LIED Laboratoire Interdisciplinaire des Energies de Demain

Université Paris Cité

IFF

UNIVERSITÉ PARIS CITÉ

École doctorale n°563 : Médicament, Toxicologie, **C**himie, **I**mageries (MTCI)

Laboratoire **I**nterdisciplinaire des Énergies de Demain (LIED UMR 8236)

International **F**lavors and **F**ragrances (IFF)

Thèse de Doctorat en Microbiologie

Contrôle du cycle de reproduction asexuée de *Penicillium camemberti* pour influencer la production de conidies en milieu liquide : du laboratoire à l'industrie

---

Présentée par **Aymeric PARADIS**

Dirigée par **Philippe SILAR** et **Valérie GAUTIER**

Soutenue publiquement le **23 juin 2025** devant un jury composé de :

Mélanie MOREL-ROUHIER, Pr	Université de Lorraine	**Rapportrice**
Jean-Luc JANY, MCF-HDR	Université de Bretagne Occidentale	**Rapporteur**
Florence CHAPELAND-LECLERC, Pr	Université Paris Cité	**Examinatrice**
Fadhel BEN CHAABANE, PhD-HDR	IFP Énergies Nouvelles	**Examinateur**
Valérie GAUTIER, IR-ADT	Université Paris Cité	**Co-directrice de thèse**
Philippe SILAR, Pr	Université Paris Cité	**Directeur de thèse**
Nicolas HARDY, PhD	*International Flavors and Fragrances*	**Membre invité**

Résumé

Titre : Contrôle du cycle de reproduction asexuée de *Penicillium camemberti* pour influencer la production de conidies en milieu liquide, du laboratoire à l'industrie

Mots-clés : *Penicillium camemberti*, conidiation, morphologie, carbone, transcriptomique, bioréacteur, fermentation liquide

Résumé : La particularité des fromages traditionnels français de type Camembert ou Brie, appelés fromage à pâte molle et à croûte fleurie, est que leur affinage nécessite un ensemencement de spores d'un champignon filamenteux appelé *Penicillium camemberti*, qui va apporter les saveurs et textures à ces fromages. Ces spores, appelées conidies, sont à la base du cycle de reproduction asexuée de cette moisissure, qui produit de nouvelles conidies à partir du mycélium issu de la germination des premières conidies, via des structures spécialisées appelées conidiophores. Les industries en biotechnologie utilisent ce cycle pour produire massivement des conidies en fermentation liquide, qui seront ensuite vendues comme ferment d'affinage. L'induction de la conidiation en milieu liquide est multifactorielle, tout comme l'acquisition de la macromorphologie du mycélium. Dans cette étude, un premier travail exploratoire a permis de caractériser l'influence de différents paramètres de culture à l'échelle de la fiole. Le taux d'ensemencement, l'agitation, la concentration ainsi que la source de carbone, impactent non seulement la morphologie de *P. camemberti*, mais également sa capacité à produire des conidies et de la biomasse. La morphologie en *pellets* a été corrélée à une absence de production de conidies, alors qu'une morphologie dispersée était indispensable à la conidiation, mais pas suffisante. Dans un second temps, une étude transcriptomique a permis d'explorer l'influence de la concentration et de la source de carbone sur l'expression des gènes, en particulier ceux de la voie de la conidiation. Des différences de régulation ont été observées selon la macromorphologie adoptée, et un potentiel facteur de transcription répresseur de la conidiation, spécifique aux *Eurotiales*, a été identifié. Enfin, une dernière étude a permis d'extrapoler en bioréacteurs les observations faites au cours des culture en fioles. Les effets des sources de carbone ont été confirmés par ce changement d'échelle, en particulier le rôle inhibiteur du saccharose sur la conidiation en bioréacteur. La production de conidies en présence de glucose a été mesurée comme dix fois plus élevée en bioréacteur pilote qu'en Fernbach ou en bioréacteur de laboratoire, suggérant que cette montée d'échelle a levé un élément limitant à la production de conidies.

Abstract

Title: Control of the asexual reproduction cycle of *Penicillium camemberti* to influence the production of conidia in liquid media, from the laboratory to industry

Keywords: *Penicillium camemberti*, conidiation, morphology, carbon, transcriptomics, bioreactor, submerged fermentation

Abstract: The uniqueness of traditional French cheeses like Camembert or Brie, known as soft-ripened cheeses, lies in their aging process, which requires the inoculation of spores from a filamentous fungus called *Penicillium camemberti*. These spores, known as conidia, are at the core of the asexual reproduction cycle of this mold, producing new conidia from the mycelium that emerges from the germination of the initial conidia through specialized structures called conidiophores. Biotechnology industries utilize this cycle to mass-produce conidia in submerged fermentation, which are then sold as ripening cultures. Conidiation induction in liquid media is multifactorial, as is the acquisition of the mycelium's macromorphology. In this study, an initial exploratory work characterized the influence of various culture parameters at the flask scale. The inoculation rate, agitation, concentration, and carbon source not only impact the morphology of *P. camemberti*, but also its ability to produce conidia and biomass. Under specific conditions, pellets morphology was correlated with an absence of conidia production, whereas dispersed morphology was essential for conidiation, though not always sufficient. Subsequently, a transcriptomic study explored the influence of concentration and carbon source on gene expression, particularly those in the conidiation pathway. Regulatory differences were observed based on the adopted macromorphology, and a potential conidiation repressor transcription factor specific to *Eurotiales* was identified. Finally, a final study allowed us to extrapolate the observations made during flask cultures to bioreactors. The effects of carbon sources were confirmed by this change in scale, in particular the inhibitory role of sucrose on conidiation in the bioreactor. Conidia production in the presence of glucose was measured as ten times higher in the pilot bioreactor than in the Fernbach or laboratory bioreactor, suggesting that this scale-up removed a limiting element to conidial production.

Remerciements

Tout d'abord, je souhaiterais remercier les membres du jury, Mélanie Morel-Rouhier, Jean-Luc Jany, Florence Chapeland-Leclerc et Fadhel Ben Chaabane, d'avoir accepté et pris le temps d'évaluer mon travail.

Tout au long de ces trois ans et demi de stage de M2 et de thèse, j'ai eu la chance de côtoyer ces deux mondes, académique et entreprise, et de rencontrer tant de personnes qui m'ont accompagné et aidé, de manières diverses, à réaliser ces travaux. Je vais peut-être malheureusement en oublier certains, je vous prie de m'en excuser. Ces remerciements auraient mérité un chapitre entier.

Philippe, merci pour votre accueil au sein de l'équipe et pour votre accompagnement durant ces années. Votre vision et votre optimisme m'ont souvent beaucoup apaisé, même si, comme vous le disiez, c'était « votre métier ». Vous m'avez permis d'évoluer et de grandir dans un environnement très rassurant pour débuter ma vie professionnelle. Merci de m'avoir offert cela.

Valérie, merci pour ton encadrement au quotidien, ta disponibilité et ces milliers d'heures que tu m'as consacrées. Tu m'as donné un cadre, mais surtout une organisation (papier-crayon…) qui me faisait parfois défaut. Merci surtout pour ta bonne humeur et ta bienveillance. Je n'avais pas l'impression de travailler quand je venais au laboratoire grâce à toi.

Nicolas, merci pour ta générosité, tout ce temps que tu m'as donné et tout ce que tu m'as appris, aussi bien d'un point de vue professionnel que personnel. Des visites d'usines aux tutos réparation auto, merci de m'avoir guidé dans des environnements qui m'étaient parfois peu familiers. Ta créativité sans limites restera une grande source d'inspiration. Merci pour tout.

Plus globalement, merci à tous les trois d'avoir rendu cette thèse plus simple. Vous avez toujours agi dans mon intérêt, en facilitant toujours les démarches, avec une séparation du temps quasi parfaite entre les deux entités. Je mesure la chance que j'ai eue d'avoir pu profiter de cet environnement, tant de proches ayant fait une thèse aurait rêvé d'avoir ce contexte.

Wanda, merci infiniment d'avoir rendu cette aventure possible, et de l'avoir suivi et soutenu de si près, même dans ces aspects les plus techniques. Je sais que tu as dû te battre et forcer le destin pour que j'en sois là. Je t'en serai toujours reconnaissant.

J'en profite pour remercier Annie Mornet pour son soutien de longue date. Et je remercie également Sebastian Stahl pour son appui, au cours de ma thèse et pour la suite des évènements.

Avant de remercier mes collègues et amis, je tiens à remercier l'Association Nationale de la Recherche et de la Technologie de m'avoir accordé ce financement CIFRE, qui m'a permis de les connaitre et de vivre tout cela.

Christophe, merci pour tout ce que tu m'as appris et tout le temps que tu as passé sur ce projet transcriptomique. Tes blagues (Monique, les biquettes) et tes offrandes alimentaires me manqueront. Merci à Sylvie pour sa gentillesse et son aide technique, ainsi qu'à Aurélien pour sa sympathie et pour avoir pris la relève.

Annabelle, merci pour ta bonne humeur et pour le temps que tu as passé à m'expliquer et à me réexpliquer le montage des bioréacteurs, je n'ai pas été le meilleur des élèves (la stérilité était un concept flou…) mais j'y suis arrivé grâce à toi. Merci Patrick pour nos discussions et le partage de ton expérience. Merci à toi et à Alexia pour votre aide dans les expériences de la dernière chance, grâce à vous mon manuscrit a encore plus d'allure.

Merci à la plateforme Biomics de l'Institut Pasteur, et particulièrement à Yakov Vitrenko pour nos échanges. Merci à Nadim Kassis de BFA pour ses nombreux conseils sur ces extractions d'ARN qui m'ont posé bien des problèmes. Merci à Lisa et à Audrey pour leur fastidieux travail en analyse HPLC.

Je souhaiterais également remercier les membres de mon Comité de Suivi de thèse, Françoise, Fadhel et Emmanuel Coton pour leur suivi et leurs conseils avisés durant ces trois années.

Pour poursuivre, je souhaiterais remercier l'ensemble de mes collègues du LIED de faire de ce laboratoire un lieu extraordinaire dans lequel je me suis pleinement épanoui grâce à eux. Je remercie l'ancien directeur Mathieu Arnoux pour son accueil. Honneur aux membres des équipes champignons, je remercie chaleureusement Émilie de m'avoir accueilli à mes débuts en stage, Roselyne pour son humour (et son lecteur de plaque), Éva pour nos discussions passionnées sur la nature humaine, Narumon pour sa gentillesse, ainsi que Florence, Gwenaël, Hervé et Sylvain, pour leur sympathie et leur accompagnement à Asilomar. Je souhaiterais également remercier Catherine J et Névada pour leur grande aide, ainsi que Aurélie, Catherine V, Delphine, Éric, François, Fred et Sabina pour l'ensemble des moments de convivialité que j'ai eu la chance de partager avec eux.

Pour continuer, je voudrais remercier le président de Danisco France Christophe Salagnad ainsi que le directeur du site de Dangé-Saint-Romain Olivier Le-Lièvre pour leur accueil. Je remercie les collègues de l'ensemble des services du site. Un grand merci à Valéria de m'avoir accueilli durant plus d'un an. Sans suspens, je vais bien évidemment remercier l'ensemble de mes collègues du BDC, en plus de ceux que j'ai déjà cités. Merci mille fois pour votre accueil et votre solidarité, vous m'avez tous aidé d'une façon ou d'une autre, je ne l'oublierai pas. Je sais que vous avez l'esprit de compétition, mais pour une fois il n'y aura pas de classement, je vais vous citer par ordre alphabétique (je ne veux pas de problèmes à mon retour…). J'adresse donc un immense merci à Adrien, Amélie, Damien, Élisabeth, Ekoué, Flora, Françoise L, Françoise R, Frédéric, Gaëlle, Geoffrey Ba, Geoffrey Bo, Isabelle, Laura, Léa, Nicolas N, Pauline, Salomé, Sébastien, Stéphanie, Sylvie, Valérie C, Valérie L, Victor, Vincent et Yann. Merci pour tous ces bons moments passés à vos côtés, et des quelques dizaines de nouveaux sujets de thèse que vous avez trouvés pour me garder une centaine d'années.

Vous l'avez noté j'en ai volontairement oublié certains. Je voulais particulièrement remercier mes collègues du bureau Karaoké-Kebab et associés, Steven, Bernadett, Fabienne, et Luiz, pour les nombreuses playlists réalisées et les kilos qu'ils m'ont fait prendre.

Je vais évidemment finir avec mes amis du bureau 600, le canal historique. (T)hibault, (Cl)ara, Lucia et Paul, merci pour tout. Je sais qu'on se le dit dans tous nos remerciements de thèse respectifs, mais vous savez ce que je vous dois. Je suis l'avant-dernier à partir, et les « bons week-ends » du lundi dans ce bureau clafis de doctorants me manquaient déjà. Un grand merci à Xiaoyue, que j'ai été ravi de connaitre, à Elsa et Marta, à qui je pense fort dans leur « dernière ligne droite », à ma co-stagiaire de M2 Céline, à Huijuan, à Aurore. Merci à la relève méditerranéenne, Arthur, Luna et Domenico, pour votre soutien sur la fin de mon aventure. Merci à tous ceux que j'ai croisés au cours de ma thèse, Sarasvati, Sebastian, Redha, Pauline, ainsi que l'ensemble des stagiaires, particulièrement Camille et Imane, ainsi que Marvin et Ashley.

D'un point de vue plus personnel, merci à mes amis d'être là depuis tout ce temps. Merci à mon équipe depuis la Licence 1, quasiment 10 ans, mes amis Rébecca, Mélanie, Anaëlle, Sophia, Shana, Joana, Luc et Salah. Merci à mes amis du lycée, Benoît, Estelle et Benjamin, depuis presque 15 ans. Merci d'être toujours là.

Encore plus personnel, merci à ma famille, ma mère Patricia, mon père Michel, et ma sœur Adé, pour leur présence et leur soutien sans faille.

Avant-propos

Ces travaux de thèse ont été financés dans le cadre d'une Convention Industrielle de Formation par la Recherche (CIFRE) avec l'Agence Nationale de la Recherche et de la Technologie (ANRT).

Ils sont le fruit d'une collaboration entre le Laboratoire Interdisciplinaire des Énergies de Demain (LIED) de l'Université Paris Cité, et l'entreprise Danisco France SAS appartenant au groupe International Flavors and Fragrances (IFF).

Cette collaboration a débuté lors de mon stage de Master 2 de janvier à juin 2021, et s'est poursuit au cours de ma thèse d'avril 2022 à juin 2025.

L'étude préliminaire des différents facteurs ainsi que l'étude transcriptomique, objet d'un article soumis en avril 2025, ont été réalisées au LIED à Paris (75). L'étude de changement d'échelle a été réalisée au sein du site de Danisco à Dangé-Saint-Romain dans la Vienne (86).

Table des matières

Résumé i
Abstract ii
Remerciements iii
Avant-propos vi

Table des matières 1
Index des figures 4
Index des tables 8
Abréviations 10

1. Chapitre 1 – État de l'art 13
   1.1 Fromages et Microbiologie 13
      1.1.1 Origine et définition 13
      1.1.2 Fabrication du fromage 16
      1.1.3 Diversité des champignons du fromage 18
   1.2 Étude du genre Penicillium et de l'espèce Penicillium camemberti 22
      1.2.1 Biologie des *Penicillium* 22
      1.2.2 Spécificités de *Penicillium camemberti* 26
   1.3 Reproduction des champignons filamenteux 30
      1.3.1 Germination et croissance 30
      1.3.2 Reproduction sexuée 31
      1.3.3 Développement asexué 31
   1.4 Production de conidies de *Penicillium* en milieu liquide 43
      1.4.1 Procédés de production des champignons filamenteux 43
      1.4.2 Induction de la conidiation en milieu liquide 46
      1.4.3 Morphologies en fermentation submergée 47

Objectifs de l'étude 52

2. Chapitre 2 – Matériels & méthodes 55
2.1 Dispositifs expérimentaux 55
2.1.1 Fioles d'Erlenmeyer et de Fernbach 56
2.1.2 Bioréacteurs de laboratoire 57
2.1.3 Bioréacteur pilote 60
2.2 Conditions de culture et facteurs testés 61
2.2.1 Souche et ensemencement 61
2.2.2 Milieux de culture 61
2.2.3 Agitation et aération 62
2.2.4 Grandeurs caractéristiques du mélange 63
2.2.5 Autres paramètres 66
2.3 Analyses des critères de fermentation 66
2.3.1 Observations des macromorphologies et micromorphologies 66
2.3.2 Mesure du poids sec 67
2.3.3 Mesure de la conidiation 67
2.3.4 Mesure du pH et de la pO_2 67
2.3.5 Mesure de la concentration en sucres, en acides aminés et en acides organiques 67

3. Chapitre 3 – Étude transcriptomique 69
Avant-propos 69
3.1 Introduction 74
3.2 Materials and Methods 76
3.2.1 Strain and culture conditions 76
3.2.2 Observation of morphology, production of conidia and biomass 76
3.2.3 RNA extraction 77
3.2.4 RNA sequencing data analysis 78
3.3 Results and discussion 78
3.3.1 Design of the experimental set-up 78
3.3.2 RNA-seq analysis of carbon sources impact on *P. camemberti* submerged cultures 80
3.3.3 Comparison of gene expression over time in 10 $g \cdot L^{-1}$ glucose medium 82
3.3.4 Comparison of 20 $g \cdot L^{-1}$ glucose vs 10 $g \cdot L^{-1}$ glucose 83
3.3.5 Comparison of 10 $g \cdot L^{-1}$ sucrose vs 10 $g \cdot L^{-1}$ glucose 87
3.4 Conclusion 92
Supplementary data 107

4. Chapitre 4 – Automatisation du comptage des conidies 111
4.1 Problématiques posées par les méthodes traditionnelles 111
4.2 Description de l'algorithme et preuve de concept 113
4.3 Mise en place de la méthode 115
4.4 Algorithme Python du comptage automatisé des conidies 117

5. Chapitre 5 – Extrapolation multi-échelles 119
5.1 Introduction 119
5.2 Résultats 120
5.2.1 Passage de la fiole d'Erlenmeyer à la fiole de Fernbach 120
5.2.2 Passage de la fiole au bioréacteur de laboratoire 126
5.2.3 Expérience en bioréacteur pilote 131
5.3 Discussion 139
Données supplémentaires 141

6. Chapitre 6 – Discussion générale et perspectives 143
6.1 Utilité du modèle en fiole et améliorations possibles 143
6.2 Quel mécanisme pour l'influence des sucres sur la production de conidies ? 146
6.3 Modification génétique pour augmenter la production de conidies 148

Références 150

Index des figures

Fig. 1 *Peinture murale du Temple d'Isis de Pompéi datant du début de l'Empire Romain, représentant des faisselles en vannerie remplies de fromage blanc.* *14*
Fig. 2 *Différentes classifications des fromages.* *16*
Fig. 3 *Étapes générales de la fabrication des fromages.* *17*
Fig. 4 *Phylogénie des Dikarya.* *19*
Fig. 5 *Phylogénie des Ascomycota présents dans les fromages.* *20*
Fig. 6 *Phylogénie des Ascomycota.* *22*
Fig. 7 *Fréquence des groupes de mots Penicillium candidum et Penicillium camemberti dans la base de données textuelles des livres scannées de Google Books depuis 1800.* *26*
Fig. 8 *Représentation schématique des relations entre P. camemberti et ses plus proches parents, P. biforme et P. fuscoglaucum.* *28*
Fig. 9 *Impact de la croissance de P. camemberti sur le métabolisme au cours de l'affinage d'un fromage à pâte molle et à croûte fleurie.* *29*
Fig. 10 ***(A)*** *Activité transcriptionnelle au sein d'une conidie lors de sa maturation après la phase de dormance (**B**) Processus de croissance et de sécrétion des protéines à l'apex d'une hyphe.* *30*
Fig. 11 *Cycle de reproduction asexuée chez les espèces de Penicillium, avec des images de P. camemberti (souche PC01 de la collection de IFF).* *32*
Fig. 12 *Comparaison entre les conidiophores des genres Neurospora, Aspergillus et Penicillium.* *34*
Fig. 13 *Stades morphologiques de Penicillium cyclopium en culture liquide au cours du temps.* *36*
Fig. 14 *Voie centrale du développement.* *38*
Fig. 15 *Régulations de la conidiation et de la croissance végétative chez les espèces d'Aspergillus et de Penicillium.* *40*
Fig. 16 *Représentation scénique de la fermière Marie Harel effectuant l'étape de moulage des Camembert à gauche, et de l'affinage des Camembert à droite.* *43*
Fig. 17 *Schéma des différentes macromorphologies et exemples d'images en microscopie de A. niger en fermentation submergée.* *47*
Fig. 18 *Mécanismes de formation des morphologies en pellets et dispersée.* *48*
Fig. 19 *Modèle théorique de la formation de produit en fonction de la morphologie des pellets chez A. niger.* *49*
Fig. 20 *Stratégies d'ingénierie morphologique.* *50*

Fig. 21 *Présentations des différents dispositif expérimentaux.* *55*
Fig. 22 *Dimensions des fioles d'Erlenmeyer et de Fernbach.* *56*
Fig. 23 *(**A**) Pièce de culture pour les fermentations en fioles au LIED, avec les deux plateaux agités (**B**) Kitronik Air Quality Control HAT et paramètres mesurés.* *57*
Fig. 24 *Bioréacteur Labfors 5 de 3,6 L.* *58*
Fig. 25 *Photographie de l'axe d'agitation avec les quatre mobiles.* *60*
Fig. 26 *(**A**) Photographie du bioréacteur de 80.0 L (**B**) Turbine HTGP4.* *61*

