé expérimentalement à 0,01 h^{-1} ± 0,01 h^{-1} pour la souche sauvage. Puis à partir de 15 heures de culture, le k_d de la souche sauvage augmente plus rapidement que celui du clone qui reste toujours inférieur à celui de la souche sauvage. Ce taux de décès moins important du « clone » indique une meilleure résistance de celui-ci, corroborant les résultats obtenus pour le mutant à partir des mesures de capacitance (Figure 101).

Le taux de décès instantané peut également être calculé à partir du X_{viable} des données de la sonde capacitive (Figure 108 (b)). Pour cela, une corrélation entre le nombre de cellules viables dans le réacteur (en million de cellules) et le signal de la sonde a été déterminée (nombre de cellules = signal de la sonde × coefficient). Le taux de décès calculé à partir du X_{viable} du comptage cellulaire a un profil continu, alors que celui obtenu avec le X_{viable} de la sonde

capacitive présente des oscillations. Ces oscillations reflètent les chocs thermiques et sont détectables grâce à la fréquence d'acquisition élevée de la sonde (6 minutes) par rapport à celle des comptages cellulaires (1,5 heure). Les oscillations reflètent l'évolution de la fraction de cellules viables et traduisent un décès plus important pendant et après le choc, puis une diminution du taux de décès lorsque les cellules « récupèrent » leur capacité de croissance. Le k_d maximal est atteint 5 heures plus tôt pour les deux souches, vers 35-40 heures à partir du calcul avec le X_{viable} de la sonde, contre 40-45 heures, avec le X_{viable} du comptage cellulaire.

Ces résultats montrent toute la difficulté de l'analyse des phénomènes et notamment la significativité des résultats par rapport à la précision des mesures réalisées (comptages cellulaire *vs* analyses « électriques »). Pour ces deux méthodes, les ordres de grandeur des taux de décès obtenus sont les mêmes.

L'évolution du taux de décès en fonction de la concentration en éthanol dans le milieu (Figure 109) montre que le mutant généré a un taux de décès supérieur au taux de décès de la souche sauvage cultivée dans les mêmes conditions.

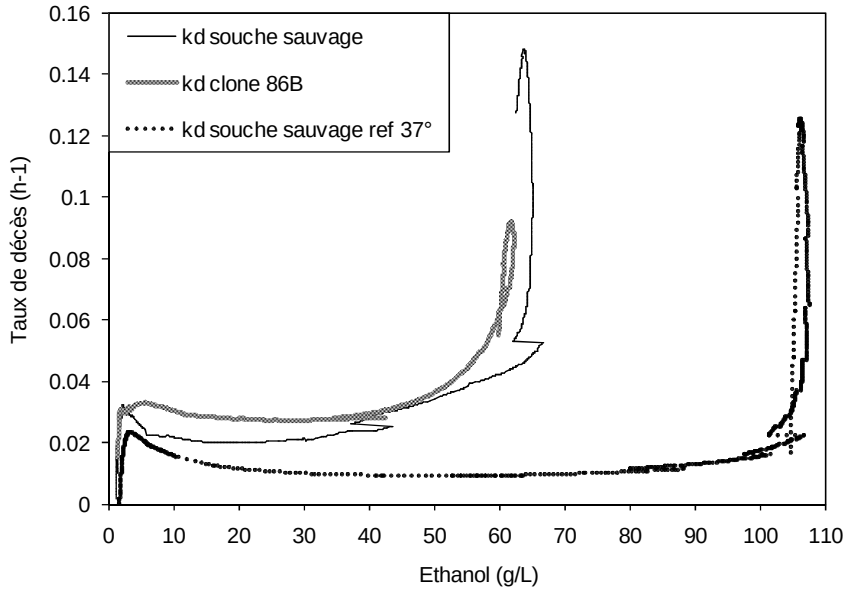


Figure 109. Taux de décès instantané (kd) de la souche sauvage et du clone 86B calculé à partir du X_{viable} du comptage cellulaire en fonction de la concentration en éthanol dans le milieu à 37°C en présence de chocs à 45°C et à 37°C en isotherme (culture de référence - souche sauvage)

L'effet de l'éthanol sur le taux de décès est significatif à partir de 60 $g.L^{-1}$. Comparé au profil de décès lors de la culture de référence en isotherme à 37°C, sans choc thermique, on constate que la présence de fluctuations de température diminue drastiquement les capacités de la levure, réduisant de 40% environ la production d'éthanol à taux de décès équivalent. La tolérance

à l'éthanol est donc nettement affectée pour les deux souches, le taux de décès est maximal à 65 $g.L^{-1}$ d'éthanol pour la souche sauvage et à 62 $g.L^{-1}$ pour le clone 86B, alors que sans choc la souche sauvage tolère jusqu'à 107 $g.L^{-1}$ d'éthanol.

V.4.2.5 Concordance des taux de décès par rapport aux données du modèle cinétique

En instantané, les taux de décès obtenus pour la souche sauvage et le clone 86B à partir des cellules viables sont de 0,148 h^{-1} et 0,092 h^{-1}. La température de la culture était de 37°C avec des chocs thermiques de 30 minutes à 45°C toutes les 2 heures, ce qui correspond à une température moyenne de 39°C tout au long de la fermentation.

Dans le modèle cinétique, les paramètres influençant le taux de décès (k_d b, k_d t, tpc et la pente) ont été estimés pour la souche sauvage par la méthode des moindres carrés, à partir de cultures en mode discontinu à différentes températures (en isothermes ou en présence de chocs thermiques).

$$k_d = k_d\ b + \frac{k_d\ t}{1 + e^{(-(T - tpc) * pente)}} \quad \textbf{\textit{Équation 80}}$$

Sur la base de ce modèle, le k_d moyen recalculé à 39°C est de 0,216 h^{-1} pour la souche sauvage, soit un écart de 31% par rapport à la valeur de 0,148 h^{-1} obtenue expérimentalement pour une température moyenne de 39°C. Pour la souche mutante le taux de décès expérimental est de 0,092 h^{-1} et le taux de décès du modèle à 39°C est de 0,153 h^{-1}, soit un écart de 40%. Ces écarts pourraient s'expliquer par le fait que le calcul du k_d est fait à une température moyenne (39°C) qui n'est pas le reflet de la réalité pour les cellules (37°C – 1h30 / 45°C – 30 minutes). Une étude plus spécifique du calcul du k_d pourrait être réalisée.

Une diminution du taux de décès de 38% a été obtenue pour le clone par rapport à la souche sauvage (de 0,148 h^{-1} à 0,092 h^{-1}). D'après le modèle développé, à 39°C, une diminution du décès de 29% ($k_{d\ wt}$ = 0,216 h^{-1} et $k_{d\ mutant}$ = 0,153 h^{-1}) serait nécessaire à l'implantation d'une souche au phénotype de tolérance aux fluctuations thermiques amélioré.

Au vu de l'étude de sensibilité réalisée sur le taux de décès, nous pouvons considérer que les résultats obtenus expérimentalement corroborent les résultats du modèle choisi pour l'estimation du taux de décès et valide son expression et son paramétrage.

Le « clone » semble avoir une meilleure résistance aux chocs thermiques que la souche sauvage (moindre décès), néanmoins, les capacités de production de chaque souche doivent être intégrées à l'analyse.

V.4.3 Analyse de la production de métabolites et des performances fermentaires

Le clone 86B a été comparé à la souche sauvage sur ses performances fermentaires en présence de chocs thermiques en condition de production intensive d'éthanol.

Les graphes suivants présentent l'évolution en fonction du temps des masses de glucose consommées et des masses d'éthanol, biomasse et glycérol produites au cours des fermentations en mode discontinu alimenté de la souche sauvage (Figure 110) et du clone 86B (Figure 111).

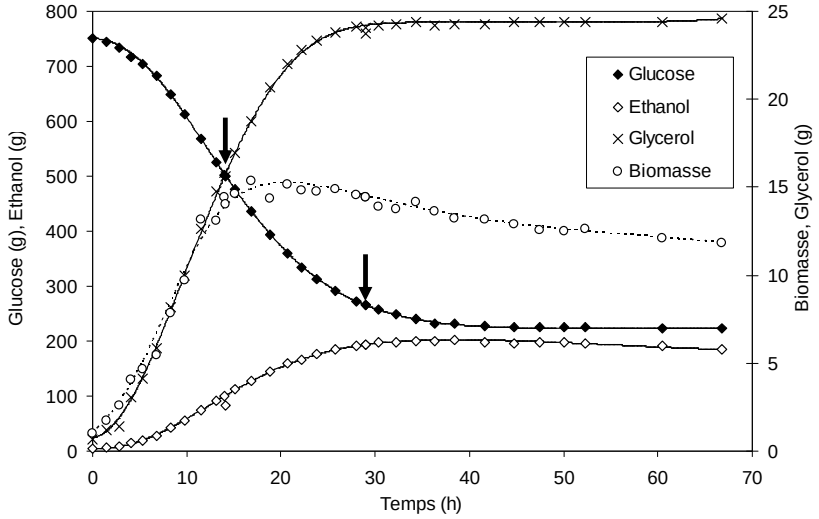


Figure 110. Evolution de la masse de glucose consommée et des masses d'éthanol, de biomasse (masse sèche) et de glycérol produites au cours de la fermentation de la souche sauvage à 37°C en présence de chocs à 45°C (les ajouts de glucose sont représentés par des flèches)

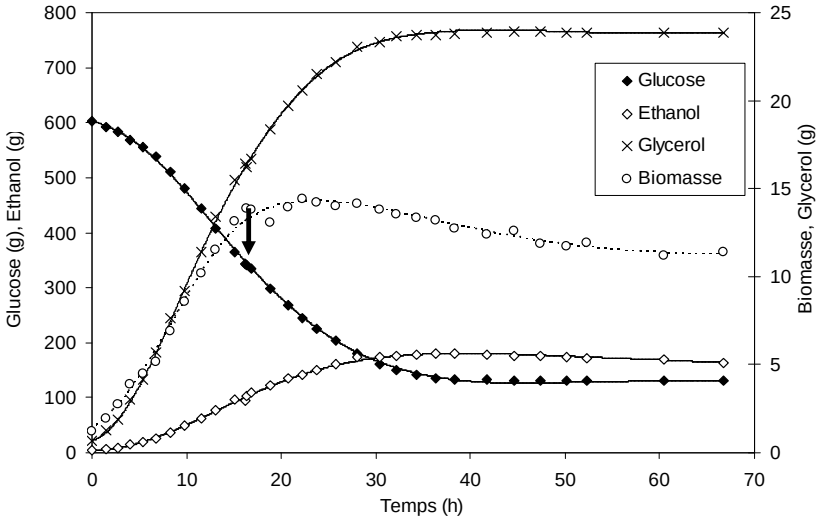


Figure 111. Evolution de la masse de glucose consommée et des masses d'éthanol, de biomasse (masse sèche) et de glycérol produites au cours de la fermentation du clone 86B à 37°C en présence de chocs à 45°C (les ajouts de glucose sont représentés par des flèches)

Deux phases se distinguent. Une première phase de croissance, pendant laquelle la production de biomasse s'accompagne de la production de métabolites, s'arrête à 20 heures pour la souche sauvage et à 24 heures pour le clone 86B. Elle est suivie d'une phase de production où la production d'éthanol se prolonge jusqu'à 39 heures, pour les deux souches, malgré l'arrêt de la croissance. Pour la souche sauvage, deux ajouts de glucose ont été effectués à 14,1 et 29 heures pour une consommation totale de 526 grammes alors qu'un seul ajout de glucose à 16,3 heures a été nécessaire à la culture du clone 86B, correspond à une consommation totale de 472 grammes de glucose.

Malgré la présence du condenseur, de l'éthanol est évaporé dans les deux fermentations. La correction de l'évaporation est réalisée ici avec la mesure de la fraction d'éthanol présente dans les gaz de sortie mesurée par spectrométrie de masse. Une diminution de la concentration est quand même observée après correction de l'évaporation, à partir de 40 heures, à la fin de la phase de production. Les souches n'étant pas limitées en substrat (glucose résiduel relativement important), il n'y a pas de reconsommation de l'éthanol et donc la diminution observée est due à une mauvaise estimation de l'éthanol évaporé. Une quantité détectée relativement faible conduisant à une erreur sur la mesure relativement grande ; un étalonnage plus précis pourrait être fait. En première approximation la masse finale d'éthanol dans le réacteur sera considérée égale à la masse maximale d'éthanol atteinte, masse produite à la fin de la phase de production, soit 202 grammes pour la souche sauvage et 181 grammes pour le clone 86B.

Le profil d'évolution des concentrations des acides organiques (acides acétique, succinique et pyruvique) sont similaires pour les deux souches (graphes non présentés).

Le Tableau 28 récapitule les chiffres clés (durées, concentrations, rendements).

Tableau 28. Chiffres clés des deux cultures réalisées à 37°C en présence de chocs thermiques à 45°C pour la souche sauvage et le clone 86B

Culture à 37°C - chocs 45°C	Souche sauvage	Clone 86B
Durée de la fermentation (h)	39	39
Durée de la phase de croissance (h)	20	24
Concentration en Ethanol produite ($g.L^{-1}$)	66,7 ± 1,3	63,9 ± 1,3
Concentration en Biomasse produite ($g.L^{-1}$)	5,17 ± 0,16	4,85 ± 0,15
Concentration en Glycérol produite ($g.L^{-1}$)	8,36 ± 0,17	8,54 ± 0,17
Rendement Ethanol/Glucose ($g.g^{-1}$)	0,39 ± 0,003	0,39 ± 0,004
Rendement Biomasse/Glucose ($g.g^{-1}$)	0,039 ± 0,003	0,040 ± 0,003
Rendement Glycérol/Glucose ($g.g^{-1}$)	0,056 ± 0,002	0,057 ± 0,002
Rendement Glycérol/Biomasse ($g.g^{-1}$)	1,32 ± 0,08	1,38 ± 0,006

Les concentrations atteintes sont comparables pour les deux souches. Les rendements biomasse et glycérol sont calculés sur les vitesses à la fin de la phase de croissance (20 heures pour la souche sauvage et 24 heures pour le clone 86B), l'erreur représente la déviation standard par rapport à la pente obtenue. Le rendement éthanol/substrat est égal sur la phase de croissance et sur la durée totale de fermentation (39 heures) pour les deux souches. Les rendements atteints sont assez proches entre les deux souches et les incertitudes ne permettent pas de conclure sur la significativité des différences obtenues.

A partir du lissage des masses obtenues, les vitesses spécifiques sont déterminées pour chaque composé. Les vitesses spécifiques maximales de production d'éthanol sont similaires : 1,27 $g_{Ethanol}.g_X^{-1}.h^{-1}$ pour la souche sauvage et 1,22 $g_{Ethanol}.g_X^{-1}.h^{-1}$ pour le clone 86B, pour un calcul de $q_{Ethanol}$ par rapport aux cellules viables les valeurs sont supérieures avec 1,35 et 1,31 $g_{Ethanol}.g_X^{-1}.h^{-1}$ (Figure 112). La productivité sur la durée totale des fermentations est de 1,71 $g_{Ethanol}.L^{-1}.h^{-1}$ pour la souche sauvage, contre 1,64 $g_{Ethanol}.L^{-1}.h^{-1}$ pour le clone 86B. Les résultats sont comparables pour les deux souches, il ne semble pas y avoir ni amélioration ni détérioration des capacités du mutant généré dans le pilote d'adaptation. Par ailleurs, la tolérance à l'éthanol en termes de production est de 67 $g.L^{-1}$ d'éthanol environ pour la souche sauvage et de 62 $g.L^{-1}$ d'éthanol pour le clone 86B alors que sans choc thermique la production a lieu jusqu'à 107 $g.L^{-1}$ d'éthanol pour la souche sauvage.

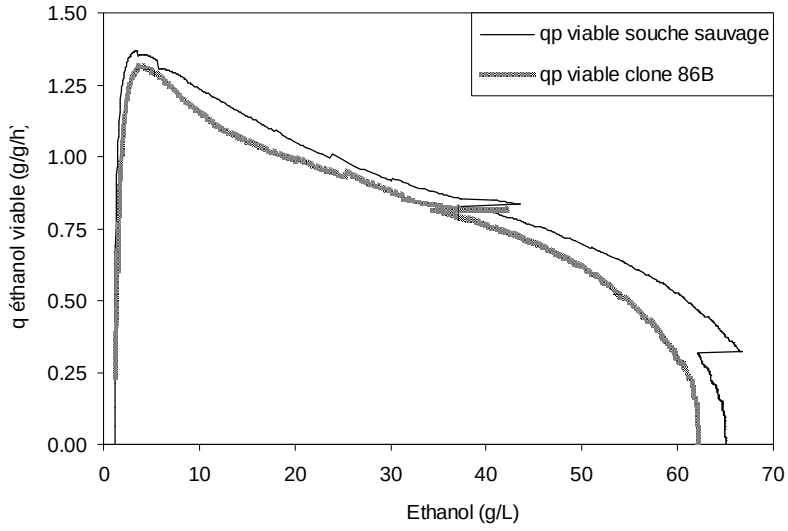


Figure 112. Vitesse spécifique de production d'éthanol (par rapport à la biomasse viable) de la souche sauvage et du clone 86B en fonction de la concentration en éthanol dans le milieu

Concernant la production de glycérol, lorsque la vitesse spécifique de production de glycérol (par rapport à la biomasse viable) est représentée en fonction du taux de croissance des cellules viables (Figure 113), un couplage entre croissance et production de glycérol est observable pour les deux souches pour la phase de croissance. Un découplage apparaît pour le clone 86B et la souche sauvage lors de l'arrêt de la croissance.

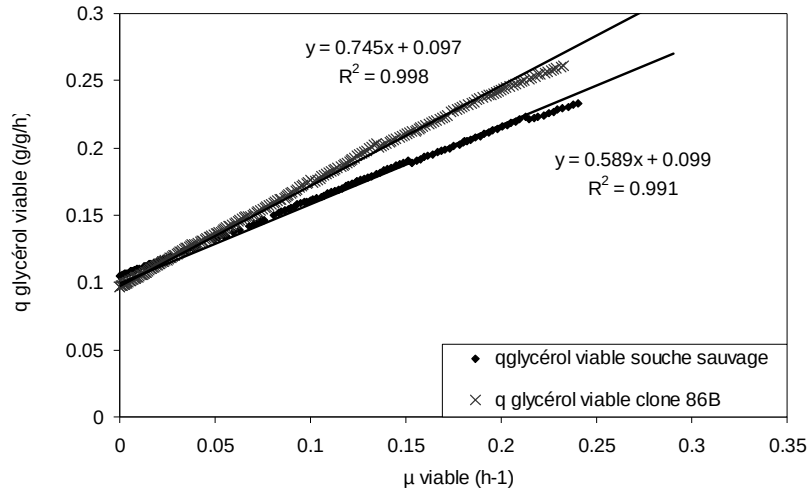


Figure 113. Vitesse spécifique de production de glycérol (par rapport à la biomasse viable) de la souche sauvage et du clone 86B en fonction du taux de croissance (par rapport à la biomasse viable)

Les constantes de découplage (à l'arrêt de la croissance : $\mu = 0$) sont identiques avec 0,099 $g_{Glycérol}.g_X^{-1}.h^{-1}$ pour la souche sauvage et 0,097 $g_{Glycérol}.g_{Xv}^{-1}.h^{-1}$ pour le clone 86B. Ce phénomène de découplage rapporté par Aldiguier *et al.* (2004) à partir de 36°C chez la souche *Saccharomyces cerevisiae* CBS8066 se retrouve pour cette souche à 37°C en présence de chocs à 45°C.

La constante de couplage croissance/production de glycérol est supérieure pour le clone (+ 26%) avec 0,75 $g_{Glycérol}.g_{Xv}^{-1}$ contre 0,59 $g_{Glycérol}.g_{Xv}^{-1}$ pour la souche sauvage. Ceci peut être mis en relation avec la balance d'oxydo-réduction, la levure produisant plus de glycérol en limitation d'oxygène pour équilibrer les bilans d'oxydo-réduction lors d'un fonctionnement réduit de la respiration. Or, les vitesses spécifiques de consommation d'O_2 sont identiques pour les deux souches (0 à 0,2 $mmol.g_{Xviable}^{-1}.h^{-1}$) sur la majorité de la fermentation (aération en surface). Il est peu probable que la balance d'oxydo-réduction explique cette différence de couplage croissance/glycérol.

V.5 Conclusion

Dans ce chapitre, différents clones générés lors de la mise en œuvre du pilote d'obtention de variants ont été caractérisés sur la base du gain en termes de robustesse vis-à vis des fluctuations de température. Les phénotypes des souches ont été criblés sur les différences de cinétiques de croissance, de décès et de performances fermentaires (titres finaux, productivité, rendement) qui correspondent aux critères d'intérêts industriels.

Les clones ont tout d'abord été caractérisés sur leurs performances de croissance. Celles-ci ont été évaluées sur milieu solide et en milieu liquide en isotherme et en présence de chocs thermiques. L'étape de criblage haut débit sur milieu solide a permis de cribler 768 clones issus de quatre prélèvements du pilote continu, ainsi que 192 exemplaires de la souche sauvage. Puis, les cinétiques de croissance de trois clones seulement issus d'un prélèvement et selectionnés parmi les 768 testés sur milieu solide ont été comparées à celle de la souche sauvage en milieu liquide. Les performances fermentaires de ces clones ont été déterminées en condition de stress thermique (chocs à 45°C). Suite à ces tests, un clone (86B) est apparu potentiellement « meilleur » (croissance et production) et a été choisi pour une caractérisation cinétique et stoechiométrique complète en réacteur en condition de production intensive d'éthanol, lors d'une culture fed-batch limitée en oxygène à 37°C en présence de chocs thermiques à 45°C.

Le décès cellulaire du clone 86B et de la souche sauvage ont été évalués dans ces conditions. L'analyse dynamique de la biomasse viable grâce à la mesure *in-situ* de capacitance a montré une chute de la fraction de cellules viables 5 heures après la diminution observée pour la souche sauvage. De plus, couplé à cette perte moins rapide de biomasse viable, un taux de décès plus faible (-38%) a été déterminé chez le clone 86B (0,092 h^{-1} contre 0,148 h^{-1}). Ceci a été obtenu aussi bien sur le calcul du taux de décès moyen que sur celui du taux de décès instantané, que ce soit à partir des données de biomasse viable issues du comptage ou de la sonde. Le clone 86B s'est révélé plus performant que la souche sauvage à court terme, en termes de décès (plus faible) en présence de chocs thermiques. Par contre, cette tolérance améliorée en termes de décès ne s'est pas traduite par une amélioration des performances fermentaires (titre final en éthanol, tolérance à l'éthanol, rendements) de ce variant qui se sont révélées comparables à celles de la souche sauvage

Le fait que le clone se maintienne mieux que la souche sauvage pendant la phase de croissance peut être expliqué par une production de glycérol légèrement supérieure durant la phase couplée. La production de glycérol augmentant lors d'une élévation de la température (Gardner *et al.* 1993; Omori *et al.* 1996; Torija *et al.* 2003b; Aldiguier *et al.* 2004) et étant impliquée dans la thermoprotection des protéines contre la dénaturation (Back *et al.* 1979; Henle *et al.* 1982; Zancan and Sola-Penna 2005) ainsi que de la cellule entière contre le décès (Henle *et al.* 1982; Carvalheiro *et al.* 1999), expliquerait en partie un meilleur maintien du clone 86B en présence de chocs à 45°C.

La présence de chocs thermiques à 45°C altère donc les cinétiques et la tolérance à l'éthanol chez les deux souches en termes de croissance, de production et de viabilité, ce qui corrobore les données de la littérature qui rapportent une diminution de la tolérance à l'éthanol lors d'une élévation de température (Lee *et al.* 1980; Casey and Ingledew 1986). Les résultats macroscopiques ou dynamiques ont montré peu de différences entre la souche sauvage et le mutant sélectionné (clone 86B). Seul le décès cellulaire plus faible semble être un indicateur de différenciation des deux souches.

L'hypothèse posée était la suivante **: l'obtention d'un mutant plus tolérant au stress température que la souche sauvage repose sur le fait qu'à une température donnée le taux de croissance apparent du mutant est supérieur à celui de la souche sauvage car son taux de décès est inférieur à celui de la souche sauvage**.