Fig. 27 *Photographies macroscopiques des différences de macromorphologie en fonction de la concentration initiale en glucose.* *69*
Fig. 28 *Observations microscopiques du mycélium et des conidies au cours du temps en condition de morphologie dispersée.* *70*
Fig. 29 *Ratio de conidiation à 140h en fonction du poids sec mesurés à 140h pour différentes sources de carbone.* *71*
Fig. 30 *Production de conidies ou de biomasse en fonction de la nature ou de la concentration de la source de carbone.* *72*
Fig. 31 *Effect of carbon sources on mycelium morphology, dry weight and conidia production at 48h, 96h and 140h.* *80*
Fig. 32 *PCA analysis of RNA-seq data obtained from mycelium cultured at 48h, 96h, and 140h in the four indicated nutritional conditions.* *81*
Fig. 33 *Quantification of differentially expressed genes over time for the 10 g·L^{-1} glucose condition.* *83*
Fig. 34 *Quantification of differentially expressed genes between 20 g·L^{-1} and 10 g·L^{-1} glucose conditions at 48h and 96h.* *84*
Fig. 35 *Bubble plot of the significantly enriched Gene Ontology (GO) terms for the differentially expressed genes between 20 g·L^{-1} and 10 g·L^{-1} glucose conditions at 48h on the left and 96h on the right* *86*
Fig. 36 *Putative conidiation pathway in P. camemberti with comparison at 48h of the genes differently expressed in 20 g·L^{-1} glucose vs 10 g·L^{-1} glucose* *87*
Fig. 37 *Quantification of differentially expressed genes between 10 g·L^{-1} sucrose and 10 g·L^{-1} glucose conditions at 48h and 96h.* *88*
Fig. 38 *Bubble plot of the significantly enriched Gene Ontology (GO) terms for the differentially expressed genes between 10 g·L^{-1} sucrose and 10 g·L^{-1} glucose conditions at 48h on the left and 96h on the right.* *89*

Fig. 39 *Volcano plots of differentially expressed genes between 10 g·L^{-1} mix glucose/fructose and 10 g·L^{-1} glucose or sucrose conditions at 48h and 96h..... 91*
Fig. 40 *Bubble plot of the significantly enriched Gene Ontology (GO) terms for the differentially expressed genes between 96h and 48h in 10 g·L^{-1} glucose condition..... 108*
Fig. 41 *Putative conidiation pathway in P. camemberti with comparison in 10 g·L^{-1} glucose condition of the genes differently expressed at 140h and 96h vs 48h..... 109*
Fig. 42 *Bubble plot of the significantly enriched Gene Ontology (GO) terms for the differentially expressed genes at 96h between 10 g·L^{-1} mix and 10 g·L^{-1} glucose conditions on the left, and between 10 g·L^{-1} mix and 10 g·L^{-1} sucrose conditions on the right..... 110*

Fig. 43 *Schémas des grilles des cellules de comptage utilisées, à gauche la cellule de Malassez, à droite la cellule de Bürker..... 112*
Fig. 44 *Captures des images des intersections de la cellule de Bürker, afin de tester l'algorithme Python et les fonctions de traitements d'images..... 114*
Fig. 45 *Différence de comptage pour deux exemples d'intersection..... 114*
Fig. 46 *Présentation des outils pour la mise en place de l'algorithme au laboratoire..... 115*
Fig. 47 *Moyenne du nombre de conidies comptées en fonction du nombre d'images capturées..... 116*

Fig. 48 *Macromorphologie en fioles d'Erlenmeyer et de Fernbach à des concentrations initiales de 2·10^{4}, 2·10^{5}, 2·10^{6} et 2·10^{7} conidies·mL^{-1} après 140h de culture à 180 tr·min^{-1} en milieu glucose 10 g·L^{-1}..... 120*
Fig. 49 *Observations microscopiques à 48h en présence d'une morphologie dispersée (**A**) en Erlenmeyer et (**B**) en Fernbach..... 121*
Fig. 50 *(**A**) Mesures des ratios de conidiation et des poids secs finaux en fonction du type de fiole, du taux d'ensemencement et du sucre initial. (**B**) Mesures du pH pour ces mêmes conditions..... 124*
Fig. 51 *(**A**) Effet de l'agitation sur la macromorphologie en bioréacteur de laboratoire (**B**) Effet de l'aération et de l'agitation en bioréacteur sur la pO_2 (en %)..... 127*
Fig. 52 *Observations microscopiques à 48h en présence d'une culture homogène en bioréacteur de laboratoire (3,6 L)..... 129*
Fig. 53 *Mesures des ratios de conidiation et des poids secs finaux en fonction du type de fiole et du sucre initial..... 129*
Fig. 54 *Micromorphologie en bioréacteur pilote entre 36h et 48h de culture, observations de conidiophores complexes à gauche, et d'un microcycle à droite..... 132*

Fig. 55 *Dynamique du poids sec et de la concentration en sucre du milieu au cours de la culture de PC01 en bioréacteur pilote en milieux (**A**) glucose 10 g·L^{-1} et (**B**) saccharose 10 g·L^{-1}..... 134*

Fig. 56 *Dynamique du ratio de conidiation et de la pO_2 au cours de la culture de PC01 en bioréacteur pilote en milieux (**A**) glucose 10 g·L^{-1} et (**B**) saccharose 10 g·L^{-1}..... 136*

Fig. 57 *Dynamique du ratio de conidiation et du pH au cours de la culture de PC01 en bioréacteur pilote en milieux (**A**) glucose 10 g·L^{-1} et (**B**) saccharose 10 g·L^{-1}..... 137*

Fig. 58 *Dynamique du pH et de la concentration en acide acétique dans le milieu au cours de la culture de PC01 en bioréacteur pilote en milieux (**A**) glucose 10 g·L^{-1} et (**B**) saccharose 10 g·L^{-1}. 138*

Fig. 59 *Reproductibilité des mesures en ligne de la pO_2 pour six expérimentations distinctes en bioréacteur de 3.6 L en conditions 500 tr·min^{-1}, 0.175 vvm et glucose 10 g·L^{-1}..... 141*

Fig. 60 *Comparaison des profils de pH en Fernbach et en bioréacteur pour un taux d'ensemencement de 2·10^6 conidies·mL^{-1}. 141*

Index des tables

Table 1 *Régulateurs connus de la voie centrale de la conidiation chez A. nidulans. 42*

Table 2 *Facteurs d'induction de la conidiation en milieu liquide. 46*

Table 3 *Diamètre et nombre de puissance des mobiles utilisés dans l'étude..... 64*

Table 4 *Evaluation of stirring speed, inoculation concentration, pH and light on mycelium macromorphology, presence or absence of conidiophores and conidia with 10 g·L^{-1} of glucose..... 96*

Table 5 *List of the most significantly enriched GO terms between 20 g·L^{-1} and 10 g·L^{-1} glucose conditions at 48h, with the number of genes significantly differentially expressed, the number of genes significantly differentially expressed by at least a twofold ratio, and the top 5 of these genes upregulated or downregulated. 97*

Table 6 *List of the most significantly enriched GO terms between 20 g·L^{-1} and 10 g·L^{-1} glucose conditions at 96h, with the number of genes significantly differentially expressed, the number of genes significantly differentially expressed by at least a twofold ratio, and the top 5 of these genes upregulated or downregulated. 99*

Table 7 *Differences in expression of genes involved in the conidiation and vegetative growth pathways between 20 g·L^{-1} glucose or 10 g·L^{-1} sucrose or 10 g·L^{-1} mix glucose + fructose vs 10 g·L^{-1} glucose at 48h. 101*

Table 8 *List of all genes differentially expressed between 10 g·L^{-1} sucrose and glucose at 48h, compared to the differential expression between 20 g·L^{-1} and 10 g·L^{-1} glucose, and between 10 g·L^{-1} mix and glucose, associated with the most significantly enriched GO terms..... 102*

Table 9 *List of all genes differentially expressed between 10 g·L^{-1} sucrose and glucose at 96h, compared to the differential expression between 20 g·L^{-1} and 10 g·L^{-1} glucose, and between 10 g·L^{-1} mix and glucose, associated with the most significantly enriched GO terms..... 104*

Table 10 *List of all genes differentially expressed between 10 g·L^{-1} mix and glucose at 48h, compared to the differential expression between 20 g·L^{-1} and 10 g·L^{-1} glucose, and between 10 g·L^{-1} sucrose and glucose. 105*

Table 11 *List of all genes differentially expressed between 10 g·L^{-1} mix and sucrose at 48h, compared to the differential expression between 10 g·L^{-1} mix and 20 g·L^{-1} glucose, and between 10 g·L^{-1} mix and glucose. 106*

Table 12 *Carbohydrates (g·L^{-1}) and amino acids (mg·kg^{-1}) concentrations in the medium as a function of nutrient conditions at 0h, 48h, 96h and 140h of culture. 107*

Table 13 *Macromorphologies observées en Erlenmeyer et en Fernbach en fonction du taux d'ensemencement et de la puissance dissipée par unité de volume (dépendante de l'agitation).* *122*
Table 14 *Aspect de la culture, ratio de conidiation final et poids sec final en fonction de l'agitation et de l'aération, paramètres influençant la puissance dissipée.* *128*
Table 15 *Aspect de la culture, ratio de conidiation final et poids sec final en fonction de l'échelle de la fermentation.* *132*
Table 16 *Détermination du nombre de Reynolds en fioles et en bioréacteur pour les niveaux d'agitation et d'aération standard.* *142*
Table 17 *Calculs des puissances dissipées par unité de volume en bioréacteur, en fonction de la vitesse d'agitation et de l'aération.* *142*

Abréviations

ARE	*AbaA response element*	Élément de réponse *AbaA*
BRE	*BrlA response element*	Élément de réponse *BrlA*
CCR	*Carbon catabolite repression*	Répression catabolique du carbone
CDP	*Central Developmental Pathway*	Voie centrale du développement
CPA	*Cyclopiazonic acid*	Acide cyclopiazonique
CXS	Codex Alimentarius	/
ESID	*Extracellular sporulation inducing factor*	Facteur extracellulaire d'induction de la sporulation
FAO	*Food and Agriculture Organization*	Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture
GSI	*Glutamine synthetase I*	Glutamine synthétase I
HPLC	*High performance liquid chromatography*	Chromatographie en phase liquide à haute performance
ICPA	*International Commission on Penicillium and Aspergillus*	Commission Internationale des *Penicillium* et *Aspergillus*
IFF	*International Flavors & Fragrances*	/
ITS	*Internal transcribed spacer*	Espaceur interne transcrit
IUMS	*International Union of Microbiological Societies*	Union internationale des sociétés de microbiologie
MGM	*Genetically modified microorganisms*	Micro-organismes génétiquement modifiés
MPEC	*Microparticle-enhanced cultivation*	Culture assistée par microparticules
Nm^3	*Normal cubic meter*	Normo mètre cube
OGM	*Genetically modified organism*	Organismes génétiquement modifiés
OMS	*World Health Organization*	Organisation mondiale de la santé
Re	*Reynolds number*	Nombre de Reynolds
SmF	*Submerged fermentation*	Fermentation submergée
SNP	*Single nucleotide polymorphism*	Polymorphisme mononucléotidique
SSF	*Solid state fermentation*	Fermentation solide
Sp.	*Species*	Espèce
Subsp	*Subspecies*	Sous-espèce

TEFD	*Moisture on a fat-free basis*	Teneur en eau dans le fromage dégraissé
UDA	*Upstream Developmental Activators*	Activateurs du développement en amont
Var.	*Variety*	Variété
vvm	*Gas volumetric flow rate per unit volume of culture*	Débit volumétrique de gaz par unité de volume de milieu
WRE	*WetA response element*	Élément de réponse *WetA*

Chapitre 1

État de l'art

« *Un pays capable de donner au monde 360 fromages ne peut pas mourir* ».

Cette phrase, attribuée à Winston Churchill et prononcée durant l'Occupation de la France par l'Allemagne pendant la Seconde Guerre mondiale (Lortal, 2017), reflète la grande diversité des fromages produits en France. Elle est grande également à travers le monde, puisque selon les estimations, il existerait de 500 à plus de 1000 variétés en fonction des classifications (Sandine & Elliker, 1970; Burkhalter, 1981; Harbutt, 2015). Cette diversité est avant tout le fruit d'une longue histoire.

1.1 Fromages et Microbiologie

1.1.1 Origine et définition

1.1.1.1 Brève histoire du fromage

Fabriqué depuis la Préhistoire, il est communément admis que le fromage était utilisé pour conserver les principaux composants solides du lait. Les premiers produits laitiers fermentés datant vraisemblablement d'environ 6 000 av. J.-C. lors de la révolution agricole en Mésopotamie, avec la domestication des chèvres et des moutons (P. F. Fox et al., 2017; Scott et al., 1998). Ces produits ont pris rapidement une place importante dans l'alimentation humaine, et la fabrication du fromage s'est propagée durant l'Antiquité à travers les civilisations, puis au cours du Moyen-Âge avec les migrations des peuples en Europe, en particulier lors de déplacements de moines entre monastères. Les particularités locales, telles que l'espèce de l'animal laitier ou les pratiques d'approvisionnement en lait, ont forgé cette diversité de fromages. Ceux-ci ont évolué grâce aux contaminations accidentelles par différents micro-organismes au cours de la fabrication ou du stockage, ainsi qu'aux apports des migrations d'une région à une autre. Les fromages ont alors tiré leur nom de la ville, de la région, ou du monastère d'où ils provenaient, le Camembert par exemple, est originaire du village

éponyme dans l'Orne (61). Cette fabrication artisanale semble avoir peu changé de la chute de l'Empire Romain (**Fig. 1**) jusqu'au XIX^{ème} siècle, avec le début de l'industrialisation et l'ouverture des premières *cheese factories* à New York à partir de 1851, ainsi que la standardisation des procédés de production (P. F. Fox et al., 2017; Scott et al., 1998).



Fig. 1 *Peinture murale du Temple d'Isis de Pompéi datant du début de l'Empire Romain, représentant des faisselles en vannerie remplies de fromage blanc. Située au musée archéologique national de Naples (Croisille, 2015).*

Aujourd'hui, le fromage constitue un marché important, avec 23,2 millions de tonnes de fromage produites en 2023, contre 19 millions il y a dix ans. Les trois premiers producteurs sont l'Union Européenne, les Etats-Unis et le Brésil (International Dairy Federation, 2023). Cette quantité produite représente 35 à 40% de la production mondiale de lait (P. F. Fox et al., 2017), le lait constituant à lui seul près de 87% du coût de production, contre 1 à 2% seulement pour les ferments (Données clients IFF non publiées, 2020).

1.1.1.2 Définition et classifications

En 1963, l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) et l'Organisation mondiale de la santé (OMS) créent le Codex Alimentarius (CXS), un programme dont le but est d'élaborer et d'harmoniser les normes et codes d'usages alimentaires internationaux. L'idée est de protéger la santé des consommateurs, et de garantir des pratiques équitables dans le commerce alimentaire (Hickey, 2017). D'après la « norme générale pour le fromage » (Codex Alimentarius, 1978), le fromage est le produit résultant de la concentration des protéines du lait et/ou des matières issues du lait, comme la crème, la crème de lactosérum ou le babeurre. Cette concentration résulte de la coagulation des protéines, principalement la caséine, et de l'égouttage

partiel du lactosérum résultant de cette coagulation. Le fromage est donc un produit de consistance molle à extra-dure, frais ou affiné et potentiellement enrobé, dont le rapport protéines de lactosérum/caséine ne dépasse pas celui du lait (Codex Alimentarius, 1978).

Cette définition, qui laisse apparaître la grande diversité des fromages en termes d'arômes, de saveurs, de textures, ou de couleurs, rend cependant leur classification complexe. Il en existe de nombreuses, mais deux approches se distinguent particulièrement : d'une part l'approche « à l'anglosaxonne » avec un classement des variétés en fonction principalement des propriétés texturales, par exemple la classification de la FAO (**Fig. 2A**) ; d'autre part l'approche « latine » d'inspiration française et sud-européenne, basée sur les procédés technologiques de fabrication (Almena-Aliste & Mietton, 2014), comme la classification française de Lenoir et al., 1983 (**Fig. 2B**).

Ces classifications sont complémentaires, mais les facteurs linguistiques peuvent être source de confusion technique. Ainsi, si dans le modèle anglo-saxon de la FAO, l'appellation *soft cheese* est utilisée pour décrire l'ensemble des fromages ayant une consistance molle, incluant par exemple les *cream cheeses*. Sa traduction littérale française « fromage à pâte molle » désigne spécifiquement une technologie de fabrication sans pressage ni chauffage, qui concerne par exemple le Camembert ou le Roquefort. Dans un but commercial, et afin de s'adapter aux spécificités locales, l'entreprise Danisco (International Flavors & Fragrances) utilise un système de classification mixte en douze catégories (**Fig. 2C**) dans laquelle, par exemple, les termes *traditionnal soft cheese* et *stabilized soft cheese* correspondent bien aux fromages à pâte molle de la classification française, non pressés et non chauffés.

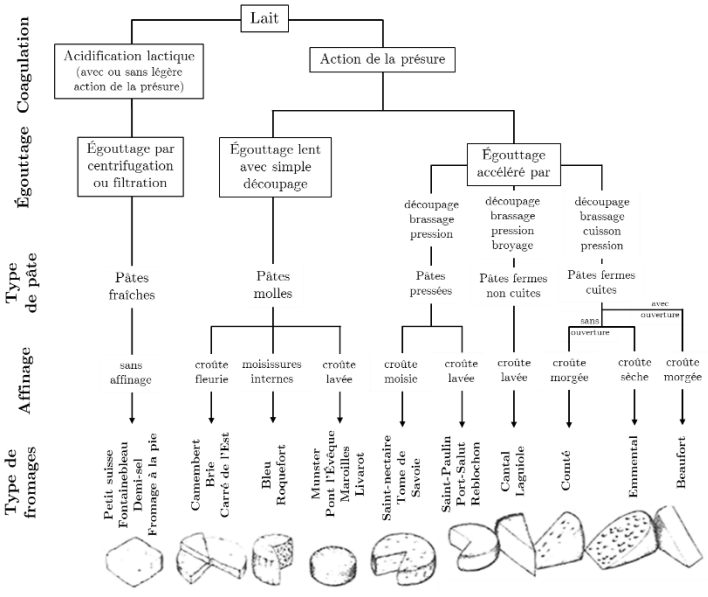
A

Dénomination de la FAO selon les caractéristiques de fermeté et d'affinage		
Critère 1 : Fermeté		**Critère 2 : Affinage**
TEFD*	Dénomination *en anglais* / en français	
< 51 %	*Extra hard cheese* / Pâte extra-dure	Affiné
49 – 56 %	*Hard cheese* / Pâte dure	Affiné aux moisissures
54 – 69 %	*Firm & Semi-hard cheese* / Pâte ferme et semi-dure	Non affiné ou frais
> 67 %	*Soft cheese* / Pâte molle	En saumure

*TEFD

$$= \frac{Poids\ de\ l'eau\ dans\ le\ fromage}{Poids\ total\ du\ fromage - matière\ grasse\ dans\ le\ fromage} \times 100$$

B



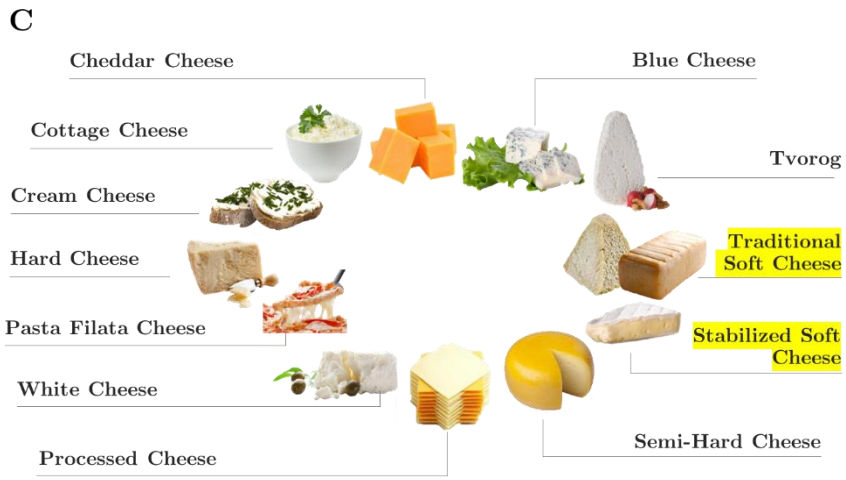


Fig. 2 *Différentes classifications des fromages (**A**) Classification à l'anglosaxonne de la FAO (Codex Alimentarius, 1978) avec la formule du pourcentage de la **t**eneur en **e**au dans le **f**romage **d**égraissé, nommée TEFD (**B**) Classification française de Lenoir et al., 1983 (**C**) Classification commerciale de Danisco, 2020.*

1.1.2 Fabrication du fromage

Pour produire un fromage spécifique, différents éléments doivent être définis, notamment les ingrédients, leurs proportions et leur qualité, les installations et les équipements nécessaires, le procédé précis avec les valeurs de pH et de températures nécessaires à chaque étape, et enfin les conditions de stockage et la durée de l'affinage (Scott et al., 1998).

1.1.2.1 Ingrédients

Le fromage est un produit assez simple, avec un nombre d'ingrédients autorisés restreint. Toujours d'après la norme générale pour le fromage (Codex Alimentarius, 1978), en plus des matières premières que sont le lait et les produits obtenus à partir du lait, seuls sont autorisés les cultures de micro-organismes, les enzymes, le sel et l'eau potable. Certains additifs alimentaires, tel que des colorants ou des régulateurs d'acidité, peuvent néanmoins être utilisés, mais uniquement dans des limites fixées.

1.1.2.2 Procédé de fabrication

La production de toutes les variétés de fromage suit un protocole généralement similaire (**Fig. 3**), dont les différentes étapes sont modifiées pour obtenir un produit aux caractéristiques souhaitées.

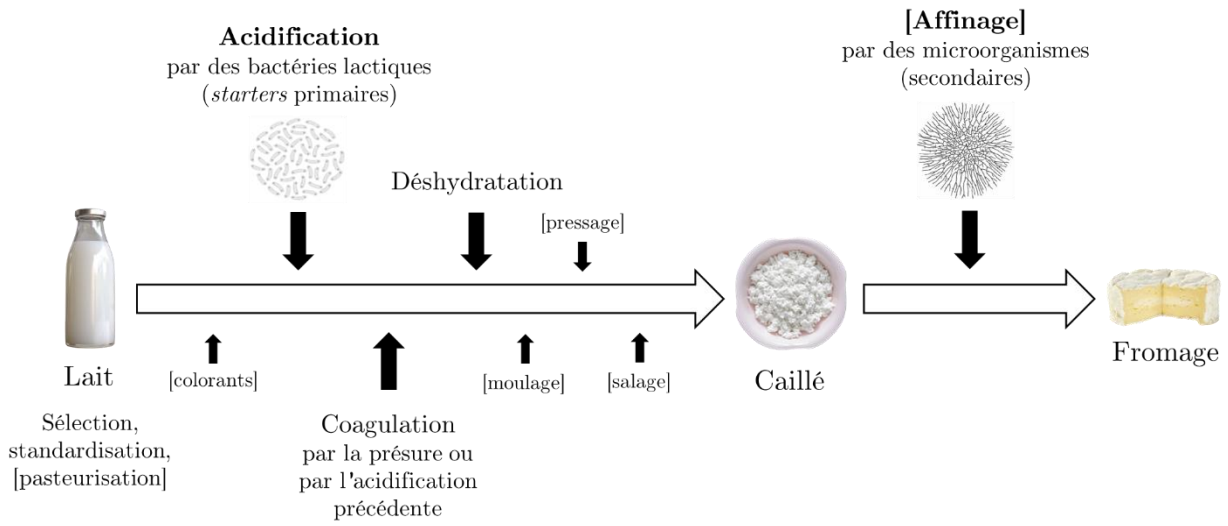


Fig. 3 *Étapes générales de la fabrication des fromages. Les étapes optionnelles sont entre crochets. Les images sont issues des sites suivants : https://www.lejardindemarthe.fr/shop/lait-bio-pasteurise-1l-bouteille-en-verre-non-consignee/, https://revolutionfermentation.com/fra/blogs/divers/ferment-lactique-definition-ou-trouver/, https://core.ac.uk/download/pdf/6117416.pdf.*

1.1.2.3 Utilisation de micro-organismes

Depuis les premiers fromages, il y a quelques millénaires, la clé de la fabrication réside dans l'utilisation de différents micro-organismes, d'abord de manière non maitrisée lors des premières préparations, puis avec un fort contrôle de nos jours dans nos sociétés industrialisées.

1.1.2.3.1 Fabrication du caillé

La première étape du procédé, l'acidification, est l'étape majeure pour produire le caillé (**Fig. 3**). Historiquement et encore aujourd'hui pour quelques fromages grecs ou espagnols, elle peut s'effectuer spontanément avec les bactéries présentes dans le lait. Mais pour la plupart des fromages fabriqués de nos jours, des cultures de démarrage (ou *starters* primaires) constituées de bactéries lactiques sont volontairement ajoutées au lait pasteurisé ou cru pour l'acidifier. En effet et comme leur nom l'indique, ces bactéries lactiques produisent de l'acide lactique à partir du lactose du lait, ce qui entraîne une diminution du pH du caillé et du lactosérum. Les deux étapes suivantes sont alors facilitées. La première, la coagulation, est réalisée généralement par l'activité de la présure, un mélange d'enzymes provenant de la panse des jeunes ruminants. Elle est peut également être effectuée par des champignons, telle que *Rhizomucor miehei*, ou par des chymosines produites par fermentation (Stocco et al., 2025). La deuxième étape est l'égouttage du lactosérum. Les cultures de

démarrage sont généralement classées en deux catégories principales : les bactéries mésophiles, qui se développent à une température optimale de 30 à 32°C, et les bactéries thermophiles, à une température optimale entre 43 et 53°C (Galli et al., 2016; Fox et al., 2017). Les cultures mésophiles comprennent principalement des souches de *Lactococcus lactis subsp. cremoris*, de *Lactococcus lactis subsp. lactis* et de *Leuconostoc sp*. Les cultures thermophiles quant à elles comprennent *Streptococcus thermophilus*, associées avec *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* ou *Lactobacillus delbrueckii helveticus*. L'ensemble de ces bactéries lactiques appartient à l'ordre des *Lactobacillales* (Makarova et al., 2006).

1.1.2.3.2 Au cours de l'affinage

Même si des différences existent dans les étapes de fabrication du caillé entre les nombreuses espèces de fromage, c'est majoritairement au cours de l'affinage que les saveurs et textures spécifiques à chaque variété se développent, grâce à un ensemble complexe de réactions biochimiques. Pour de nombreux procédés de fabrication, l'ajout de cultures secondaires de microorganismes au lait ou au caillé est nécessaire (**Fig. 3**). Ils peuvent être de divers types, par exemple des bactéries lactiques telles que celles des genre *Lactococcus* pour les fromages hollandais ou *Propionibacterium* pour les fromages suisses, mais aussi des levures telle que *Geotrichum candidum* et *Kluyveromyces lactis* pour les fromages à pâte molle et à croûte fleurie (P. F. Fox et al., 2017). Mais les champignons filamenteux sont sans aucun doute les agents d'affinage les plus emblématiques.

1.1.3 Diversité des champignons du fromage

Les *Eumycota*, ou « vrais champignons », constituent une des lignées d'eucaryotes qui a connu le plus grand succès évolutif. La très grande majorité des espèces actuelles appartient au règne des *Dikarya* (Hibbett, James & Vilgalys, 2007), une lignée monophylétique. Celle-ci contient la division des *Ascomycota*, qui regroupent 65% des espèces de champignons décrites du règne des *Dikarya* (Silar, 2016), dont de nombreux champignons filamenteux (**Fig. 4**).

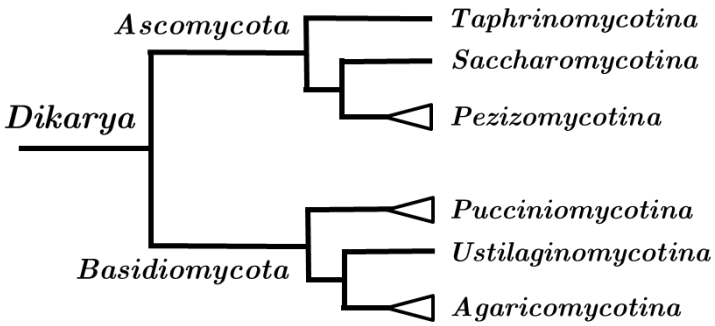


Fig. 4 *Phylogénie des Dikarya d'après Silar, 2016*

1.1.3.1 Diversité

La phylogénie montre que les champignons du fromage se trouvent principalement dans deux classes d'Ascomycota : les *Eurotiomycetes*, qui contiennent les espèces de *Penicillium* (*Eurotiales*), *Sporendonema casei* et *Sporendonema equinum* (*Onygenales*) ; et les *Sordariomycetes*, qui contiennent *Fusarium domesticum* (*Hypocreales*) et les *Scopulariopsis spp.* (*Microascales*) (**Fig. 5**). Cependant, d'autres champignons comme les *Mucor sp.* (*Mucoromycota*, *Mucorales*) ou *Geotrichum candidum* (*Ascomycota, Saccharomycotina*, *Dipodascales*) participent également à l'affinage de plusieurs fromages. Ainsi, les champignons du fromage sont intercalés parmi d'autres champignons, ce qui indique qu'ils ont probablement été domestiqués plusieurs fois (Ropars et al., 2012).

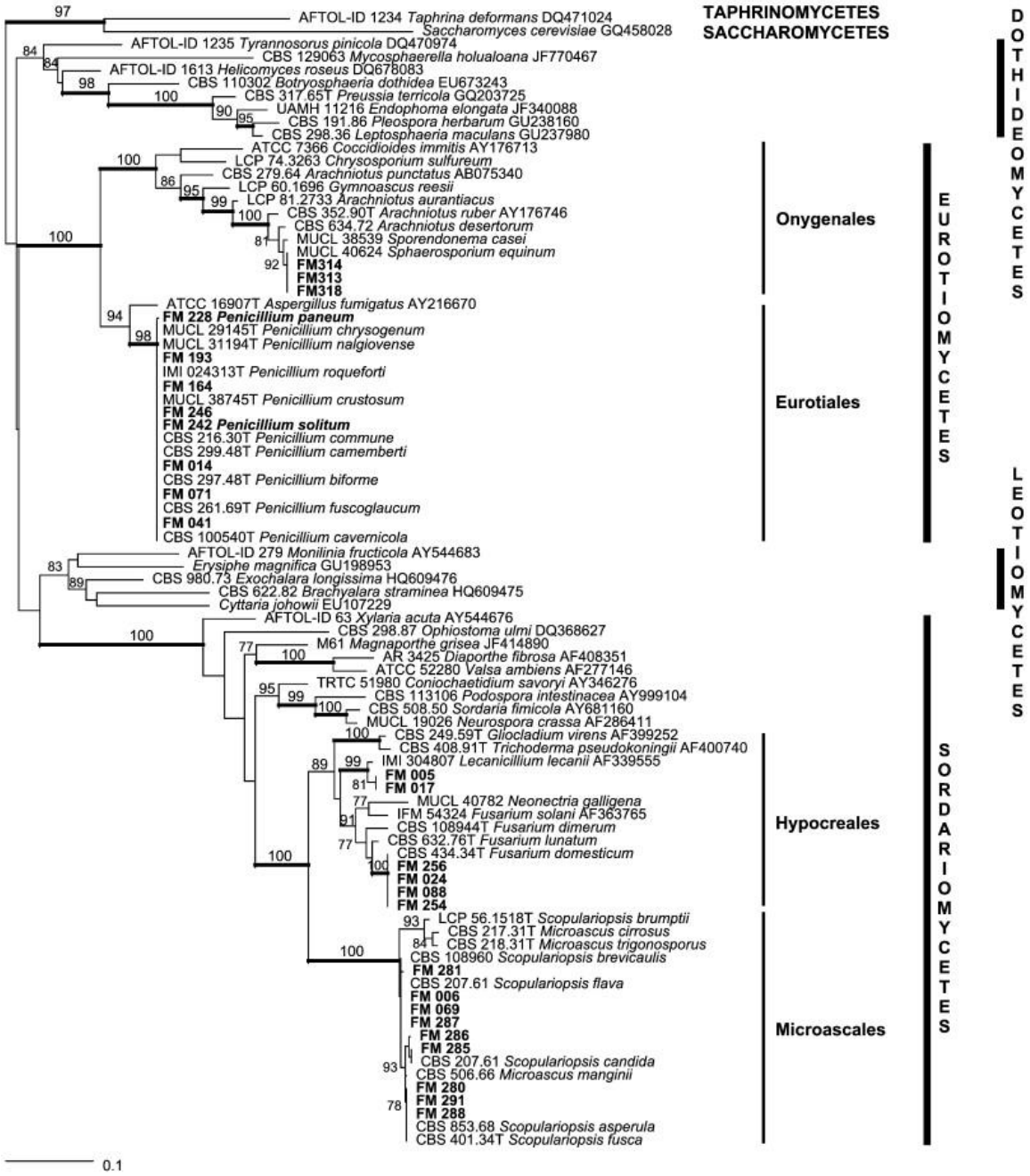


Fig. 5 *Phylogénie des Ascomycota présents dans les fromages, d'après Ropars et al., 2012.*

1.1.3.2 Utilisation pour l'affinage

Le genre *Penicillium*, qui sera étudié de façon plus approfondie dans la **partie 1.2.1**, possède une grande place dans l'environnement fromager, puisqu'il s'agit du genre le plus retrouvé lors d'échantillonnage de différents fromages commerciaux (Barrios et al., 1998). En effet, de nombreux fromages traditionnels français sont affinés avec des moisissures du genre *Penicillium* (voir

classifications de Lenoir **Fig. 2B** et de Danisco **Fig. 2C**), ce qui leur donne ainsi leurs saveurs, textures, couleurs et aspects caractéristiques. Deux espèces majeures sont utilisées pour la maturation. D'une part *Penicillium camemberti*, sujet de ce manuscrit, qui est utilisé dans l'affinage des fromages à pâte molle et à croûte fleurie comme le Brie, le Neufchâtel, le Coulommiers, ou le célèbre Camembert (Giraud et al., 2010). Comme pour la plupart des fromages affinés avec des moisissures, *P. camemberti* ne se développe qu'à la surface (Ropars, Cruaud, et al., 2012), après pulvérisation des spores à la surface du caillé dans les procédés traditionnels (Krasniewski et al., 2006), ou ensemencement direct dans le lait dans les procédés modernes (P. F. Fox et al., 2017). D'autre part, *Penicillium roqueforti* est utilisé pour l'affinage des fromages à pâte persillée, tels que le Roquefort, le Gorgonzola ou les Bleus (Crequer et al., 2023). Son ensemencement dans le lait permet d'obtenir les veines bleues caractéristiques de ces fromages (Dumas et al., 2020). Le genre *Mucor*, est le deuxième genre le plus retrouvé dans les échantillons de différents fromages commerciaux (Barrios et al., 1998), il est utilisé dans l'affinage des fromages à pâte pressée non cuites (Hermet et al., 2012), notamment le Saint Nectaire et la Tomme de Savoie (voir Classification de Lenoir **Fig. 2B**).

1.1.3.3 Contaminants potentiels

Néanmoins, si ces genres sont utilisés dans un but biotechnologique en agroalimentaire, ils peuvent également être des contaminants (Ropars, Cruaud, et al., 2012) . Certaines espèces de *Mucor* sont plus connues pour détériorer des aliments comme la viande, les fruits et les légumes frais, et d'être responsables de défauts organoleptiques dans les aliments transformés ou les produits laitiers (Hermet et al., 2012). Ils sont responsables d'accidents de fromagerie chez les fromages à pâte molle et à croûte fleurie, notamment du défaut dit du « poil de chat », qualifiant l'aspect noirci que prennent ces variétés contaminées. De même, pour les espèces du genre *Penicillium*, *P. roqueforti* est un contaminant des fromages à pâte dure, et *P. camemberti* dérive de *P. fuscoglaucum* (voir **partie 1.2**), espèce contaminante de la viande, des fruits ou des fromages (Ropars, Cruaud, et al., 2012; Ropars et al., 2020).

1.2 Étude du genre Penicillium et de l'espèce Penicillium camemberti

1.2.1 Biologie des *Penicillium*

1.2.1.1 Phylogénie

Le genre *Penicillium* fut introduit par le naturaliste Heinrich Friedrich Link il y a deux siècles (Link, 1809). Il appartient à l'ordre des *Eurotiales* (G.W. Martin ex Benny & Kimbr., 1980) tout comme *Aspergillus*, *Rasamsonia* et *Talaromyces*. Si certaines espèces possèdent un rôle important dans l'économie et sont utilisées dans les industries agroalimentaires, pharmaceutiques ou biotechnologiques, d'autres nuisent aux activités humaines et sont responsables de l'altération des aliments, de la production de mycotoxines et de pathologies (Houbraken et al., 2020). Les *Eurotiales* appartiennent à la classe des *Eurotiomycetes* (Erikss & Winka, 1997) eux-mêmes membres des *Pezizomycotina* (Erikss & Winka, 1997), qui constituent l'une des trois lignées indépendantes du phylum des *Ascomycota* (Cavalier-Smith, 1998) (**Fig. 6**).

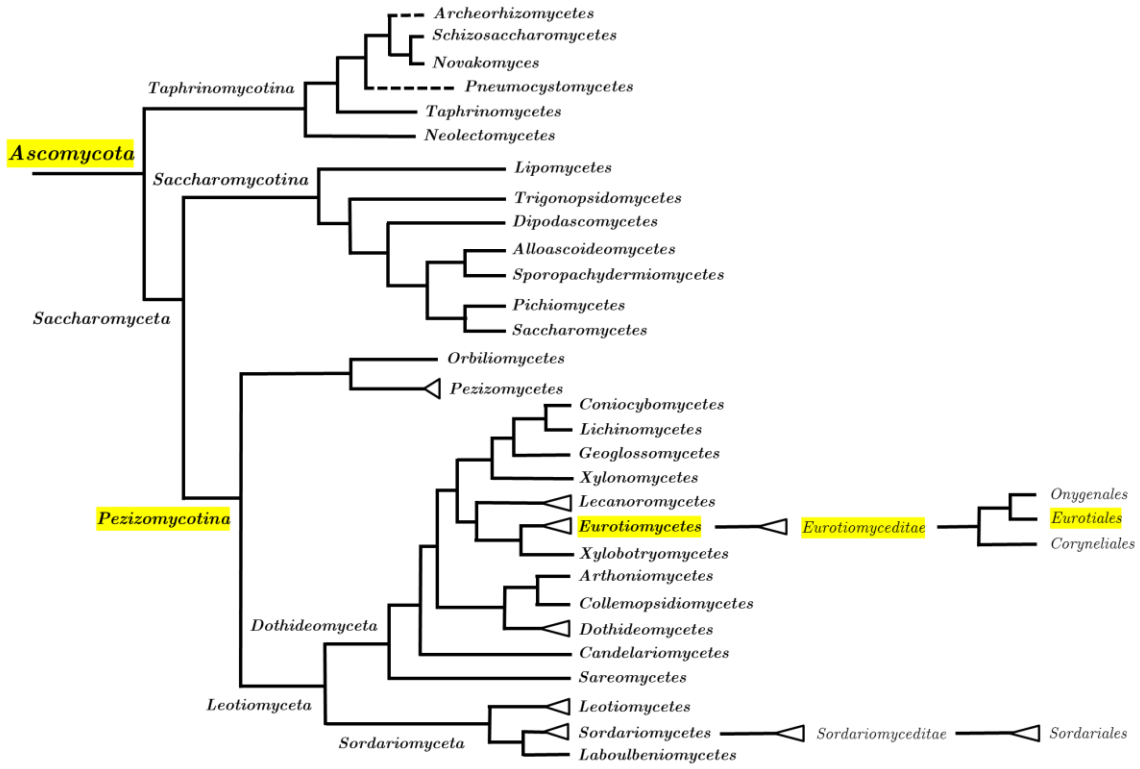


Fig. 6 *Phylogénie des Ascomycota d'après Silar, 2025 (publié prochainement). Le chemin menant aux Eurotiales dans cette classification est surligné en jaune.*

1.2.1.2 Identification

Cela n'est pas un hasard si le nom *Penicillium* vient du latin *penicillius*, qui signifie brosse ou pinceau. En effet, depuis l'introduction du genre par Link et jusqu'à la fin du XXème siècle, la taxonomie du genre était principalement basée sur des critères morphologiques, aussi bien l'aspect macromorphologique des colonies en culture sur milieux gélosés, que les caractéristiques micromorphologiques des structures reproductrices (Visagie et al., 2014), qui seront vues en détails dans la **partie 1.3.3**. L'étude chimique des profils d'extrolites, mélanges de métabolites secondaires produits et sécrétés dans le milieu extracellulaire par le mycélium, permet aussi de préciser l'identité de certaines espèces depuis longtemps (Frisvad & Thrane, 1987). En 1930, le célèbre mycologue Charles Thom a ainsi révisé l'ensemble du genre *Penicillium* et a accepté 300 espèces (Thom, 1930). Cependant, dans les années 1990 l'arrivée du séquençage de l'ADN a bouleversé l'identification des espèces. Le système de *DNA barcoding* a alors permis d'identifier l'ensemble des espèces eucaryotes, en utilisant des courtes séquences d'ADN standardisées et en interrogeant une base de données de référence (DeSalle et al., 2005). Chez les champignons, la région ITS (*internal transcribed spacer*) de l'ADNr nucléaire est le marqueur les plus largement séquencé, et est considéré comme le *DNA barcoding* officiel du règne (Schoch et al., 2012). En revanche pour le genre *Penicillium*, l'ITS ne permet pas de distinguer des espèces étroitement apparentées, c'est donc le gène de la β-tubuline, *benA*, qui est utilisé comme marqueur secondaire, pour identifier avec précision les espèces de *Penicillium* (Visagie et al., 2014).

1.2.1.3 Diversité et métabolisme des *Penicillium*

La Commission Internationale des *Penicillium* et *Aspergillus* (ICPA), faisant partie de l'Union internationale des sociétés de microbiologie (IUMS), coordonne la recherche taxonomique sur les *Eurotiales*, et fournit ainsi la systématique la plus récente des espèces pour chaque genre. Ainsi, à la date de consultation de leur site en mars 2025, il y a à l'heure actuelle 535 espèces de *Penicillium* décrites et acceptées (https://www.aspergilluspenicillium.org/).

1.2.1.3.1 *Penicillium* dans la nature

Les espèces de *Penicillium* sont ubiquitaires, elles sont présentes dans une grande variété d'habitats naturels, dans l'air, dans la végétation, mais surtout dans les sols (Dhakar et al., 2014; Visagie et al., 2014). Certaines espèces résistent ainsi à des températures extrêmes, dans des régions polaires ou dans des sources chaudes (Hashimoto et al., 1972; McRae et al., 1999). D'autres sont présentes à hautes altitudes ou dans les abysses (Rabha & Jha, 2018), supportent des pH très acides ou de fortes concentration en sels (Dhakar et al., 2014). Dans la nature, les sources principales de

nutriments des espèces de *Penicillium* sont issues de la décomposition de la matière organique, principalement végétale (Panda, 2011; Visagie et al., 2014), puisqu'elles possèdent une gamme variée de voies métaboliques leur permettant d'assimiler des sources de carbone et d'azote variées (Rabha & Jha, 2018). Les champignons filamenteux sont en effet hétérotrophes et saprotrophes, ils ont donc besoin de matière organique externe (Willey et al., 2008). Ils détectent ainsi la disponibilité des nutriments dans l'environnement, et ajustent leur métabolisme pour optimiser leur croissance et leur reproduction, qui seront détaillées dans la **partie 1.3**.

De nombreux substrats sont utilisables comme source de carbone par les espèces de *Penicillium*, notamment les acides aminés, les protéines, les lipides, les acides organiques, les alcools ou les hydrocarbures. Cependant, ce sont les glucides qui constituent la source de carbone privilégiée par ces espèces, parmi eux des monosaccharides simples tels que le glucose ou le galactose, des disaccharides comme le tréhalose, des sucre-alcools comme le mannitol, ou des polysaccharides complexes comme la cellulose, principal composant de la biomasse végétale (Papagianni, 2004; Rabha & Jha, 2018). Pour métaboliser l'ensemble de ces substrats, diverses enzymes sont nécessaires. A titre d'exemple, les enzymes métabolisant les glucides, appelées CAZymes (*Carbohydrate-active enzymes*), sont divisées en cinq classes principales : les hydrolases de glycosides (GH), les glycosyltransférases (GT), les lyases de polysaccharides (PL), les enzymes d'activité auxiliaire (AA) et les estérases. Elles sont présentes chez la plupart des espèces de *Penicillium*. Ces enzymes sont liées à des voies métaboliques, et dans le cas des glucides il en existe trois qui permettent de les convertir en pyruvate : la glycolyse, la voie des pentoses phosphates et la voie d'Entner-Doudoroff (Rabha & Jha, 2018). Pour d'autres substrats, les différentes enzymes ne sont présentes que chez certaines espèces, par exemple, *P. expansum*, *P. cyclopium* ou *P. camemberti* produisent des enzymes lipolytiques telles que des lipases et des estérases. Concernant les substrats utilisés comme source d'azote, on peut citer l'ammonium, les nitrates, les acides aminés, les protéines, les peptones, et les extraits de levure (Papagianni, 2004; Rabha & Jha, 2018).