Malgré des performances similaires, la caractérisation du décès et la prise en compte de la significativité des mesures montre que la stratégie développée peut permettre d'améliorer la tolérance (en termes de décès) de la souche en présence de fluctuations de température (chocs thermiques à 45°C). Le clone 86B a été amélioré puisqu'il se maintient mieux en présence de chocs à 45°C et qu'il possède un taux de décès inférieur à celui de la souche sauvage, l'objectif a donc été atteint. Par contre, en conditions de production intensive d'éthanol, en mode discontinu alimenté, cette diminution avérée du décès ne s'accompagne pas d'une amélioration des capacités fermentaires de la souche. Ce résultat repose toutefois sur la caractérisation d'un individu sur 768 clones isolés, eux même criblés sur une population initiale de 10^8 cellules dans l'échantillon (1mL) récupéré. Une étude statistique du nombre d'individus à tester, basée sur un plan d'expérience, pourrait être réalisée pour obtenir une stratégie de caractérisation moins lourde (plus haut débit) capable de quantifier les phénotypes obtenus (titre, productivité, tolérance, décès) aussi fiablement que lors d'une étude en bioréacteurs instrumentés.

Conclusions et Perspectives

Conclusions et Perspectives

Conclusions

Afin de minimiser les coûts de matières et d'énergie en fermentation et en post-traitement (distillation), les micro-organismes utilisés pour la production d'éthanol doivent être capables de produire des quantités élevées d'éthanol, de tolérer les concentrations induites et doivent répondre à différents critères économiques :

- obtenir un rendement de production d'éthanol élevé avec un taux de sucre résiduel nul

- obtenir des productivités importantes

- obtenir une concentration finale en éthanol supérieure à 8°GL

Dans les conditions industrielles, où des fluctuations des paramètres environnementaux sont très couramment rencontrées, le métabolisme des levures est affecté entrainant des baisses de performances et rendant difficile le respect des critères précédemment cités. Ce sujet de thèse vise à améliorer la survie des levures par un moindre décès en conditions de stress, afin d'intensifier ou de maintenir la production d'éthanol.

L'objectif de ce travail était de développer une stratégie couplant modélisation et conduite de fermentation pour améliorer la tolérance d'une souche de levure vis-à-vis du stress température. Dans ce but, une approche originale de génie microbiologique couplant culture continue, mutagénèse aux UV et pression de sélection a été mise en œuvre afin d'améliorer une souche industrielle diploïde de *Saccharomyces cerevisiae*. Ainsi, un réacteur d'expérimentation dédié et un modèle mathématique spécifique ont été développés au cours de cette étude.

Le stress température est un paramètre affectant toutes les souches de manière plus ou moins différente (perte d'activité, de viabilité, décès, etc…). L'obtention par mutagénèse aléatoire aux UV d'un mutant plus tolérant que la souche sauvage au stress appliqué repose sur l'hypothèse qu'**à une température donnée le taux de croissance apparent du mutant est supérieur à celui de la souche sauvage car son taux de décès est inférieur à celui de la souche sauvage**.

Un pilote dédié, fonctionnant en mode continu, a été développé : outre un réacteur principal où les paramètres environnementaux sont contrôlés et mesurés, il comprend une boucle externe de traitement aux UV. Les variants générés par mutagénèse aléatoire qui sont les plus robustes sont sélectionnés en milieu liquide au sein du chémostat par l'application d'une pression de sélection.

La pression de sélection choisie est ici un gradient croissant de température couplé à des chocs thermiques successifs à une température sélective.

L'analyse dynamique de la viabilité et du décès cellulaire sont des paramètres indispensables pour mettre en évidence une éventuelle amélioration du phénotype des variants. Ils ont été quantifiés par plusieurs techniques, comptage au bleu de méthylène, numération sur boîte de pétri et mesure de capacitance. La mesure de capacitance a été mise en œuvre pour déterminer l'état physiologique des cellules *in-situ*. Du fait des cinétiques rapides de réponse au stress température, il était intéressant d'avoir une mesure en ligne de la fraction de cellules viables afin de permettre une analyse à une fréquence élevée.

Un modèle phénoménologique décrivant l'impact de la température et de l'exposition aux UV sur les cinétiques de croissance, de production, de consommation et de décès de la souche sauvage a été développé. L'objectif de ce modèle était de prédire l'évolution des dynamiques de réponse des levures afin d'optimiser les conditions de fonctionnement du pilote. Un profil de température est recherché et doit permettre la sélection d'un mutant plus robuste aux variations de température en minimisant les durées de culture et en maximisant l'enrichissement du variant. Les paramètres cinétiques ont été quantifiés en fonction de la température et des traitements de mutagénèse par UV et ont permis d'implémenter le modèle développé pour paramétrer l'apparition de mutants résistants au sein d'un pilote.

La mise en œuvre du pilote couplant culture continue, mutagénèse aux UV et pression de sélection par la température a généré des populations de variants qui ont été caractérisées sur leurs capacités cinétiques afin de déceler la présence de phénotypes intéressants.

L'ensemble des résultats obtenus nous permet de répondre aux différentes problématiques scientifiques énoncées en introduction. En premier lieu :

- Quel est l'impact de variations de température et de l'exposition aux UV sur les cinétiques de croissance, de production et de décès et sur les différentes populations cellulaires, chez Saccharomyces cerevisiae, en conditions intensives de production d'éthanol ?

Une des premières étapes du sujet était de déterminer l'impact d'un facteur de stress environnemental, la température et de l'exposition aux UV sur les cinétiques de croissance de décès et de production ainsi que sur la viabilité des levures. Pour cela, des cultures dédiées ont été conduites pour étudier spécifiquement le comportement de la souche sauvage en mode isotherme, en présence de chocs thermiques et avec une exposition à différentes puissances d'UV. Des bilans de populations cellulaires ont été établis afin de quantifier le rôle et le mode d'action de ces stress sur la viabilité cellulaire, le nombre de cellules totales, la cultivabilité et le décès

Les bilans de populations sur les cultures exposées à un stress température ont montré que ce paramètre affecte l'ensemble des populations cellulaires et entraine - lors du passage à une température élevée - une chute de la concentration en biomasse totale, viable et cultivable. Un impact a été observé sur la viabilité, sur le décès cellulaire et sur les cinétiques de consommation

et de production comme rapporté par Torija *et al.* (2003b) et Aldiguier *et al.* (2004). Plus le choc est intense et plus la viabilité est affectée rapidement. La viabilité chute de 100% à 0% en 12, 10, 6 et 4 heures respectivement pour un choc thermique à 39°C, 42°C, 45°C et 47°C. L'application de chocs thermiques, lors de la culture continue ou lors des cultures dédiées à la caractérisation des souches, a montré le même impact sur les populations que les cultures en mode discontinu. Des variations de température quasi-instantanées ont été réalisées et il est connu dans la littérature que la vitesse de variation de la température est un facteur important dans la réponse au stress thermique, l'impact étant plus important sur le métabolisme des levures lorsque la variation est rapide (Gervais and Martínez De Marañón 1995; Marechal *et al.* 1999; Martínez De Marañón *et al.* 1999; Beney *et al.* 2000; Guyot *et al.* 2005). Les taux de décès à différentes températures ont été calculés à partir des cultures en condition de stress thermique dans une gamme de 30 à 47°C et ont montré une augmentation du taux de décès avec la température (k_d : 0,01 h^{-1} à 30°C ; 1,05 h^{-1} à 47°C). Les valeurs obtenues sont du même ordre de grandeur que certains taux de décès rapportés dans la bibliographie pour une gamme de température plus restreinte (Ling *et al.* 1995).

Des cultures sous exposition aux UV ont montré un impact sur le taux de croissance, la production d'éthanol et les populations cellulaires (totales, viables et cultivables) et l'effet est d'autant plus important que la puissance des UV est élevée. L'exposition à une puissance de 25 $W.m^{-2}$ réduit le nombre de cellules totales, viables et cultivables respectivement de 25%, 20% et 37% alors que l'exposition à 6 $W.m^{-2}$ réduit uniquement le nombre de cellules cultivables (-12%). Dans la bibliographie, les UV sont connus pour perturber la division cellulaire et entrainer un retard de croissance (Resnick and Setlow 1972; James and Nasim 1987) ce qui va dans le sens des observations faites sur les populations de cellules viables, cultivables et totales. Par contre, aux puissances utilisées, l'exposition aux UV n'induit pas un décès supérieur au décès « naturel » induit majoritairement par l'éthanol, observé sur une culture de référence. Des données contradictoires ont été trouvées dans la littérature qui rapportent un impact drastique des UV induisant la mort cellulaire de la quasi-totalité de la population dès 300 $J.m^{-2}$ (Del Carratore *et al.*, 2002), or dans nos expériences la dose reçue par les cellules est supérieure (500 $J.m^{-2}$). Les différences observées peuvent s'expliquer par un temps de contact des cellules avec les UV réduit (< 90 secondes) à une puissance élevée plutôt qu'une durée d'exposition plus longue à des puissance plus faibles (pour une même dose reçue). De plus, les techniques d'adaptation sont différentes : dans ce pilote continu seule une fraction de la population est irradiée (7,5 heures pour l'irradiation de la totalité des cellules) et la sélection se fait au sein du même pilote alors que dans la littérature l'irradiation des levures se fait en statique (0,9% (w/v) NaCl) sur l'ensemble de la population et la phase de sélection est réalisée ensuite sur milieu solide.

En conclusion, la température et les UV ont un impact sur les différentes populations cellulaires viables et cultivables (le paramètre le plus sensible étant sans nul doute la cultivabilité). Par ailleurs, aux doses utilisées et dans les conditions choisies de mise en œuvre, les UV n'ont pas d'effet sur le décès cellulaire, et bien que pris en compte dans la modélisation il pourrait être négligé.

La deuxième problématique posée est la suivante :

- Est-il possible, en mettant en œuvre une stratégie couplée de génie microbiologique et de mutagénèse aléatoire aux UV, d'obtenir un variant possédant une tolérance améliorée au stress température ? Peut-on déduire à partir d'un modèle phénoménologique les conditions optimales d'obtention de ce variant ?

Une stratégie de modélisation de la conduite de la fermentation a été développée pour prédire les conditions de fonctionnement optimales pour l'obtention d'un variant plus tolérant que la souche sauvage aux fluctuations de température.

Le modèle phénoménologique développé repose sur des équations cinétiques de croissance et de décès, de consommation du substrat, de production des métabolites majeurs (éthanol et glycérol) paramétrées en fonction de l'environnement et notamment du paramètre température. Certains des paramètres inhérents au modèle sont obtenus pour la souche sauvage grâce aux résultats issus de cultures dédiées (chocs thermiques et exposition aux UV). D'autres paramètres ont été fixés sur la base d'hypothèse ou de données bibliographiques. Ce modèle a permis de simuler des conditions de fonctionnement et d'optimiser ces conditions pour la recherche d'un variant potentiel en quantité suffisante et en un temps de culture jugé acceptable d'un point de vue expérimental.

Les conditions simulées ont été utilisées expérimentalement. En couplant stratégie de génie microbiologique et mutagénèse, il a été possible de générer des populations de variants pouvant présenter des caractéristiques phénotypiques intéressantes. Tout au long de la culture continue, des fractions des populations cellulaires ont été conservées et les phénotypes de certains clones ont été caractérisés par différentes stratégies de criblage afin d'évaluer leur capacités cinétiques (croissance, décès et production) et de caractériser l'obtention ou non de variants améliorés.

Un clone (clone 86B) a été sélectionné pour ses capacités de croissance et de production d'éthanol. Il a été caractérisé en conditions intensives de production d'éthanol et a montré un taux de décès inférieur de 38% à celui de la souche sauvage en présence de chocs thermiques (k_d = 0,092 h^{-1} contre 0,148 h^{-1}) (Figure 114).

La mise en œuvre de la modélisation couplée à une stratégie de conduite originale a permis de générer au moins un variant possédant un phénotype de tolérance améliorée vis-à-vis du stress température en termes de moindre décès. La caractérisation de plusieurs clones aurait pu conduire à isoler un variant plus performant mais nécessitait des appareillages particuliers pour des caractérisations moins lourdes (haut-débit).

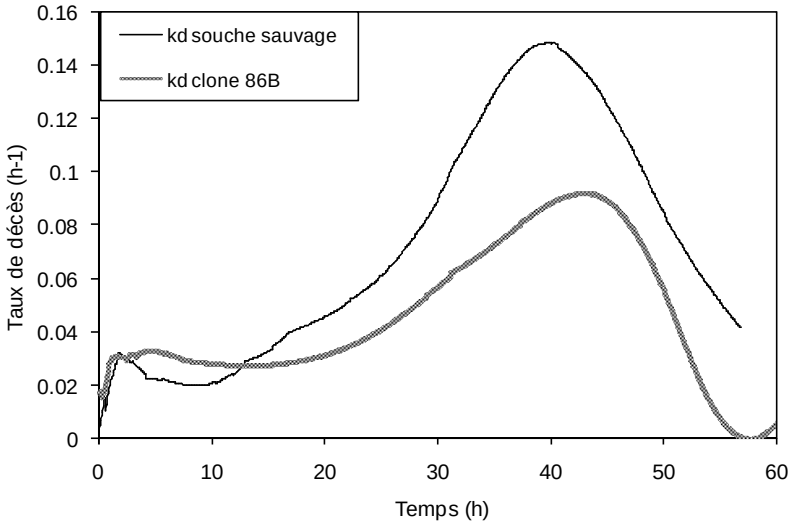


Figure 114. Taux de décès instantané (kd) de la souche sauvage et du clone 86B en fonction du temps à 37°C en présence de chocs à 45°C

Suite aux observations faites en chémostat et aux données de la littérature, nous nous sommes intéressés au co-produit majeur de la fermentation alcoolique, le glycérol, et au rôle qu'il peut jouer en présence d'un stress température.

- Quel est l'impact du glycérol sur la protection des levures en conditions de stress thermique ?

Lors de la mise en œuvre du chémostat pour l'obtention de variants à l'inverse de l'évolution des autres composés (chute des concentrations), une augmentation de la concentration en glycérol ainsi que de la vitesse spécifique de production de glycérol a été observée sur les 100 premières heures de perturbation.

Ce phénomène est rapporté dans la littérature (Omori *et al.* 1996; Remize *et al.* 2000; Balli *et al.* 2003; Torija *et al.* 2003b) et interprété comme la synthèse de molécules protectrices par les levures en réponse au stress thermique (Aldiguier *et al.* 2004; Zancan and Sola-Penna 2005).

Nous avons pu mettre en évidence le rôle protecteur du glycérol vis-à-vis du stress température par la culture de *Saccharomyces cerevisiae* en mode continu et discontinu alimenté en condition de stress thermique. Des cultures en mode discontinu alimenté (30°C à 37°C) en présence de chocs thermiques dans une gamme de 39°C à 47°C ont montré un couplage entre croissance et production de glycérol et l'existence de facteurs de découplage à partir de 37°C (lors de l'arrêt de la croissance) augmentant avec la température (Annexe 1 p.243). Ce découplage confirme les résultats précédents sur des souches différentes (Aldiguier *et al.* 2004). La vitesse spécifique de production de glycérol a donc été corrélée au taux de croissance dans le modèle avec un facteur de découplage fonction de la température (Annexe 1 p.240 et chapitre III). Malgré la prise en compte de cette cinétique de production de glycérol fonction de la température, la

simulation du chémostat par le modèle exposé en annexe (Annexe 1) a montré une différence entre la concentration en glycérol simulée et expérimentale.

D'où provient cette augmentation de glycérol lors de l'expérience ? Une lyse cellulaire ayant été avancée pour expliquer la différence entre concentration en biomasse expérimentale et simulée, celle-ci pourrait être responsable de la libération du contenu cellulaire dans le milieu de culture et donc conduire à une surestimation du glycérol détecté interprété premièrement comme une augmentation de la production. Nous nous sommes demandé quelle concentration en glycérol intracellulaire expliquerait que la lyse seule soit responsable de cette augmentation de la concentration en glycérol. La concentration intracellulaire théorique serait de 4 M et n'est donc pas réaliste par rapport aux données de la littérature (Reed *et al.* 1987; Olz *et al.* 1993). L'augmentation de glycérol ne peut pas s'expliquer seulement par la lyse cellulaire et il existe donc des modifications stoechiométriques non décrites par le modèle, bien que celui-ci ait été validé sur les résultats expérimentaux d'une culture en mode discontinu et continu. Il semble bien y avoir une surproduction de glycérol réelle lors des chocs thermiques, afin de protéger la levure du stress subi. L'analyse en ligne de la capacitance a montré que les cellules « récupèrent » leurs capacités entre chaque choc et ce certainement grâce à la production accrue de glycérol liée aux phénomènes de lutte contre les stress. Il doit donc y avoir une stimulation de l'activité de l'enzyme GPDH (Radler and Schutz 1982; Omori *et al.*1996).

Le glycérol semble donc bien avoir un rôle dans la protection des levures contre le stress thermique.

Enfin, il a été possible de répondre à la question suivante.

- Une meilleure tolérance au stress température en termes de moindre décès se traduit-elle par de meilleures performances fermentaires ?

Les variants issus du chémostat couplant mutagénèse UV et pression de sélection (température) ont été criblés sur leur vitesse de croissance sur milieu solide à différentes températures d'incubation, puis sur leur croissance et leur production en milieu liquide. Parmi les variants sélectionnés pour leurs performances en termes de croissance et de production d'éthanol, le clone 86B, qui semblait être le plus performant, a fait l'objet d'une caractérisation plus fine dans des conditions de cultures contrôlées en production intensive d'éthanol. Ce clone possède un taux de décès plus faible que celui de la souche sauvage (-38%) et donc un meilleur maintien en présence de chocs thermiques sur la gamme de température testée (37°C - 45°C) (Figure 114). Par contre, ce moindre taux de décès n'impacte pas les performances fermentaires de ce clone qui se sont révélées proches de celles de la souche industrielle. Dans les conditions de haute production d'éthanol testées une amélioration du décès n'entraîne donc pas une amélioration des performances fermentaires. Néanmoins, en mode continu, où les durées de fermentation sont plus longues, cette souche qui possède un décès moins rapide pourrait éventuellement permettre d'améliorer la productivité.

Perspectives

Pour poursuivre ce travail, plusieurs perspectives sont envisagées. Tout d'abord, il serait intéressant de faire une implémentation des travaux à court terme et de vérifier les hypothèses avancées.

La détermination du décès à différentes températures a permis d'établir une relation entre le k_d et la température pour la souche sauvage qui a été intégrée au modèle. Ce travail aurait pu être complété par des cultures du clone 86B en mode discontinu en isotherme à plusieurs températures, afin d'obtenir les valeurs de taux de décès pour ces différentes températures, déterminer les paramètres définissant le profil d'évolution du décès propres à la souche mutante (k_d t_m, tpc_m, $pente_m$) et ainsi compléter le modèle cinétique. Seuls les paramètres pour la souche sauvage ont été obtenus expérimentalement, ceux de la souche mutante ont seulement été déduits. Une détermination expérimentale de ces paramètres serait donc intéressante pour faire évoluer le modèle phénoménologique développé.

Le clone 86B est le seul qui ait été caractérisé en termes de décès en condition de production intensive d'éthanol et de stress thermique, le choix d'un autre clone aurait pu montrer de meilleures performances de production d'éthanol. La souche sauvage et les clones pourraient également être comparés à une souche mutée à l'EMS pour observer l'impact d'une autre technique d'amélioration de souche. De plus, il serait intéressant de réaliser une culture continue en présence de chocs thermiques sur une fermentation de longue durée afin de voir si le gain en termes de taux de décès se traduit par un gain au niveau des performances fermentaires pour ce mode de conduite, ce qui n'était pas le cas en mode discontinu.

Changer de souche peut également être un moyen d'améliorer l'efficacité du système développé. Il serait intéressant d'utiliser une souche haploïde pour laquelle le taux de mutations pourrait être augmenté du fait d'une majorité de mutations récessives. Dans la littérature, des auteurs ont montré des taux de mutations pour des souches diploïdes proches ou supérieurs à ceux évalués pour des souches haploïdes pour des mutations spontanées (Magni and Von Borstel 1962; Ohnishi *et al.* 2004) ou induites par les UV (Hashimoto *et al.* 2005). Cependant, comme les taux de mutations trouvés dans la littérature sont très différents, il conviendrait de vérifier ce paramètre avec une souche haploïde. En plus des clones obtenus, la souche industrielle a également été comparée à la souche de laboratoire *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK113-7D et à l'une de ses déclinaisons modifiées dans la voie du glycérol (TEFmut2). La souche modifiée TEFmut2 est délétée pour le gène GPD2. Le promoteur natif du gène GPD1 est remplacé par un promoteur mutant de faible activité : TEF1_2 (construction effectuée au TUBerlin) ; Génotype : gpd2Δ::loxP-ble^R-loxP GPD1pΔ::loxP-KanMX4-loxP-TEF1p mutant 2 (Pagliardini *et al.* 2010). Des cultures en microplaques ont révélé que la souche industrielle est très performante en termes

de croissance et de production par rapport à ces deux autres souches. On peut donc penser qu'améliorer une souche qui possède déjà d'excellentes performances sur des critères d'intérêt industriel est difficile. Une mise en œuvre du chémostat d'obtention de variants avec une de ces deux autres souches serait intéressante afin de déterminer si une amélioration des performances de production d'éthanol peut être atteinte.

D'autre part, des perspectives à visée applicative peuvent être envisagées. Il serait intéressant de faire une utilisation du pilote sur substrat réel sur hydrolysats lignocellulosiques et également d'améliorer d'autres souches appartenant par exemple au genre *Candida* pour l'utilisation des pentoses issus de la fraction hémicellulosique des hydrolysats de paille de blé.

Pour les procédés d'hydrolyse enzymatique et de fermentation simultanées : SSF (Simultaneous Saccharification and Fermentation) l'hydrolyse enzymatique est couplée à la fermentation. L'hydrolyse enzymatique permet la digestion de la cellulose, issue du prétraitement de la biomasse lignocellulosique (Wheals *et al.* 1999; Olofsson *et al.* 2008a), en monomères (hexoses) assimilables par les micro-organismes (Ogier *et al.* 1999; Zaldivar *et al.* 2001; Sun and Cheng 2002; Sánchez and Cardona 2008). La réalisation simultanée de ces deux étapes permet ainsi de simplifier le procédé, de réduire les coûts et de diminuer l'inhibition des cellulases par le glucose qui est transformé en éthanol au fur et à mesure de sa libération. Les principaux inconvénients de la SSF sont le choix de conditions environnementales favorables (température, pH,…) à la fois pour l'hydrolyse enzymatique et la fermentation, permettant d'obtenir le plus haut degré d'hydrolyse et le rendement en éthanol le plus élevé possible (Ogier *et al.* 1999; Olofsson *et al.* 2008a). Pour le procédé SSF la tolérance à la température et aux inhibiteurs et la capacité de dégrader différents sucres sont essentielles. Grâce au pilote développé, l'amélioration de la robustesse à ces différents stress est envisageable.

La température optimale pour les cellulases et pour les levures est différente, avec respectivement 55°C et 30°C. Pour permettre une hydrolyse enzymatique et une fermentation simultanées, la température est en général inférieure ou égale à 37°C. Olofsson *et al.* (2008a) ont réalisé leurs procédés SSF à 37°C sur hydrolysats de paille de blé (hexoses et pentoses) en mode discontinu alimenté, avec la souche modifiée *Saccharomyces cerevisiae* TMB3400. Une concentration en éthanol finale de 38,1 $g.L^{-1}$ et un rendement de 0,36 $g_P.g_S^{-1}$ (71% du rendement théorique limite) ont été atteints en 96 heures, soit une productivité de 0,4 $g.L^{-1}.h^{-1}$ (Olofsson *et al.* 2008b). La productivité faible observée est due aux cinétiques de croissance et de production de la souche à température élevée mais surtout à la faible activité des enzymes à ces températures. L'hydrolyse à une telle température est lente et la cinétique microbienne est limitée par la libération du substrat. La souche utilisée ou le clone 86B pourraient être testés en SSF à une température supérieure à 37°C, 40,5°C, température utilisée en chémostat pour laquelle la levure présentait un régime stable sur glucose en présence de chocs thermiques à 45°C avec une productivité de 3,5 $g.L^{-1}.h^{-1}$. Cette température permettrait des vitesses d'hydrolyse enzymatique

plus rapides. D'autre part, la conduite de fermentations à des températures plus élevées serait techniquement et économiquement avantageuse en diminuant les coûts de refroidissement et de distillation. Il est donc intéressant de poursuivre la recherche de micro-organismes montrant de bonnes performances fermentaires à température plus élevée en plus de la tolérance aux fluctuations de température (Banat *et al.* 1998; Abdel-Banat *et al.* 2009).

Le modèle établi permet de déterminer le profil de température dans le cas du pilote mis en place. Le taux de dilution est imposé dans les conditions choisies par l'inhibition éthanol. Ce modèle pourrait également être appliqué à d'autres pilotes présentant des conditions de stress température en adaptant les volumes de culture, les cinétiques, … aux conditions mises en œuvre. De plus il pourrait être utilisé pour l'optimisation et le contrôle de la fermentation éthanolique à plus grande échelle.

Des recherches restent à faire au niveau de la production de bioéthanol à partir de substrat d'origine agricole. L'amélioration de la tolérance des souches vis-à-vis de différents stress en culture continue couplée à une mutagénèse aux UV et à une pression de sélection pour le caractère recherché permet de générer une diversité phénotypique des souches. La caractérisation des variants obtenus est une étape importante pour la recherche de nouvelles souches possédant une robustesse accrue. Un phénotype de tolérance améliorée aux fluctuations de température ou à d'autres stress environnementaux conduirait à l'intensification de la production d'éthanol.

Références Bibliographiques

Références Bibliographiques

Abdel-Banat, B., H. Hoshida, A. Ano, S. Nonklang and R. Akada (2009) High-temperature fermentation: how can processes for ethanol production at high temperatures become superior to the traditional process using mesophilic yeast? *Applied Microbiology and Biotechnology* 85 *(4)*, 861.

ADEME (2010). Analyses de Cycle de Vie appliquées aux biocarburants de première génération consommés en France (Etude réalisée pour le compte de l'Agence de l'environnement et de la Maîtrise de l'Energie, du Ministère de l'Ecologie, de l'Energie, du Développement Durable et de la Mer, du Ministère de l'Alimentation, de l'Agriculture et de la Pêche, et de FranceAgriMer) par BIO Intelligence Service.

Alao, J. P. and P. Sunnerhagen (2008) Rad3 and Sty1 function in *Schizosaccharomyces pombe*: an integrated response to DNA damage and environmental stress? *Molecular Microbiology* 68 *(2)*, 246.

Aldiguier, A. S. (2006) Activité bio-catalytique en haute densité cellulaire de *Saccharomyces cerevisiae* pour l'intensification de la production de bio-éthanol, Thèse INSA Toulouse.

Aldiguier, A. S., S. Alfenore, X. Cameleyre, G. Goma, J. L. Uribelarrea, S. E. Guillouet and C. Molina-Jouve (2004) Synergistic temperature and ethanol effect on *Saccharomyces cerevisiae* dynamic behaviour in ethanol bio-fuel production, *Bioprocess and Biosystems Engineering* 26 *(4)*, 217.

Alfenore, S., X. Cameleyre, L. Benbadis, C. Bideaux, J. L. Uribelarrea, G. Goma, C. Molina-Jouve and S. E. Guillouet (2004) Aeration strategy: a need for very high ethanol performance in *Saccharomyces cerevisiae* fed-batch process, *Applied Microbiology and Biotechnology* 63 *(5)*, 537.

Alfenore, S., J. Molina, C., S. E. Guillouet, J. L. Uribelarrea, G. Goma and L. Benbadis (2002) Improving ethanol production and viability of *Saccharomyces cerevisiae* by a vitamin feeding strategy during fed-batch process, *Applied Microbiology and Biotechnology* 60 *(1)*, 67.

Ali, S. H., O. Al-Rashed, F. A. Azeez and S. Q. Merchant (2011) Potential biofuel additive from renewable sources - Kinetic study of formation of butyl acetate by heterogeneously catalyzed transesterification of ethyl acetate with butanol, *Bioresour. Technol.* 102 *(21)*, 10094.

Allen, C., S. Büttner, A. D. Aragon, J. A. Thomas, O. Meirelles, J. E. Jaetao, D. Benn, S. W. Ruby, M. Veenhuis, F. Madeo and M. Werner-Washburne (2006) Isolation of quiescent and nonquiescent cells from yeast stationary-phase cultures, *The Journal of Cell Biology* 174 *(1)*, 89.

Alper, H., J. Moxley, E. Nevoigt, G. R. Fink and G. Stephanopoulos (2006) Engineering yeast transcription machinery for improved ethanol tolerance and production, *Science* 314 *(5805)*, 1565.

Andrade, R., E. Ccopa Rivera, A. Costa, D. Atala, F. Filho and R. Filho (2007) Estimation of temperature dependent parameters of a batch alcoholic fermentation process, *Applied Biochemistry and Biotechnology* 136-140 *(1)*, 753.

Argiriou, T., A. Kalliafas, C. Psarianos, K. Kana, M. Kanellaki and A. Koutinas (1992) New alcohol resistant strains of *Saccharomyces cerevisiae* species for potable alcohol production using molasse, *Applied Biochemistry and Biotechnology* 36 *(3)*, 153.

Atala, D., A. Costa, R. Maciel and F. Maugeri (2001) Kinetics of ethanol fermentation with high biomass concentration considering the effect of temperature, *Applied Biochemistry and Biotechnology* 91-93 *(1)*, 353.

Athenstaedt, K. and G. Daum (1999) Phosphatidic acid, a key intermediate in lipid metabolism, *European Journal of Biochemistry* 266 *(1)*, 1.

Attfield, P. V. (1997) Stress tolerance: The key to effective strains of industrial baker's yeast, *Nature Biotechnology* 15 *(13)*, 1351.

Back, J. F., D. Oakenfull and M. B. Smith (1979) Increased thermal stability of proteins in the presence of sugars and polyols, *Biochemistry* 18 *(23)*, 5191.

Balakumar, S., V. Arasaratnam and K. Balasubramaniam (2001) Isolation and improvement of a thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae* strain, *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 17 *(7)*, 739.

Balli, D., V. Flari, E. Sakellaraki, V. Schoina, M. Iconomopoulou, A. Bekatorou and M. Kanellaki (2003) Effect of yeast cell immobilization and temperature on glycerol content in alcoholic fermentation with respect to wine making, *Process Biochemistry* 39 *(4)*, 499.

Banat, I. M., P. Nigam, D. Singh, R. Marchant and A. P. McHale (1998) Ethanol production at elevated temperatures and alcohol concentrations: Part I - Yeasts in general, *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 14 *(6)*, 809.

Barber, A. R., F. Vriesekoop and N. B. Pamment (2002) Effects of acetaldehyde on *Saccharomyces cerevisiae* exposed to a range of chemical and environmental stresses, *Enzyme and Microbial Technology* 30 *(2)*, 240.

Barford, J. P. and R. J. Hall (1979) An examination of the crabtree effect in *Saccharomyces cerevisiae*: the role of respiratory adaptation, *Journal of General Microbiology* 114 *(2)*, 267.

Beaven, M. J., C. Charpentier and A. H. Rose (1982) Production and tolerance of ethanol in relation to phospholipid fatty-acyl composition in *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 431, *Journal of General Microbiology* 128 *(7)*, 1447.

Belloch, C., S. Orlic, E. Barrio and A. Querol (2008) Fermentative stress adaptation of hybrids within the Saccharomyces sensu stricto complex, *International Journal of Food Microbiology* 122 *(1-2)*, 188.

Beney, L., I. Martínez de Marañón, P.-A. Marechal and P. Gervais (2000) Influence of thermal and osmotic stresses on the viability of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *International Journal of Food Microbiology* 55 *(1-3)*, 275.

Beney, L. B. and P. G. Gervais (2001) Influence of the fluidity of the membrane on the response of microorganisms to environmental stresses, *Applied Microbiology and Biotechnology* 57 *(1)*, 34.

Bernaerts, K., K. J. Versyck and J. F. Van Impe (2000) On the design of optimal dynamic experiments for parameter estimation of a Ratkowsky-type growth kinetics at suboptimal temperatures, *International Journal of Food Microbiology* 54 27.

Bernard, D. (1996) The yeast genome project: what did we learn? *Trends in Genetics* 12 *(7)*, 263.

Berovic, M., A. Pivec, T. Kosmerl, M. Wondra and S. Celan (2007) Influence of heat shock on glycerol production in alcohol fermentation, *Journal of Bioscience and Bioengineering* 103 *(2)*, 135.

Birch, R. M. and G. M. Walker (2000) Influence of magnesium ions on heat shock and ethanol stress responses of *Saccharomyces cerevisiae*, *Enzyme and Microbial Technology* 26 *(9-10)*, 678.

Blomberg, A. and L. Adler (1989) Roles of glycerol and glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD+) in acquired osmotolerance of *Saccharomyces cerevisiae*, *Journal of Bacteriology* 171 *(2)*, 1087.

Bocquet, J. (1988), "Partie II Le génie microbiologique - Chapitre I Généralités sur les micro-organismes," in "Biotechnologie," Technique et Documentation - Lavoisier, R. Scriban.

Botton, B. (1991), "La physiologie des levures," in "Biotechnologie des levures," Masson, J. P. Larpent.

Bouix, M. and J. Y. Leveau (2001) Rapid assessment of yeast viability and yeast vitality during alcoholic fermentation, *Journal of the Institute of Brewing* 107 *(4)*, 217.

Breeuwer, P. and T. Abee (2000) Assessment of viability of microorganisms employing fluorescence techniques, *International Journal of Food Microbiology* 55 *(1-3)*, 193.

Brown, S. W. and S. G. Oliver (1982) Isolation of ethanol-tolerant mutants of yeast by continuous selection, *Applied Microbiology and Biotechnology* 16 *(2)*, 119.

Brown, S. W., S. G. Oliver, D. E. F. Harrison and R. C. Righelato (1981) Ethanol inhibition of yeast growth and fermentation: Differences in the magnitude and complexity of the effect, *Applied Microbiology and Biotechnology* 11 *(3)*, 151.

Burhans, W. C., M. Weinberger, M. A. Marchetti, L. Ramachandran, G. D'Urso and J. A. Huberman (2003) Apoptosis-like yeast cell death in response to DNA damage and replication defects, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 532 *(1-2)*, 227.

Cakar, Z. P., U. O. S. Seker, C. Tamerler, M. Sonderegger and U. Sauer (2005) Evolutionary engineering of multiple-stress resistant *Saccharomyces cerevisiae*, *Fems Yeast Research* 5 *(6-7)*, 569.

Carvalheiro, F., J. C. Roseiro and F. M. Girio (1999) Interactive effects of sodium chloride and heat shock on trehalose accumulation and glycerol production by *Saccharomyces cerevisiae*, *Food Microbiology* 16 *(6)*, 543.

Casey, G. P. and W. M. Ingledew (1986) Ethanol tolerance in yeasts, *CRC Critical Reviews in Microbiology* 13 *(3)*, 219.

Castillo Agudo, L. (1992) Lipid content of *Saccharomyces cerevisiae* strains with different degrees of ethanol tolerance, *Applied Microbiology and Biotechnology* 37 *(5)*, 647.

Chanet, R., R. Waters and E. Moustacchi (1975) Induction of pyrimidine dimers in nuclear DNA after uv irradiation during the synchronous cycle of *Saccharomyces cerevisiae*, *International Journal of Radiation Biology* 27 *(5)*, 481.

Cole, K. S. and R. H. Cole (1941) Dispersion and absorption in dielectrics I. Alternating current characteristics, *Journal of Chemical Physics* 9 *(4)*, 341.

Coote, P. J., M. B. Cole and M. V. Jones (1991) Induction of increased thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae* may be triggered by a mechanism involving intracellular pH, *Journal of General Microbiology* 137 *(7)*, 1701.

Costa, A. C., D. I. P. Atala, F. Maugeri and R. Maciel (2001) Factorial design and simulation for the optimization and determination of control structures for an extractive alcoholic fermentation, *Process Biochemistry* 37 *(2)*, 125.

Cour.des.comptes (2012). Evaluation d'une politique publique: la politique d'aide aux biocarburants. La Documentation française. janvier 2012.

D'Amore, T. and G. G. Stewart (1987) Ethanol tolerance of yeast, *Enzyme and Microbial Technology* 9 *(6)*, 322.

Davidson, J. F., B. Whyte, P. H. Bissinger and R. H. Schiestl (1996) Oxidative stress is involved in heat-induced cell death in *Saccharomyces cerevisiae*, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93 *(10)*, 5116.

De Deken, R. H. (1966) The Crabtree Effect: A regulatory system in yeast, *Journal of General Microbiology* 44 *(2)*, 149.

Del Carratore, R., C. Della Croce, M. Simili, E. Taccini, M. Scavuzzo and S. Sbrana (2002) Cell cycle and morphological alterations as indicative of apoptosis promoted by UV irradiation in *S. cerevisiae*, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 513 *(1-2)*, 183.

Dombek, K. M. and L. O. Ingram (1984) Effects of ethanol on the *Escherichia coli* plasma membrane, *Journal of Bacteriology* 157 *(1)*, 233.

Donoso-Bravo, A., J. Mailier, C. Martin, J. Rodriguez, C. A. Aceves-Lara and A. V. Wouwer (2011) Model selection, identification and validation in anaerobic digestion: A review, *Water Research* 45 *(17)*, 5347.

Drake, J. W. (1991) A constant rate of spontaneous mutation in DNA-based microbes, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88 *(16)*, 7160.

Duboc, P. and U. Von Stockar (1998) Systematic errors in data evaluation due to ethanol stripping and water vaporization, *Biotechnology and Bioengineering* 58 *(4)*, 428.

Estruch, F. (2000) Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast, *FEMS Microbiology Reviews* 24 *(4)*, 469.

Farrell, J. and A. Rose (1967) Temperature effects on microorganisms, *Annual Review of Microbiology* 21 *(1)*, 101.

Federighi, M. (2004) Les formes viables non cultivables des bactéries: point de vue et retour d'expérience d'un hygiéniste, *Bulletin - Société Francaise de Microbiologie* 19 *(4)*, 237.

Fintan Walton, E. and J. R. Pringle (1980) Effect of growth temperature upon heat sensitivity in *Saccharomyces cerevisiae*, *Archives of Microbiology* 124 *(2)*, 285.

Fricke, H. and H. J. Curtis (1934) Electric impedance of suspensions of yeast cells, *Nature* 134 102.

Friedberg, E. C. (1988) Deoxyribonucleic acid repair in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Microbiological Reviews* 52 *(1)*, 70.

Fyferling, M. (2007) Transfert d'oxygène en condition de culture microbienne intensive, Thèse INSA Toulouse.

Gardner, N., N. Rodrigue and C. P. Champagne (1993) Combined effects of sulfites, temperature, and agitation time on production of glycerol in grape juice by *Saccharomyces cerevisiae*, *Applied and Environmental Microbiology* 59 *(7)*, 2022.

Gervais, P. and I. Martínez De Marañón (1995) Effect of the kinetics of temperature variation on *Saccharomyces cerevisiae* viability and permeability, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1235 *(1)*, 52.

Ghose, T. K. and R. D. Tyagi (1979) Rapid ethanol fermentation of cellulose hydrolysate. II. Product and substrate inhibition and optimization of fermentor design, *Biotechnology and Bioengineering* 21 *(8)*, 1401.

Goffeau, A., B. G. Barrell, H. Bussey, R. W. Davis, B. Dujon, H. Feldmann, F. Galibert, J. D. Hoheisel, C. Jacq, M. Johnston, E. J. Louis, H. W. Mewes, Y. Murakami, P. Philippsen, H. Tettelin and S. G. Oliver (1996) Life with 6000 Genes, *Science* 274 *(5287)*, 546.

Goodin, L. J., R. G. Johnson and H. G. Morrison (1971) Photoreversal of ultraviolet-induced division delay in *Saccharomyces cerevisiae*, *Radiation Research* 45 *(2)*, 440.

Gottlieb, R. A., J. Nordberg, E. Skowronski and B. M. Babior (1996) Apoptosis induced in Jurkat cells by several agents is preceded by intracellular acidification, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93 *(2)*, 654.

Gourlay, C. W., W. Du and K. R. Ayscough (2006) Apoptosis in yeast – mechanisms and benefits to a unicellular organism, *Molecular Microbiology* 62 *(6)*, 1515.

Gray, J. V., G. A. Petsko, G. C. Johnston, D. Ringe, R. A. Singer and M. Werner-Washburne (2004) "Sleeping Beauty": Quiescence in *Saccharomyces cerevisiae*, *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 68 *(2)*, 187.

Gray, W. D. and C. Sova (1969) Effect of alcohol on yeast hexokinase, *Mycopathologia* 37 *(1)*, 70.

Gregori, G., S. Citterio, A. Ghiani, M. Labra, S. Sgorbati, S. Brown and M. Denis (2001) Resolution of viable and membrane-compromised bacteria in freshwater and marine waters based on analytical flow cytometry and nucleic acid double staining, *Applied and Environmental Microbiology* 67 *(10)*, 4662.

Guillou, V. (1996) Etude du comportement dynamique de *Saccharomyces cerevisiae* en culture continue dans la région oxydative des taux de croissance., Thèse INSA Toulouse.

Guyot, S., E. Ferret and P. Gervais (2005) Responses of *Saccharomyces cerevisiae* to thermal stress, *Biotechnology and Bioengineering* 92 *(4)*, 403.

Haefner, K. (1967) Concerning the mechanism of ultraviolet mutagenesis. a micromanipulatory pedigree analysis in *Schizosaccharomyces pombe*, *Genetics* 57 *(1)*, 169.

Hall, D. W., R. Mahmoudizad, A. W. Hurd and S. B. Joseph (2008) Spontaneous mutations in diploid *Saccharomyces cerevisiae*: another thousand cell generations., *Genetics Research* 90 229.

Hanai, T., N. Koizumi and A. Irimajiri (1975) A method for determining the dielectric constant and the conductivity of membrane-bounded particles of biological relevance, *European Biophysics Journal* 1 *(4)*, 285.

Hanawalt, P. C. and R. H. Haynes (1965) Repair replication of DNA in bacteria: Irrelevance of chemical nature of base defect, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 19 *(4)*, 462.

Handbook_of_Chemistry_and_Physics (1983 -1984) 64th Edition - D-235,

Hashimoto, S., M. Ogura, K. Aritomi, H. Hoshida, Y. Nishizawa and R. Akada (2005) Isolation of auxotrophic mutants of diploid industrial yeast strains after UV mutagenesis, *Applied and Environmental Microbiology* 71 *(1)*, 312.

Hatzis, C. and D. Porro (2006) Morphologically-structured models of growing budding yeast populations, *Journal of Biotechnology* 124 *(2)*, 420.

Henle, K. J., W. A. Nagle, A. J. Moss, Jr. and T. S. Herman (1982) Polyhydroxy compounds and thermotolerance: A proposed concatenation, *Radiation Research* 92 *(3)*, 445.

Hinnen, A., J. B. Hicks and G. R. Fink (1978) Transformation of yeast, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 75 *(4)*, 1929.

Hottiger, T., P. Schmutz and A. Wiemken (1987) Heat-induced accumulation and futile cycling of trehalose in *Saccharomyces cerevisiae*, *Journal of Bacteriology* 169 *(12)*, 5518.

Hou, L. (2010) Improved production of ethanol by novel genome shuffling in *Saccharomyces cerevisiae*, *Applied Biochemistry and Biotechnology* 160 *(4)*, 1084.

James, A. P., B. J. Kilbey and G. J. Prefontaine (1978) The timing of UV mutagenesis in yeast: Continuing mutation in an excision-defective *rad* strain, *Molecular and General Genetics MGG* 165 *(2)*, 207.

James, A. P. and B. Lee-Whiting (1955) Radiation-induced genetic segregations in vegetative cells of diploid yeast, *Genetics* 40 *(6)*, 826–831.

James, A. P. and A. Nasim (1987), "Effects of radiation on yeast," in "The Yeast. Vol. 2: Yeasts and the Environment," Academic Press Inc; 2nd Revised edition, A. H. Rose and J. S. Harrison.

James, A. P. and M. M. Werner (1966) Radiation-induced lethal sectoring in yeast, *Radiation Research* 29 *(4)*, 523.

Jeffries, T. W. and Y.-S. Jin (2000), "Ethanol and thermotolerance in the bioconversion of xylose by yeasts," in "Advances in Applied Microbiology," Academic Press, Volume 47**:** 221.

Jones, R. P. (1987) Measures of yeast death and deactivation and their meaning, *Process Biochemistry* 22 *(4)*, 118.

Käppeli, O. and B. Sonnleitner (1986) Regulation of sugar metabolism in *Saccharomyces*-type yeast: Experimental and conceptual considerations., *CRC Critical Reviews in Biotechnology* 4 *(3)*, 299.

Kell, D. B., A. S. Kaprelyants, D. H. Weichart, C. R. Harwood and M. R. Barer (1998) Viability and activity in readily culturable bacteria: a review and discussion of the practical issues, *Antonie van Leeuwenhoek* 73 *(2)*, 169.

Kelner, A. (1949) Photoreactivation of ultraviolet-irradiated *Escherichia coli*, with special reference to the dose-reduction principle and to ultraviolet-induced mutation, *Journal of Bacteriology* 58 511.

Kelner, A., W. D. Bellamy, G. E. Stapleton and M. R. Zelle (1955) Symposium on radiation effects on cells and bacteria, *Bacteriological Reviews* 19 *(1)*, 22.

Kiran Sree, N., M. Sridhar, K. Suresh, I. M. Banat and L. Venkateswar Rao (2000) Isolation of thermotolerant, osmotolerant, flocculating *Saccharomyces cerevisiae* for ethanol production, *Bioresource Technology* 72 *(1)*, 43.

Klinke, H. B., A. B. Thomsen and B. K. Ahring (2004) Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass, *Applied Microbiology and Biotechnology* 66 *(1)*, 10.

Koltovaya, N., Y. Nikulushkina, M. Roshina and A. Devin (2008) Interaction between checkpoint genes RAD9, RAD17, RAD24 and RAD53 involved in the determination of yeast *Saccharomyces cerevisiae* sensitivity to ionizing radiation, *Russian Journal of Genetics* 44 *(6)*, 659.

Kopsahelis, N., A. Nisiotou, Y. Kourkoutas, P. Panas, G. J. E. Nychas and M. Kanellaki (2009) Molecular characterization and molasses fermentation performance of a wild yeast strain operating in an extremely wide temperature range, *Bioresource Technology* 100 *(20)*, 4854.

Kubitschek, H. E. and H. E. Bendigkeit (1961) Latent Mutants in Chemostats, *Genetics* 46 *(2)*, 105.

Larsson, S., A. Reimann, N.-O. Nilvebrant and L. Jönsson (1999) Comparison of different methods for the detoxification of lignocellulose hydrolyzates of spruce, *Applied Biochemistry and Biotechnology* 77 *(1)*, 91.

Lawrence, C. W. and R. B. Christensen (1979a) Absence of relationship between UV-induced reversion frequency and nucleotide sequence at the CYC1 locus of yeast, *Molecular and General Genetics MGG* 177 *(1)*, 31.

Lawrence, C. W. and R. B. Christensen (1979b) Ultraviolet-induced reversion of cyc1 alleles in radiation-sensitive strains of yeast: III. *rev3* mutant strains, *Genetics* 92 *(2)*, 397.

Lawrence, C. W., Christine Guthrie and G. R. Fink (1991), "Classical mutagenesis techniques," in "Methods in Enzymology," Academic Press, Volume 194**:** 273.

Leao, C. and N. Van Uden (1985) Effects of ethanol and other alkanols on the temperature relations of glucose transport and fermentation *Saccharomyces cerevisiae*, *Applied Microbiology and Biotechnology* 22 *(5)*, 359.

Lee, J. H., D. Williamson and P. L. Rogers (1980) The effect of temperature on the kinetics of ethanol production by *Saccharomyces uvarum*, *Biotechnology Letters* 2 *(4)*, 141.

Lee, K. J., M. L. Skotnicki, D. E. Tribe and P. L. Rogers (1981) The effect of temperature on the kinetics of ethanol production by strains of *Zymomonas mobilis*, *Biotechnology Letters* 3 *(6)*, 291.

Lemontt, J. F. (1971) Mutants of yeast defective in mutation induced by ultraviolet light, *Genetics* 68 *(1)*, 21–33.

Leveau, J. Y. and M. Bouix (1993), "Les levures," in "Microbiologie industrielle - Les micro-organismes d'intérêt industriel," Technique et Documentation - Lavoisier, J. Y. Leveau and M. Bouix.

Lewis, J. G., R. P. Learmonth and K. Watson (1995) Induction of heat, freezing and salt tolerance by heat and salt shock in *Saccharomyces cerevisiae*, *Microbiology* 141 *(3)*, 687.

Ling, Z. Y., S. Morimura and K. Kida (1995) Effect of fermentation temperature on relationship between cell viability and trehalose content of *Saccharomyces cerevisiae* KF-7 in repeated-batch fermentation, *Journal of Fermentation and Bioengineering* 80 *(2)*, 204.

Maga, J. A. and K. McEntee (1985) Response of *S. cerevisiae* to N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine: mutagenesis, survival and DDR gene expression, *Molecular and General Genetics MGG* 200 *(2)*, 313.

Mager, W. H. and P. M. Ferreira (1993) Stress response Of yeast, *Biochemical Journal* 290 1.

Magni, G. E. and R. C. Von Borstel (1962) Different Rates of Spontaneous Mutation during Mitosis and Meiosis in Yeast, *Genetics* 47 *(8)*, 1097.

Malacrino, P., G. Zapparoli, S. Torriani and F. Dellaglio (2001) Rapid detection of viable yeasts and bacteria in wine by flow cytometry, *Journal of Microbiological Methods* 45 *(2)*, 127.