Cependant, ce rôle écologique de décomposition peut avoir un rôle néfaste pour nos sociétés, avec des espèces responsables de l'altération des aliments comme *P. digitatum*, voir des espèces phytopathogènes dévastant les cultures comme *P. solitum* (Kim et al., 2007). Quelques espèces constituent des pathogènes humains et animaux (Roncal & Ugalde, 2003; Visagie et al., 2014), par exemple *P. citrinum* ou *Talaromyces marneffei* (plus connue sou les nom de *P. marneffei*), dont les maladies résultantes sont appelées pénicillioses (Egbuta et al., 2017). Ces effets toxiques sur la santé sont généralement dus à la production de mycotoxines, très répandues chez les champignons filamenteux. *P. citrinum* produit ainsi de l'ochratoxine A et de la citrinine, qui sont associées avec

certaines infections fongiques, et des maladies telles que la kératite, l'asthme et la pneumonie (Walsh et al., 2004). Une seule espèce peut ainsi produire plusieurs mycotoxines, comme *P. viridicatum* qui synthétise de l'ochratoxine A, de la rubrosulphine, de la viopurpurine et de la viomellein. Mais une même mycotoxine peut aussi être synthétisée par plusieurs espèces différentes, comme la patuline avec *P. expansum*, *P. griseofulvum*, *P. claviforme* et *P. roqueforti*. (Egbuta et al., 2017).

1.2.1.3.2 *Penicillium* comme outil biotechnologique

Plus globalement, ces mycotoxines appartiennent à une catégorie bien plus vaste, celle des métabolites secondaires. Contrairement aux métabolites primaires tels que les glucides, les protéines ou les vitamines, les métabolites secondaires ne sont pas directement nécessaires à la croissance et la reproduction (E. M. Fox & Howlett, 2008). Dans la nature, ils sont produits par les champignons pour différents objectifs : communication avec leur environnement, compétition avec d'autres microorganismes, lutte contre les stress environnementaux, ou pathogénicité (Rabha & Jha, 2018). Parmi eux on retrouve des alcaloïdes, des quinoléines, des polycétides, des terpénoïdes ou des lactones, qui peuvent donc constituer des mycotoxines, mais également des métabolites antibiotiques, antifongiques, immunosuppresseurs voir hypocholestérolémiants (Petit et al., 2009; Akaniro et al., 2023). Les propriétés des métabolites secondaires ont ainsi commencé à être exploitées avec la synthèse de pénicilline par *P. notatum*, qui a révolutionné le traitement des maladies bactériennes, notamment pendant la Seconde Guerre mondiale (Fleming 1929, Thom 1945). L'utilisation de *Penicillium* s'est poursuivi dans l'industrie pharmaceutique, avec la production là encore de pénicilline, mais à partir de *P. chrysogenum*, ou encore la production de griséofulvine (antifongique) par *P. griseofulvum* (E. M. Fox & Howlett, 2008; Rabha & Jha, 2018). De nombreux autres domaines d'application sont à signaler, comme la synthèse de molécules bioactives ou d'enzymes, la production de biocarburants à partir de source ligno-cellulosique, la biorestauration des écosystèmes, l'utilisation comme agents de lutte biologique, ou la biocatalyse (Roncal & Ugalde, 2003; Akaniro et al., 2023).

Un autre domaine d'intérêt pour les *Penicillium* est l'industrie agroalimentaire, notamment avec l'affinage des fromages par *P. camemberti* et *P. roqueforti* déjà évoqué dans la **partie 1.1.3.2**, mais pas seulement. Des espèces de *Penicillium* sont utilisées pour l'affinage de la viande séchée ou du saucisson, notamment *P. nalgiovense* ou *P. salamii* (Perrone et al., 2015). Le genre *Penicillium* a donc un fort impact sur les sociétés humaines, et il apparait raisonnable de penser que l'ensemble des humains aurait été en contact avec une espèce de *Penicillium* où l'un de ces produits (Pitt, 1979).

1.2.2 Spécificités de *Penicillium camemberti*

1.2.2.1 Étymologie

En 1904, Thom isola un champignon filamenteux d'un Camembert provenant de France, qu'il nommera officiellement *Penicillium camemberti* deux ans plus tard (Thom, 1906). Néanmoins, un siècle auparavant, lorsque Link créa le genre *Penicillium*, il décrivit l'espèce *Penicillium candidum* (Link, 1809) comme correspondant à n'importe quel *Penicillium* de couleur blanche, qui comprenait bien la moisissure blanche utilisée historiquement pour la préparation du Camembert (Moreau, 1979). Si dans la littérature on observe une utilisation de la dénomination *P. camemberti* dès son introduction (***Fig. 7***), commercialement c'est l'ancien nom qui continue encore aujourd'hui d'être employé communément par les industriels, artisans fromagers et fournisseurs. Par exemple le fournisseur Agro Direct, décrit *Penicillium candidum* sur son site internet comme « le nom courant de *Penicillium camemberti* ».

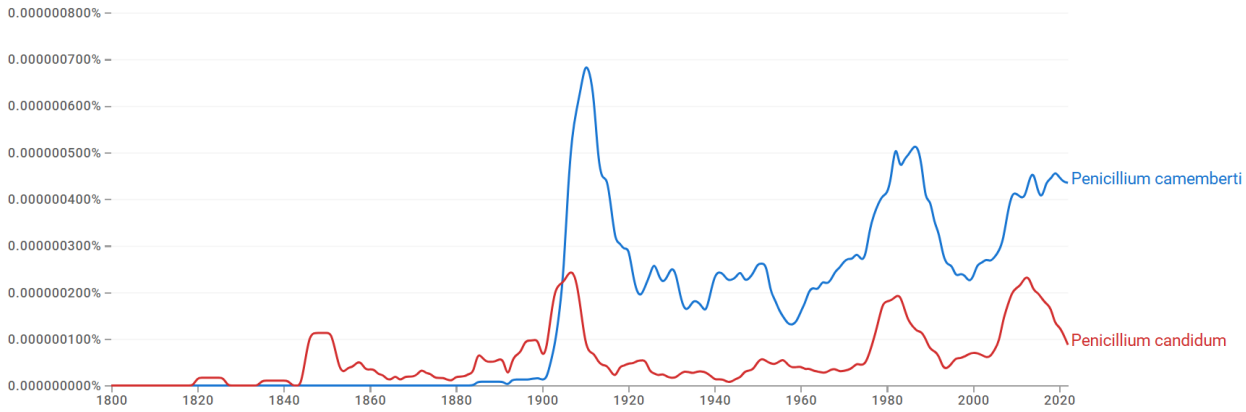


Fig. 7 *Fréquence des groupes de mots Penicillium candidum et Penicillium camemberti dans la base de données textuelles des livres scannées de Google Books depuis 1800, généré à l'aide de l'outil Ngram de Google.*

1.2.2.2 Domestication

Il existe très peu d'études publiées sur *P. camemberti*, à titre indicatif une recherche sur Scopus indique que 86 publications tous sujets confondus comportent le groupe de mot *Penicillium camemberti* dans leur titre depuis 1900, et 49 pour *Penicillium candidum*, contre plus de 8 000 pour *Aspergillus niger* par exemple, un autre *Eurotiales* d'intérêt industriel. Récemment pourtant, une étude génomique issue de la collaboration entre deux laboratoires français, à Paris-Saclay et à Brest, a remis la lumière sur cette espèce (Ropars et al., 2020). Elle révèle que

P. camemberti, *P. biforme* et *P. fuscoglaucum* forment chacun un groupe génétique distinct, les deux premiers étant des clades frères spécifiques à l'environnement fromager, alors que *P. fuscoglaucum* serait un clade plus éloigné se trouvant principalement dans les environnements naturels (**Fig. 8**). Par rapport à *P. fuscoglaucum*, des preuves d'adaptation phénotypique sont apparues chez *P. biforme*, et encore plus forte chez *P. camemberti*, à savoir une couleur plus blanche, une production plus faible de toxines, et une croissance plus rapide dans des conditions de forte humidité (grotte, cave, surface d'un fromage, etc.). Ces divergences résultent d'évènements de domestication, plutôt récent entre *P. biforme* et *P. camemberti* et plus ancien entre *P. fuscoglaucum* et *P. biforme*.

De plus, deux variétés de *P. camemberti* ont été génétiquement différenciées, à savoir *P. camemberti* var. *camemberti* et *P. camemberti* var. *caseifulvum* (**Fig. 8**). En effet, ces deux clades au sein de *P. camemberti* présentent très peu de SNP (polymorphismes mononucléotidiques) communs (13 %), mais une identité nucléotidique très élevée (99,998 %). Si la variété *camemberti* correspond bien aux souches blanches emblématiques isolées du Camembert ou du Brie par exemple, les souches de la variété *caseifulvum* sont grises-vertes et ont été isolées de fromages à pâte molle et à croûte fleurie différents, tels que Saint-Marcellin ou la Rigotte de Condrieu. De plus, si la variété *camemberti* est connue pour produire une mycotoxine particulière, l'acide cyclopiazonique (CPA), la variété *caseifulvum* n'en produit pas. Sur la base de ces différences phénotypiques, *P. caseifulvum* avait d'abord été proposé comme espèce distincte (Visagie et al., 2014) avant cette étude (Ropars et al., 2020). Dans une autre étude publiée très récemment (Valle et al., 2023), il a été observé que la croissance radiale de la variété *caseifulvum* en milieu solide était plus sensible à une augmentation de la pression partielle en CO_2 que celle de la variété *camemberti*, avec l'apparition d'excroissance pour la première, tandis que la seconde restait circulaire. Cet élément participe à la compréhension des effets des facteurs abiotiques sur la fabrication des fromages, pour empêcher leur détérioration et augmenter leur durée de conservation (Valle et al., 2023).

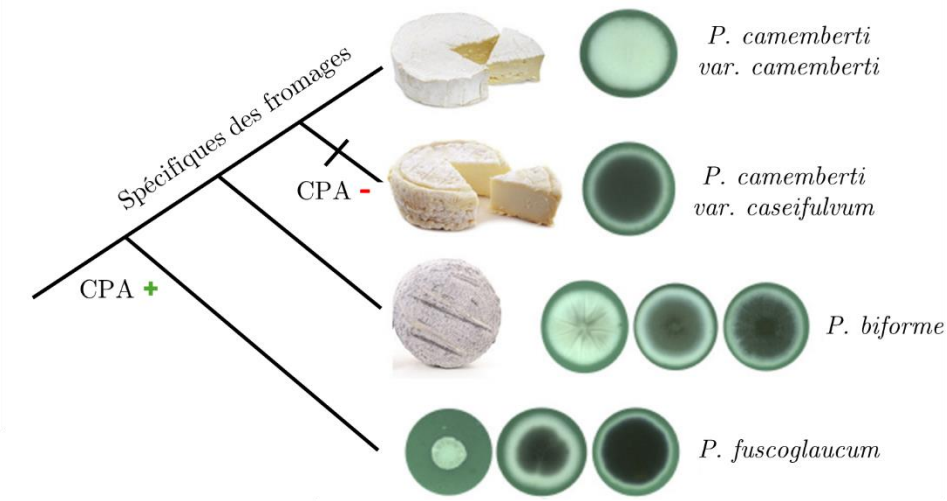


Fig. 8 *Représentation schématique des relations entre P. camemberti et ses plus proches parents, P. biforme et P. fuscoglaucum, avec photos des mycéliums sur du milieu fromage salé à 25°C après 10 jours de croissance, d'après Ropars et al., 2020. CPA : acide cyclopiazonique.*

Cette étude (Ropars et al., 2020), reprise dans la presse généraliste internationale (BBC, 2024; CNN, 2024; Der Spiegel, 2024; El País, 2025; RFI, 2024), suggère que l'émergence de ces deux lignées a eu un impact négatif sur la diversité des champignons utilisés pour la fabrication des fromages à pâte molle et à croûte fleurie, car une seule lignée clonale prédominerait aujourd'hui pour *P. camemberti*. Jusqu'au milieu du XX^{ème} siècle en effet, les Camembert et les Brie étaient vert-gris, avant de devenir blanc à la suite de différentes pressions de sélection humaine (Ropars et al., 2020).

1.2.2.3 Technologie

Comme vu dans la **partie 1.1.3.2**, *P. camemberti* est utilisé lors de l'affinage des fromages à pâte molle et à croûte fleurie, au cours duquel se développent les saveurs et la texture caractéristiques de ces variétés. Cela est dû aux différents micro-organismes secondaires utilisés pour cette maturation (**Fig. 3**), le champignon filamenteux *P. camemberti*, mais également les levures *Geotrichum candidum* et *Kluyveromyces lactis* ainsi que la bactérie *Brevibacterium linens*. La haute teneur en humidité de ces fromages, environ 50%, favorise la croissance de ces micro-organismes. Ils sont aérobies obligatoires, pulvérisés à la surface ou ajoutés au lait avec les *starters* primaires, et ils ne se développent qu'à la surface des fromages (P. F. Fox et al., 2017). Dans un premier temps, *G. candidum*, *K. lactis* et *B. linens* se développent à la surface, mais ils sont rapidement suivis par une croissance assez dense de *P. camemberti* (McSweeney, 2004). Sur des Camembert expérimentaux produits en laboratoire, la croissance de *P. camemberti* était visible au bout de sept jours, et

recouvrait complètement la surface du fromage au douzième jour (Leclercq-Perlat et al., 2004). De façon générale, les micro-organismes affectent grandement la biochimie des fromages au cours de l'affinage, à savoir le métabolisme de l'acide lactique, du lactose résiduel et du citrate, la lipolyse et le métabolisme des acides gras, ainsi que la protéolyse et le catabolisme des acides aminés (P. F. Fox et al., 2017).

Le métabolisme de l'acide lactique a un rôle majeur dans l'acquisition des propriétés organoleptiques des fromages à pâte molle et à croûte fleurie (McSweeney, 2004). En regardant la **Fig. 9**, on peut voir que les levures, suivies par *P. camemberti* (**1**), métabolisent rapidement le lactate en surface de manière oxydative (**2**), ce qui désacidifie le fromage plus rapidement à la surface qu'au cœur (**3**). De plus, au sein du fromage les *starters* primaires produisent en continu de l'acide lactique à partir du lactose résiduel. Cela crée un gradient de pH du centre vers la croûte (**3**), qui permet la migration du phosphate de calcium $Ca_3(PO_4)^2$ à la surface (**4**). Cela créé un nouveau gradient, cette fois de phosphate de calcium, du centre vers la surface. Au cœur du fromage, la réduction de la concentration de phosphate de calcium, l'augmentation du pH et la protéolyse, entraînent un ramollissement, caractéristique de ce type de fromage bien mûr (**5**). Dans les fromages très mûrs, de l'ammoniac NH_3 est produit en surface à partir des protéines, et se diffuse à l'intérieur (Leclercq-Perlat et al., 2004; McSweeney, 2004) (**Fig. 9**).

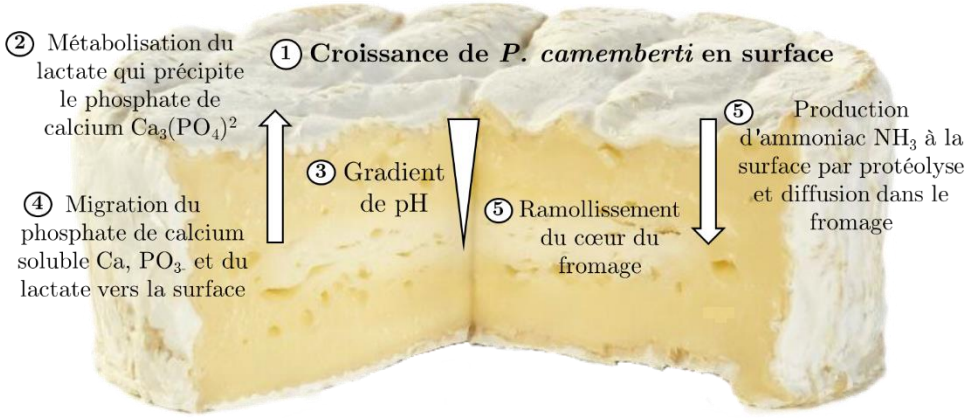


Fig. 9 *Impact de la croissance de P. camemberti sur le métabolisme au cours de l'affinage d'un fromage à pâte molle et à croûte fleurie, d'après McSweeney, 2004.*

1.3 Reproduction des champignons filamenteux

1.3.1 Germination et croissance

Le cycle de vie des champignons filamenteux repose sur plusieurs formes qui possèdent des aspects morphologiques très différents (Silar, 2016). Les spores constituent la forme dormante, efficace pour la survie, la propagation et la protection du génome (Seo et al., 2006). Sexuées (ascospores) ou asexuées (conidies), elles germent après leur phase de dormance métabolique, lorsque les conditions environnementales sont favorables à la croissance (**Fig. 10A**). Pour les conidies, cette germination débute par une entrée d'eau qui provoque un gonflement isotropique de la spore chez les champignons filamenteux. La polarité est établie grâce au recrutement du cytosquelette d'actine, et un tube germinatif émerge de la spore. La croissance se poursuit pour former une hyphe, qui constitue l'unité de base de croissance des champignons (Willey et al., 2008; Cairns et al., 2019). Ce sont de minces filaments qui peuvent se ramifier, sous-ramifier, et croître par allongement au niveau de leur partie apicale, appelée apex (**Fig. 10B**) À mesure que les hyphes continuent de croître, elles se ramifient fréquemment pour former un réseau de filaments appelée mycélium, qui constitue l'appareil végétatif du champignon (Papagianni, 2004).

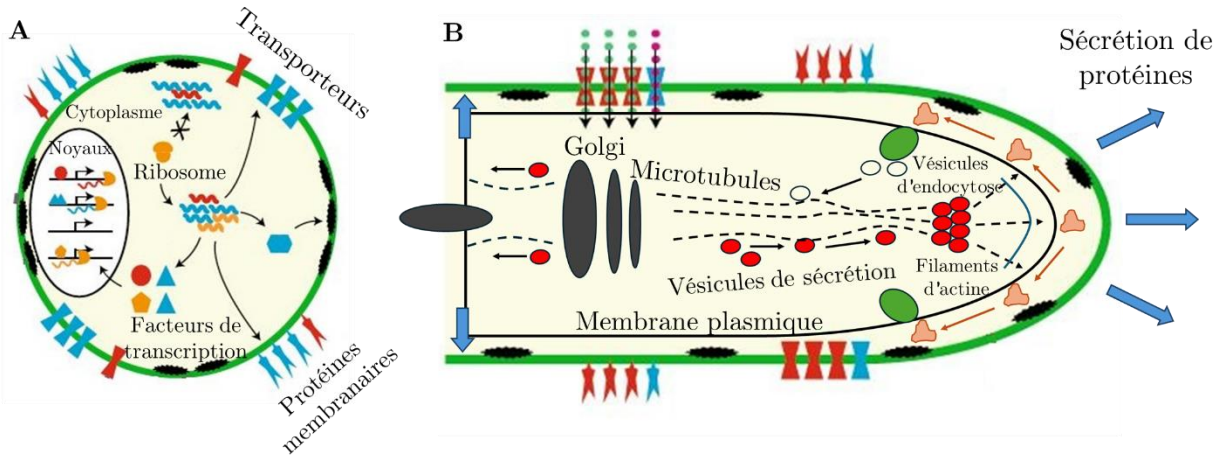


Fig. 10 *(**A**) Activité transcriptionnelle au sein d'une conidie lors de sa maturation après la phase de dormance, d'après Wang et al., 2021 (**B**) Processus de croissance et de sécrétion des protéines à l'apex d'une hyphe, d'après Cairns et al., 2019 et Wang et al., 2021.*

En fonction des conditions, favorables ou non à la croissance, un équilibre se crée entre l'augmentation et la diminution de la masse du mycélium. À partir de celui-ci, les champignons filamenteux sont capables de produire de nouvelles spores sexuées (méioses) ou asexuées (mitoses) selon les espèces et les conditions.

1.3.2 Reproduction sexuée

Dans l'ensemble du règne des *Fungi*, environ 80% des espèces auraient une reproduction sexuée connue, proportion relativement faible par rapport à d'autres groupes (Taylor et al., 1999). Les espèces appartenant au *Ascomycota* ont comme caractère commun la production de méiospores, appelées ascospores, à l'intérieur d'un sac nommé asque. Ces asques sont contenus dans des organes de reproduction sexué tels que les périthèces ou les cléistothèces (Silar, 2016). Chez les *Eurotiales* cependant, il ne s'agit pas du mode de reproduction le plus répandu. Ainsi il y a une quinzaine d'années, on estimait que sur les 250 espèces de *Aspergillus* acceptées, 36% avaient une reproduction sexuée connue. Pour les espèces de *Penicillium* c'est encore moins, avec seulement 27% de reproduction sexuée connue sur les 225 espèces acceptées (Dyer & O'Gorman, 2011).

Pourtant, il a été montré qu'un grand nombre d'espèces qui étaient considérées comme exclusivement asexuées jusqu'ici, pouvait se reproduire sexuellement. Cette reproduction sexuée a par exemple été induite en laboratoire chez *P. chrysogenum* (Böhm et al., 2013) ou chez *P. roqueforti* par Ropars et al., 2014, espèce évoquée en **partie 1.2.1.3.2** utilisée pour l'affinage des fromages à pâte persillée. Les intérêts industriels de la reproduction sexuée sont considérables, puisqu'elle permet de créer des variations génétiques par recombinaison, ce qui sélectionnerait de nouvelles mutations intéressantes en termes de couleur, de taux de croissance ou de production de métabolites par exemple. En plus de ce renouvellement, ce cycle sexué permet de corriger et de prévenir les mutations délétères qui s'accumulent lors de la propagation clonale (Ropars et al., 2012b; Ropars et al., 2014).