Marechal, P. A., M. d. Marañon, I. Poirier and P. Gervais (1999) The importance of the kinetics of application of physical stresses on the viability of microorganisms: significance for minimal food processing, *Trends in Food Science and Technology* 10 *(1)*, 15.

Martín, C., M. Marcet, O. Almazán and L. J. Jönsson (2007) Adaptation of a recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* strain to a sugarcane bagasse hydrolysate with high content of fermentation inhibitors, *Bioresource Technology* 98 *(9)*, 1767.

Martínez De Marañón, I., N. Chaudanson, N. Joly and P. Gervais (1999) Slow heat rate increases yeast thermotolerance by maintaining plasma membrane integrity, *Biotechnology and Bioengineering* 65 *(2)*, 176.

Marullo, P., C. Mansour, M. Dufour, W. Albertin, D. Sicard, M. Bely and D. Dubourdieu (2009) Genetic improvement of thermo-tolerance in wine *Saccharomyces cerevisiae* strains by a backcross approach, *FEMS Yeast Research* 9 *(8)*, 1148.

McCready, S. and B. Cox (1993) Repair of 6-4 photoproducts in *Sacchromyces cerevisiae*, *Mutation Research/DNA Repair* 293 *(3)*, 233.

McDougald, D., S. A. Rice, D. Weichart and S. Kjelleberg (1998) Nonculturability: adaptation or debilitation? *FEMS Microbiology Ecology* 25 *(1)*, 1.

Mitchell, P. (1961) Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism, *Nature* 191 *(4784)*, 144.

Mizoguchi, H. and S. Hara (1997) Ethanol-induced alterations in lipid composition of *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of exogenous fatty acid, *Journal of Fermentation and Bioengineering* 83 *(1)*, 12.

Mizoguchi, H. and S. Hara (1998) Permeability barrier of the yeast plasma membrane induced by ethanol, *Journal of Fermentation and Bioengineering* 85 *(1)*, 25.

Monod, J. (1942) Recherches sur la croissance des cultures bactériennes, *Hermann, Paris*

Mortimer, R. K. (1955) Evidence for two types of X-ray-induced lethal damage in *Saccharomyces cerevisiae*, *Radiation Research* 2 *(4)*, 361.

Mortimer, R. K. (1958) Radiobiological and genetic studies on a polyploid series (haploid to hexaploid) of *Saccharomyces cerevisiae*, *Radiation Research* 9 *(3)*, 312.

Nebe-von Caron, G., Stephens and Badley (1998) Assessment of bacterial viability status by flow cytometry and single cell sorting, *Journal of Applied Microbiology* 84 *(6)*, 988.

Nedwell, D. B. (1999) Effect of low temperature on microbial growth: lowered affinity for substrates limits growth at low temperature, *FEMS Microbiology Ecology* 30 *(2)*, 101.

Nevoigt, E. and U. Stahl (1997) Osmoregulation and glycerol metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *FEMS Microbiology Reviews* 21 *(3)*, 231.

Nystrom, T., R. M. Olsson and S. Kjelleberg (1992) Survival, stress resistance, and alterations in protein expression in the marine *Vibrio* sp. strain S14 during starvation for different individual nutrients, *Applied and Environmental Microbiology* 58 *(1)*, 55.

Ogier, J. C., J. P. Leygue, D. Ballerini, J. Pourquie and L. Rigal (1999) Production d'éthanol à partir de biomasse lignocellulosique, *Oil & Gas Science and Technology - Rev. IFP* 54 *(1)*, 67.

Ohnishi, G., K. Endo, A. Doi, A. Fujita, Y. Daigaku, T. Nunoshiba and K. Yamamoto (2004) Spontaneous mutagenesis in haploid and diploid *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 325 *(3)*, 928.

Oliveira, S. C., T. C. B. Paiva, A. E. S. Visconti and R. Giudici (1999) Continuous alcoholic fermentation process: model considering loss of cell viability, *Bioprocess and Biosystems Engineering* 20 *(2)*, 157.

Oliver, J. D. (2005) The viable but nonculturable state in bacteria, *The Journal of Microbiology* 43 93.

Oliver, J. D., L. Nilsson and S. Kjelleberg (1991) Formation of nonculturable *Vibrio vulnificus* cells and its relationship to the starvation state, *Applied and Environmental Microbiology* 57 *(9)*, 2640.

Olofsson, K., M. Bertilsson and G. Liden (2008a) A short review on SSF - an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks, *Biotechnology for Biofuels* 1 *(1)*, 7.

Olofsson, K., A. Rudolf and G. Liden (2008b) Designing simultaneous saccharification and fermentation for improved xylose conversion by a recombinant strain of *Saccharomyces cerevisiae*, *Journal of Biotechnology* 134 *(1-2)*, 112.

Olsson, L. and B. Hahn-Hägerdal (1996) Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production, *Enzyme and Microbial Technology* 18 *(5)*, 312.

Olz, R., K. Larsson, L. Adler and L. Gustafsson (1993) Energy flux and osmoregulation of *Saccharomyces cerevisiae* grown in chemostats under NaCl stress, *Journal of Bacteriology* 175 *(8)*, 2205.

Omori, T., K. Ogawa, Y. Umemoto, K. Yuki, Y. Kajihara, M. Shimoda and H. Wada (1996) Enhancement of glycerol production by brewing yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) with heat shock treatment, *Journal of Fermentation and Bioengineering* 82 *(2)*, 187.

Oura, E. (1977) Reaction products of yeast fermentations, *Process Biochemistry* 12 19.

Pagliardini, J., G. Hubmann, C. Bideaux, S. Alfenore, E. Nevoigt and S. Guillouet (2010) Quantitative evaluation of yeast's requirement for glycerol formation in very high ethanol performance fed-batch process, *Microbial Cell Factories* 9 *(1)*, 36.

Palmqvist, E. and B. Hahn-Hägerdal (2000a) Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification, *Bioresource Technology* 74 *(1)*, 17.

Palmqvist, E. and B. Hahn-Hägerdal (2000b) Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition, *Bioresource Technology* 74 *(1)*, 25.

Parlement.Européen.et.Conseil.de.l'Union.Européenne (2009). Directive 2009/28/CE du 23 avril 2009 relative à la promotion de l'utilisation de l'énergie produite à partir de sources renouvelables. Journal Officiel de l'Union Européenne.

Parry, J. M. and B. S. Cox (1965) Photoreactivation of ultraviolet induced reciprocal recombination, gene conversion and mutation to prototrophy in *Saccharomyces cerevisiae*, *Journal of General Microbiology* 40 *(2)*, 235.

Parry, J. M., P. J. Davies and W. E. Evans (1976) The effects of "Cell age" upon the lethal effects of physical and chemical mutagens in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Molecular and General Genetics MGG* 146 *(1)*, 27.

Parry, J. M., D. Sharp, R. S. Tippins and E. M. Parry (1979) Radiation-induced mitotic and meiotic aneuploidy in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 61 *(1)*, 37.

Patrick, M. H. and R. H. Haynes (1964) Dark recovery phenomena in yeast: II. conditions that modify the recovery process, *Radiation Research* 23 *(4)*, 564.

Patrick, M. H., R. H. Haynes and R. B. Uretz (1964) Dark recovery phenomena in yeast: I. comparative effects with various inactivating agents, *Radiation Research* 21 *(1)*, 144.

Pfeifer, G. P., Y.-H. You and A. Besaratinia (2005) Mutations induced by ultraviolet light, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 571 *(1-2)*, 19.

Phisalaphong, M., N. Srirattana and W. Tanthapanichakoon (2006) Mathematical modeling to investigate temperature effect on kinetic parameters of ethanol fermentation, *Biochemical Engineering Journal* 28 *(1)*, 36.

Porro, D., L. Brambilla and L. Alberghina (2003) Glucose metabolism and cell size in continuous cultures of *Saccharomyces cerevisiae*, *FEMS Microbiology Letters* 229 *(2)*, 165.

Postgate, J. R. (1967), "Viability measurements and the survival of microbes under minimum stress," in "Advances in Microbial Physiology," Academic Press, A. H. Rose and J. F. Wilkinson, Volume 1**:** 1.

Postgate, J. R. (1969), "Viable counts and Viability," in "Methods in Microbiology," Academic Press, J. R. Norris and D. W. Ribbons, Volume 1**:** 611.

Postgate, J. R., J. E. Crumpton and J. R. Hunter (1961) The Measurement of Bacterial Viabilities by Slide Culture, *Journal of General Microbiology* 24 *(1)*, 15.

Postma, E., C. Verduyn, W. A. Scheffers and J. P. Van Dijken (1989) Enzymic analysis of the crabtree effect in glucose-limited chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*, *Applied and Environmental Microbiology* 55 *(2)*, 468.

Quah, S.-K., R. C. von Borstel and P. J. Hastings (1980) The origin of spontaneous mutation in *Saccharomyces cerevisiae*, *Genetics* 96 *(4)*, 819.

Radler, F. and H. Schutz (1982) Glycerol production of various strains of *Saccharomyces*, *American Journal of Enology and Viticulture* 33 *(1)*, 36.

Ratkowsky, D. A., J. Olley, T. A. McMeekin and A. Ball (1982) Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures, *Journal of Bacteriology* 149 *(1)*, 1.

Reed, R. H., J. A. Chudek, R. Foster and G. M. Gadd (1987) Osmotic significance of glycerol accumulation in exponentially growing yeasts, *Applied and Environmental Microbiology* 53 *(9)*, 2119.

Remize, F., J. M. Sablayrolles and S. Dequin (2000) Re-assessment of the influence of yeast strain and environmental factors on glycerol production in wine, *Journal of Applied Microbiology* 88 *(3)*, 371.

Resnick, M. A. (1969) Induction of mutations in *Saccharomyces cerevisiae* by ultraviolet light, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 7 *(3)*, 315.

Resnick, M. A. (1970) Sunlight-induced killing in *Saccharomyces cerevisiae*, *Nature* 226 *(5243)*, 377.

Resnick, M. A. and J. K. Setlow (1972) Repair of pyrimidine dimer damage induced in yeast by ultraviolet light, *Journal of Bacteriology* 109 *(3)*, 979.

Rieger, M., O. Kappeli and A. Fiechter (1983) The role of limited respiration in the incomplete oxidation of glucose by *Saccharomyces cerevisiae*, *Journal of General Microbiology* 129 *(3)*, 653.

Rivera, E. C., A. C. Costa, R. R. Andrade, D. I. P. Atala, F. Maugeri and R. Maciel Filho (2007) Development of adaptive modeling techniques to describe the temperature-dependent kinetics of biotechnological processes, *Biochemical Engineering Journal* 36 *(2)*, 157.

Rivera, E. C., A. C. Costa, D. I. P. Atala, F. Maugeri, M. R. W. Maciel and R. M. Filho (2006) Evaluation of optimization techniques for parameter estimation: Application to ethanol fermentation considering the effect of temperature, *Process Biochemistry* 41 *(7)*, 1682.

Ronot, X. (1998), "Le cycle cellulaire," in "La cytométrie en flux: pour l'étude de la cellule normale ou pathologique," MEDSI/ McGraw-Hill., P. Mélézeau, X. Ronot, G. Noan-Merdrignac and M. Ratinaud**:** Chapitre 6.

Rose, A. H. and J. S. Harrison (1971), "The Yeast. Vol. 2: Physiology and biochemistry of yeasts," in, Academic Press.

Roszak, D. B. and R. R. Colwell (1987) Survival strategies of bacteria in the natural environment, *Microbiological Reviews* 51 *(3)*, 365.

Russell, I. (2003), "Understanding yeast fundamentals," in "The Alcohol Text Book 4th Edition," Nottingham University Press, K. A. Jacques, T. P. Lyons and D. R. Kelsall**:** 85-119.

Sablayrolles, J. and P. Barre (1989) Effect of anisothermal conditions on the kinetics of alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*, *Bioprocess and Biosystems Engineering* 4 *(3)*, 139.

Sánchez, Ó. J. and C. A. Cardona (2008) Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks, *Bioresource Technology* 99 *(13)*, 5270.

Sanchez, Y., J. Taulien, K. A. Borkovich and S. Lindquist (1992) Hsp104 is required for tolerance to many forms of stress, *European Molecular Biology Organisation Journal* 11 *(6)*, 2357.

Schwan, H. P. (1957) Electrical properties of tissue and cell suspensions, *Advances in Biological and Medical Physics* 5 147.

Sharma, S. C. (1997) A possible role of trehalose in osmotolerance and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*, *FEMS Microbiology Letters* 152 *(1)*, 11.

Shi, D.-j., C.-l. Wang and K.-m. Wang (2009) Genome shuffling to improve thermotolerance, ethanol tolerance and ethanol productivity of *Saccharomyces cerevisiae*, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 36 *(1)*, 139.

Sinensky, M. (1974) Homeoviscous adaptation - A homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli*, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 71 *(2)*, 522.

Singer, M. A. and S. Lindquist (1998) Multiple effects of trehalose on protein folding *in vitro* and *in vivo*, *Molecular Cell* 1 *(5)*, 639.

Sinha, R. P. and D.-P. Hader (2002) UV-induced DNA damage and repair: a review, *Photochemical & Photobiological Sciences* 1 *(4)*, 225.

Sridhar, M., N. Kiran Sree and L. Venkateswar Rao (2002) Effect of UV radiation on thermotolerance, ethanol tolerance and osmotolerance of *Saccharomyces cerevisiae* VS1 and VS3 strains, *Bioresource Technology* 83 *(3)*, 199.

Stanley, D., S. Fraser, P. Chambers, P. Rogers and G. Stanley (2009) Generation and characterisation of stable ethanol-tolerant mutants of Saccharomyces cerevisiae, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 37 *(2)*, 139.

Stanley, D., S. Fraser, P. Chambers, P. Rogers and G. Stanley (2010) Generation and characterisation of stable ethanol-tolerant mutants of *Saccharomyces cerevisiae*, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 37 *(2)*, 139.

Steels, E. L., R. P. Learmonth and K. Watson (1994) Stress tolerance and membrane lipid unsaturation in *Saccharomyces cerevisiae* grown aerobically or anaerobically, *Microbiology* 140 *(3)*, 569.

Strasser, A., A. W. Harris, T. Jacks and S. Cory (1994) DNA damage can induce apoptosis in proliferating lymphoid cells via p53-independent mechanisms inhibitable by Bcl-2, *Cell* 79 *(2)*, 329.

Sun, Y. and J. Cheng (2002) Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review, *Bioresource Technology* 83 *(1)*, 1.

Terleth, C., P. Schenk, R. Poot, J. Brouwer and P. van de Putte (1990a) Differential repair of UV damage in rad mutants of *Saccharomyces cerevisiae*: a possible function of G2 arrest upon UV irradiation, *Molecular and Cellular Biology* 10 *(9)*, 4678.

Terleth, C., R. Waters, J. Brouwer and P. van de Putte (1990b) Differential repair of UV damage in *Saccharomyces cerevisiae* is cell cycle dependent, *The EMBO Journal* 9 *(9)*, 2899.

Thomas, D. S., J. A. Hossack and A. H. Rose (1978) Plasma-Membrane lipid composition and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*, *Archives of Microbiology* 117 *(3)*, 239.

Thuriaux, P. (2004) La levure: les organismes modèles, Coll. Belin sup sciences,

Tibayrenc, P., L. Preziosi-Belloy and C. Ghommidh (2010) On-line monitoring of dielectrical properties of yeast cells during a stress-model alcoholic fermentation, *Process Biochemistry* 46 *(1)*, 193.

Tibayrenc, P., L. Preziosi-Belloy and C. Ghommidh (2011) Single-cell analysis of *S. cerevisiae* growth recovery after a sublethal heat-stress applied during an alcoholic fermentation, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 38 *(6)*, 687.

Tobias, C. A. (1959) Effects of radiations on populations of cells and multicellular organisms, *Reviews of modern physics* 31 *(2)*, 289.

Torija, M. J., G. Beltran, M. Novo, M. Poblet, J. M. Guillamón, A. Mas and N. Rozès (2003a) Effects of fermentation temperature and *Saccharomyces* species on the cell fatty acid composition and presence of volatile compounds in wine, *International Journal of Food Microbiology* 85 *(1-2)*, 127.

Torija, M. J., N. Rozès, M. Poblet, J. M. Guillamón and A. Mas (2003b) Effects of fermentation temperature on the strain population of *Saccharomyces cerevisiae*, *International Journal of Food Microbiology* 80 *(1)*, 47.

Torres-Ramos, C. A., S. Prakash and L. Prakash (2002) Requirement of RAD5 and MMS2 for postreplication repair of UV-damaged DNA in *Saccharomyces cerevisiae*, *Molecular and Cellular Biology* 22 *(7)*, 2419.

Tosun, A. and M. Ergun (2007) Use of experimental design method to investigate metal ion effects in yeast fermentations, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 82 *(1)*, 11.

Trigueros, D. E., A. N. Módenes, F. R. Espinoza-Quiñones and A. D. Kroumov (2010) The evaluation of benzene and phenol biodegradation kinetics by applying non-structured models, *Water Research* 61 *(5)*, 1289.

Van der Rest, M. E., A. H. Kamminga, A. Nakano, Y. Anraku, B. Poolman and W. N. Konings (1995) The plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*: structure, function, and biogenesis, *Microbiological Reviews* 59 *(2)*, 304.

Van Dijken, J. P. and W. A. Scheffers (1986) Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts, *FEMS Microbiology Letters* 32 *(3-4)*, 199.

van Gulik, W. M. and J. J. Heijnen (1995) A metabolic network stoichiometry analysis of microbial growth and product formation, *Biotechnology and Bioengineering* 48 *(6)*, 681.

Van Urk, H., E. Postma, W. A. Scheffers and J. P. Van Dijken (1989) Glucose transport in Crabtree-positive and Crabtree-negative yeasts, *Journal of General Microbiology* 135 *(9)*, 2399.

Verduyn, C., E. Postma, W. A. Scheffers and J. P. van Dijken (1990) Physiology of *Saccharomyces cerevisiae* in anaerobic glucose-limited chemostat cultures, *Journal of General Microbiology* 136 *(3)*, 395.

Verduyn, C., T. P. L. Zomerdijk, J. P. Dijken and W. A. Scheffers (1984) Continuous measurement of ethanol production by aerobic yeast suspensions with an enzyme electrode, *Applied Microbiology and Biotechnology* 19 *(3)*, 181.

Wang, Z., J. Zhuge, H. Fang and B. A. Prior (2001) Glycerol production by microbial fermentation: A review, *Biotechnology Advances* 19 *(3)*, 201.

Watson, K. (1987), "Temperature relations," in "The Yeast. Vol. 2: Yeasts and the Environment," Academic Press Inc; 2nd Revised edition, A. H. Rose and J. S. Harrison.

Wheals, A. E., L. C. Basso, D. M. G. Alves and H. V. Amorim (1999) Fuel ethanol after 25 years, *Trends in Biotechnology* 17 *(12)*, 482.

Witkin, E. M. (1969) Ultraviolet-induced mutation and DNA repair, *Annual Review of Genetics* 3 *(1)*, 525.

Wright, P., E. Bellissimi, E. de Hulster, A. Wagner, J. T. Pronk and A. J. A. Van Maris (2011) Batch and continuous culture-based selection strategies for acetic acid tolerance in xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae*, *FEMS Yeast Research* 11 299.

www.bioethanolcarburant.com. (2011), Retrieved 22/07/11.

Ylitervo, P., C. J. Franzén and M. J. Taherzadeh (2011) Ethanol production at elevated temperatures using encapsulation of yeast, *Journal of Biotechnology* In Press, Accepted Manuscript

Zaldivar, J., J. Nielsen and L. Olsson (2001) Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration, *Applied Microbiology and Biotechnology* 56 *(1)*, 17.

Zancan, P. and M. Sola-Penna (2005) Trehalose and glycerol stabilize and renature yeast inorganic pyrophosphatase inactivated by very high temperatures, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 444 *(1)*, 52.

Zhang, T. and H. H. P. Fang (2004) Quantification of *Saccharomyces cerevisiae* viability using BacLight, *Biotechnology Letters* 26 *(12)*, 989.

Zhao, X. Q. and F. W. Bai (2009) Mechanisms of yeast stress tolerance and its manipulation for efficient fuel ethanol production, *Journal of Biotechnology* In Press, Corrected Proof

Zwietering, M. H., J. T. de Koos, B. E. Hasenack, J. C. de Witt and K. van't Riet (1991) Modeling of bacterial growth as a function of temperature, *Applied and Environmental Microbiology* 57 *(4)*, 1094.

Annexes

Annexe 1 – Publication

Dynamic model of temperature impact on cell viability and major product formation during fed-batch and continuous ethanolic fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*

Bioresource Technology (2012), http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.04.013

Emilie Amillastre[A, 1, 2, 3], César-Arturo Aceves-Lara[A, 1, 2, 3], Jean-Louis Uribelarrea [1, 2, 3], Sandrine Alfenore [1, 2, 3], Stéphane E. Guillouet[1, 2, 3, *]

1. Université de Toulouse, INSA, UPS, INP, LISBP, 135 Avenue de Rangueil, F-31077 Toulouse, France
2. INRA, UMR792, Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés, F-31400 Toulouse, France
3. CNRS, UMR5504, F-31400 Toulouse, France

* Corresponding author.
Université de Toulouse, INSA, UPS, INP, LISBP, 135 Avenue de Rangueil, F-31077 Toulouse, France.
Tel.: +33 05 61 55 94 47; fax: +33 05 61 55 94 00.
E-mail address: stephane.guillouet@insa-toulouse.fr (S.E. Guillouet).

[A] These two authors worked equally on this project and should be considered both as first authors.

Abstract

A dynamic model was proposed to describe the impact of temperature on *Saccharomyces cerevisiae* kinetics in ethanol fermentation. Both total biomass, viable biomass, ethanol and glycerol, were considered into this model. Fed-batch cultures were carried out at different temperatures under isotherm mode and with temperature upshifts allowing model parameter estimation. Then, the model validation was implemented with experimental data sets from independent cultures under different temperatures, temperature variation profiles and cultivation modes (fed-batch and chemostat). The proposed model fitted accurately the dynamic evolutions for product, biomass and substrate concentrations over a wide range of temperature profiles. This dynamic model could be further used for optimizing and monitoring the ethanol fermentation at larger scale.

Keywords:

Bio-ethanol fermentation; Glycerol; Dynamic model; Temperature.

1. Introduction

Alternative energy sources must be developed to cope with fossil energy depletion and to reduce greenhouse gas emissions and global warming. Biofuels, derived from renewable resources are realistic substitutes to fossil fuels. Bio-ethanol, the main biofuel produced by fermentation of several feedstocks, constitutes a rapid and significant answer to these problems (Sánchez and Cardona 2008).

Temperature is one of the main technological factors known to impact both the metabolism and the activity of *Saccharomyces cerevisiae (S. cerevisiae*) at industrial scale due to inhomogeneities in large scale bioreactor (Torija *et al.* 2003b). An optimal temperature, different for growth and ethanol production, exists for each yeast species, and a suboptimal temperature can decrease production kinetics and yields (Torija *et al.* 2003b; Aldiguier *et al.* 2004). Moreover, a temperature raise alters the cell viability and decreases the ethanol tolerance, (Torija *et al.* 2003b; Aldiguier *et al.* 2004). Besides, the rate of temperature variation significantly impacts the viability, thermal shocks being much more drastic than weak variations (Gervais and Martínez De Marañón 1995; Marechal *et al.* 1999; Martínez De Marañón *et al.* 1999; Beney *et al.* 2000; Guyot *et al.* 2005).

Besides ethanol and CO_2, glycerol is the main by-product of the alcoholic fermentation and may account for up to 5% of the carbon in some industrial processes (Oura 1977). The production of glycerol was reported to be coupled to an increase of the fermentation temperature (Omori *et al.* 1996; Torija *et al.* 2003b; Aldiguier *et al.* 2004; Berovic *et al.* 2007). Moreover, on different *S. cerevisiae* strains a 10 to 20% higher production was reached when the temperature was shifted for 10 minutes from 27°C to 45°C or 50°C (Omori *et al.* 1996). The glycerol on glucose yields obtained from cultures regulated at 36°C and 39°C were found 4 to 6-fold higher than those obtained at 30°C (Aldiguier *et al.* 2004). In a range between 27°C and 33°C a coupling phenomenon was reported between growth and glycerol production in *S. cerevisiae*. Above 36°C a decoupling phenomenon was shown (Aldiguier *et al.* 2004) *i.e.* glycerol was still produced in absence of growth. It is reported that temperature leads to protein unfolding and then in a loss of enzyme functionality, and that glycerol limits heat damages. This metabolite, *in vitro*, was shown to stabilise and renature inorganic pyrophosphatases, involved in lipid anabolism and DNA synthesis (Zancan and Sola-Penna 2005). Moreover, glycerol and polyols in general participate in the thermal protection of proteins against denaturation and cell death (Back *et al.* 1979; Henle *et al.* 1982).

Glycerol synthesis is mainly documented for its involvement in (i) maintaining cell oxydo-reductive balance in the case of a cytosolic NADH excess (Verduyn *et al.* 1990) (ii) providing the cell with the G3P intermediate required for glycerophospholipid and triacylglycerol biosynthesis (Athenstaedt and Daum 1999; Wang *et al.* 2001) and (iii) protecting the yeast against osmotic stress (Blomberg and Adler 1989; Nevoigt and Stahl 1997). Glycerol is synthesised via a deviation of the glycolysis pathway from the glycolytic intermediate dihydroxyacetone phosphate (DHAP). DHAP is reduced to glycerol-3-phosphate (G3P) by the glycerol 3-phosphate dehydrogenases (GPDH: GPD1 and GPD2) and then dephosphorylated into glycerol by specific phosphatases (GPP1 and GPP2). The activity of GPDH was found to increase with the temperature (Omori *et al.* 1996). In *S. cerevisiae*, at 27°C, GPDH activity was improved by 1.15 to 1.25 fold with a 10 minutes heat shock at 45°C or 50°C

(Omori *et al.* 1996). However, this was a transient activity enhancement as it decreased through cell divisions (Omori *et al.* 1996).

In literature, only few studies investigated and modelled the impact of the temperature on ethanol fermentation kinetics (Atala *et al.* 2001; Phisalaphong *et al.* 2006; Rivera *et al.* 2006; Andrade *et al.* 2007; Rivera *et al.* 2007). Some took into account the viable biomass but none considered the glycerol production.

In the present study, a dynamic model was developed in order to predict and quantify the major production kinetics including glycerol and both total biomass and viable biomass during different ethanol fermentation processes. Fed-batch experiments in isotherm and with temperature upshift were carried out and the experimental data were used in order to calibrate the model parameters. An optimal set of parameters was obtained from a global optimization algorithm. The kinetic model was then validated with experimental data from fed-batch and heat-stress continuous cultures and showed robustness over a wide range of experimental conditions.

2. Materials and Methods

2.1 Microorganism, media and growth conditions

The industrial *S. cerevisiae* strain was supplied from Fermentis (France). The strain was maintained on YPD (yeast extract 1% (w/v), bactopeptone 2% (w/v), glucose 2% (w/v) and NaCl 0.9% (w/v)) agar medium at 4°C. Pre-culture of yeast cells was carried out in a 5 ml tube of YPD rich medium (2 mL) at 30°C for 12 h on a rotary shaker (100 rpm). The culture was transferred to a 250 ml Erlenmeyer flask containing 18 ml of mineral medium (pH 4) prepared as follows (all compounds are expressed in g l^{-1}): KH_2PO_4, 3.0; $(NH_4)_2SO_4$, 3.0; $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$, 3.0; sodium glutamate, 1.0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.5; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.04; $MnSO_4 \cdot H_2O$, 0.0038; $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.0005; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 0.0009; $Na_2MoSO_4 \cdot 2H_2O$, 0.00006; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.023; $(NH_4)_2Fe(SO_4)_6 \cdot 6H_2O$, 0.023; H_3BO_3, 0.003; pantothenate, 0.005; nicotinic acid, 0.005; meso-inositol, 0.125; thiamine, 0.005; pyridoxine, 0.005; para-aminobenzoic acid: 0.001, and biotin, 0.000012. Glucose was added at a final concentration of 100 g l^{-1}. After 10 h of growth at 30°C under agitation (100 rpm), the 20 ml culture was used to inoculate a 1 l Erlenmeyer flask containing 180 ml of mineral medium as described above and incubated at 30°C for 10 h. The second pre-culture in synthetic medium was used to inoculate the 1.8 l of the same mineral medium in a 3 litre bioreactor (10% v/v). For the 1 l and 5 l bioreactor pre-cultures, a 10% (v/v) ratio was conserved. Moreover, the inoculums for the 37°C isothermal fed-batch and the continuous cultures were grown at 37°C instead of 30°C.

2.2 Fed batch experiments

2.2.1 Fermentations

Fed-batch cultures were performed in 1 l, 3 l or 5 l bioreactors (B. Braun Biotech International® (3 l) and Sartorius® Stedim Biostat B DCU (1 l and 5 l)) containing 100 g l^{-1} of glucose. The temperature was regulated at 30°C, 32°C, 33°C, 34°C and 37°C and the pH maintained at 4 with the addition of a 14% (v/v) NH_3 solution. Stirring and aeration rates were regulated to provide the reactor

with a dissolved oxygen level higher than 20% of air saturation, in order to avoid any oxygen limitation in the cultures (Alfenore *et al.* 2004). The maximum flow rate was 1 l min^{-1} regulated by a mass flow meter corresponding to a VVM of 1, and the stirring rate was fixed up to 1000 rpm.

During the stress-model culture, the temperature was shifted when the ethanol concentration reached 50 g l^{-1}, from 30 to 39°C, from 32 to 42°C, from 33 to 45°C and from 34 to 47°C. Besides these four stress fermentations, an isothermal culture was carried out at 37°C. These conditions were chosen to study the impact of temperature on yeasts in order to cover a wide temperature range, from 30°C (optimal temperature for *S. cerevisiae* growth) to 47°C (a high temperature affecting drastically the kinetics). The amplitudes of the temperature shifts were chosen in order to decorrelate Ratkowsky parameters because it was shown that different dynamic temperature profiles were needed for better estimation of model parameters (Bernaerts *et al.* 2000).

The fermentor was connected to a computer and the BioPAT® MFCS/DA software carried out the on-line acquisition of the controlled parameters (stirring rate, pH, temperature, partial pressure of dissolved oxygen, NH_3 addition) and allowed the monitoring and the regulation of these parameters on-line.

The fermentor was supplied with a sterile feed using a peristaltic pump (Masterflex). Fermentation was started with a glucose concentration of 100 g l^{-1}. The glucose feed concentration (S_{in}) was 700 g l^{-1}. The density of the feeding solution was measured by weighing a known volume. The mass of glucose added in the fermentor was estimated instantly by weighing.

2.2.2 Vitamin feeding strategy

All fermentations were performed with an exponential feeding of biotin and vitamins based on the growth profile (Alfenore *et al.* 2002). Vitamins were added at each doubling of yeast population as assessed by OD measurements.

2.2.3 Glucose feeding strategy

Fermentation was started with a glucose concentration of 100 g l^{-1}. Whenever the residual glucose concentration was lower than 20 g l^{-1}, a glucose feeding (700 g l^{-1}) was carried out. The two first feedings were carried out to reach a glucose concentration of 100 g l^{-1}. Then, the others glucose feedings brought the concentration back to 50 g l^{-1} in order to limit strong osmotic stress impacting the metabolism. Thus the impact of the glucose feeding could be considered similar in all fed-batch experiments.

2.3 Continuous experiments

Continuous culture was carried out in a 1 l bioreactor (Sartorius® Stedim Biostat B DCU) fed with the mineral medium. The temperature was regulated at 37.6°C and the pH maintained at 4 with the addition of a 7% (v/v) NH_3 solution. The continuous culture was started at the end of the batch phase when the ethanol concentration reached 50 g l^{-1}. The fermentor was supplied with a sterile fed containing mineral medium supplemented with oligo-elements, vitamins and glucose using a peristaltic pump (Masterflex). At 37°C, a dilution rate of 0.2 h^{-1} was required to perform an ethanol-inhibited chemostat culture at 50 g l^{-1}. Thus the feed flow rate (Q_{in}) was fixed to 0.2 l h^{-1} and the outlet flow rate (Q_{out}) was regulated as the same level in order to maintain a constant reactor volume. The

glucose concentration in the reservoir (S_{in}) was 150 g l^{-1}. Besides, the reactor was continuously flushed with air at a flow of 1.1 l min^{-1} and the stirring rate was fixed at 400 rpm. These conditions of oxygen limitation with a dissolved oxygen lower than 5% of air saturation, allowed steady state stabilisation. When the steady state was reached and characterized (at 180 h), temperature was raised gradually at a rate of 0.03°C h^{-1}, and heat shocks were applied. Shocks were carried out by shifting the temperature to 47°C during 20 minutes every 12 hours. At the end of the continuous culture, a temperature of 42.6°C was reached.

The on-line acquisition and monitoring of the controlled parameters were carried out with MFCS software as well as fed-batch fermentations.

2.4 Chemicals

Chemical products (glucose, salts, oligo-elements, orthophosphoric acid and NH3) were provided from Prolabo, the vitamins from Sigma and the sodium glutamate from Merck. All products were of the highest analytical grade available.

2.5 Analytical methods

Yeast growth was evaluated by spectrophotometric measurements at 620 nm in a spectrophotometer (Libra S4 Biochrom) and calibrated against cell dry weight measurements. The spectrophotometric measurements enabled evaluation during the culture of the population doubling and the generation time for the exponential addition of vitamins during the growth. Cell dry weight was measured by filtration of a known volume on 0.45 µm-pore-size polyamide membranes (Sartorius®) and drying to a constant weight at 60°C under a partial vacuum (200 mm Hg ≈26.7 kPa) for 48 hours. The determination of glucose from culture supernatants was performed during the cultivation with a glucose analyser (YSI model 27 A: Yellow Springs Instruments). Determination of ethanol, organic acids and glucose from supernatants was performed by HPLC (Waters Alliance) using an Aminex HPX-87H column (300 mm × 7.8 mm) and the following conditions: a temperature of 50°C, with 5 mM H_2SO_4 as eluant (flow rate of 0.5 ml min^{-1}) and a dual detection (refractometer and UV detector at 210 nm).

2.6 Gas analysis

The composition of inlet and outlet gas (carbon dioxide, oxygen and nitrogen) was analysed by a quadrupole mass spectrometer (Proline Dycor, Ametek Process Instruments). The calibration was done on a standard gas composed of O_2 (20%), CO_2 (5%) and N_2 (75%) (Air liquide), the baseline was made with He. On-line acquisition was carried out using the Dycor Process 2000 software every 5 minutes. O_2 consumption and CO_2 production rates were calculated from the difference between inlet and outlet gas composition, according to culture volume, airflow, temperature and pressure.

2.7 Determination of cell viability

The cell viability was determined by the Methylene Blue technique as described by Alfenore et al. (2004).

2.8 Mathematical model

The following considerations were assumed:

- The bioreactor behaved as a perfectly mixed reactor in both modes (fed-batch or continuous);
- There was no limitation in mass transfers;
- The loss of viability caused both by ethanol inhibition and temperature was considered and as a consequence cell population was segregated into viable (X_v) and nonviable cells ($X_t - X_v$);
- The cellular composition was assumed to be the same along the culture.
- Cell lysis was not taking into account

2.8.1 Kinetic Model

The components involved in this bioprocess were total biomass (X_t), viable biomass (X_v), glucose (S), ethanol (P) and glycerol (G).

The kinetic model described the specific growth rate as a function of substrate limitation, based on a modified Monod equation considering ethanol inhibition as follows:

$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{K_{sx} + S} \left(1 - \frac{P}{P_{mx}}\right) \quad (1)$$

The maximum specific growth rate (μ_{max}) was expressed as a function of temperature using a modified form of the Ratkowsky model (Equation 2) (Ratkowsky *et al.* 1982; Zwietering *et al.* 1991) which shows a better adjustment for microbial growth than the Arrhenius law, better suited for chemical kinetics (Ali *et al.* 2011).

$$\mu_{max} = \left[(a.(T - \theta_1)) \times (1 - \exp(b.(T - \theta_2)))\right]^2 \quad (2)$$

The ethanol concentration inhibiting growth (P_{mx}) was represented with a sigmoid type function of the temperature (Equation 3).

$$P_{mx} = a_2 \ / \ (1 - \exp(-(T - \theta_3) \cdot b_2)) \quad (3)$$

The ethanol and glycerol specific production rates depended on the specific growth rate and a decoupling factor function of the temperature, as follows:

$$\nu_P = \alpha_P \mu + \beta_P \quad (4)$$

$$\nu_G = \alpha_G \mu + \beta_G \quad (5)$$

With $\beta_P = \gamma_1 \exp\left(-\frac{A_{P1}}{T}\right) - \gamma_2 \exp\left(-\frac{A_{P2}}{T}\right)$ (6)

and

$$\beta_G = \gamma_3 \exp\left(-\frac{A_{G1}}{T}\right) - \gamma_4 \exp\left(-\frac{A_{G2}}{T}\right) \quad (7)$$

The specific consumption rate for glucose was expressed as follows:

$$q_S = \frac{\mu}{Y_{X/S}} + \frac{\nu_P}{Y_{P/S}} + \frac{\nu_G}{Y_{G/S}} \quad (8)$$

Where $Y_{X/S}$ = 0.53 g g^{-1}; $Y_{P/S}$ = 0.51 g g^{-1}; $Y_{G/S}$ = 0.86 g g^{-1} are the maximum theoretical yield values.

Yeast were exposed to heat stress conditions, which induced cell death (Fintan Walton and Pringle 1980; Gervais and Martínez De Marañón 1995; Martínez De Marañón *et al.* 1999; Guyot *et al.* 2005). The specific death rate was represented by a nonlinear equation (sigmoid) as a function of the temperature.

$$K_d = K_{d\,b} + \frac{K_{d\,t}}{1 + \exp(-(T - \theta_4) * \theta_5)} \quad (9)$$

Where $K_d\,b$ corresponds to a basal specific death rate and $K_d\,t$ to the maximum value of specific death rate due to temperature.

2.8.2 Fed-batch model

The mass balance equations for biomass, glucose and products, considering volume fluctuations were:

- Total biomass

$$\frac{dX_t}{dt} = \mu\ X_v - \frac{X_t}{V}\frac{dV}{dt} \quad (10)$$

- Viable biomass

$$\frac{dX_v}{dt} = (\mu\ - K_d)X_v - \frac{X_v}{V}\frac{dV}{dt} \quad (11)$$

- Glucose

$$\frac{dS}{dt} = -\ q_S X_v + \frac{Q_{in}S_{in}}{V} - \frac{S}{V}\frac{dV}{dt} \quad (12)$$

- Ethanol

$$\frac{dP}{dt} = \nu_P X_v - \frac{P}{V}\frac{dV}{dt} \quad (13)$$

- Glycerol

$$\frac{dG}{dt} = \nu_G X_v - \frac{G}{V}\frac{dV}{dt} \quad (14)$$

- Volume

$$\frac{dV}{dt} = Q_{in} - Q_{out} \quad (15)$$

2.8.3 Continuous culture model

The mass balance equations for biomass, glucose, ethanol and glycerol for chemostat process were:

- Total biomass

$$\frac{dX_t}{dt} = -D X_t + \mu X_v \quad (16)$$

- Viable biomass

$$\frac{dX_v}{dt} = -D X_v + (\mu - K_d) X_v \quad (17)$$

- Glucose

$$\frac{dS}{dt} = D (S_{in} - S) - q_s X_v \quad (18)$$

- Ethanol

$$\frac{dP}{dt} = -D P + \nu_P X_v \quad (19)$$

- Glycerol

$$\frac{dG}{dt} = -D G + \nu_G X_v \quad (20)$$

The mass balance differential equations were solved with the ode 113 function of Matlab® (MathWorks release R2007b).

2.8.4 Parameter estimation method

The Particle Swarm Optimization algorithm (PSO) was implemented in Matlab in order to estimate these parameters. This algorithm was based on animal social behavior simulation (Trigueros *et al.* 2010). It can solve constrained and non-constrained equations and reach convergence with only few iteration.

The cost function was formulated as follows (Donoso-Bravo *et al.* 2011):

$$J(\chi) = \min \sum_{t=1}^{N} \left(\frac{\nu_{exp}(t) - \nu_{sim}(t,\chi)}{\max(\nu_{exp}(t))} \right)^2 \quad (21)$$

Subject to $L_p \leq \chi_p \leq U_p$, p = 1, …, 22. Where χ_p are the kinetic parameters, L_p and U_p are lower and upper bounds. These bounds were used in order to avoid negative values and values without any biological meaning.

3. Results and Discussion

3.1 Temperature impact on fermentation parameters

Fermentations were carried out in fed-batch cultures in order to study the temperature impact on yeast behavior under high ethanol performance (Alfenore *et al.* 2002; Aldiguier *et al.* 2004; Alfenore *et al.* 2004). The first one was operated in isotherm mode at 37°C and the three other experiments were started in isotherm at 30°C, 33°C and 34°C and followed by a temperature shift to 39°C, 45°C and 47°C, respectively. Total biomass, viable biomass, glucose, ethanol and glycerol evolutions were measured (figures 1 to 4). Table 1 presents the main kinetic parameters and yields during these fed-batch cultures. The μ_{max} and ethanol yield values were found similar within the range of 30 to 37°C. The temperature upshifts stopped the yeast's growth and the cell's viability dropped drastically (figures 1 to 4-a). At 39°C the highest ethanol yield was determined at 0.48 g g^{-1} very closed to the ethanol yield typically found during the uncoupling phase of growth and ethanol production at 30°C in isotherm mode (0.49 g g^{-1}; data not shown). Above 39°C, the ethanol production kinetics were stronger affected as the temperature increased. No ethanol formation was detected at 47°C. The glycerol yield increased with increasing temperature and showed its highest value at 37°C (Aldiguier *et al.* 2004). Above 37°C, a decoupling phenomenon between growth and glycerol production occurred, as described by Aldiguier et al. (2004) on *S. cerevisiae* CBS8066 and the decoupling factor (corresponding the specific glycerol production specific rate at $\mu=0$) increased with the temperature raise (Table 1).

Table 1. Temperature impact on kinetic parameters and yields during the fed-batch cultures. The upper and lower parts of the table indicate the values during the cultivation period before and after the temperature upshifts, respectively.

	μ_{max} (h^{-1})	$R_{X/S}$ (g g^{-1})	$R_{P/S}$ (g g^{-1})	$R_{G/S}$ (g g^{-1})	Decoupling factor β_G
30°C	0.42 ± 0.02	0.11 ± 0.005	0.42 ± 0.02	0.027 ± 0.001	0
33°C	0.44± 0.01	0.12 ± 0.007	0.42 ± 0.01	0.033 ± 0.003	0
34°C	0.44 ± 0.02	0.09 ± 0.004	0.43 ± 0.01	0.033 ± 0.001	0
37°C	0.43 ± 0.01	0.09 ± 0.002	0.43 ± 0.002	0.045 ± 0.002	0.01 ± 0.0001
39°C	NA	0	0.48 ± 0.01	0.017 ± 0.001	0.023 ± 0.0001
45°C	NA	0	0.44 ± 0.02	0.016 ± 0.002	0.025 ± 0.0001
47°C	NA	0	0	0	0.048 ± 0.0005

NA: Not Applicable; μ_{max}: specific growth rate for non shocked cultures; $R_{i/S}$: apparent yield of production of compound *i* based on consumed substrate *S* with X: biomass, P: ethanol, G: glycerol and S: glucose; β_G: decoupling factor, glycerol specific production rate at $\mu = 0$

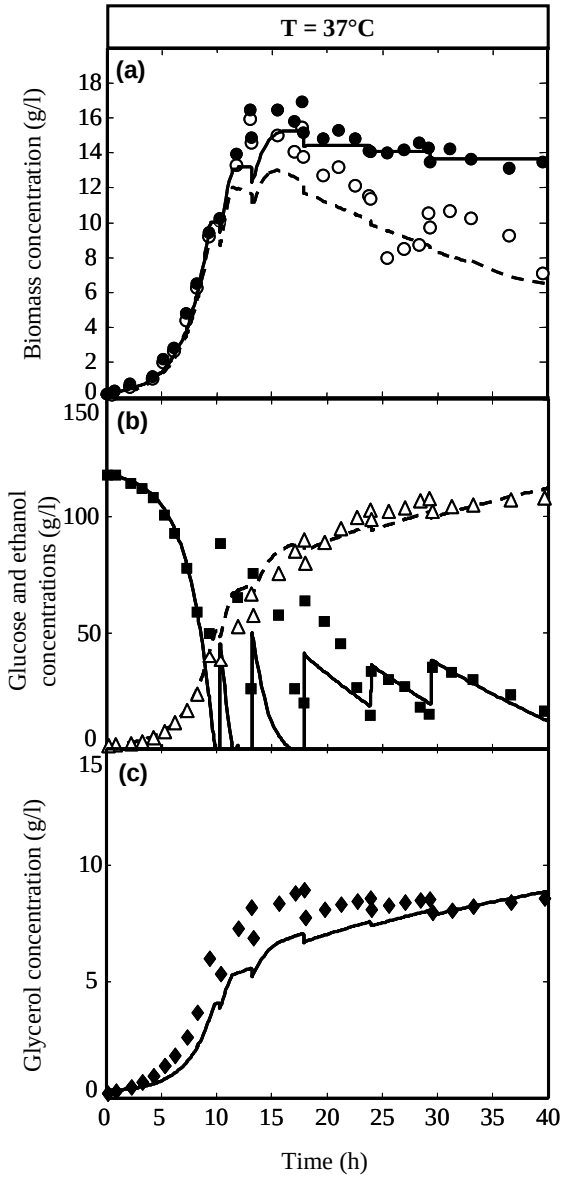


Figure 1. Dynamic simulations of total biomass (a ●), viable biomass (a ○), substrate (b ■), ethanol (b ▵), and glycerol (c ♦) concentrations during fed-batch isothermal culture at 37°C. Experimental data are represented by symbols and simulations by lines (viable biomass and ethanol (---), others state variables (–).

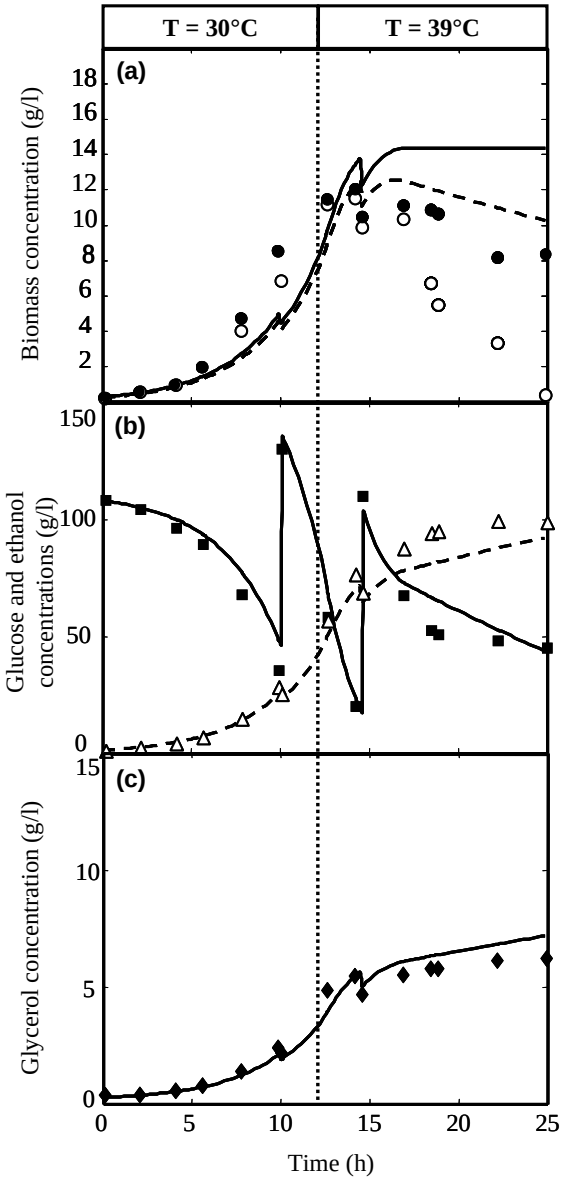


Figure 2. Dynamic simulations of total biomass (a ●), viable biomass (a ○), substrate (b ■), ethanol (b ▵), and glycerol (c ♦) concentrations during fed-batch experiment with a temperature shift from 30°C to 39°C. The temperature shift is illustrated by a vertical dotted line. Experimental data are represented by symbols and simulations by lines (viable biomass and ethanol (---), others state variables (–)).