1.3.3 Développement asexué

1.3.3.1 Principe général

Chez de nombreux champignons filamenteux, en particulier chez les ascomycètes, le mode de reproduction le plus courant est la sporulation asexuée, appelée conidiation. Il s'agit d'une spécialisation de certaines hyphes au sein du mycélium végétatif, qui vont, par des divisions mitotiques asymétriques et successives, se différencier en une structure complexe appelée conidiophore (**Fig. 11**). Ces conidiophores produisent des spores asexuées non mobiles, nommées conidies ou plus rarement conidiospores (Adams et al., 1998; Park & Yu, 2012; Roncal & Ugalde, 2003). Cette transition de l'hyphe végétative au conidiophore correspond à une réponse à un changement des conditions environnementales. La croissance polaire est alors inhibée, et le développement asexué aura pour finalité cette production rapide et abondante de conidies. Leur

métabolisme latent leur permet d'être adaptées aux nouvelles conditions (Etxebeste et al., 2010; Canteri & Ghoul, 2015).

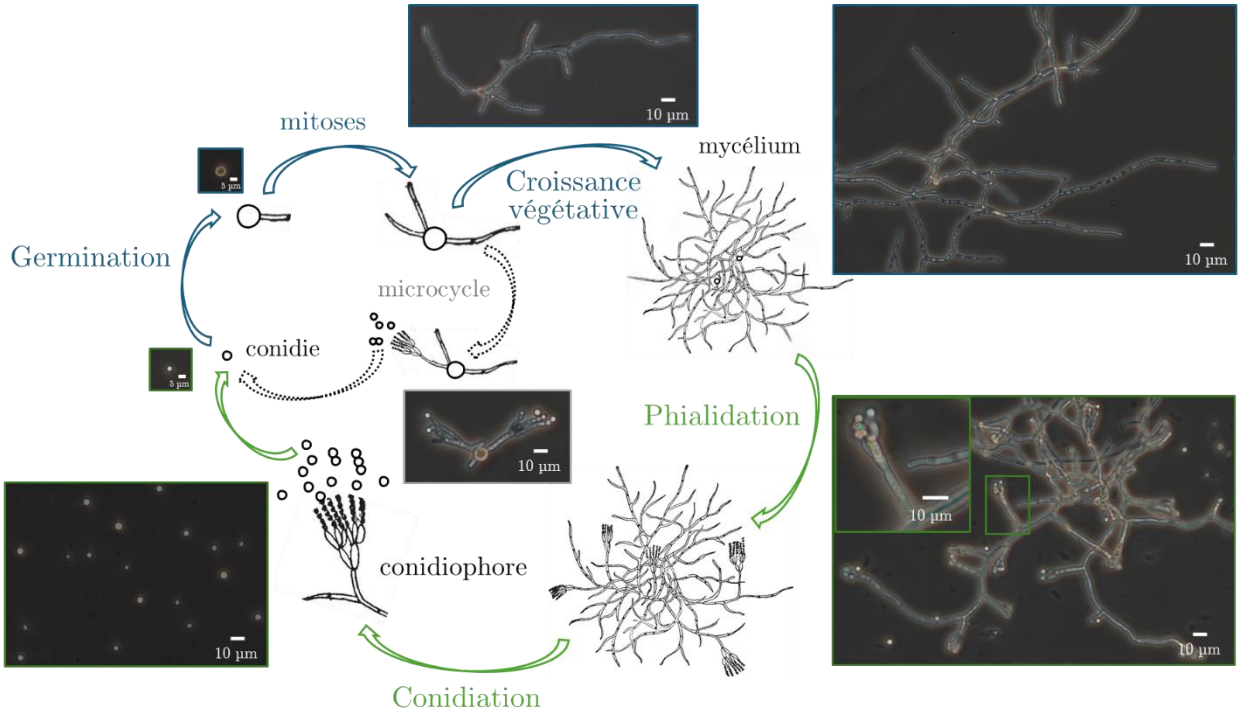


Fig. 11 *Cycle de reproduction asexuée chez les espèces de Penicillium, avec des images de P. camemberti (souche PC01 de la collection de IFF) en microscopie à contraste de phase grossissement X100. Les dessins sont repris de https://etc.usf.edu/clipart/galleries/210-mold.*

La formation des conidiophores est un processus essentiel chez les *Ascomycota*, dont les mécanismes ont été étudiés en détails chez deux espèces modèles, d'abord *Neurospora crassa* (Springer & Yanofsky, 1989) membre des *Sordariales*, puis chez *Aspergillus nidulans* (Adams et al., 1998) qui appartient aux *Eurotiales* (**Fig. 6**). Ces mécanismes peuvent être relativement transposés à d'autres genres fongiques d'intérêt industriel et phylogénétiquement proches, *Trichoderma reesei* pour les *Sordariales* et les *Penicillium* pour les *Eurotiales* par exemple. Les différents stades morphologiques seront décrits d'abord chez *N. crassa*, puis chez *A. nidulans*, et enfin chez les espèces du genre Penicillium. Ces descriptions cellulaires seront suivies d'un récapitulatif des connaissances sur le contrôle génétique de ce processus.

1.3.3.2 Mécanismes cellulaires de la conidiation

1.3.3.2.1 Modèle *Neurospora*

Comme d'autres *Ascomycota*, *Neurospora crassa* peut se reproduire par développement sexué ou asexué. Cependant, les mécanismes de la conidiation chez *Neurospora* sont assez différents de ceux observés chez *Aspergillus* et *Penicillium*, bien qu'appartenant à la même division. Il existe deux voies de reproduction asexuée chez *N. crassa*, la macroconidiation et la microconidiation, qui impliquent le bourgeonnement à partir des hyphes par deux mécanismes différents (Springer, 1993; Springer & Yanofsky, 1989).

La macroconidiation débute par la formation de chaînes proconidiales, équivalentes aux conidiophores. Les hyphes végétatives stoppent leur croissance, pour débuter des phases de bourgeonnements apicaux répétés, formant des chaînes perlées (Springer, 1993). Chaque bourgeon, appelé proconidie, donne naissance à un ou deux nouveaux bourgeons, et ainsi de suite. Lors des premières phases, la structure différencie des proconidies et des jonctions interconidiales quasiment aussi larges les unes que les autres, constituant une chaîne de constriction mineure. Les bourgeonnements suivants différencient des jonctions interconidiales bien plus fines, et la structure se transforme en chaîne de constriction majeure. Ainsi, une chaîne proconidiale typique est constituée d'un court segment de chaîne de constriction mineure, suivi d'un segment plus long de chaîne de constriction majeure (**Fig. 12**). Les chaînes de constriction mineure ont tendance à revenir à la croissance hyphale et à alterner entre les deux. En revanche, une fois la chaîne de constriction majeure formée, il n'y a pas de retour en arrière possible : cette transition correspond à l'engagement définitif dans le processus de conidiation (Ruger-Herreros & Corrochano, 2020; Springer, 1993; Springer & Yanofsky, 1989).

La phase de bourgeonnement, avec la formation puis l'épaississement de nouvelles cloisons transversales à chaque jonction interconidiale, est suivie par une phase de séparation, avec le clivage des jonctions les macroconidies adjacentes, qui restent toutefois reliées par de fragiles fils connecteurs jusqu'à leur dispersion (Springer, 1993). Ces macroconidies issues des conidiophores, de forme oblongue, sont appelées blastoconidies, car ce ne sont pas les seules à être formées lors de ce processus. En effet, peu après la phase de séparation, des cloisons supplémentaires apparaissent dans les hyphes les plus proches du conidiophore, et subissent le même processus d'épaississement et de séparation, avant un détachement complet de fragments hyphaux. Ce sont des arthroconidies, de forme cylindrique, qui représentent environ 1% de la masse totale des macroconidies récoltées (Springer, 1993; Springer & Yanofsky, 1989).

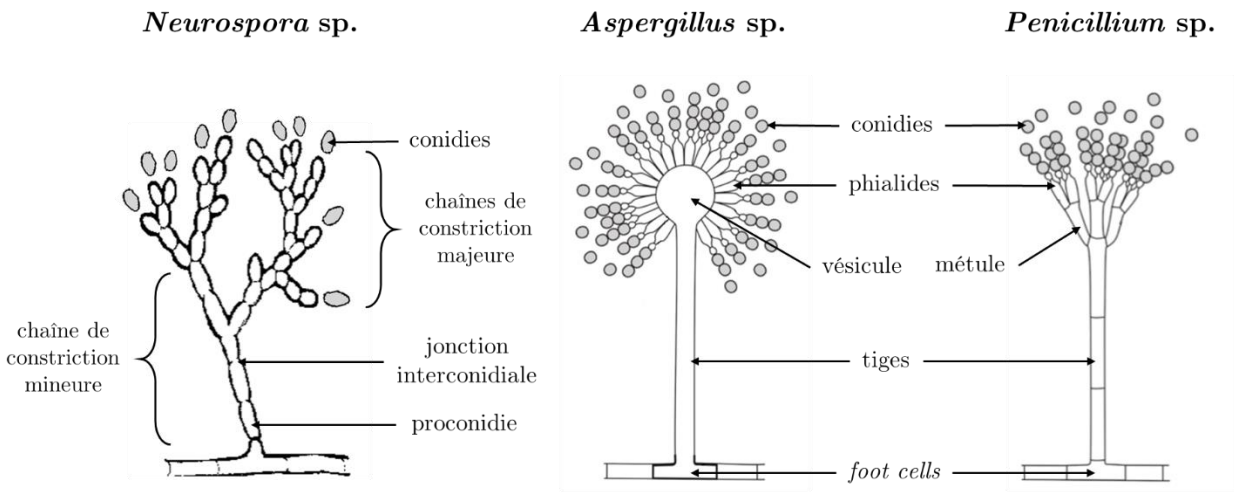


Fig. 12 *Comparaison entre les conidiophores des genres Neurospora, Aspergillus et Penicillium. Dessins repris de https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Conidiophores,_Aspergillus,_Penicillium,_Eurotiales,_Ascomycota_%28M._Piepenbring%29.png.*

Les microconidies sont quant à elles des spores uninucléées, qui émergent d'une protubérance issue d'hyphes végétatives, et se libèrent à travers la paroi à mesure qu'elles mûrissent. Elles sont plus petites et moins viables que les macroconidies. La microconidiation chez *N. crassa* est mécanistiquement proche de la conidiation chez *A. nidulans* (Springer, 1993), qui sera décrite au prochain paragraphe.

1.3.3.2.2 Modèle *Aspergillus*

Le processus de conidiation chez *A. nidulans* (Adams et al., 1998) débute par l'élongation polaire de certaines cellules parmi les hyphes végétatives, formant chacune une cellule spécialisée à double paroi appelée *foot cell* (**Fig. 12**). De cette cellule émerge la future tige du conidiophore, non septée, qui s'allonge pour atteindre une longueur définie, spécifique de l'espèce en question, par exemple 100 µm pour *A. nidulans*. Après l'arrêt de son extension apicale, l'extrémité de cette tige gonfle de manière isotropique pour former une vésicule. La couche interne de la *foot cell*, la tige ainsi que la vésicule forment alors une cellule unique non septée, contenant de grandes vacuoles qui organisent le positionnement des noyaux et des organites intracellulaires (Adams et al., 1998; Etxebeste et al., 2010) (**Fig. 12**).

Les noyaux sont distribués dans le dôme de la vésicule, et après des divisions nucléaires (caryocinèses) successives, des bourgeonnements apparaissent à la surface pour former une première couche de stérigmates primaires appelés métules. Après une extension polaire limitée, les

métules bourgeonnent à leur tour pour produire une couche de stérigmates secondaires appelés phialides (Adams et al., 1998; Etxebeste et al., 2010). Le conidiophore est ainsi formé (**Fig. 12**). Tout comme la longueur de la tige, la formation des stérigmates diffère selon les espèces, certaines produisent plus d'une couche de métules avant de fabriquer des phialides, tandis que d'autres produisent des phialides directement à partir de la vésicule (Adams et al., 1998). Si la division des noyaux est bien évidemment essentielle à la formation des stérigmates et plus globalement à la morphogenèse des conidiophores, il en va de même pour leur migration, qui implique des interactions complexes entre les microtubules et les protéines motrices (Xiang, 2018). Ce développement des conidiophores affecte particulièrement le métabolisme du mycélium, d'abord avec une forte augmentation de la production de métabolites secondaires, mais également avec l'activation de processus autolytiques dans les hyphes entourant les conidiophores, hypothétiquement pour fournir à ces derniers des ressources cellulaires nécessaires à leur développement (Etxebeste et al., 2010). Les phialides produisent enfin de longues chaînes de spores uninucléées, appelées conidies, de manière basipétale : les plus jeunes conidies sont formées à la base de la phialide, repoussant les conidies anciennement formées en bout de chaîne (van Leeuwen, 2009) (**Fig. 12**). Ces conidies matures sont à l'état de dormance, et germent lorsque les conditions redeviennent favorables à la croissance hyphale (Baltussen et al., 2020).

Les mécanismes de la conidiation chez *A. nidulans* et ceux de la macroconidiation chez *N. crassa* sont donc fondamentalement différents. Les conidies de *A. nidulans* sont uninucléés et sont produites à partir de cellules spécialisées (Adams et al., 1998), tandis que les macroconidies de *N. crassa* sont multinucléées et dérivées d'une chaîne de bourgeons cytoplasmiquement continue (Springer, 1993).

1.3.3.2.3 Différences entre *Penicillium* et *Aspergillus*

Si les mécanismes de la conidiation chez *Penicillium* semblent relativement similaires à ceux observés chez *Aspergillus*, la formation des conidiophores présente toutefois des différences mineures. Chez les espèces *P. notatum* et *P. cyclopium*, après l'arrêt de la croissance, certaines cellules du mycélium, délimitées par un septum, commencent à gonfler, pendant que des branches subapicales émergent de celles-ci concomitamment. Ainsi, il n'y a pas de formation d'une « *foot cell* », le conidiophore se forme directement à partir d'une hyphe végétative, sa tige est donc septée (**Fig. 12**). La cellule apicale se différencie ensuite directement en métules et/ou en phialides, et les premières conidies finissent enfin par bourgeonner à leurs extrémités (Roncal & Ugalde, 2003). La

formation des stérigmates n'intervient donc pas à partir d'une vésicule, et découle directement de la division de la tige du conidiophore (**Fig. 12**).

Ce modèle, sans croissance isotropique à l'extrémité de la tige, permet d'observer la grande variété d'organisations des conidiophores chez *Penicillium*. Les plus simples sont constitués par de simples phialides solitaires, sans tige, produisant des chaines de conidies uniques (Visagie et al., 2014). Pour les organisations un peu plus complexes, la classification se base sur le nombre de ramifications formées de la tige aux conidies. Ainsi, les conidiophores monoverticillés ne présentent qu'une tige avec plusieurs phialides, les biverticillés des métules ou des branches avant les phialides, et les triverticillés des branches, des métules et des phialides (Visagie et al., 2014). Ces conidiophores peuvent être symétriques ou asymétriques, sachant que la présence de branches entraîne généralement une asymétrie.

De par cette organisation spatiale de leurs conidiophores, les capacités de production de conidies des espèces de *Penicillium* semblent moins importantes que celles des espèces d'*Aspergillus*. Si pour les premières, le nombre de phialides varient en fonction de la diversité des organisations, une dizaine de phialides pour un conidiophore biverticillé par exemple (Visagie et al., 2014), *A. nidulans* en revanche possède 120 phialides par conidiophore en moyenne, pour une production totale pouvant dépasser les 10 000 conidies (Adams et al., 1998). De même, s'il n'est pas forcément pertinent de comparer les temps d'apparition des premières conidies entre les différentes espèces et conditions de culture, en culture liquide celles-ci peuvent être observées environ 7h après la germination chez *P. notatum* et *P. cyclopium* (**Fig. 13**) (Ugalde & Pitt, 1983), contre 16h pour *A. nidulans* (Martinelli, 1976).

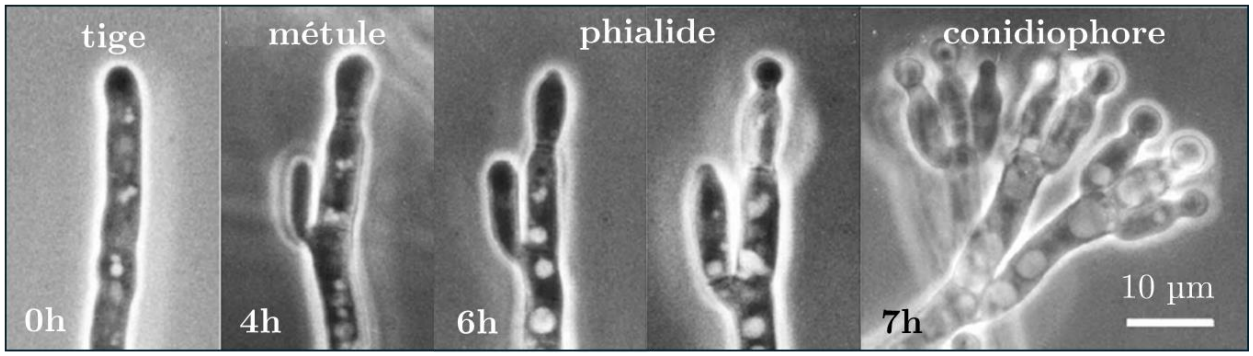


Fig. 13 *Stades morphologiques de Penicillium cyclopium en culture liquide au cours du temps, d'après Roncal & Ugalde, 2003.*

1.3.3.2.4 Microcycle

En plus de ces mécanismes cellulaires classiques de la conidiation, un cycle simplifié de reproduction asexuée, appelé microcycle de conidiation, peut se produire chez de nombreuses espèces fongiques. Ainsi, sous certaines conditions défavorables à la croissance, les conidies germent et produisent directement d'autres conidies sans former de mycélium (Anderson & Smith, 1971; Jung et al., 2014). Les microcycles peuvent alors produire la quasi-totalité de la biomasse totale sous forme de conidies (Boualem, 2008). Ce phénomène a d'abord été décrit chez *A. niger* (Anderson & Smith, 1971), puis chez d'autres espèces tel que *P. cyclopium* (Pazout & Schroder, 1988; Roncal & Ugalde, 2003) ou *P. camemberti* (Boualem et al., 2014). Malgré la ressemblance étymologique, ces microcycles chez les *Eurotiales* n'ont pas de lien avec la microconidiation chez *N. crassa* décrite plus haut, espèce qui elle-même possède des mécanismes de microcycles spécifiques (Jung et al., 2014).

Les caractéristiques morphologiques des microcycles peuvent être très diverses en fonction des différentes espèces : si chez certaines, les conidies peuvent produire des conidiophores complets directement après leur germination, d'autres produisent des conidiophores extrêmement simplifiés, voire n'en différencient pas du tout, avec des conidies directement produites depuis le tube germinatif. Pour toutes ces espèces, les conidies produites par microcycle ne sont pas fondamentalement différentes de celles produites par conidiation classique, si ce n'est par leur taille et leur pigmentation (Jung et al., 2014).

1.3.3.3 Régulation génétique de la conidiation

Tout comme la germination et la croissance, le processus de différenciation cellulaire lors de la reproduction asexuée est programmé génétiquement, une régulation à la fois spatiale et temporelle (Park & Yu, 2012). La régulation a principalement été étudiée chez *A. nidulans*, et sert de modèle au genre *Penicillium*.

1.3.3.3.1 Voie centrale du développement

La voie régulatrice centrale de la conidiation, nommé *Central Developmental Pathway* ou CDP (Etxebeste et al., 2010), a d'abord été proposée par Timberlake et ses collaborateurs chez *A. nidulans* il y a près de quarante ans (Timberlake et al., 1987). Elle est composée de trois gènes, à savoir *brlA*, *abaA* et *wetA*, qui sont exprimés séquentiellement pour diriger le développement des conidiophores et la maturation des conidies (**Fig. 14**). Chacun de ces gènes est absolument nécessaire à ce mécanisme, indépendamment de la croissance végétative. La mutation d'un seul d'entre eux bloque la conidiation à un stade spécifique (Adams et al., 1998). La CDP est exclusivement exprimée dans les

conidiophores (Etxebeste et al., 2010), et coordonne l'expression de l'ensemble des gènes spécifiques à la conidiation (Park & Yu, 2012).

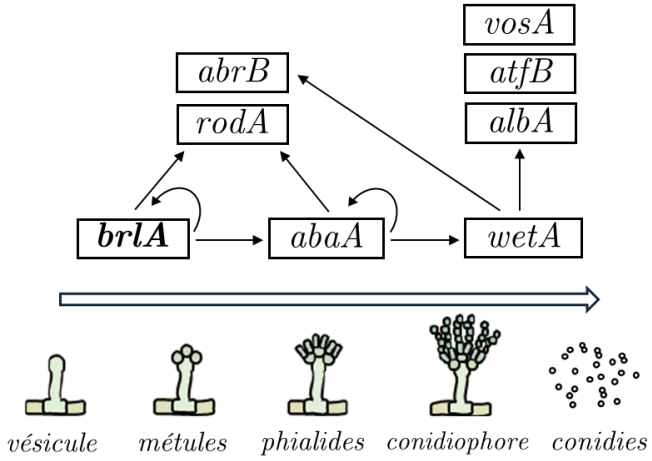


Fig. 14 *Voie centrale du développement avec les gènes brlA, abaA et wetA d'après Adams et al., 1998, dessins repris de Park & Yu, 2012.*

Le premier de ces trois gènes code pour la protéine BrlA, composée de 432 acides aminés, et principalement localisée dans les vésicules et les stérigmates (métules et phialides). Ce facteur de transcription, qui contient deux motifs à doigt de zinc Cys2His2, est un régulateur précoce du développement asexué, nécessaire pour la transition de la croissance des hyphes végétative à la formation des conidiophores (Park & Yu, 2012; Son et al., 2023). Le gène sauvage *brlA*, isolé par des expériences de complémentation (Timberlake et al., 1987), est constitué de deux unités de transcription qui se chevauchent, *brlAα* et *brlAβ*, et qui s'accumulent lors de l'apparition des vésicules au début du développement. L'activité du gène *brlA* continue d'être requise jusqu'à la formation des spores (Adams et al., 1998). Son nom vient de l'anglais *bristle*, qui qualifie ainsi le phénotype hérissé du mycélium des mutants délétés du gène *brlA*. Le gonflement de leurs vésicules est inhibé, et ils développent de longues tiges, vingt à trente fois plus grandes que les tiges des conidiophores sauvages (Clutterbuck, 1969). La formation des stérigmates, et par conséquent la production de conidies, sont inhibées. A l'inverse, la surexpression du gène *brlA* provoque l'arrêt de la croissance et la formation de conidies directement à partir des pointes hyphales (Park & Yu, 2012). La protéine BrlA contrôle sa propre expression ainsi que celle de gènes régulateurs du développement, tel que le gène *abaA* que nous allons détailler ci-dessous, mais également des gènes de classe A *rodA* et *abrB*, en se liant à leurs promoteurs (**Fig. 14).** Son site de liaison, appelé BRE pour *BrlA response element*, correspond à la séquence 5'-(C/A)(G/A)AGGG(G/A)-3' (Son et al., 2023).