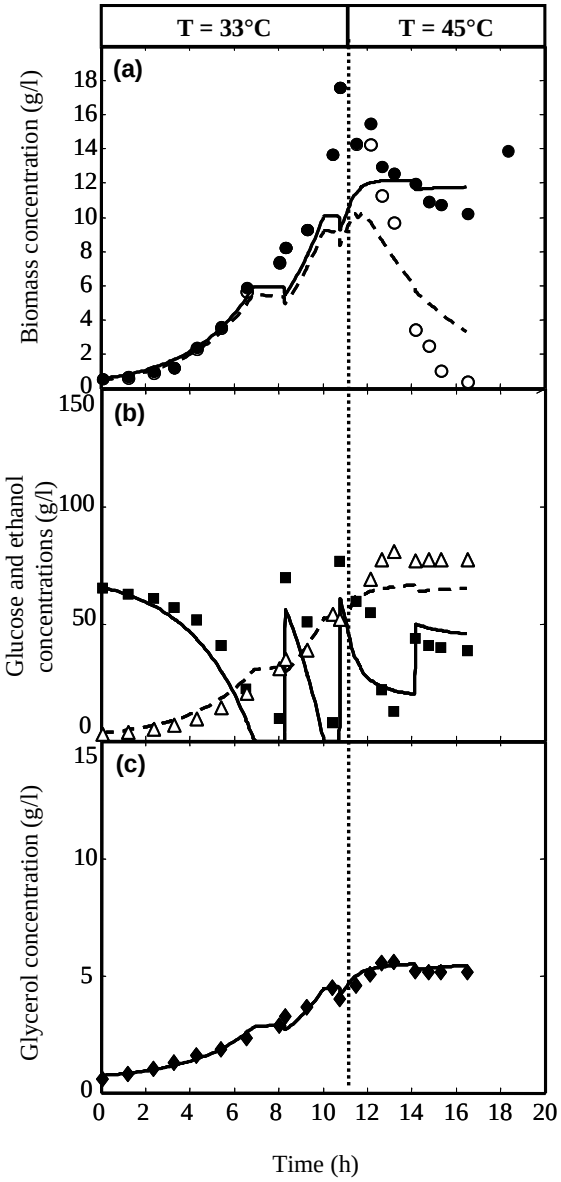


Figure 3. Dynamic simulations of total biomass (a ●), viable biomass (a ○), substrate (b ■), ethanol (b ▵), and glycerol (c ♦) concentrations during fed-batch experiment with a temperature shift from 33°C to 45°C. The temperature shift is illustrated by a vertical dotted line. Experimental data are represented by symbols and simulations by lines (viable biomass and ethanol (---), others state variables (–)).

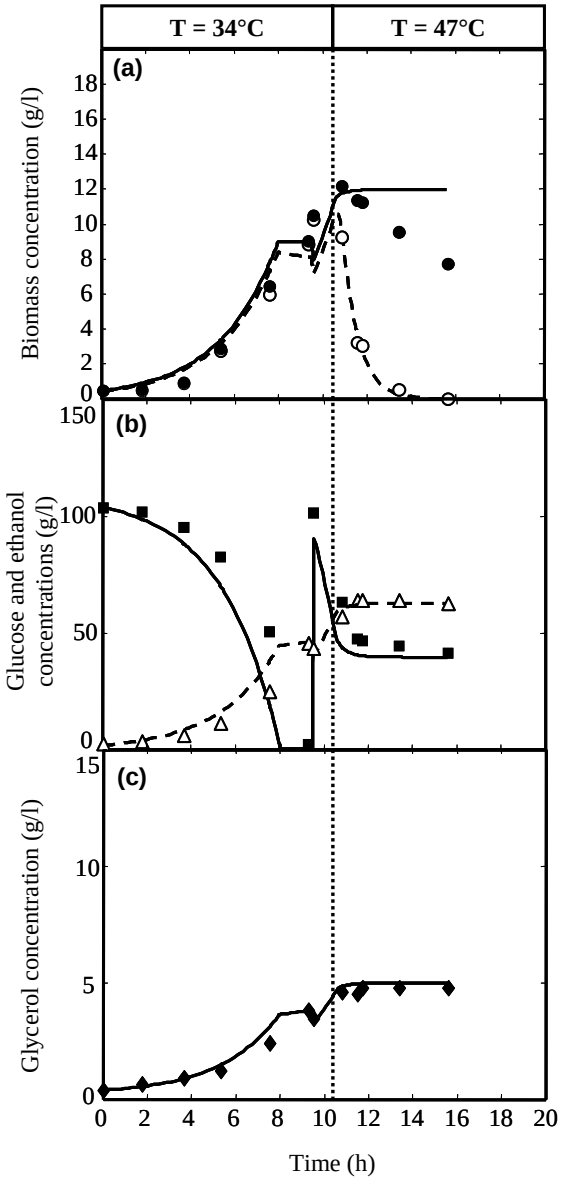


Figure 4. Dynamic simulations of total biomass (a ●), viable biomass (a ○), substrate (b ■), ethanol (b ▵), and glycerol (c ♦) concentrations during fed-batch experiment with a temperature shift from 34°C to 47°C. The temperature shift is illustrated by a vertical dotted line. Experimental data are represented by symbols and simulations by lines (viable biomass and ethanol (---), others state variables (–)).

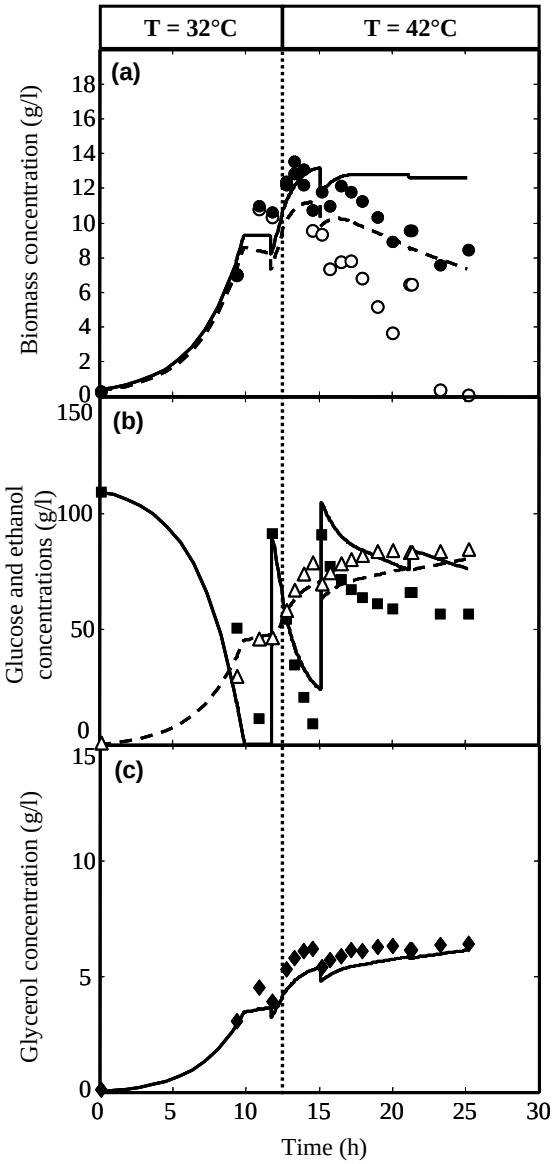


Figure 5. Dynamic simulations for model validation of total biomass (a ●), viable biomass (a ○), substrate (b ■), ethanol (b △), and glycerol (c ♦) concentrations during fed-batch experiment with a temperature shift from 32°C to 42°C. The temperature shift is illustrated by a vertical dotted line. Experimental data are represented by symbols and simulations by lines (viable biomass and ethanol (---), others state variables (–)).

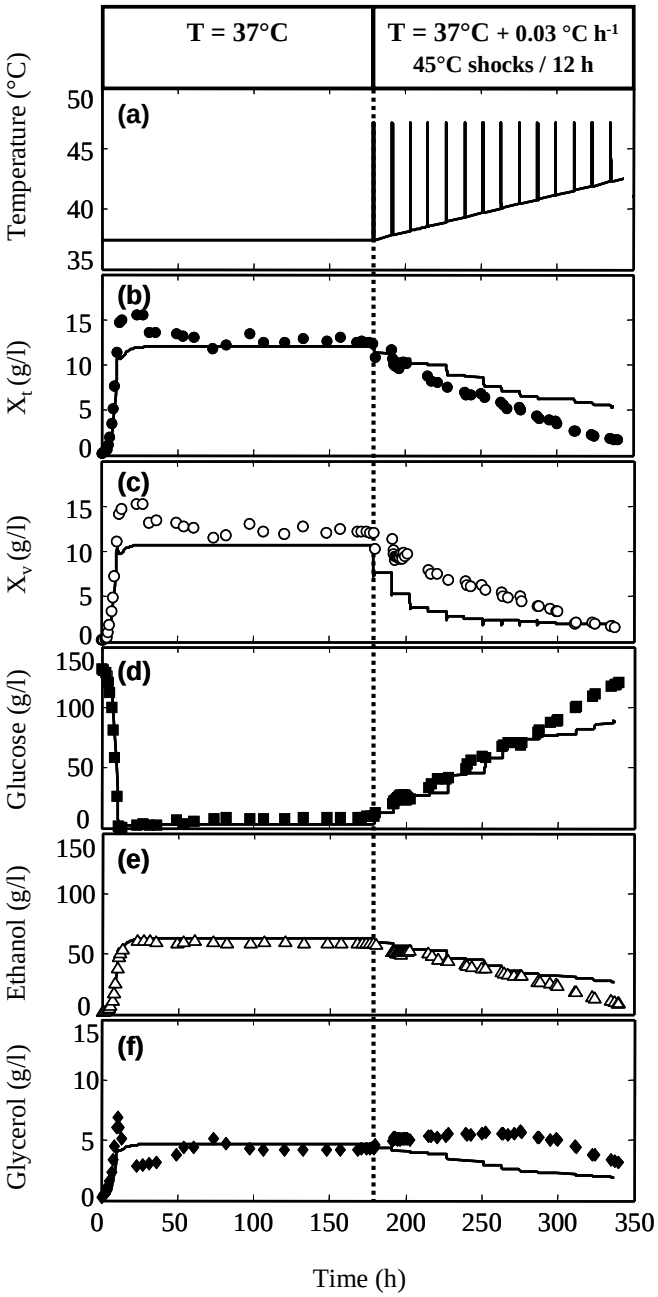


Figure 6. Dynamic simulations for model validation of temperature (a), total biomass (b ●), viable biomass (c ○), substrate (d ■), ethanol (e △) and glycerol (f ♦) profiles during a continuous culture submitted to an increasing temperature profile (a). Experimental data are represented by symbols and simulations by lines (–).

3.2 Parametric estimation and simulations of fed-batch cultures

Parameter values involved in kinetic equations were estimated from the four experimental data sets obtained from fed-batch processes. The estimated numerical values are indicated in Table 2. All these values were within the rank of other studies reported in the literature (Atala *et al.* 2001; Phisalaphong *et al.* 2006; Rivera *et al.* 2006; Andrade *et al.* 2007; Rivera *et al.* 2007).

Figures 1 to 4 illustrate the dynamic profiles of the experimental data from fed-batch cultures for substrate, biomass, metabolite concentrations and temperature. One can notice that in general, the model simulations fitted the overall dynamics of the experimental data for all compounds. This suggested that the proposed model and the kinetic parameters found can accurately describe the cell dynamic behavior as a function of the temperature.

Table 2. Estimated parameter values

Parameter	Estimated value	Unit
a	0.023 ± 0.034	$°C^{-1}h^{-0.5}$
b	0.08 ± 0.39	$°C^{-1}$
a_2	50.3 ± 25.5	$g\,l^{-1}$
b_2	0.07 ± 0.11	$°C^{-1}$
A_{P1}	6.0 ± 550.3	$°C$
A_{P2}	20.3 ± 616.7	$°C$
A_{G1}	2.4 ± 78.3	$°C$
A_{G2}	3.66 ± 5.66	$°C$
$K_d\,b$	0.025 ± 0.281	h^{-1}
$K_d\,t$	78.6 ± 863.8	h^{-1}
K_{sx}	0.50 ± 0.22	$g\,l^{-1}$
α_G	0.34 ± 8.63	-
α_P	4.5 ± 63.4	-
β_1	0.38 ± 29.47	$g\,g_X^{-1}\,h^{-1}$
β_2	0.29 ± 8.73	$g\,g_X^{-1}\,h^{-1}$
β_3	0.21 ± 0.44	$g\,g_X^{-1}\,h^{-1}$
β_4	0.20 ± 5.30	$g\,g_X^{-1}\,h^{-1}$
θ_1	4.34 ± 17.6	$°C$
θ_2	65.5 ± 59.0	$°C$
θ_3	24.7 ± 23.5	$°C$
θ_4	51.1 ± 120.8	$°C$
θ_5	0.91 ± 1.82	$°C^{-1}\,h^{-1}$

3.3 Model validation with fed-batch and continuous culture data

Experimental results from an independent fed-batch culture and a continuous culture submitted to thermal shifts were used in order to validate the dynamic model.

Figure 5 presents both the experimental and simulated concentrations obtained in a culture carried out at 32°C with a temperature shift to 42°C. At 32°C, μ_{max} was 0.44 h^{-1} ± 0.02 and the yields of production of biomass (0.10 g g_S^{-1} ± 0.004), ethanol (0.44 g g_S^{-1} ± 0.01) and glycerol (0.027 g g_S^{-1} ± 0.008) were found in the same range that those obtained at 30°C and 33°C. At 42°C, ethanol yield decreased to 0.43 g g_S^{-1} ± 0.01 and the decoupling of glycerol production and growth was confirmed ($R_{G/S}$ at 0.016 g g_S^{-1} ± 0.002 with a decoupling factor of 0.027 ± 0.003).The model described well the dynamic profiles for growth, sugar consumption and production and the most accurate results were obtained for ethanol and glycerol, as noticed for the previous simulations.

Figure 6 presents both the experimental data and model simulations obtained for the continuous process. The model described well both the transient and the steady states obtained experimentally. The first batch phase before turning into chemostat mode was simulated accurately and the switch to continuous mode was well described for substrate and ethanol. In steady state, all the simulated concentrations were constant and very close to the experimental data. Moreover, the whole dynamics of the transient state, consisting in a temperature gradient of 0.03 °C h^{-1} and periodical shocks at 47°C, were correctly described. The loss of total biomass and the decrease in ethanol production, caused by the increase in the temperature, were well simulated.

A statistical analysis was carried out to estimate the model validity. The deviations between simulation and experimental data were determined by a residual analysis with the correlation coefficient (R^2) estimation. The correlation coefficient values for total biomass, viable biomass, substrate, ethanol and glycerol are presented on Table 3 for each experiment. In general, the model allowed an accurate estimation for all experimental data, whatever the mode of process, batch, fed-batch or continuous mode. The gap between simulated and experimental results for total biomass and viable biomass can be due to cell lysis, which appeared at the end of the temperature shift experiment and was not considered in the model (R^2 0.43, 0.59 for Xv and 0.59 for Xt). The best correlations were obtained for ethanol and glycerol, except in chemostat for the glycerol (R^2 0.29).

The model predicted a decrease in the glycerol concentration at 220 h, however experimentally the glycerol concentration slightly increased up to 275 h before dropping. This difference could be due to some adaptation phenomenon of the yeast versus thermal stress (via the glycerol formation). This would be in agreement with a protective role of glycerol against thermal stress as suggested by other authors (Henle *et al.* 1982; Aldiguier *et al.* 2004; Zancan and Sola-Penna 2005). Adaptation phenomena are indeed more easily observable under long periods of cultivation such as in continuous cultures (Martín *et al.* 2007; Stanley *et al.* 2010).

Table 3. Analysis of the deviations between experimental and simulated data: correlation coefficients **(**R^2)

R^2	X_v	X_t	S	P	G
30°C - 39°C	0.43	0.80	0.14	0.99	0.97
33°C - 45°C	0.94	0.86	0.15	0.98	0.99
34°C - 47°C	0.95	0.91	0.42	0.98	0.99
37°C	0.90	0.95	0.67	0.97	0.91
32°C - 42°C	0.59	0.59	0.21	0.97	0.96
Chemostat	0.86	0.86	0.97	0.96	0.29

To summarize, this dynamic model allows us to describe accurately the experimental data, both in fed-batch and continuous fermentation processes, in steady states and transient periods. Our modeling approach using global algorithms for parameter estimation enables us to obtain a unique and optimal set of parameters. Therefore this model shows a good robustness over a wide range of experimental conditions. Thus, this macroscopic model could be very useful to determine closed loop control laws and to develop software sensors that could be applied in order to optimize and monitor the ethanol bioprocesses, in particular under SSF (Simultaneous Saccharification and Fermentation) strategies from lignocellulosic raw materials. A major challenge in SSF indeed consists in finding the optimal operating conditions for the monomeric sugar liberation by enzymatic hydrolysis and for the sugar fermentation whereas the optimal temperature for enzyme cocktails is much higher (around 50°C) than the one for the yeast fermentative activity.

Conclusions

A mathematical model was proposed for bio-ethanol production to describe kinetics as a function of temperature with special attention to cell viability and growth decoupled glycerol production. Fed-batch cultures with *Saccharomyces cerevisiae* from 30°C to 47°C were used to estimate kinetic parameters. The model was validated using independent data sets with temperature variations and different culture modes (fed-batch and chemostat cultures). This population model fitted accurately the fermentation dynamics over a wide range of temperature profiles (R^2 above 0.96 for ethanol and glycerol in most experiments). This model could be applied as an efficient tool to optimize industrial processes.

Acknowledgements

This study was partially supported by the French National Agency for Research as part of the National Research Program on Biofuels. E. Amillastre gratefully acknowledges financial doctoral support by the CNRS and the “Region Midi-Pyrénées”. The authors acknowledge Lesaffre International (Fermentis) (Marcq en Baroeul, France) for providing the yeast.

Nomenclature

a	Ratkowsky parameter in $\mu_{\max}$ expression ($^{\circ}C^{-1}h^{-0.5}$)
a_2	Ratkowsky parameter in P_{mx} expression ($g\,l^{-1}$)
A_{G1}	Activation energy for glycerol production divided by the gas constant (R) ($^{\circ}C$)
A_{G2}	Inactivation energy for glycerol production divided by the gas constant (R) ($^{\circ}C$)
A_{P1}	Activation energy for ethanol production divided by the gas constant (R) ($^{\circ}C$)
A_{P2}	Inactivation energy for ethanol production divided by the gas constant (R) ($^{\circ}C$)
b	Ratkowsky parameter in $\mu_{\max}$ expression ($^{\circ}C^{-1}$)
b_2	Ratkowsky parameter in P_{mx} expression ($^{\circ}C^{-1}$)
D	Dilution rate based on reactor volume (h^{-1})
$\frac{d}{dt}$	Derivative with respect to time (*t)*
G	Glycerol concentration ($g\,l^{-1}$)
J	Objective function (cost function)
K_d	Specific rate of cell death (h^{-1})
$K_d\,b$	Basal specific rate of cell death (h^{-1})
$K_d\,t$	Maximum value of specific rate of cell death due to temperature (h^{-1})
K_{sx}	Glucose saturation constant for the specific growth rate ($g\,l^{-1}$)
N	Number of measurements
P	Ethanol concentration ($g\,l^{-1}$)
P_{mx}	Ethanol concentration inhibiting growth at which $\mu = 0$ ($g\,l^{-1}$)
Q_{in}	Feed flow rate ($l\,h^{-1}$)
Q_{out}	Outlet flow rate ($l\,h^{-1}$)
q_S	Specific consumption rate of substrate ($g\,g_X^{-1}\,h^{-1}$)
$R_{G/S}$	Glycerol yield based on sugar consumed ($g\,g^{-1}$)
$R_{P/S}$	Ethanol yield based on sugar consumed ($g\,g^{-1}$)
$R_{X/S}$	Biomass yield based on sugar consumed ($g\,g^{-1}$)
S	Glucose concentration ($g\,l^{-1}$)
S_{in}	Glucose feed concentration ($g\,l^{-1}$)
t	Time
T	Temperature of the reactor ($^{\circ}C$)
V	Reactor volume (l)
X_t	Total cell concentration ($g\,l^{-1}$)
X_v	Viable cell concentration ($g\,l^{-1}$)
$Y_{G/S}$	Glycerol theoretical yield based on sugar consumed ($g\,g^{-1}$)
$Y_{P/S}$	Ethanol theoretical yield based on sugar consumed ($g\,g^{-1}$)
$Y_{X/S}$	Biomass theoretical yield based on sugar consumed ($g\,g^{-1}$)

Greek symbols:

α_P	Parameter "associated" with growth between μ and ν_P
α_G	Parameter "associated" with growth between μ and ν_G
β_G	Uncoupling factor: glycerol specific production rate when μ = 0 ($g\ g_X^{-1}\ h^{-1}$)
β_P	Uncoupling factor: ethanol specific production rate when μ = 0 ($g\ g_X^{-1}\ h^{-1}$)
β_1	Constant of ethanol production factor when μ = 0 ($g\ g_X^{-1}\ h^{-1}$)
β_2	Constant of ethanol production factor when μ = 0 ($g\ g_X^{-1}\ h^{-1}$)
β_3	Constant of glycerol production factor when μ = 0 ($g\ g_X^{-1}\ h^{-1}$)
β_4	Constant of glycerol production factor when μ = 0 ($g\ g_X^{-1}\ h^{-1}$)
χ	Parameters to be determined
μ	Specific growth rate (h^{-1})
μ_{max}	Maximum value of the specific growth rate (h^{-1})
ν_{exp}	Experimental data
ν_G	Specific production rate of glycerol ($g\ g_X^{-1}\ h^{-1}$)
ν_{sim}	Model predictive outputs
ν_P	Specific production rate of ethanol ($g\ g_X^{-1}\ h^{-1}$)
$\nu_{P\,max}$	Maximum value of the ethanol specific production rate ($g\ g_X^{-1}\ h^{-1}$)
θ_1	Constant in μ_{max} expression ($°C$)
θ_2	Constant in μ_{max} expression ($°C$)
θ_3	Constant in P_{mx} expression ($°C$)
θ_4	Temperature at the inflection point of the K_d = f (T) sigmoid curve ($°C$)
θ_5	Slope of the K_d = f (T) sigmoid curve ($°C^{-1}\ h^{-1}$)

Annexe 2 – Modèle de simulation de l'apparition de variants tolérants sous Matlab (MathWorks 7.5.0)

Modèle

```
function y=modelFassttempRatkowsky(t,x,flag,parcinet,Vol,debits,Alim,Temp)
% Variables globales
global Y
%% Températures
 T=interp1q(Temp(:,1),Temp(:,2),t);

%% Variables
Xv1=x(1);
Xvm1=x(2);
Xt1=x(3);
S1=x(4);
P1=x(5);
G1=x(6);
Xv2=x(7);
Xvm2=x(8);
Xt2=x(9);
S2=x(10);
P2=x(11);
G2=x(12);

%% Volumes
V1=Vol(1);
V2=Vol(2);

%% Débits
Qe=debits(1);
Q12=debits(2);
Q21=debits(3);
Qs=debits(4);

%% Alim
So=Alim(1);

%% Paramètres
ks1 = parcinet(1);
ksm1 = parcinet(2);
kdb = parcinet(3);
kdt = parcinet(4);
kdbm = parcinet(5);
kdtm = parcinet(6);
tpc = parcinet(7);
tpcm = parcinet(8);
pente = parcinet(9);
pentem = parcinet(10);
alpha_p = parcinet(11);
alpha_g = parcinet(12);
m1 = parcinet(13);
m2 = parcinet(14);
m3 =  parcinet(15);
m4 =  parcinet(16);
Ap1 = parcinet(17);
Ap2 = parcinet(18);
```

```
Ag1 = parcinet(19);
Ag2 = parcinet(20);
Yxs = parcinet(21);
Yps = parcinet(22);
Ygs = parcinet(23);
kdmut = parcinet(24);
mut_spont = parcinet (25);
mutUV = parcinet (26);

%%%% Paramètres fonction de la temperature T(°C)
mumax1 = ((0.023*(T-4.34))*(1-exp(0.08*(T-65.5))))^2 ; % Ratkowsky
Pm = 50.3/(1-exp(-(T-24.7)*0.07));                     % Ratkowsky
mumaxm1 = ((0.023*(T-4.34))*(1-exp(0.08*(T-65.5))))^2 ;% Ratkowsky

%% Equations cinétiques
%%%%% Réacteur 1
factP=P1/Pm;
Nb= factP*(factP<=1)+(factP>1); %=if (P1/Pm)<=1 -> Nb=P1/Pm;
                                %else -> Nb=1; end
mu1 = mumax1*(S1/(ks1+S1))*(1-Nb);

if (mu1 > mumax1)
    mu1=mumax1;
end

mum1 = (mumaxm1+0.02)*(S1/(ksm1+S1))*(1-Nb);

kd1 = kdb+kdt/(1+exp(-(T-tpc)*pente));

kd1m = kdbm+kdtm/(1+exp(-(T-tpcm)*pentem));

qp1 = alpha_p*mu1+ (m1*exp(-Ap1/T)-m2*exp(-Ap2/T));

qg1 = alpha_g*mu1+ (m3*exp(-Ag1/T)-m4*exp(-Ag2/T));

qs1 = mu1/Yxs + qp1/Yps + qg1/Ygs;


%%%%% Réacteur 2
factP2=P2/Pm;
Nb2= factP2*(factP2<=1)+(factP2>1);

mu2 = mumax1*(S2/(ks1+S2))*(1-Nb2);

mum2 = (mumaxm1+0.02)*(S2/(ksm1+S2))*(1-Nb2);;

kd2 = kdb+kdt/(1+exp(-(T-tpc)*pente))+kdmut ;

kd2m = kdbm+kdtm/(1+exp(-(T-tpcm)*pentem))+kdmut ;

qp2 = alpha_p*mu2+ (m1*exp(-Ap1/T)-m2*exp(-Ap2/T));

qg2 = alpha_g*mu2+ (m3*exp(-Ag1/T)-m4*exp(-Ag2/T));

qs2 = mu2/Yxs + qp2/Yps + + qg2/Ygs;
```

```
%% Modèle (bilan matière)
%%%%%% Réacteur 1

dXv1 = Q21/V1*Xv2-Xv1/V1*(Q12+Qs)+(mu1-kd1)*Xv1 - Xv1*prob;

dXvm1 = Q21/V1*Xvm2-Xvm1/V1*(Q12+Qs)+(mum1-kd1m)*Xvm1 + Xv1*prob ;

dXt1 = Q21/V1*Xt2-Xt1/V1*(Q12+Qs)+mu1*Xv1+mum1*Xvm1;

dS1  = Qe/V1*So+Q21/V1*S2-S1/V1*(Q12+Qs)-qs1*(Xv1+Xvm1);

dP1  = Q21/V1*P2-P1/V1*(Q12+Qs)+qp1*(Xv1+Xvm1);

dG1 = Q21/V1*G2-G1/V1*(Q12+Qs)+qg1*(Xv1+Xvm1);

%%%%%% Réacteur 2

dXv2 = Q12/V2*Xv1-Q21/V2*Xv2+(mu2-kd2-kdmut)*Xv2 - Xv2*prob - Xv2*probUV;

dXvm2 = Q12/V2*Xvm1-Q21/V2*Xvm2+(mum2-kd2m-kdmut)*Xvm2 + Xv2*prob +
Xv2*probUV ;

dXt2 = Q12/V2*Xt1-Q21/V2*Xt2+mu2*Xv2+mum2*Xvm2;

dS2  = Q12/V2*S1-Q21/V2*S2-qs2*(Xv2+Xvm2);

dP2  = Q12/V2*P1-Q21/V2*P2+qp2*(Xv2+Xvm2);

dG2 = Q12/V2*G1-Q21/V2*G2+qg2*(Xv2+Xvm2);

%% Sorties
y=[dXv1 dXvm1 dXt1 dS1 dP1 dG1 dXv2 dXvm2 dXt2 dS2 dP2 dG2]';

if ~isempty(Y) & t<=Y(end,1)
    Y(end,:)=[t mu1 mum1 mu2 mum2 mumax1 kd1];
else
    Y=[Y;[t mu1 mum1 mu2 mum2 mumax1 kd1]];
end
if size(Y,1)>=2 & Y(end,1)==Y(end-1,1)
   Y(end-1,:)=[];
end
```

Paramètres

```
%function Principal()

clear all
clear global
close all
clc

%% Durée simulation
tfin = 700;
tsim=[0 tfin];
options_int = odeset('Reltol',1e-6,'AbsTol',1e-12);
```

```
% Variables globales
global Y

%% Initialisation X, S, P, G (valeurs à t0)
Xv1= 13;
Xvm1= 0.0;
Xt1= 13;
S1= 0.1;
P1= 50;
G1= 5;

Xv2= 13;
Xvm2=0.0;
Xt2= 13;
S2= 0.1;
P2= 50;
G2= 5;

Etats0 =[Xv1 Xvm1 Xt1 S1 P1 G1 Xv2 Xvm2 Xt2 S2 P2 G2];

%% Volumes
V1=1 ;
V2=0.0032 ;

Vol=[V1 V2];

%% Débits Q
Qe = 0.15 ;
Q12 = 0.13 ;
Q21 = 0.13 ;
Qs = 0.15 ;

debits=[Qe Q12 Q21 Qs];

%% Alim
So=150;
Alim=[So];

%% Paramètres cinétiques
ks1 = 0.1;       % manip
ksm1 = 0.1 ;     % manip
kdb = 0.01 ;     % cte décès de base wt
kdt = 1.2;       % cte décès température wt
kdbm = 0.01 ;    % cte décès de base mutant
kdtm = 1.2 ;     % cte décès température mutant
tpc = 42.5 ;     %température au point d'inflexion(°C
tpcm = 44;
pente = 0.4493 ; %pente wt
pentem = 0.4 ;   %pente mutant
alpha_p =  4.5;
alpha_g = 0.34;
m1 = 0.38;
m2 = 0.29;
m3 =  0.21;
m4 =  0.2;
Ap1 = 6;
Ap2 = 20.3;
Ag1 = 2.4;
Ag2 = 3.66;
Yxs = 0.53 ;
```

```
Yps = 0.51 ;
Ygs = 0.86 ;
kdmut = 0 ;      % cte décès mutagénèse
mut_spont = 5*10^-8;
mutUV = 3*10^-4;

parcinet=[ks1 ksm1 kdb kdt kdbm kdtm tpc tpcm pente pentem alpha_p alpha_g
m1 m2 m3 m4 Ap1 Ap2 Ag1 Ag2 Yxs Yps Ygs kdmut prob probUV];

%% Profil de température

inter=0.1;       % intervalle de tps
Tmin=37;         % Température de départ (°C)
Tmax=45;         % Température des chocs (°C)
grad=0.02;       % gradient de température (°C/h)
pchoc=12;        % période des chocs (h)
dchoc=0.3;       % durée du choc (h)

tps=[0:inter:tfin];
choc=dchoc+1;

for j=1:length(tps)
    T(j)=grad*tps(j)+Tmin;
    if (mod(tps(j),pchoc)==0)&&(tps(j)>0)
        T(j)=Tmax;
        choc=0;
    end
    if (choc<=dchoc)
        T(j)=Tmax;
        choc=choc+inter;
    end
end
Temp = [tps',T'];

%% Solution Equations différentielles
[t,y]=ode113('modelFassttempRatkowsky',tsim,Etats0,options_int,parcinet,Vol
,debits,Alim,Temp);

Y_sorties=interp1q(Y(:,1),Y(:,2:end),t);

mu1=Y_sorties(:,1);%[mu1 mum1 mu2 mum2]
mum1=Y_sorties(:,2);%[mu1 mum1 mu2 mum2]
mumax1=Y_sorties(:,5);
kd1=Y_sorties(:,6);

%% Figures
figure(1)
 plot(t,y(:,1),'-k',t,y(:,2),'-k',t,y(:,3),':k')
 legend('X_{v1}','X_{vm1}','X_{t1}')
 allowaxestogrow(1)
xlabel('Temps (h)')
ylabel('Concentrations (g/L)')

figure(2)
 plot(t,y(:,4),':k',t,y(:,5),'-k')
 legend('S1','P1')
   allowaxestogrow(1)
xlabel('Temps (h)')
ylabel('Concentrations (g/L)')
```

Annexe 3 – Photographies des boites de pétri QTray incubées à 42°C, 43°C et 46°C pendant 3 heures et 14 heures

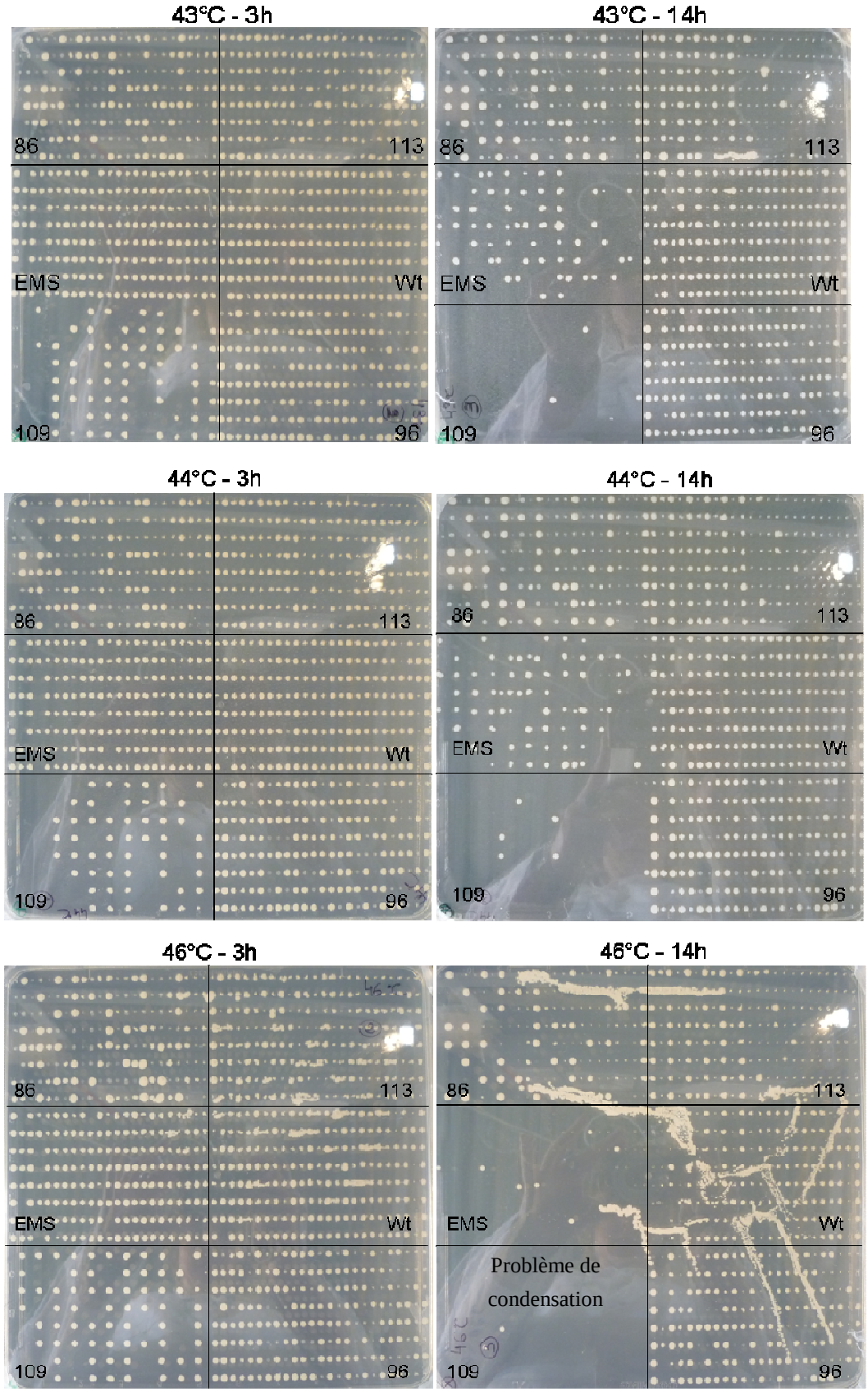


Figure 115. Photographie des boites de pétri QTray incubées à 42°C, 43°C et 46°C pendant 3 heures et 14 heures puis à 30°C jusqu'à apparition des colonies

Index des Figures et Tableaux

Index des Figures

Figure 1. Cycle cellulaire chez *Saccharomyces cerevisiae* (www.md.ucl.ac.be/) 8

Figure 2. Reproduction sexuée et asexuée chez *Saccharomyces cerevisiae* (www.univ-bpclermont.fr) 9

Figure 3. Schéma simplifié du métabolisme central carboné sur glucose chez *Saccharomyces cerevisiae* (Feria Gervasio 2008) 12

Figure 4. Métabolisme fermentaire – Voie de synthèse de l'éthanol 13

Figure 5. Voie de synthèse du glycérol 14

Figure 6. Répartition des classes d'UV suivant leur longueur d'onde (100 à 400 nm) (www.ats84.fr) 40

Figure 7. Spectre d'absorption des UV par l'ADN (http://inac.cea.fr) 40

Figure 8. Liaisons hydrogènes entre les bases pyrimidiques et leur purine complémentaire (http://3.bp.blogspot.com/_QwiM5bXMBk8/TTufaRI8hDI/AAAAAAAAABY/1pX5BL2vuEg/s1600/bases.jpg) 41

Figure 9. Formation de dimères de pyrimidine (dimères cyclobutane de pyrimidine et photoproduits 6-4) lors de l'irradiation aux UV (www.web-books.com/MoBio/Free/Ch7F5.htm) 42

Figure 10. Représentation schématique du mécanisme de réparation par excision de nucléotides (Sinha and Hader 2002) 43

Figure 11. Schéma récapitulatif de l'effet des UV sur les levures 49

Figure 12. Schéma de l'installation utilisée - Chémostat 62

Figure 13. Mesure de la biomasse – Capacitance en fonction de la fréquence (Fogale) 66

Figure 14. Superposition du signal de la sonde capacitive, de la biomasse totale (en grammes) et des cellules totales (en Mcell) en fonction du temps pour une culture en mode discontinu alimenté de la souche sauvage à 37°C 67

Figure 15. Superposition du signal de la sonde capacitive et des cellules viables (en Mcell) en fonction du temps pour une culture en mode discontinu alimenté de la souche sauvage à 37°C 67

Figure 16. Superposition du signal de la sonde capacitive et des cellules cultivables (en Mcell) en fonction du temps pour une culture en mode discontinu alimenté de la souche sauvage à 37°C 68

Figure 17. Superposition du signal de la sonde capacitive et des cellules viables (en Mcell) en fonction du temps pour une culture en mode discontinu alimenté de la souche sauvage à 37°C avec exposition aux UV à une puissance de 6 $W.m^{-2}$ (a) et de 25 $W.m^{-2}$ (b) 69

Figure 18. Superposition du signal de la sonde capacitive et des cellules viables (en Mcell) en fonction du temps pour une culture en mode discontinu alimenté de la souche sauvage à 33°C avec un choc de température à 45°C à 11,5 heures (trait pointillé) 69

Figure 19. Superposition du signal de la sonde capacitive et des cellules viables (en Mcell) en fonction du temps pour une culture en mode continu 70

Figure 20. Corrélation entre le signal de la sonde capacitive et les cellules viables (en Mcell) pour une culture de la souche sauvage en mode discontinu alimenté à 37°C sans et avec exposition

aux UV (à 6 et 25 W.m^{-2}) et pour une culture en mode continu – Facteurs de corrélation des régressions linéaires 70

Figure 21. Effet du pH sur la distribution des carbonates en solution 77

Figure 22. Concentration en éthanol résiduel en fonction du temps pour les différents débits d'aération (0,1 L.min-1, 0,5 L.min-1, 1L.min-1, 1,5 L.min-1) à 37°C et sous une agitation de 200 rpm 81

Figure 23. Vitesse d'évaporation de l'éthanol en fonction de la concentration en éthanol pour les différents débits d'aération (0,1 L.min^{-1}, 0,5 L.min^{-1}, 1L.min^{-1}, 1,5 L.min^{-1}) à 37°C et sous une agitation de 200 rpm 82

Figure 24. Représentation théorique du taux de croissance et du taux de décès de la souche sauvage et du mutant tolérant en fonction de la température 86

Figure 25. Exemple de paliers de température réalisés pour la sélection du mutant 87

Figure 26. Schéma du procédé d'adaptation – Composés et flux intervenants dans le modèle 87

Figure 27. Représentation théorique du taux de croissance et du taux de décès de la souche sauvage et du mutant tolérant en fonction de la température 93

Figure 28. Evolution des masses de glucose consommées et des masses d'éthanol, de biomasse et de glycérol produites au cours de la fermentation de la souche sauvage, phase de croissance à 32°C puis choc thermique à 42°C à 12,7 heures de culture (le changement de température est représenté par le trait pointillé) 97

Figure 29. Evolution des masses de glucose consommées et des masses d'éthanol, de biomasse et de glycérol produites au cours de la fermentation de la souche sauvage, phase de croissance à 33°C puis choc thermique à 45°C à 11,6 heures de culture (le changement de température est représenté par le trait pointillé) 98

Figure 30. Taux de croissance de la souche sauvage pour les fermentations avec phase de croissance à 32°C ou 33°C puis choc thermique à 42°C ou 45°C en fonction de la concentration en éthanol (le changement de température est représenté par une flèche) 99

Figure 31. Vitesse spécifique de production d'éthanol de la souche sauvage pour les fermentations avec phase de croissance à 32°C ou 33°C puis choc thermique à 42°C ou 45°C en fonction de la concentration en éthanol (le changement de température est représenté par une flèche) 99

Figure 32. Evolution de la concentration en cellules totales (en million de cellules/mL) dénombrées par comptage pour la souche sauvage avec phase de croissance à 32°C ou 33°C puis choc thermique à 42°C (représenté par un trait plein) ou 45°C (représenté par un trait pointillé) en fonction du temps 100

Figure 33. Evolution de la concentration en cellules viables (en million de cellules/mL) dénombrées par comptage pour la souche sauvage avec phase de croissance à 32°C ou 33°C puis choc thermique à 42°C (représenté par un trait plein) ou 45°C (représenté par un trait pointillé) en fonction du temps 101

Figure 34. Signal normalisé de la sonde capacitive pour la souche sauvage avec phase de croissance à 32°C ou 33°C puis choc thermique à 42°C (représenté par un trait plein) ou 45°C (représenté par un trait pointillé) en fonction du temps en fonction du temps 102

Figure 35. Représentation semi-logarithmique de l'évolution des cellules viables (en million de cellules) dénombrées par comptage pour la souche sauvage avec phase de croissance à 32°C ou 33°C puis choc thermique à 42°C (représenté par un trait plein) ou 45°C (représenté par un trait pointillé) en fonction du temps. La perte de cellules se fait selon un profil linéaire (double trait) 103

Figure 36. Pourcentage de viabilité de la souche sauvage en mode discontinu alimenté à 32°C ou 33°C puis choc thermique à 42°C (représenté par un trait plein) ou 45°C (représenté par un trait pointillé) en fonction du temps 104

Figure 37. Evolution de la concentration en cellules mortes (en million de cellules/mL) dénombrées par comptage pour la souche sauvage avec phase de croissance à 32°C ou 33°C puis choc thermique à 42°C (représenté par un trait plein) ou 45°C (représenté par un trait pointillé) en fonction du temps 104

Figure 38. Taux de décès de la souche sauvage en mode discontinu alimenté à 32°C ou 33°C puis choc thermique à 42°C (représenté par un trait plein) ou 45°C (représenté par un trait pointillé) en fonction du temps 105

Figure 39. Représentation du taux de décès de la souche sauvage en fonction de la température. Les k_d expérimentaux sont représentés par des cercles vides (○), les kd issus de la littérature (Ling et al. 1995) sont représentés par des cercles pleins (●), et le k_d estimé est représenté par la courbe en pointillés 108

Figure 40. Représentation du taux de décès de la souche sauvage et du mutant tolérant en fonction de la température 109

Figure 41. Puissance reçue (en $W.m^{-2}$), après la cuve en quartz, à une distance de 2,25 cm et 9 cm de la source UV en fonction de la concentration en cellules dans la cuve (en $cellules.mL^{-1}$) 111

Figure 42. Taux de croissance de la souche sauvage en mode discontinu alimenté à 37°C sans et avec exposition aux UV (6 et 25 $W.m^{-2}$) en fonction du temps (a) et en fonction de la concentration en éthanol dans le milieu (b) 113

Figure 43. Masse d'éthanol produite en fonction de l'avancement de la réaction (fraction de substrat consommé) en mode discontinu alimenté à 37°C sans et avec exposition aux UV (6 et 25 $W.m^{-2}$) 114

Figure 44. Evolution des cellules totales (en million de cellules) dénombrées par comptage pour la souche sauvage à 37°C sans (trait plein) et avec exposition aux UV à une puissance de 6 $W.m^{-2}$ (trait épais) ou 25 $W.m^{-2}$ (trait pointillé) en fonction du temps 114

Figure 45. Evolution des cellules viables (en million de cellules) dénombrées par comptage pour la souche sauvage à 37°C sans (trait plein) et avec exposition aux UV à une puissance de 6 $W.m^{-2}$ (trait épais) ou 25 $W.m^{-2}$ (trait pointillé) en fonction du temps 115

Figure 46. Signal normalisé de la sonde capacitive pour la souche sauvage à 37°C sans (trait plein) et avec exposition aux UV à une puissance de 6 $W.m^{-2}$ (trait épais) ou 25 $W.m^{-2}$ (trait pointillé) en fonction du temps 116

Figure 47. Evolution des cellules cultivables (en million de cellules) dénombrées sur milieu solide pour la souche sauvage à 37°C sans (trait plein) et avec exposition aux UV à une puissance de 6 $W.m^{-2}$ (trait épais) ou 25 $W.m^{-2}$ (trait pointillé) en fonction du temps 117

Figure 48. Evolution des cellules mortes (en million de cellules) dénombrées par comptage pour la souche sauvage à 37°C sans (trait plein) et avec exposition aux UV à une puissance de 6 $W.m^{-2}$ (trait épais) ou 25 $W.m^{-2}$ (trait pointillé) en fonction du temps 118

Figure 49. Taux de décès de la souche sauvage en mode discontinu alimenté sans et avec exposition aux UV (puissance de 6 et 25 $W.m^{-2}$) en fonction du temps 119

Figure 50. Taux de décès de la souche sauvage en mode discontinu alimenté sans et avec exposition aux UV (puissance de 6 et 25 $W.m^{-2}$) en fonction de la concentration en éthanol 120

Figure 51. Profil de température imposé pour les premiers tests de simulation 124

Figure 52. Simulation des concentrations en biomasse viable sauvage (trait plein), en biomasse viable mutante (trait plein épais) et en biomasse totale (trait pointillé) obtenues avec le modèle cinétique selon les conditions décrites dans le Tableau 20 avec une rampe de température

de 0,03°C.h^{-1} (a). Résultat de la simulation sur une gamme de concentration en biomasse de 0 à 2 g.L^{-1} (b) 125

Figure 53. Etude de sensibilité du gradient de température (grad : 0,01 ; 0,02 ; 0,03°C.h^{-1})..... 126

Figure 54. Etude de sensibilité de la température nominale (Tmin : 33, 35 et 37°C)..... 127

Figure 55. Etude de sensibilité du taux de décès induit par la mutagénèse ($k_{d\ mut}$: 0, 2 et 4 h^{-1})..... 130

Figure 56. Etude de sensibilité du taux de mutations spontanés et induites par les UV..... 132

Figure 57. Etude de sensibilité du taux de croissance maximal du mutant (μ_{max} mut= μ_{max} wt + 0 ; 0,02 ou 0,05)..... 133

Figure 58. Profil de température réalisé pour la sélection du mutant dans le modèle cinétique..... 134

Figure 59. Simulation de l'évolution des concentrations en biomasse dans le réacteur 1 obtenues grâce au modèle cinétique pour les paramètres choisis..... 135

Figure 60. Simulation de l'évolution des concentrations en substrat, en éthanol et en glycérol dans le réacteur 1 obtenues grâce au modèle cinétique pour les paramètres choisis..... 135

Figure 61. Taux de croissance de la souche industrielle de *Saccharomyces cerevisiae* en culture en mode discontinu alimenté à 37°C *en* fonction de la concentration en éthanol..... 143

Figure 62. *Schéma global du réacteur continu*..... 144

Figure 63. Représentation du profil de température du chémostat d'obtention de variants 145

Figure 64. Evolution des masses de glucose consommées et des masses d'éthanol glycérol et biomasse produites au cours de la fermentation de la souche sauvage en culture continue – Régime permanent..... 146

Figure 65. Evolution des masses de glucose consommées et des masses d'éthanol et biomasse produites au cours de la fermentation de la souche sauvage en culture continue..... 147

Figure 66. Evolution de la concentration en glycérol au cours du temps en culture continue..... 149

Figure 67. Evolution des concentrations en acides pyruvique, acétique et succinique au cours du temps 149

Figure 68. Taux de croissance, vitesses spécifiques de consommation de glucose et de production d'éthanol au cours du temps en culture continue 150

Figure 69. Température, taux de croissance et vitesse spécifique de production de glycérol au cours du temps en culture continue..... 151

Figure 70. Vitesse spécifique de production de glycérol en fonction de la température pendant la PERTURBATIONS 1 (trait fin) et 3 (trait gras) 152

Figure 71. Vitesse spécifique de production de glycérol en fonction du taux de croissance pendant les PERTURBATIONS 1, 2 et 3 153

Figure 72. Vitesses spécifiques de production d'acides pyruvique, acétique et succinique au cours du temps en culture continue..... 154

Figure 73. Vitesses de consommation d'O_2 et de production de CO_2 au cours du temps..... 155

Figure 74. Vitesses spécifiques de consommation d'O_2 et de production de CO_2 au cours du temps en culture continue..... 156

Figure 75. Quotient respiratoire (q_{CO2} / q_{O2}) au cours du temps en culture continue..... 156

Figure 76. Rendement global en éthanol sur CO_2 et en O_2 sur biomasse au cours du temps en culture continue..... 157