Le deuxième gène de cette voie centrale code pour la protéine AbaA, un régulateur intermédiaire du développement asexué essentiel pour la différenciation des phialides, activé par la protéine BrlA après la différenciation des métules (**Fig. 14**). La protéine AbaA contient un domaine de liaison à l'ADN TEA/ATTS, ainsi qu'un motif leucine zipper utile à la dimérisation (Adams et al., 1998; Park & Yu, 2012). Comme pour le gène *brlA*, le gène *abaA* est nommé en raison des caractéristiques morphologiques des mutants délétés du gène. Le terme abacus désigne en effet un phénotype « en boulier », les mutants différenciant bien les métules mais pas les phialides, ils forment de longues chaînes de cellules perlées en guise de conidiophores, sans produire de conidies (Sewall et al., 1990). La surexpression du gène *abaA* provoque l'arrêt de la croissance végétative, une vacuolisation cellulaire accentuée, ainsi que l'inhibition de la production de conidies (Park & Yu, 2012). En revanche, cette surexpression du gène *abaA* entraîne également l'activation du gène *brlA*, tandis que la délétion du gène *abaA* entraîne une surexpression du gène *brlA*. Les gènes *brlA* et *abaA* seraient ainsi des inducteurs réciproques, mais l'expression du gène brlA doit se produire avant l'expression du gène *abaA* pour un développement productif du conidiophore (Adams et al., 1998). La protéine AbaA régule sa propre expression ainsi que celle d'autres gènes de la conidiation, tels que les gènes *brlA* et *wetA*, mais également *abrB* et *rodA* (**Fig. 14**), en reconnaissant dans leurs promoteurs leur site de liaison, appelé ARE pour *AbaA response element*, qui correspond à la séquence 5'-CATTCY-3' où Y est une pyrimidine (Adams et al., 1998; Son et al., 2023).

Le dernier gène de cette voie code pour la protéine WetA, un régulateur tardif de la conidiation, induit par la protéine AbaA et localisé dans les conidies (**Fig. 14**). Celui-ci est indispensable à leur maturation, et plus précisément à la synthèse des composants de leur paroi cellulaire (Marshall & Timberlake, 1991; Park & Yu, 2012). Les mutants délétés du gène *wetA* différencient des conidiophores normaux, mais ceux-ci produisent des conidies mutantes immatures dites wet-white, perméables et non pigmentées, dont la viabilité est réduite et qui finissent par s'autolyser (Adams et al., 1998; Son et al., 2023). La protéine WetA, qui contient un domaine de liaison à l'ADN ESC1/WetA, va permettre de réguler l'expression de gènes spécifiques aux conidies tels que *abrB*, *albA*, *vosA* et *atfB* (**Fig. 14**), en reconnaissant dans leur promoteur le site de liaison WRE pour *WetA response element*, qui correspond à la séquence 5'-CCGYTTGCGGC-3' (Son et al., 2023).

Ces mécanismes de contrôle de la conidiation semble être conservés au cours de l'évolution chez l'ensemble des espèces d'*Aspergillus*, mais également celles de *Penicillium* (Park & Yu, 2012; Roncal & Ugalde, 2003). Les gènes *brlA, abaA* et *wetA* ont été découvert chez *P. chrysogenum* et *P. marneffei* (Borneman et al., 2000; Prade & Timberlake, 1994), et également clonés chez *P. camemberti* par Boualem (Boualem, 2008).

1.3.3.3.2 Activation de la voie centrale

L'arrêt de la croissance végétative et l'initiation de la conidiation ont lieu en réponse à des signaux internes et/ou externes qui seront détaillés au prochain chapitre. Il y a trente ans, un gène en amont de la CDP, nommé *fluG*, a été caractérisé (Wieser et al., 1994). Ce gène a été montré comme nécessaire à l'initiation de la conidiation et à l'activation du gène *brlA*, en permettant la synthèse d'un facteur extracellulaire d'induction de la sporulation (ESID) (**Fig. 15**) (Park & Yu, 2012; Son et al., 2023). Les mutants délétés du gène *fluG* ainsi que ceux des gènes *flb*, qui seront discutés au prochain paragraphe, présentent un phénotype duveteux ou cotonneux, de l'anglais fluffy. En l'absence du gène *fluG*, même si le gène *brlA* n'est pas activé, il est toutefois possible d'observer une faible conidiation en réponse à un stress environnemental, ce qui prouve qu'il existe un mécanisme de conidiation indépendant de *fluG* (Adams et al., 1998). L'extrémité C-terminale de la protéine FluG, composée de 436 acides aminés, possède 28 % d'identité avec la glutamine synthétase I procaryote GSI. S'il est peu probable que la protéine FluG soit impliquée dans la synthèse de la glutamine ou du glutamate, elle pourrait fonctionner comme une enzyme apparentée à la GSI dans la synthèse de l'ESID (Adams et al., 1998; Lee & Adams, 1994). La régulation développementale médiée par le gène *fluG* s'applique à deux voies de signalisation antagonistes : d'une part l'activation de la conidiation, et d'autre part l'inhibition de la croissance végétative (**Fig. 15**) (Park & Yu, 2012; Son et al., 2023). Ces deux voies sont probablement fonctionnelles chez les espèces de *Penicillium* (Roncal & Ugalde, 2003).

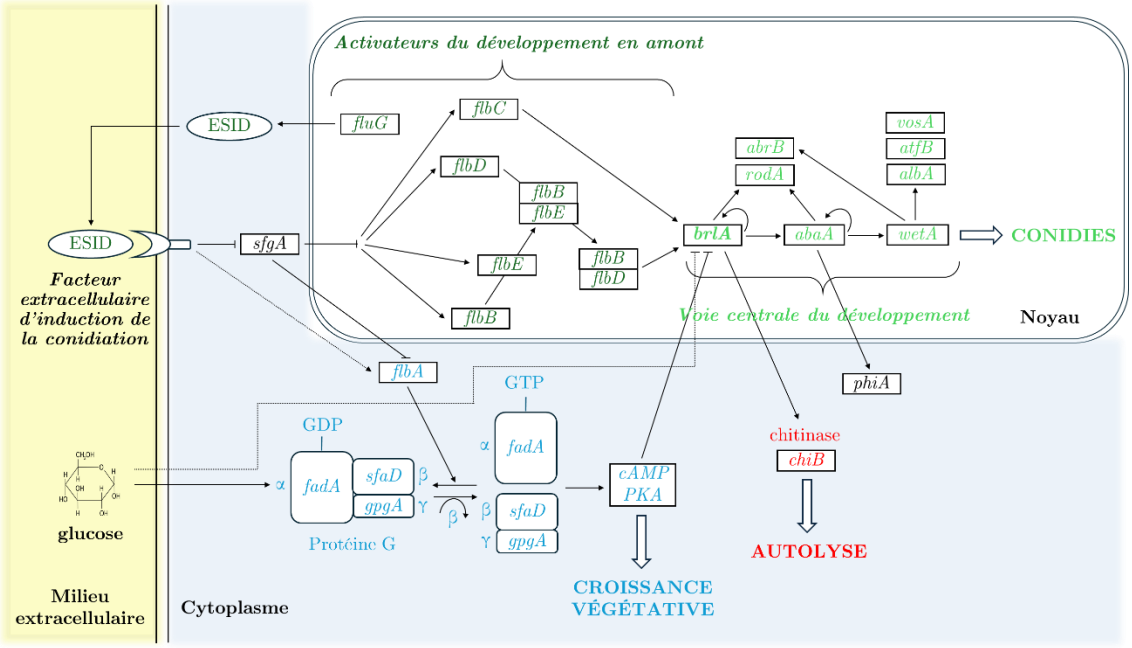


Fig. 15 *Régulations de la conidiation (en vert) et de la croissance végétative (en bleu) chez les espèces d'Aspergillus et de Penicillium d'après Adams et al., 1998; Emri et al., 2005; Park & Yu, 2012; Son et al., 2023.*

La première voie, l'activation du développement des conidiophores, est régulée par un réseau complexe de facteurs de transcription interdépendants (**Fig. 15**) (Garzia et al., 2010). Certains, appelés gènes *sfg* (*sfgA*, *sfgB*, *sfgC* et *sfgD*), inhibent le développement asexué lorsque les conditions sont favorables à la croissance végétative. *SfgA*, inhibé par *fluG* lors de la conidiation, est un facteur de transcription de type Gal4, dont le mutant délété présente une conidiation hyperactive (Son et al., 2023). D'autres gènes, appelés *Upstream Developmental Activators* (UDA), induisent au contraire la production de conidiophores (Seo et al., 2006). Parmi eux le gène *fluG*, ainsi que les gènes *flb* (*flbB*, *flbC*, *flbD*, et *flbE*), dont les mutants délétés présentent le fameux phénotype duveteux, d'où l'appellation flb pour fluffy *low bristle*. Le signal transmis par FluG active la conidiation en inhibant l'expression de *SfgA*, empêchant l'effet inhibiteur de SfgA sur les protéines Flb. Ces dernières permettent le développement asexué en induisant l'expression de *brlA* (Lee & Adams, 1994; Son et al., 2023; Wieser et al., 1994). Ces quatre gènes *flb* se répartissent en deux voies distinctes pour activer *brlA, flbB-flbE-flbD et flbC* (Park & Yu, 2012). La protéine FlbB est un facteur de transcription de type leucine zipper basique bZIP, qui contient des domaines similaires à ceux trouvés dans la famille des facteurs de type AP-1, participant à la réponse au stress oxydatif. FlbB est localisée au Spitzenkörper et dans les noyaux les plus apicaux des hyphes végétatives, où elle forme un complexe avec FlbE. Toujours dans le noyau, le complexe FlbB-FlbE active l'expression du gène *flbD*, qui code pour un facteur de transcription de type cMyb. FlbB et FlbD forment à leur tour un complexe qui se lie au promoteur et active l'expression transcriptionnelle de *brlA* (Etxebeste et al., 2010; Son et al., 2023). Parallèlement, FlbC, facteur de transcription qui contient deux motifs à doigt de zinc Cys2His2, est également localisé dans le noyau. FlbC n'est pas affecté par les autres protéines Flb, et se lie directement aux éléments cis régulateurs du gène *brlA* pour induire son expression. Ainsi ces deux voies, bien qu'indépendantes, sont nécessaires pour une activation complète de *brlA* (Etxebeste et al., 2010; Park & Yu, 2012).

La seconde voie, l'inhibition de la croissance végétative, implique *flbA*, un autre gène *flb* essentiel à l'équilibre entre prolifération et développement asexué (**Fig. 15**). La délétion de *flbA* altère fortement la croissance et la différenciation des conidiophores. FlbA possède un domaine RGS de régulation de la signalisation des protéines G hétérotrimériques, qui va favoriser l'hydrolyse du GTP de la sous-unité α en GDP, inactivant les protéines G, donc inhibant la signalisation de la croissance végétative. Chez *A. nidulans*, il existe ainsi une protéine G avec une sous-unité α appelée FadA, une sous-unité β nommée SfaD pour *Suppressors of the flbA-loss of function mutations*, et une sous-unité γ GpgA pour *G protein gamma A*. Dans sa forme liée au GDP, FadA inactivée inhibe la dissociation des sous-unités SfaD et GpgA, ce qui inhibe la croissance végétative et active le

développement asexué (Park & Yu, 2012; Son et al., 2023; Yu et al., 1996). En revanche, l'activation de FlbA augmente l'activité GTPases de FadA, et celle-ci, liée au GTP, va se dissocier du complexe pour activer PkaA, qui va elle-même inhiber *brlA*, donc la conidiation. Les trois sous-unités séparées vont elles-mêmes favoriser cette voie et inhiber la prolifération (Etxebeste et al., 2010; Son et al., 2023). Si certains auteurs associent directement FluG à l'activation de *flbA* (Park & Yu, 2012; Yu et al., 1996), d'autres sont plus prudents et évoquent uniquement une simultanéité des processus d'activation de la conidiation et d'inhibition de la croissance végétative peu de temps après la réception du stimulus inducteur (Etxebeste et al., 2010; Son et al., 2023).

Un mécanisme proche a été observé chez l'espèce *Talaromyces marneffei*, avec le clonage d'un gène homologue de *fadA* nommé *gasA*, impliqué dans l'inhibition spécifique de la conidiation via le déclenchement d'une cascade de protéines kinases A dépendantes de l'AMPc. En revanche, GasA n'est pas impliquée dans la régulation de la croissance végétative contrairement à FadA (Zuber et al., 2002).

1.3.3.3.3 Autres activateurs de la voie centrale

En plus de l'activation du gène *brlA* via les UDA, d'autres facteurs de transcription sont impliqués dans la régulation spatio-temporelle de la CDP. Ceux-ci ont été résumés par Son et al., 2023 et repris dans la **Table 1**.

Table 1 *Régulateurs connus de la voie centrale de la conidiation chez A. nidulans d'après Son et al., 2023.*

Régulation	**Facteur de transcription**	**Rôle**
Activateurs de *brlA* uniquement	RlmA	Phialides et remodelage de la paroi cellulaire
	AslA	Développement asexué (DA)
	MtfA	DA et production de métabolites secondaires
	RcoA	DA, croissance végétative et répression catabolique du carbone
	RtfA	DA et croissance végétative
	HbxA	DA
Activateurs de *brlA* et *abaA*	StuA	Formation des conidiophores
	RgdA	Formation des phialides
	MedA	Formation des métules et phialides
Répresseurs de *brlA*	NsdC	DA et croissance végétative
	NsdD	DA

1.4 Production de conidies de *Penicillium* en milieu liquide

1.4.1 Procédés de production des champignons filamenteux

C'est dans sa ferme que Marie Harel inventa et développa les premiers Camembert à la fin du XVIII^{ème} siècle (**Fig. 16**). Cette fabrication fermière locale concernait tous les parents de ce fromage, comme le Brie, le Coulommiers ou le Neufchâtel, sur lesquels *P. camemberti* se développe. À l'époque, le développement de cette moisissure est en fait spontané, elle se propage par l'air ambiant de la fromagerie. *P. candidum* avait notamment été isolé dans les caves de la région de Neufchâtel. Le succès de ces fromages et la nécessité d'en produire en grande quantité a rendu cette propagation spontanée bien plus difficile et aléatoire. Les fromagers eurent donc recours à l'ensemencement artificiel, et la culture de *P. camemberti* s'est industrialisée avec le temps (Desfleurs, 1968).



Fig. 16 *Représentation scénique de la fermière Marie Harel effectuant l'étape de moulage des Camembert à gauche, et de l'affinage des Camembert à droite, tirées du musée du Camembert dans le village éponyme de l'Orne (61) (Photographies personnelles, 2022).*

1.4.1.1 Fermentation solide SSF

1.4.1.1.1 Description

Les premières productions contrôlées de spores de champignons filamenteux sont conduites en fermentation solide, nommée SSF pour *Solid-state fermentation* (Larroche et al., 1988). La fermentation solide SSF est définie comme un processus de fermentation dans lequel des micro-organismes se développent sur des matériaux solides sans la présence de liquide libre (Cannel & Moo-Young, 1980). Traditionnellement la SSF a été utilisée dans la production d'aliments et boissons traditionnels en Asie-Pacifique, tels que le tempeh et l'oncom en Indonésie, le vin de riz de Shaoxing et le kaoliang en Chine, ainsi que le miso, la sauce soja et le saké au Japon. Ces productions artisanales

sont très anciennes, et la SSF s'est beaucoup développée jusqu'au milieu du XX^{ème} siècle, avec comme point d'orgue la production de pénicilline pendant la Seconde Guerre mondiale (Gowthaman et al., 2001; Krishna, 2005). Pour revenir à l'affinage des fromages, les conidies de *P. camemberti* sont historiquement produites en SSF dans des fioles de Roux (Krasniewski et al., 2006) traditionnellement avec de la farine de blé comme substrat. Celles de *P. roqueforti*, produites en SSF sur du pain (Dumas et al., 2020), peuvent néanmoins être produite à plus grande échelle, notamment en bioréacteurs SSF avec des graines de sarrasin comme substrat (Larroche et al., 1988). Pour ces deux espèces, les spores sont récoltées après trois à quatre semaines de culture.

1.4.1.1.2 Avantages et limites

La SSF possède de nombreux avantages pratiques et économiques, en premier lieu la grande variété et le faible coût des substrats, qui peuvent être des matières premières, ainsi que la non-obligation d'être en conditions aseptiques. Le niveau d'humidité en SSF étant faible, la consommation d'eau et le rejet d'eaux usées sont assez réduits, le traitement post-fermentation est moins coûteux, et l'espace de fermentation est relativement compact et réduit. Les coûts d'investissement et la dépense énergétique sont donc plutôt faibles. Enfin, la fermentation solide imite les habitats naturels, et le développement du mycélium sur un milieu solide peut ainsi s'apparenter au développement du mycélium sur le caillé lors de la fabrication du fromage (Krishna, 2005; Arora et al., 2018; Strong et al., 2022). Cependant, en plus d'un temps de croissance relativement long, et d'une grande hétérogénéité des cultures (due à l'impossibilité d'agiter convenablement le substrat), la principale limite réside dans la difficulté à mesurer et contrôler les différents paramètres physico-chimiques au cours de la fermentation. Les données sur l'aération, l'humidité, le pH ou les transferts de chaleur, essentielles pour optimiser les procédés, ne sont pas mesurables aisément (Krishna, 2005; Strong et al., 2022).

1.4.1.2 Fermentation submergée SmF

1.4.1.2.1 Un système qui pallie les défauts de la SSF

En raison de ces difficultés, les pays Occidentaux ont rapidement délaissé la fermentation solide SSF à partir des années 1950 au profit de la fermentation en milieu liquide, appelée SmF pour *Submerged fermentation*. À cette époque, la nécessité de développer des procédés pour améliorer les rendements a stimulé la recherche (Krishna, 2005; McNeil & Harvey, 2008). Ce mode de culture en bioréacteur agité et/ou aéré constitue une technologie bien établie qui prend place aussi bien en laboratoire qu'en industrie. Les bioréacteurs à petite échelle, ayant un volume total compris entre 1 et 20 L, sont des outils qui se sont démocratisés et ont facilité les changements d'échelle et les

développements de milieux et procédés. Les temps de production sont généralement plus courts en SmF qu'en SSF, avec une croissance plus rapide du mycélium, et une plus grande facilité de séparation entre biomasse et produit (Amrane et al., 1999; McNeil & Harvey, 2008; Strong et al., 2022). Ces gains de temps nécessitent cependant d'importants investissements financiers pour les entreprises, la capacité des bioréacteurs industriels les plus volumineux pouvant atteindre plusieurs dizaines de mètres cube.

1.4.1.2.2 Des paramètres et des modes de culture multiples

Par rapport à la SSF, le principal avantage de la SmF reste la grande facilité de mesure et de contrôle des paramètres physico-chimique pendant la fermentation, ce qui permet d'automatiser plus simplement les procédés. Parmi les paramètres opératoires, on peut citer le pH, la température, l'aération et l'agitation (Papagianni, 2004; Canteri & Ghoul, 2015). Ces procédés SmF impliquent l'inoculation d'une souche sélectionnée, ici fongique, qui se développe dans un milieu stérilisé au sein d'un bioréacteur stérilisé (McNeil & Harvey, 2008). La concentration, le type (conidie ou mycélium) ainsi que l'âge de cet inoculum ont donc une grande importance (Papagianni, 2004).

De plus, il existe en fermentation submergée SmF trois modes opératoires principaux. La fermentation en *batch*, le mode opératoire le plus simple, est un système fermé dans lequel tous les substrats nécessaires à la croissance de l'organisme et à la formation du produit sont contenus dans le contenant du début à la fin de la fermentation. À côté d'elle, la fermentation en *fed-batch*, si elle débute généralement comme en batch, constitue quant à elle un système ouvert, puisqu'au cours de la culture du milieu nutritif et/ou des inducteurs sont introduits dans le bioréacteur. Elle s'effectue soit à volume fixe, avec une élimination d'un volume de culture égal au volume de milieu ajouté, soit à volume variable, avec un ajout de milieu sans élimination parallèle, qui vient donc augmenter le volume total de culture. En fermentation continue enfin, du milieu nutritif frais est ajouté en continu dans le bioréacteur, la culture étant éliminée du système au même rythme. Le volume de culture et la concentration en substrat restent donc constant, tout comme les paramètres du système tels que le pH, la température ou l'oxygène dissous (McNeil & Harvey, 2008).

La façon dont le milieu nutritif est amené influencent donc fortement le comportement de la souche fongique, mais la composition du milieu en lui-même est tout aussi essentielle. Pour les champignons filamenteux, une source de carbone, une source d'azote, de l'eau et de l'oxygène, sont considérés comme des éléments indispensables à leur culture. D'autres nutriments, appelés oligoéléments, sont nécessaires en petites quantités, il s'agit par exemple du phosphore, du potassium, du soufre, du magnésium, du manganèse, du fer, du zinc, du cuivre et du molybdène. Ces

milieux nutritifs peuvent être synthétiques c'est-à-dire chimiquement définis, ou complexe avec des matières premières issues du vivant (Papagianni, 2004).

1.4.2 Induction de la conidiation en milieu liquide

À l'heure actuelle en industrie, les conidies de *Penicillium* sont préférentiellement produites en SmF, en utilisant les conidies elles-mêmes comme inoculum plutôt que le mycélium (Pascual et al., 1997). De manière générale en biotechnologie, un travail de recherche et développement est préalablement nécessaire à une production à grande échelle en bioréacteur. S'il existe des bioréacteurs pilotes de 20 à 100 L pour les études de faisabilité, ou des bioréacteurs de laboratoire de 1 à 3 L (McNeil & Harvey, 2008), la plupart des études sur l'impact de différents facteurs sur la conidiation chez les *Penicillium* sont menées à l'échelle de la fiole (dizaines de mL). L'ensemble de ces facteurs, la ou les espèce(s) impliquée(s), le mécanisme potentiel ainsi que la morphologie observée, sont résumés dans la **Table 2.**

Table 2 *Facteurs d'induction de la conidiation en milieu liquide.*

Stimuli d'induction de la conidiation	**Espèce**	**Macro-morphologie décrite**	**Référence**
Taux d'ensemencement faible (10^5 conidies·mL^{-1})	*P. camemberti*	*Pellets*	(Bockelmann et al., 1999)
Composition du milieu			
- Calcium	*P. cyclopium*	*Pellets*	(Schröder, 1978)
	P. notatum	*Pellets*	(Pitt & Poole, 1981)
	P. camemberti	*Pellets*	(Bockelmann et al., 1999)
- Acétate	*P. camemberti*	*Pellets*	(Bockelmann et al., 1999)
- Glucose (en grande quantité)	*P. griseofulvum*	Non indiquée	(Morton, 1961)
- à 10 g·L^{-1} vs 30 g·L^{-1}	*P. camemberti*	*Pellets*	(Bockelmann et al., 1999)
- Milieu complexe	*P. camemberti*	*Pellets*	(Boualem et al., 2016)
- pH proche de 7.0	*P. camemberti*	Non indiquée	(Canteri & Ghoul, 2015)
Carence dans le milieu			
Carbone	*A. nidulans*	Non indiquée	(Skromne et al., 1995)
Azote	*A. ochraceus*	Non indiquée	(Vézina et al., 1965)
	P. oxalicum	*Pellets*	(Pascual et al., 1997)
	P. camemberti	Non indiquée	(Canteri & Ghoul, 2015)
Présence de conidiogénone	*P. cyclopium*	Non indiquée	(Roncal & Ugalde, 2003)
Paramètres opératoires			
- Température	*P. camemberti*	*Pellets*	(Boualem et al., 2014)
- Lumière	*A. nidulans*	Non indiquée	(Ruger-Herreros et al., 2011)
- Exposition à l'air	*P. griseofulvum*	Non indiquée	(Morton, 1961)

1.4.3 Morphologies en fermentation submergée

1.4.3.1 Description des morphologies

En fermentation submergée SmF, les champignons filamenteux adoptent différentes macromorphologies. Ils peuvent être soit sous forme de mycélium dispersé avec des filaments libres dans une culture homogène, soit en *clumps* c'est-à-dire en amas mycéliens, soit en *pellets* (pelotes) sous forme de masses mycéliennes densément enchevêtrées mesurant jusqu'à plusieurs millimètres de diamètre (**Fig. 17**) (Cox et al., 1998; G. C. Paul & Thomas, 1998). Concrètement, le type de macromorphologie adopté par un champignon influence le comportement de la culture. Une morphologie dispersée permet une croissance rapide et une bonne diffusion des nutriments du milieu. Les cultures sont néanmoins assez visqueuses, ce qui réduit le taux de transfert d'oxygène. À l'inverse, la croissance en *pellets* permet d'avoir une culture avec une faible viscosité et une grande résistance au stress de cisaillement (Papagianni, 2004; Meyer et al., 2021). Mais la structure dense de la région centrale des *pellets* limite la diffusion de molécules. Cette structure interne peut donc subir une autolyse (Hille et al., 2009). Les amas mycéliens (*clumps*), moins étudiés et compris, constituent une morphologie intermédiaire et résulteraient, comme les *pellets*, d'une l'agglomération de mycélium, mais beaucoup moins dense (Veiter et al., 2018).

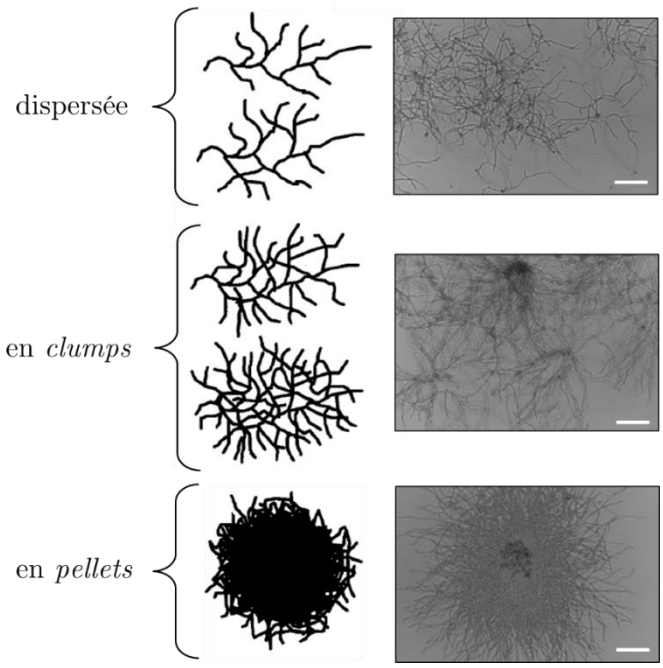


Fig. 17 *Schéma des différentes macromorphologies et exemples d'images en microscopie de A. niger en fermentation submergée d'après Paul & Thomas, 1998 et Meyer et al., 2021. Les barres d'échelle représentent 100 µm.*

De nombreuses techniques avancées ont été mises en place au cours des trente dernières années afin de caractériser plus précisément la morphologie, aux niveaux microscopique, macroscopique, voire à l'échelle du procédé (Krull et al., 2013). Celles-ci ont permis de comprendre les mécanismes de formation de ces morphologies, notamment par la nature coagulante ou non des conidies des champignons filamenteux (Nielsen, 1996). Les spores de types coagulantes s'agrègent en début de culture, et leur germination conduit inexorablement à la formation de *pellets* (**Fig. 18**). À l'inverse, les spores non coagulantes produisent des hyphes qui peuvent s'agglomérer en *pellets* ou simplement rester sous forme dispersée dans l'environnement (Krull et al., 2013; Drougard, 2018; Veiter et al., 2018). Un phénomène de fragmentation des *pellets* menant à une morphologie dispersée a également été décrit (Edelstein & Hadar, 1983), mais très peu documenté par la suite.

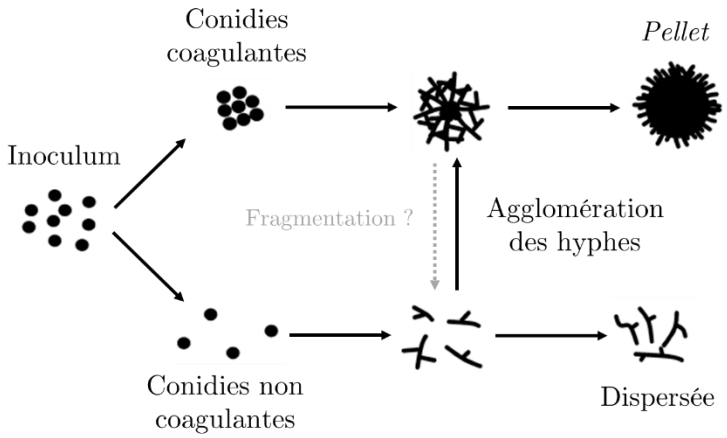


Fig. 18 *Mécanismes de formation des morphologies en pellets et dispersée en fonction du type de conidies, adaptée de Cairns et al., 2019.*

1.4.3.2 Lien avec la productivité

Ces descriptions posent question sur les différences fondamentales entre fermentation submergée et mode de vie fongique naturel, et sur l'adaptation des champignons filamenteux à leur environnement. De nombreuses études en fermentation submergée font le lien entre la macromorphologie fongique et la synthèse de métabolites et d'enzymes (Martinelli, 1976; Zhang et al., 2007; Krull et al., 2010; Wucherpfennig et al., 2011). À titre d'exemples, la production de pénicilline par *P. chrysogenum* nécessiterait l'adoption d'une morphologie dispersée. À l'inverse, la morphologie en *pellets* serait préférée pour la production de cellulases par *T. reesei* (Papagianni, 2004; Wucherpfennig et al., 2011). Un modèle hypothétique a été proposé par Cairns et al., 2019 pour *A. niger* (**Fig. 19**) : la morphologie des *pellets* est évaluée par un *morphology number* compris entre 0 (filament) et 1 (pellet rond) (Wucherpfennig et al., 2011). La production d'acide citrique serait

positivement corrélée à une augmentation de ce *morphology number* (courbe bleue pleine), alors que la production d'invertase serait négativement corrélée à celui-ci (courbe rouge en pointillé).

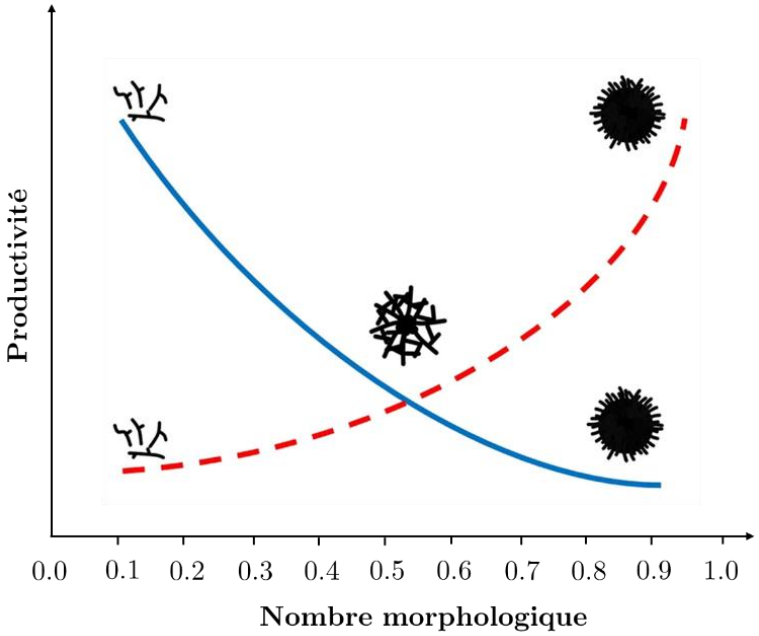


Fig. 19 *Modèle théorique de la formation de produit en fonction de la morphologie des pellets chez A. niger d'après Cairns et al., 2019.*

D'un point de vue biotechnologique, cette corrélation équivaut à considérer qu'il existe une macromorphologie optimale pour maximiser la synthèse d'un produit par une souche fongique spécifique. Dans un contexte industriel, la productivité fongique dépend fortement de la maîtrise de la morphologie, mais pas toujours directement (Cox et al., 1998; Papagianni, 2004). Certains auteurs vont même plus loin, et suggère qu'avec une combinaison parfaite de conditions de culture, il serait possible d'obtenir les mêmes effets métaboliques avec des morphologies différentes (Drougard, 2018).

1.4.3.3 Ingénierie morphologique

Afin d'influencer le métabolisme, donc la productivité, la morphologie fongique peut être contrôlée de diverses manières. Ce domaine, appelé ingénierie morphologique, est défini comme l'adaptation des morphologies à des bioprocédés spécifiques (McIntyre et al., 2001). Les techniques utilisées, qui influencent les conditions de culture, sont classées en deux types d'approches : les classiques et les modernes (Wucherpfennig et al., 2011) (**Fig. 20**).

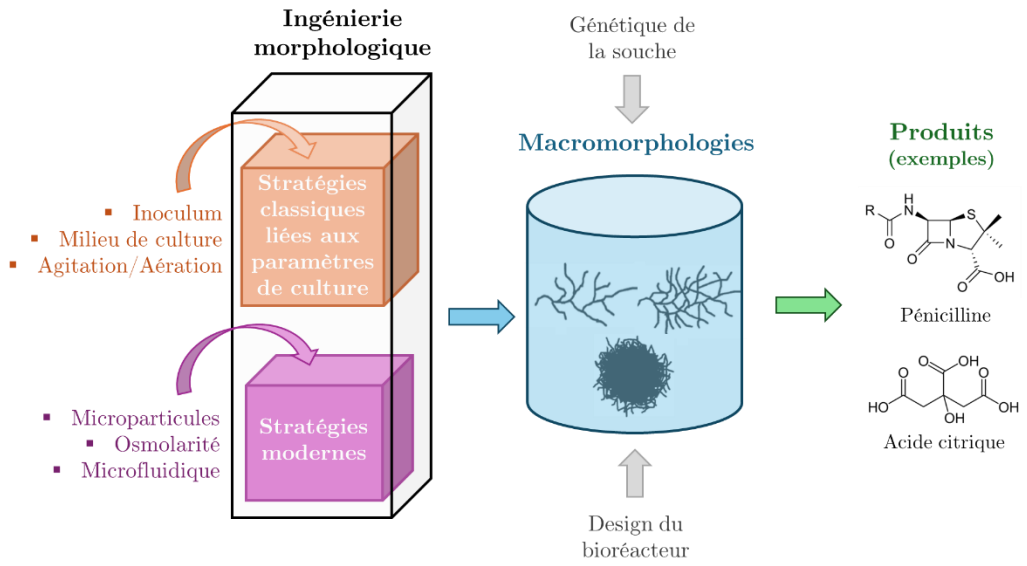


Fig. 20 *Stratégies d'ingénierie morphologique classiques et modernes.*

Les approches d'ingénierie morphologique classiques concernent la modification des paramètres classiques de fermentation submergée SmF, cités plus-haut (**Table 2**). En plus de la génétique de la souche, qui détermine la nature coagulante des conidies, le taux d'ensemencement a été corrélé avec la macromorphologie dans de nombreux travaux. Deux études ont notamment été menées chez *P. chrysogenum*. Dans la première, des *pellets* étaient visibles uniquement à des concentrations inférieures à 10^4 conidies·mL^{-1} (Calam, 1987). Dans la seconde, très peu de *pellets* ont été observées à une concentration initiale supérieure à 10^6 conidies·mL^{-1} (Tucker & Thomas, 1992). La composition du milieu de culture a également un impact sur la morphologie, notamment la concentration de la source de carbone. Lors d'une culture en batch de *A. niger*, une diminution de la concentration initiale en glucose a eu comme effet une diminution de la taille des *clumps*, ainsi qu'une diminution de la production d'acide citrique (Papagianni et al., 1999). Toujours concernant le milieu, le processus d'agglomération des conidies, vu précédemment, dépendrait du pH. Une étude chez *A. oryzae* a en effet montré que le champignon était sous forme dispersée à un pH de 3.5, alors que des pellets se formaient à un pH supérieur à 5,0 (Carlsen et al., 1996). Enfin, l'aération et l'agitation, qui définissent une grandeur caractéristique des systèmes, appelée puissance dissipée (en kW·m^{-3}), influencent la macromorphologie. Dans des cultures en bioréacteur de *A. awamori*, des *pellets* denses apparaissaient à une forte concentration d'oxygène dissous (pO_2), alors qu'à une concentration plus faible, les *pellets* étaient plus duveteux, avec une fraction de mycélium dispersée plus importante (Cui et al., 1998). Dans des cultures en bioréacteur de *A. oryzae*, plus la vitesse d'agitation augmentait,

pour passer de 525 jusqu'à 825 tr·min^{-1}, soit des puissances dissipées entre 1 et 5 kW·m^{-3} dans les conditions de l'étude, plus la concentration de biomasse et la sécrétion de protéines recombinantes augmentaient (Amanullah et al., 2002).

Les stratégies modernes d'ingénierie morphologique comprennent diverses techniques (**Fig. 20**) telles que la manipulation de l'osmolarité du milieu de culture avec l'ajout de NaCl ou de KCl pour augmenter la productivité (Krull et al., 2013; Wucherpfennig et al., 2011), l'utilisation de la microfluidique (Drougard, 2018) ou la culture assistée par microparticules (MPEC) avec l'ajout de talc, d'alumine ou de dioxyde de titane pour modifier la morphologie (Antecka et al., 2016).

Objectifs de l'étude

De nombreuses études se sont ainsi intéressées à l'effets de différents paramètres de la fermentation sur la conidiation et la morphologie des *Penicillium* et *Aspergillus* en milieu liquide, mais aucune d'entre elles n'a réellement relié les deux phénomènes. Dans les travaux sur l'induction de la conidiation à l'échelle de la fiole, lorsque la macromorphologie est décrite, il s'agit systématiquement de *pellets* dans les conditions testées. Une revue suggère néanmoins qu'en production industrielle, la morphologie dispersée est privilégiée pour la production de conidies par le genre *Penicillium* (Canteri & Ghoul, 2015). Cela n'est pas étonnant, puisque la morphologie dispersée est recherchée dans une majorité de fermentations industrielles (Papagianni, 2004), sans doute en raison de la plus grande facilité à gérer la rhéologie de la culture.

Nous avons donc voulu tester dans un premier temps les facteurs qui influencent la morphologie et la production des conidies chez *P. camemberti* en conditions de laboratoires sur des volumes réduits. Notre hypothèse de départ est que la production de conidies peut être assimilée à la production d'un produit comme un autre. Des expériences préliminaires sur les paramètres classiques en fermentation liquide à l'échelle du laboratoire permettraient ainsi d'observer leurs effets sur la conidiation, et d'établir ou non un lien avec la macromorphologie. Dans un second temps, nous avons évalué les modifications de l'expression des gènes de *P. camemberti* au cours de la conidiation en milieu liquide. Depuis une trentaine d'années maintenant, les mécanismes cellulaires et le programme génétique de la conidiation chez les *Eurotiales* sont bien connus, notamment grâce aux études menées chez l'espèce modèle *A. nidulans*. Pourtant, peu de travaux ont été menés sur les effets des facteurs environnementaux et nutritifs inducteurs ou répresseurs sur l'expression des gènes de la conidiation, en particulier peu de données existent sur *P. camemberti* cultivé en milieu liquide. Une étude transcriptomique sur les effets des paramètres de culture chez *P. camemberti* permettrait donc de contribuer à la compréhension des mécanismes de régulation de la conidiation chez cette espèce. Enfin, un changement d'échelle en fioles puis en bioréacteurs a été mené, afin d'observer si les différents facteurs influençant la morphologie et la production de conidies à petite échelle avaient toujours les mêmes effets. Aucun modèle ne permet de réaliser l'extrapolation parfaite (Marques et al., 2010). Cependant, différents critères de la fermentation peuvent être calculés à chaque échelle afin de caractériser les effets de l'extrapolation, et la culture à grande échelle facilite la mesure et la compréhension des dynamiques de production des conidies et de la biomasse, dépendantes de facteurs multiples.

Les travaux présentés dans ce manuscrit ont pour but d'enrichir les connaissances sur le contrôle de la conidiation. Après cette introduction, le matériel et les méthodes utilisés pour mener ces études seront décrits, avant d'être suivi par trois chapitres de résultats. Le premier chapitre présente l'étude transcriptomique réalisé au LIED, sous la forme d'un article soumis en avril 2025. Les deux suivants détaillent les travaux réalisés au sein de Danisco, d'une part la mise en place d'une méthode automatisée de comptage des conidies, d'autre part l'étude du changement d'échelle de la fiole au bioréacteur. Enfin, les liens entre régulation de l'expression des gènes et extrapolation seront discutés.

Chapitre 2

Matériels & Méthodes

L'ensemble des expérimentations a été mené avec des cultures aérobies agitées en batch (milieu liquide) au sein de différents dispositifs expérimentaux (**partie 2.1 Dispositifs expérimentaux**). Pour l'ensemble de ces échelles, les effets de différents facteurs de la fermentation (**partie 2.2 Conditions de culture et facteurs testés**) sur différents critères de la culture (**partie 2.3 Analyse des critères de la fermentation**) ont été observés. Les méthodes utilisées pour l'étude transcriptomique sont décrites dans la **partie 3.2 Materials and Methods** dans l'article.

2.1 Dispositifs expérimentaux

Pour ces études, quatre types de dispositif ont été utilisés, à savoir des fioles d'Erlenmeyer, des fioles de Fernbach, des bioréacteurs de laboratoire et un bioréacteur pilote. Leur capacité et leur nombre sont présentés **Fig. 21**. À toutes les échelles, les cultures ont été menées en batch durant 140h (6 jours).

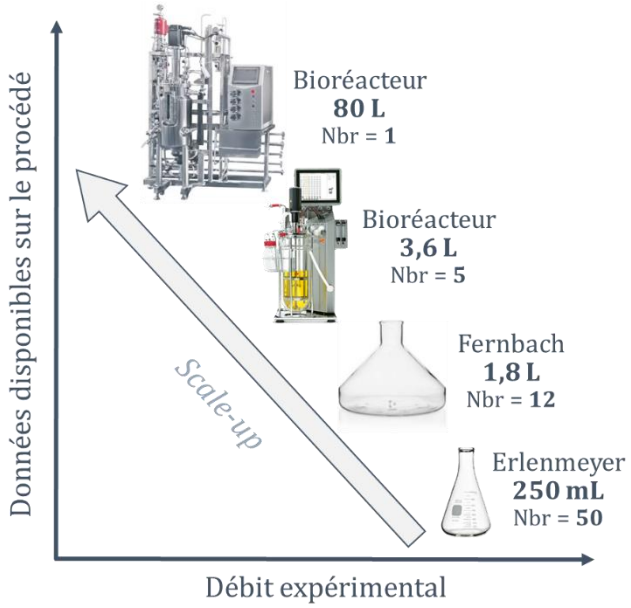


Fig. 21 *Présentations des différents dispositif expérimentaux utilisés en fonction du débit expérimental possible et de la quantité de données mesurables. Nrb = nombre d'essais possibles par expérimentation.*

2.1.1 Fioles d'Erlenmeyer et de Fernbach

Les fioles d'Erlenmeyer à col étroit (Fisher Scientific, Pittsburgh, États-Unis) ont un volume de 250 mL et sont remplies avec 65 mL de milieu. Les fioles de Fernbach à col standard (DWK Life Sciences, Vineland, États-Unis) ont un volume de 1800 mL et sont remplies avec 325 mL de milieu. Elles sont en verre borosilicaté, matériau leur permettant de résister à la stérilisation à la chaleur sèche (180°C pendant 2h). Le diamètre à la base du Fernbach (200 mm) est plus élevé que celui de l'Erlenmeyer (85 mm), ce qui impacte fortement la surface d'échange avec l'atmosphère (**Fig. 22**). Lors de la culture, ces fioles sont généralement fermées avec des bouchons en coton cardé, et plus occasionnellement avec de l'aluminium pour certains essais préliminaires.