Figure 77. Evolution de la viabilité de la biomasse en fonction du temps en culture continue..... 158

Figure 78. Evolution des cellules totales, viables et mortes (en million de cellules) en fonction du temps en culture continue (a), évolution des cellules mortes (b) 159

Figure 79. Evolution des cellules viables et cultivables (en million de cellules) en fonction du temps en culture continue 160

Figure 80. Evolution de la capacitance et de la température au cours du temps en culture continue, sur l'ensemble de la fermentation (a) et pour la perturbation 1 (b). 161

Figure 81. Taux de croissance de la souche en fonction du temps en culture continue à partir du signal de capacitance, sur l'ensemble de la fermentation (a) et pour le régime permanent et la perturbation 1 (b) 162

Figure 82. Superposition du signal de capacitance et de la vitesse de production de CO_2 163

Figure 83. Superposition du signal de capacitance et de la vitesse de production d'O_2 163

Figure 84. Taux de décès de la souche en fonction du temps en culture continue 164

Figure 85. Simulations des profils de biomasse totale (b ●) et viable (c ○), de substrat (d ■), d'éthanol (e △) et de glycérol (f ♦) en culture continue soumise à un profil croissant de température (a). Les données expérimentales sont représentées par des symboles et les simulations par des traits continus. 167

Figure 86. Rendement glycérol/biomasse en fonction du temps en culture continue calculé à partir des valeurs expérimentales et simulées par le modèle 168

Figure 87. Photographie d'une culture sur milieu solide à 39°C – hétérogénéité de taille des colonies 170

Figure 88. Positionnement des échantillons sélectionnés pour le criblage 176

Figure 89. Méthode de repiquage de clones sur boite gélosée QTray 177

Figure 90. Photographie des boites de pétri QTray incubées à 41°C pendant 3 heures et 14 heures puis à 30°C jusqu'à apparition des colonies 178

Figure 91. Photographie des boites de pétri QTray incubées à 45°C pendant 3 heures et 14 heures puis à 30°C jusqu'à apparition des colonies 179

Figure 92. Photographie de la boite de pétri QTray incubée à 41°C pendant 3 jours puis à 30°C jusqu'à apparition des colonies 180

Figure 93. Clones de l'échantillon 86 sélectionnés pour le criblage en milieu liquide 181

Figure 94. Evolution de l'absorbance de la souche sauvage (trait fin) et de 3 clones issus du chémostat (86A (trait épais), 86B (trait épais gris), 86C (trait pointillé)) déterminés en microplaque à 37°C sur la durée totale de fermentation (a) et sur les premières heures de culture (entre 3 et 9 heures) (b) 182

Figure 95. Evolution du taux de croissance de la souche sauvage et de 3 clones issus du chémostat (86A, 86B, 86C) déterminés en microplaque à 37°C 183

Figure 96. Evolution de la souche sauvage et de 3 clones issus du chémostat (86A, 86B, 86C) déterminés en microplaque à 37°C en présence de chocs thermiques à 45°C sur la durée totale de fermentation (a) et entre 5 et 9 heures de culture (b) 184

Figure 97. Evolution de la concentration en éthanol produite par la souche sauvage et les clones 86A, 86B, 86C à 37°C en présence de chocs à 45°C 185

Figure 98. Evolution de la température au cours de la fermentation de la souche sauvage et du clone 86B à 37°C en présence de CHOCS à 45°C 187

Figure 99. Evolution des cellules totales (en million de cellules) dénombrées par comptage en fonction du temps pour la souche sauvage (trait plein) et le clone 86B (trait pointillé) à 37°C en présence de CHOCS à 45°C 188

Figure 100. Evolution des cellules viables (en million de cellules) en fonction du temps pour la souche sauvage (trait plein) et le clone 86B (trait pointillé) à 37°C en présence de CHOCS à 45°C 189

Figure 101. Signal normalisé de la sonde capacitive en fonction du temps pour la souche sauvage et le clone 86B à 37°C en présence de CHOCS à 45°C 189

Figure 102. Signal normalisé de la sonde de la souche sauvage et du clone 86B à 37°C en présence de CHOCS à 45°C capacitive en fonction de la concentration en éthanol dans le milieu (a) et en fonction de l'avancement de la réaction (consommation du substrat) (b) 190

Figure 103. Taux de croissance en fonction du temps de la souche sauvage et du clone 86B à 37°C en présence de CHOCS à 45°C à partir du signal de capacitance brut (a) et lissé (b) 191

Figure 104. Taux de croissance en fonction de la concentration en éthanol de la souche sauvage et du clone 86B à 37°C en présence de CHOCS à 45°C à partir du signal de capacitance lissé 192

Figure 105. Evolution de la viabilité de la souche sauvage (trait plein) et du clone 86B (trait pointillé) à 37°C en présence de CHOCS à 45°C en fonction du temps (a) et en fonction de la concentration en éthanol dans le milieu (b) 193

Figure 106. Evolution des cellules mortes (en million de cellules) en fonction du temps pour la souche sauvage (trait plein) et le clone 86B (trait pointillé) à 37°C en présence de CHOCS à 45°C 194

Figure 107. Représentation semi-logarithmique de l'évolution des cellules viables (en million de cellules) dénombrées par comptage pour la souche sauvage et le clone 86B à 37°C en présence de chocs à 45°C. La perte de cellules se fait selon un profil linéaire (double trait) 195

Figure 108. Taux de décès instantané (k_d) de la souche sauvage et du clone 86B en fonction du temps à 37°C en présence de chocs à 45°C. k_d calculé à partir du X_{viable} du comptage cellulaire (a) et du X_{viable} du signal de la sonde capacitive (b) 196

Figure 109. Taux de décès instantané (kd) de la souche sauvage et du clone 86B calculé à partir du X_{viable} du comptage cellulaire en fonction de la concentration en éthanol dans le milieu à 37°C en présence de chocs à 45°C et à 37°C en isotherme (culture de référence - souche sauvage) 197

Figure 110. Evolution de la masse de glucose consommée et des masses d'éthanol, de biomasse et de glycérol produites au cours de la fermentation de la souche sauvage à 37°C en présence de chocs à 45°C (les ajouts de glucose sont représentés par des flèches) 199

Figure 111. Evolution de la masse de glucose consommée et des masses d'éthanol, de biomasse et de glycérol produites au cours de la fermentation du clone 86B à 37°C en présence de chocs à 45°C (les ajouts de glucose sont représentés par des flèches) 199

Figure 112. Vitesse spécifique de production d'éthanol (par rapport à la biomasse viable) de la souche sauvage et du clone 86B en fonction de la concentration en éthanol dans le milieu 201

Figure 113. Vitesse spécifique de production de glycérol (par rapport à la biomasse viable) de la souche sauvage et du clone 86B en fonction du taux de croissance (par rapport à la biomasse viable) 202

Figure 114. Taux de décès instantané (kd) de la souche sauvage et du clone 86B en fonction du temps à 37°C en présence de chocs à 45°C 211

Figure 115. Photographie des boites de pétri QTray incubées à 42°C, 43°C et 46°C pendant 3 heures et 14 heures puis à 30°C jusqu'à apparition des colonies 257

Index des Tableaux

Tableau 1. Concentrations en éthanol provoquant un arrêt de la croissance et de la production d'éthanol chez différentes souches du genre *Saccharomyces (S.)*..... 20

Tableau 2. Tableau récapitulatif de l'impact de la température sur la viabilité des levures 23

Tableau 3. Tableau récapitulatif de l'impact de la température sur la synthèse de glycérol..... 25

Tableau 4. Impact de l'ajout de glycérol ou de tréhalose sur la température optimale de fonctionnement des pyrophosphatases inorganiques de levures *in vitro* (Zancan and Sola-Penna 2005)..... 26

Tableau 5. Tableau récapitulatif des améliorations de la tolérance à l'éthanol (gains, souches, techniques)..... 35

Tableau 6. Tableau récapitulatif des performances fermentaires de *Saccharomyces cerevisiae* à 30°C sur glucose et sur hydrolysat d'épicéa détoxifié ou non par différentes techniques (Larsson *et al.* 1999)..... 36

Tableau 7. Tableau récapitulatif des améliorations de la thermotolérance (gains, souches, techniques)..... 38

Tableau 8. Tableau récapitulatif des taux de mutations spontanées et induites par les UV exprimés en nombre de mutations par division et par individu..... 48

Tableau 9. Masse molaire et coefficient γ_i des principaux composés en fermentation alcoolique (Cmol)..... 80

Tableau 10. Variables et paramètres intervenants dans les bilans de matière et équations cinétiques 88

Tableau 11. Lois cinétiques utilisées dans le modèle cinétique 94

Tableau 12. Taux de décès moyens à 42°C et 45°C..... 103

Tableau 13. Taux de décès moyens et instantanés (maximal) de 32°C à 45°C..... 106

Tableau 14. Taux de décès moyens à 39°C, 42°C, 45°C et 47°C 106

Tableau 15. Taux de décès à 30°C, 33°C, 35°C et 39°C issus de la littérature..... 106

Tableau 16. Paramètres définissant le taux de décès en fonction de la température, déterminés pour la souche sauvage et estimés pour la souche « mutante » 109

Tableau 17. Puissance de radiations UV mesurée après la cuve en quartz en fonction de la distance source UV/ cellules et de la concentration cellulaire..... 111

Tableau 18. Taux de décès moyens à 37°C sur des cultures exposées à différentes puissance d'UV (0, 6 et 25 W.m-2)..... 118

Tableau 19. Valeur des paramètres estimés 122

Tableau 20. Paramètres intervenant dans le modèle cinétique..... 123

Tableau 21. Intervalle de confiance des paramètres définissant le k_d 129

Tableau 22. Simulation du temps d'apparition (t) d'un mutant tolérant et de la concentration (Xv_m) atteinte pour différents pourcentages de variation des paramètres définissant le k_d 129

Tableau 23. Taux de mutations spontanées et induites par les UV chez des souches diploïdes de *Saccharomyces cerevisiae* 131

Tableau 24. Caractérisation de durée, profil de température et mutagénèse aux UV pour les différentes phases du chémostat 145

Tableau 25. Tableau récapitulatif des concentrations, des paramètres cinétiques et des rendements obtenus pour le régime permanent à 37°C 146

Tableau 26. Taux de croissance maximal de la souche sauvage et des clones en isothermes à 37°C et 39°C 183

Tableau 27. Concentrations finales en éthanol déterminées par HPLC produites par la souche sauvage et les clones 86A, 86B, 86C à 37°C en présence de chocs à 45°C, et productivité maximale atteinte (en éthanol équivalent CO_2 par heure) 186

Tableau 28. Chiffres clés des deux cultures réalisées à 37°C en présence de chocs thermiques à 45°C pour la souche sauvage et le clone 86B 200

Nomenclature

Nomenclature

VARIABLES

A_{G1}	Energie d'activation pour la production de glycérol divisée par la constante des gaz parfaits (R)	°C
A_{G2}	Energie d'inactivation pour la production de glycérol divisée par la constante des gaz parfaits (R)	°C
A_{P1}	Energie d'activation pour la production d'éthanol divisée par la constante des gaz parfaits (R)	°C
A_{P2}	Energie d'inactivation pour la production d'éthanol divisée par la constante des gaz parfaits (R)	°C
a	Paramètre de Ratkowsky dans l'expression de $\mu_{\max}$	$°C^{-1}.h^{-0,5}$
a_2	Paramètre de Ratkowsky dans l'expression du $P_{critique}$	$g.L^{-1}$
b	Paramètre de Ratkowsky dans l'expression de $\mu_{\max}$	$°C^{-1}$
b_2	Paramètre de Ratkowsky dans l'expression du $P_{critique}$	$°C^{-1}$
D	Taux de dilution hydraulique	h^{-1}
$\frac{d}{dt}$	Opérateur dérivé en fonction du temps	-
dchoc	Durée des chocs	h
G	Concentration en glycérol	$g.L^{-1}$
grad	gradient de température	$°C.h^{-1}$
k_d	Taux de décès induit par la température	h^{-1}
$k_d\, b$	Taux de décès basal ou « naturel »	h^{-1}
$k_d\, t$	Taux de décès maximal induit par la température	h^{-1}
$k_{d\ mut}$	Taux de décès induit par l'exposition aux UV	h^{-1}
K_s	Constante d'affinité pour le glucose	$g.L^{-1}$
$M_{acétate}$	Masse molaire de l'acide acétique	$g.Cmol^{-1}$
M_{CO_2}	Masse molaire du dioxyde de carbone	$g.Cmol^{-1}$
M_G	Masse molaire du glycérol	$g.Cmol^{-1}$
M_{O_2}	Masse molaire du dioxygène	$g.Cmol^{-1}$

M_P	Masse molaire de l'éthanol	g.Cmol^{-1}
$M_{pyruvate}$	Masse molaire de l'acide pyruvique	g.Cmol^{-1}
M_S	Masse molaire du glucose	g.Cmol^{-1}
$M_{succinate}$	Masse molaire de l'acide succinique	g.Cmol^{-1}
M_X	Masse molaire moyenne de la biomasse	g.Cmol^{-1}
O_{2d}	Dioxygène dissous dans le milieu	mg.L^{-1}
pente	Pente de la courbe sigmoïde k_d = f (T)	°C^{-1}.h^{-1}
P	Concentration en éthanol	g.L^{-1}
$P_{critique}$	Concentration critique en éthanol pour laquelle $\mu = 0$	g.L^{-1}
pchoc	Période des chocs	h
prob mut spontanée	Probabilité de mutation spontanée	-
prob mut UV	Probabilité de mutation induite par les UV	-
Q_e	Débit d'entrée, d'alimentation en milieu salin complet	L.h^{-1}
Q_s	Débit de sortie, de soutirage du moût	L.h^{-1}
Q_{in}	Débit d'air entrant dans le réacteur	L.h^{-1}
Q_{out}	Débit de gaz sortant du réacteur	L.h^{-1}
Q_{12}	Débit de recirculation du réacteur 1 vers le réacteur 2	L.h^{-1}
Q_{21}	Débit de recirculation du réacteur 2 vers le réacteur 1	L.h^{-1}
q_{CO_2}	Vitesse spécifique de production de dioxyde de carbone	mol.g$_X^{-1}$.h^{-1}
q_G	Vitesse spécifique de production de glycérol	g.g$_X^{-1}$.h^{-1}
q_{O_2}	Vitesse spécifique de consommation d'oxygène	mol.g$_X^{-1}$.h^{-1}
q_P	Vitesse spécifique de production d'éthanol	g.g$_X^{-1}$.h^{-1}
q_S	Vitesse spécifique de consommation de glucose	g.g$_X^{-1}$.h^{-1}
R	Constante des gaz parfaits (8,314)	J.K^{-1}.mol^{-1}
$R_{G/S}$	Rendement global de conversion du substrat en glycérol	g.g^{-1}
$R_{P/S}$	Rendement global de conversion du substrat en éthanol	g.g^{-1}
$R_{X/S}$	Rendement global de conversion du substrat en biomasse	g.g^{-1}
r_{CO_2}	Vitesse de production de dioxyde de carbone	g.L^{-1}.h^{-1}
r_G	Vitesse de production de glycérol	g.L^{-1}.h^{-1}

r_{O_2}	Vitesse de consommation d'oxygène	$g.L^{-1}.h^{-1}$
r_P	Vitesse de production d'éthanol	$g.L^{-1}.h^{-1}$
r_S	Vitesse de consommation de glucose	$g.L^{-1}.h^{-1}$
r_X	Vitesse de production de biomasse	$g.L^{-1}.h^{-1}$
S_0	Concentration en glucose dans l'alimentation	$g.L^{-1}$
S	Concentration en glucose	$g.L^{-1}$
t	temps	h
T	Température	°C
$T_{\min}$	Température de départ de la culture continue	°C
$T_{\max}$	Température des chocs lors de la culture continue	°C
tpc	Température au point d'inflection de la courbe sigmoïde $k_d = f(T)$	°C
V_{gaz}	Volume du ciel gazeux dans le réacteur	L
V_{liq}	Volume de liquide dans le réacteur	L
$V_{(1,2)}$	Volume du réacteur (1 ou 2)	L
Xt	Concentration en biomasse totale	$g.L^{-1}$
Xv	Concentration en biomasse viable	g.L-1
Xvm	Concentration en biomasse viable « mutante »	g.L-1
Xm	Concentration en biomasse morte	g.L-1
$Y_{G/S}$	Rendement théorique limite en glycérol sur substrat	$g.g^{-1}$
$Y_{P/S}$	Rendement théorique limite en éthanol sur substrat	$g.g^{-1}$
$Y_{X/S}$	Rendement théorique limite en biomasse sur substrat	$g.g^{-1}$
$\%CO_{2in}$	Pourcentage de CO_2 dans l'air d'entrée du réacteur	%
$\%CO_{2out}$	Pourcentage de CO_2 dans les gaz en sortie du réacteur	%
$\%N_{2in}$	Pourcentage de N_2 dans l'air d'entrée du réacteur	%
$\%N_{2out}$	Pourcentage de N_2 dans les gaz en sortie du réacteur	%
$\%O_{2in}$	Pourcentage d'O_2 dans l'air d'entrée du réacteur	%
$\%O_{2out}$	Pourcentage d'O_2 dans les gaz en sortie du réacteur	%

VARIABLES GRECQUES

α_P	Facteur de couplage entre μ et q_P	-
α_G	Facteur de couplage entre μ et q_G	-
β_G	Facteur de découplage : vitesse spécifique de production de glycérol à μ = 0	$g.g_X^{-1}.h^{-1}$
β_P	Facteur de découplage : vitesse spécifique de production d'éthanol à μ = 0	$g.g_X^{-1}.h^{-1}$
γ_1	Constante du facteur de découplage pour la production d'éthanol	$g.g_X^{-1}.h^{-1}$
γ_2	Constante du facteur de découplage pour la production d'éthanol	$g.g_X^{-1}.h^{-1}$
γ_3	Constante du facteur de découplage pour la production de glycérol	$g.g_X^{-1}.h^{-1}$
γ_4	Constante du facteur de découplage pour la production de glycérol	$g.g_X^{-1}.h^{-1}$
$\gamma_{acétate}$	Degré de réduction de l'acide acétique	-
$\gamma_{éthanol}$	Degré de réduction de l'éthanol	-
γ_G	Degré de réduction du glycérol	-
γ_{O_2}	Degré de réduction de l'oxygène	-
$\gamma_{pyruvate}$	Degré de réduction de l'acide pyruvique	-
γ_S	Degré de réduction du glucose	-
$\gamma_{succinate}$	Degré de réduction de l'acide succinique	-
γ_X	Degré de réduction de la biomasse	-
χ	Paramètre à déterminer (optimisation)	
μ	Taux de croissance	h^{-1}
μ_{max}	Taux de croissance maximal	h^{-1}
θ_1	Constante dans l'expression de μ_{max}	°C
θ_2	Constante dans l'expression de μ_{max}	°C
θ_3	Constante dans l'expression du $P_{critique}$	°C
ν_{exp}	Données expérimentales	
ν_{sim}	Données simulées	

INDICES

1	Relatif au réacteur 1 : lieu de la fermentation
2	Relatif au réacteur 2 : lieu de la mutagénèse
m	Relatif au mutant

ABREVIATIONS

ADN	Acide désoxyribo-nucléique
CO_2	Dioxyde de carbone
EMS	Ethyl méthane sulfonate
gTME	Global transcription machinery engineering
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography (Chromatographie Liquide Haute Performance)
Mcell	Million de cellules
MNNG	*N*-Méthyl-*N*'-Nitro-*N*-Nitrosoguanidine
NaCl	Chlorure de sodium
O_2	Dioxygène
pert (1, 2, 3)	Perturbation (1, 2 ou 3)
Q_R	Quotient respiratoire
R1	Réacteur 1 : lieu de la fermentation
R2	Réacteur 2 : lieu de la mutagénèse
RP	Régime permanent
rpm	Round per minute – Rotations par minute
UV	Ultra-violets
VVM	Volume de gaz injecté par unité de liquide (L) par minute
wt	Wild type : souche sauvage

UNITES

%	Pourcentage
°C	Degré celsius
g	Gramme
h	Heure
L	Litre
min	Minute
mol	Mole
M	Molaire
s	Seconde
W	Watt

ABSTRACT :

Under industrial constraints, microorganisms are exposed to various stresses, due to their cultivation in large scale bioreactor, altering their viability and the performances of bioprocesses. Fluctuations in physico-chemical parameters (temperature, pH, ...) are responsible for this reduction in fermentation efficiency. This Ph.D project intends to improve the robustness of an industrial ethanol producer *Saccharomyces cerevisiae* strain under heat stress, in order to improve its industrial production of bio-ethanol under temperature fluctuating environment. The strategy of this project is to obtain a mutant more tolerant than the wild type strain to heat stress, possessing a lower death rate. An original continuous culture reactor has been designed, coupling UV mutagenesis (generating genetic modifications) and selection pressure (temperature) to select the most robust variant. A phenomenological model was proposed to simulate microbial kinetics based on the monitoring strategy of the chemostat and to optimize the operating conditions necessary for the generation of variants. This dynamic model involves the impact of the temperature on the kinetics of growth, cell death and ethanol production in *Saccharomyces cerevisiae*. These kinetics were experimentally quantified as a function of the temperature and the UV treatment. Continuous cultures were carried out under the simulated conditions and some variants were characterized in very high ethanol performance fermentations in terms of growth, death and production performances. This strategy allowed us to select a variant possessing a better thermal robustness characterized by a lower death rate than the wild type strain under heat stress. However, the reduction of the death rate did not translate into better ethanol production performances.

KEY WORDS :

Ethanolic fermentation - *Saccharomyces cerevisiae*– Temperature - Heat stress – Cell viability / death –Dynamic response – Physiological state – Strain adaptation / Evolution – UV mutagenesis – Phenotypical changes – Tolerance improvement – Dynamic model – Glycerol

AUTEUR : Emilie Amillastré

TITRE : Amélioration de la robustesse de souches de levures aux stress technologiques par une stratégie de génie microbiologique. Application à la production industrielle de bio-éthanol à partir de matières premières agricoles

DIRECTEURS DE THESE : Stéphane Guillouet, Sandrine Alfenore

LIEU ET DATE DE SOUTENANCE : INSA de Toulouse, le 16 Juillet 2012

RESUME :

Sous contraintes industrielles, les micro-organismes sont soumis à différents stress technologiques, liés à leur culture en réacteur de grande taille, altérant leur viabilité et les performances des procédés. Les fluctuations des paramètres physico-chimiques (température, pH, …) sont responsables de cette baisse d'efficacité de la fermentation. Afin de contribuer à l'intensification des performances des procédés de production de bio-éthanol, ce projet de thèse propose d'améliorer la robustesse d'une souche industrielle de *Saccharomyces cerevisiae* productrice d'alcool vis-à-vis d'un stress environnemental : la température. La stratégie générale de ce projet réside dans l'obtention d'un mutant plus tolérant que la souche sauvage au stress appliqué par abaissement de son taux de décès. Un pilote original de culture en continu a été mis en place, couplant mutagénèse aux UV, générant des modifications génétiques et pression de sélection par des variations de température, permettant la sélection des variants les plus robustes. Un modèle phénoménologique a été développé afin de simuler les cinétiques microbiennes selon le mode de conduite du pilote et d'optimiser les conditions de fonctionnement nécessaires à l'obtention des futurs variants. Ce modèle cinétique fait intervenir l'influence de la température sur les cinétiques de croissance, de décès cellulaire et de production d'éthanol chez *Saccharomyces cerevisiae.* Ces cinétiques ont été quantifiées expérimentalement en fonction de la température et des traitements de mutagénèse par UV. Grâce aux conditions obtenues par simulation, des cultures en mode continu ont été réalisées et des variants obtenus ont été caractérisés, en condition de production intensive d'éthanol, sur la base de leurs performances en termes de croissance, de décès et de capacités fermentaires. Cette stratégie a permis de sélectionner un variant possédant une meilleure robustesse vis-à-vis de la température, caractérisé par un taux de décès plus faible que celui de la souche sauvage. Néanmoins ce variant ne se caractérise pas par de meilleures performances fermentaires.

MOTS CLES :
Fermentation éthanolique - *Saccharomyces cerevisiae* – Température - Stress thermique – Viabilité / Décès cellulaire – Réponses dynamiques – Etat physiologique – Adaptation / Evolution de souches– Mutagénèse aux UV – Modifications phénotypiques – Amélioration de la tolérance – Modèle cinétique dynamique - Glycérol

---

DISCIPLINE ADMINISTRATIVE : Ingénieries Microbienne et Enzymatique

---

INTITULE ET ADRESSE DU LABORATOIRE :
Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés (LISBP)
UMR5504 CNRS/INSA, UMR792 INRA/INSA
Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse, 135 Avenue de Rangueil, 31077 Toulouse Cedex 4