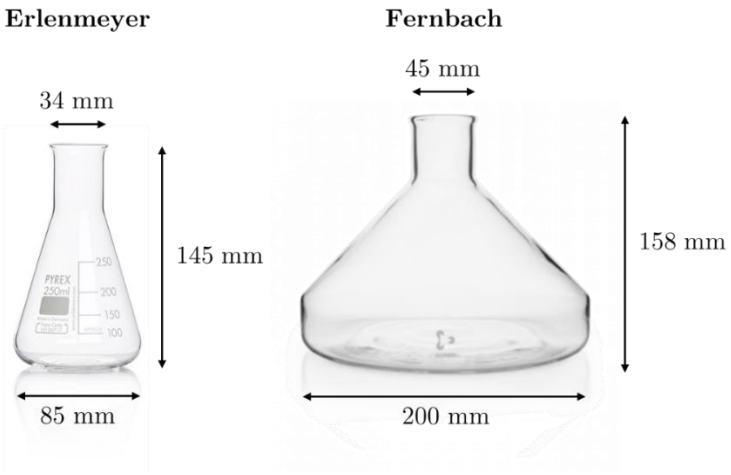


Fig. 22 *Dimensions des fioles d'Erlenmeyer (250mL) et des fioles de Fernbach (1,8 L)*

Pour les expériences au LIED, deux plateaux agités sont utilisés, à savoir un Innova 2300 (Eppendorf, Hambourg, Allemagne), et un TR-25 (Infors HT, Bâle, Suisse), chacun à une agitation orbitale de 50 mm, et ayant une capacité d'environ 25 Erlenmeyers ou 6 Fernbach. Ces cultures ont eu lieu classiquement dans une pièce à l'obscurité, régulée à 22°C (**Fig. 23A**). La température, la pression, l'humidité, le CO_2 et la luminosité de la pièce ont été contrôlés en ligne par un Kitronik Air Quality Control HAT pour Raspberry Pi (Fondation Raspberry Pi, Cambridge, Royaume-Uni) (**Fig. 23B**). Pour les expériences sur le site de Danisco, le dispositif est constitué d'un incubateur agité Multitron (Infors HT, Bâle, Suisse) à une agitation orbitale de 50 mm, et d'une capacité d'environ 32 Erlenmeyers ou 8 Fernbach. L'incubateur est régulé à 22°C et à l'obscurité.

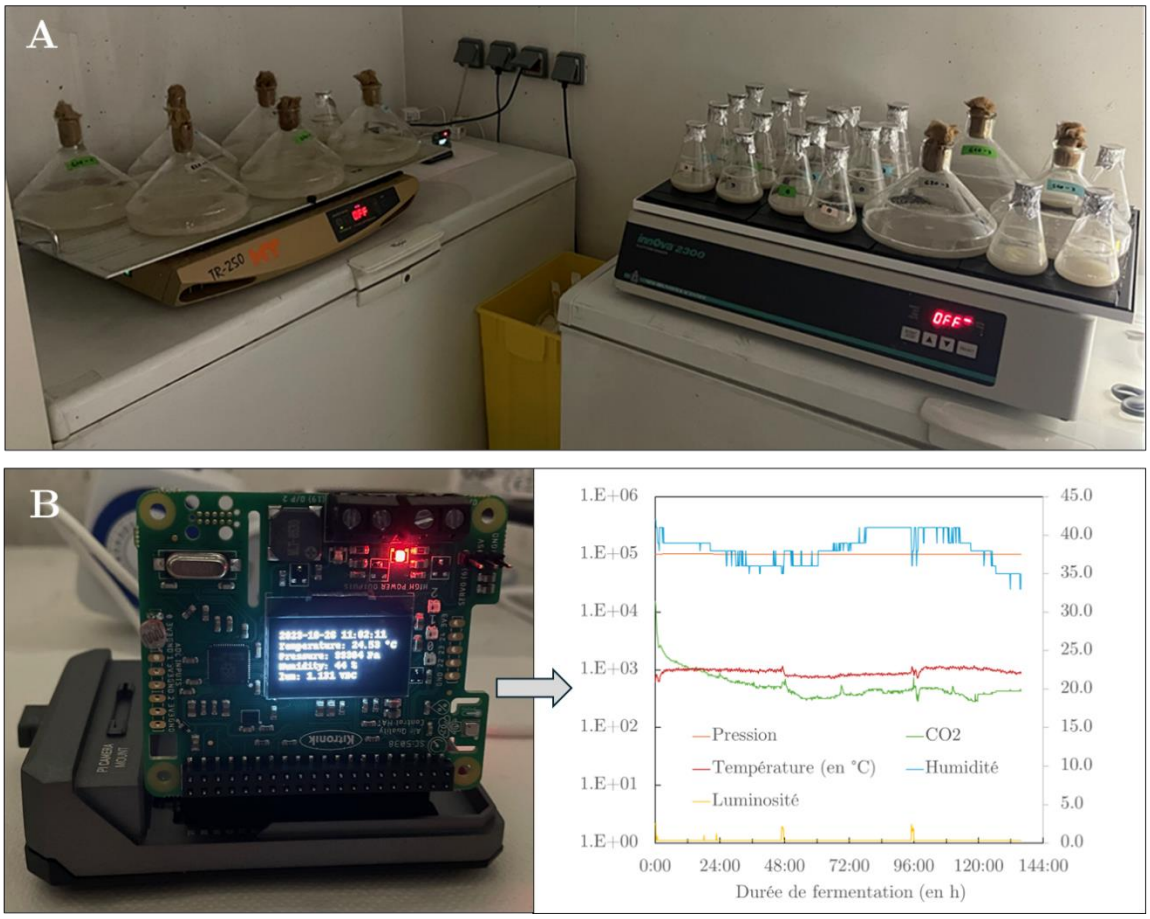


Fig. 23 *(**A**) Pièce de culture pour les fermentations en fioles au LIED, avec les deux plateaux agités (**B**) Kitronik Air Quality Control HAT et paramètres mesurés, avec en orange la pression (en Pa), en rouge la température (en °C), en jaune la luminosité (en lx), en bleu l'humidité (en %) et en vert le taux de CO_2 (en %).*

2.1.2 Bioréacteurs de laboratoire

2.1.2.1 Dispositif

Les bioréacteurs disponibles, au nombre de cinq, sur le site de Danisco sont des modèles Labors 5 (Infors HT, Bâle, Suisse) de volume 3,6 L et contenant 2,0 L de milieu (**Fig. 24A**). Ils sont équipés d'une cuve en verre à double enveloppe, qui permet de réguler la température par circulation d'eau, via un réservoir interne alimenté par une boucle à 4°C ou chauffée par une résistance électrique (**Fig. 24B**). Cette cuve est fermée hermétiquement par une platine en acier, équipée d'un moteur 430W pour faire tourner l'arbre d'agitation, d'une canne de prélèvement pour l'échantillonnage, et d'un bouchon avec un septum pour un ajout stérile éventuel (**Fig. 24C**). Les bioréacteurs sont équipés de trois sondes mesurant en continu le pH, la température et le pourcentage de pO_2 dissoute, décrites dans la **partie 2.3**.

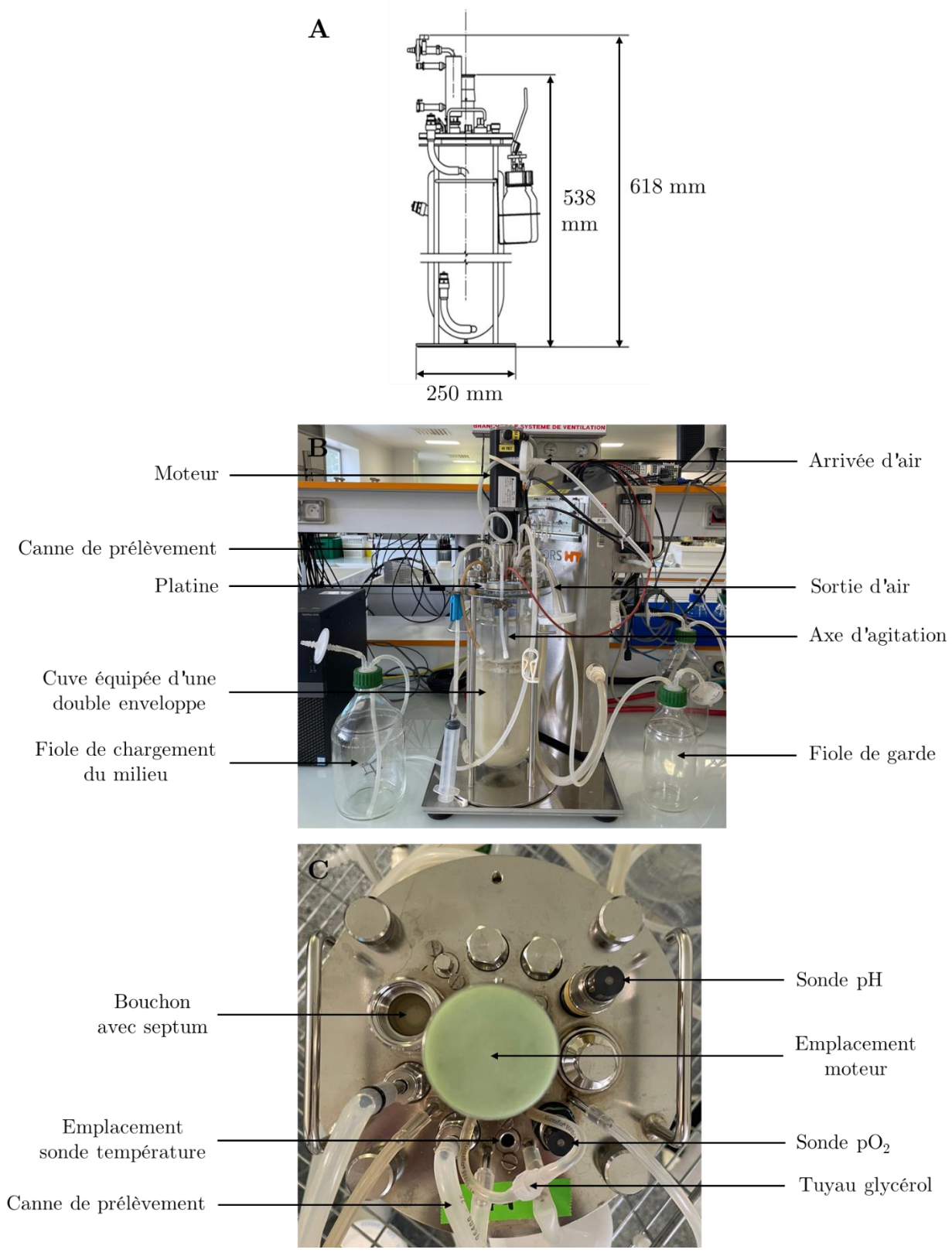


Fig. 24 *Bioréacteur Labfors 5 de 3,6 L (**A**) Dimensions (Product data sheet Labors 5 Infors HT) (**B**) Photographie du bioréacteur vu de face (**C**) Photographie de la platine du bioréacteur vue du dessus.*

2.1.2.2 Mesures des paramètres

Les bioréacteurs sont équipés de trois sondes, une sonde de mesure du pH analogique calibrée avant stérilisation, une de mesure de la température PT100, et une pour le pO_2 dissous analogique Hamilton VISIFERM DO325 (sonde Pt100 ; précision : +/- 0.2°C).

2.1.2.3 Agitation et aération

Les bioréacteurs décrits ici étaient auparavant utilisés pour la culture de bactéries lactiques. Ainsi avant notre étude, des travaux préliminaires ont été menés afin de faciliter la culture de champignons filamenteux, et notamment l'adoption d'une morphologie dispersée. Il a été observé que les moisissures avaient tendance à s'accrocher à chaque surface abiotique, comme les sondes, les mobiles, etc., en particulier PC01, champignon très épais. Pour limiter ce phénomène, seules les trois sondes décrites ci-dessus ont été mises en œuvre. Les contre-pales de série ont été retirées, et l'axe d'agitation a été équipé de trois mobiles, dans le but de maintenir en suspension le mycélium en lien avec la formation de mousse pendant la culture (**Fig. 25**). Le mobile du haut est une hélice quadripale à pales soufflant vers le bas, ce qui permet de limiter l'accumulation de biomasse en hauteur, qui est le problème majeur rencontré. Son flux principal est axial, elle a un vortex avec un effet de pompage très fort vers le bas. Le mobile intermédiaire est une turbine centripète large, avec un flux principal radial. Là encore son effet de pompage est très fort, mais ce mobile a également un effet de cisaillement puissant. Enfin, le mobile du bas est une turbine Rushton, avec un flux principal radial. Ce dernier est utilisé pour disperser l'air injecté par l'injecteur qui a été remplacé par une canule de diamètre 0.6 mm, car PC01 a tendance à boucher l'injecteur d'origine présentant de multiples orifices d'un diamètre millimétrique. Les diamètres des trois turbines sont indiqués **Fig. 25**. Une turbine Rushton supplémentaire n'est pas immergée dans la culture, elle affleure le milieu pour casser la mousse à la surface. Elle ne participe pas au mélange de la culture, contrairement aux trois autres mobiles d'agitation.

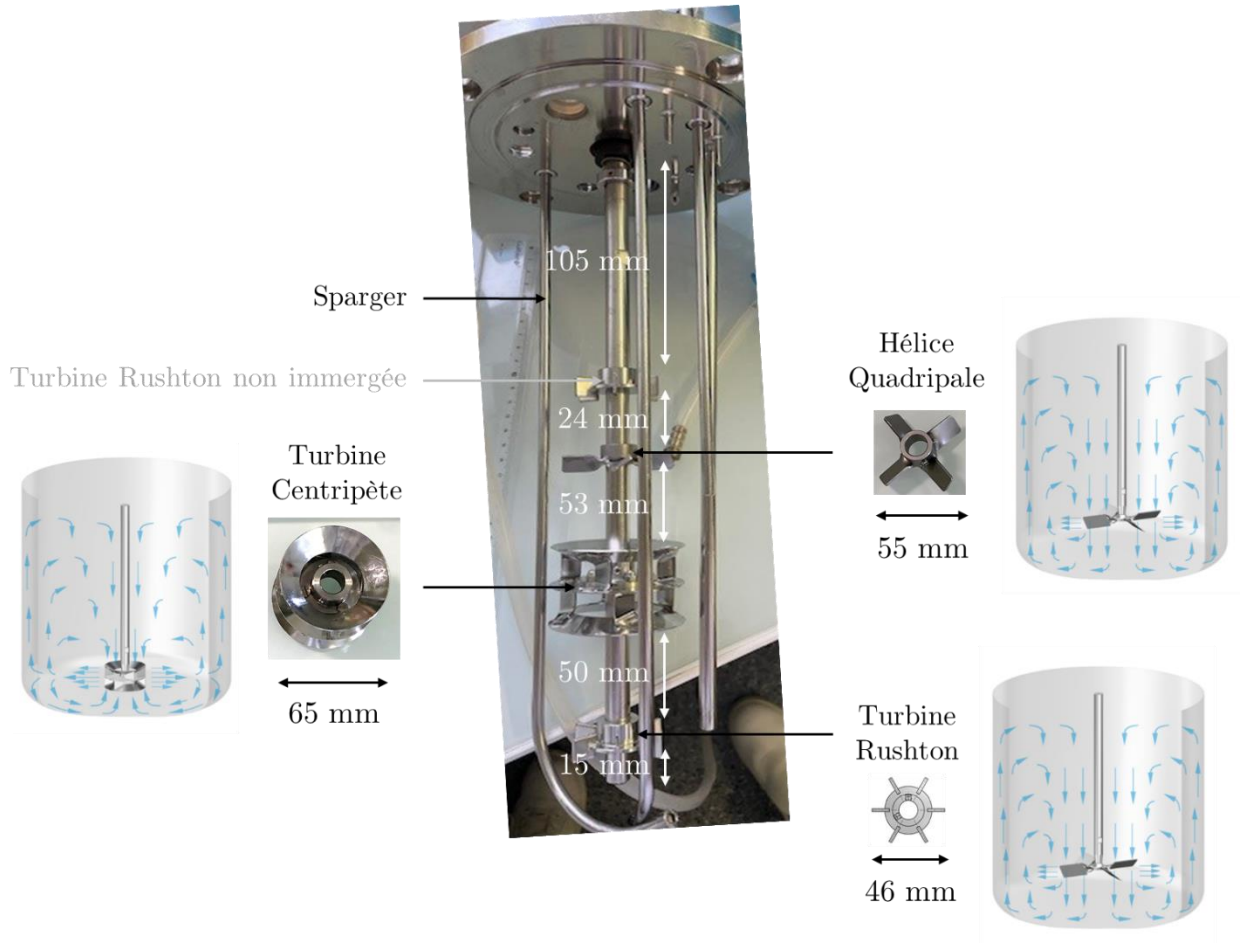


Fig. 25 *Photographie de l'axe d'agitation avec les quatre mobiles et leur diamètre. Schémas des mélanges issus de* https://www.vmimixing.com/fr/sante-chimie-des-specialites/

2.1.3 Bioréacteur pilote

Le site de Danisco possède un bioréacteur pilote (Pierre Guerin, Mauze, France) avec une cuve de 80.0 L soit un volume utile entre 50,0 et 60,0 L (**Fig. 26A**). Il possède une cuve en inox dont les dimensions sont indiquées **Fig. 26**. Comme les bioréacteurs de laboratoire, il est équipé de sondes de pH, température et pO_2. Comme pour les bioréacteurs de 3,6 L, l'axe d'agitation est équipé de trois mobiles : les mobiles du haut et intermédiaire sont des hélices HTGP4 (Pierre Guerin, Mauzé-sur-le-Mignon, France) (**Fig. 26B**) de 150 mm de diamètre, et le mobile du bas est une turbine Rushton de 110 mm de diamètre. Leurs nombres de puissance sont donnés dans la **partie 2.2.4.2**.

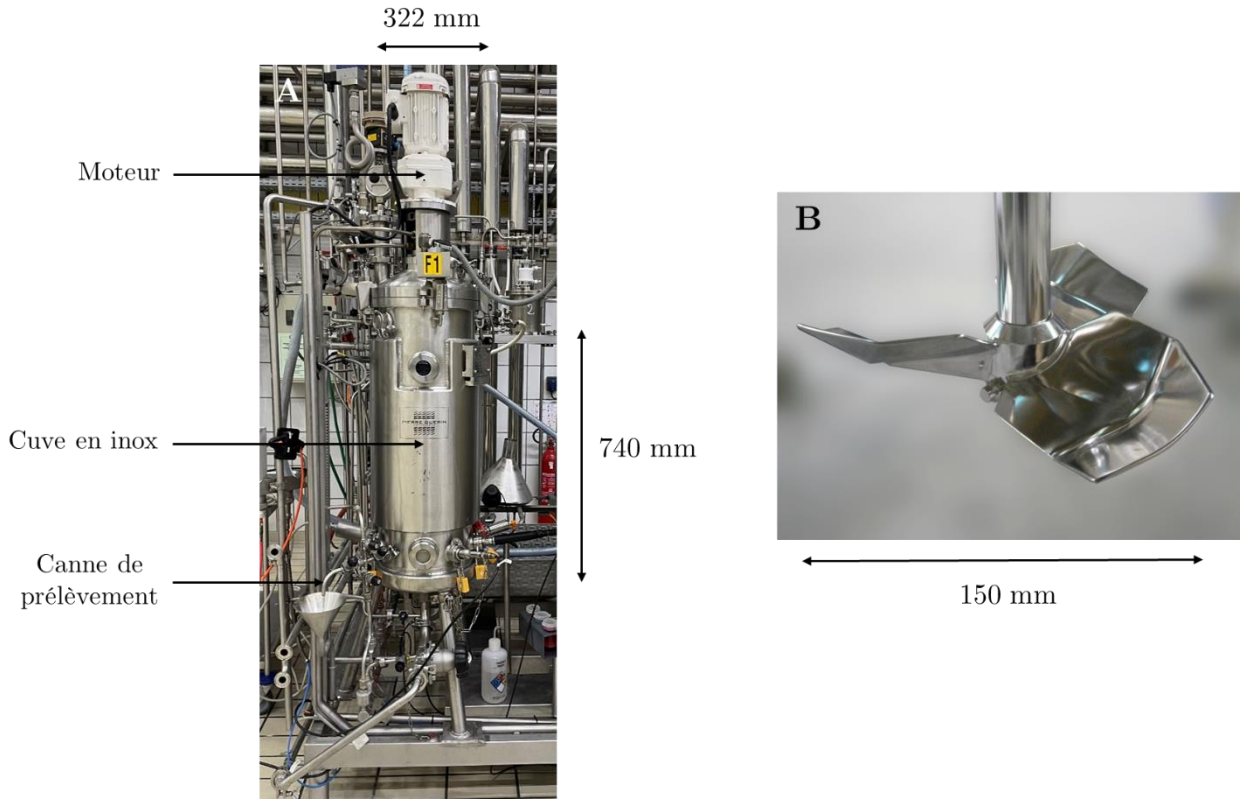


Fig. 26 *(**A**) Photographie du bioréacteur de 80,0 L (**B**) Photographie d'une turbine HTGP4, issue de https://www.pierreguerin.com/en/agitation-mixing/htpg4-three-bladed-impeller-agitator.*

2.2 Conditions de culture et facteurs testés

2.2.1 Souche et ensemencement

Pour l'ensemble des études menées, une souche de *Penicillium camemberti* nommée PC01, et provenant de la collection interne de International Flavors and Fragrances (IFF, New York, États-Unis), a été utilisée pour l'ensemencement à toutes les échelles de culture en fioles et en bioréacteurs. Les inocula étaient composés de conidies, produites en milieu riche en batch pendant 6 jours à 22°C. La méthode d'estimation de la concentration en conidies est décrite au **Chapitre 4**. La concentration initiale en conidies, parfois nommée taux d'inoculum dans ce manuscrit, a été testée à $2{\cdot}10^4$, $2{\cdot}10^5$, $2{\cdot}10^6$ et $2{\cdot}10^7$ conidies·mL^{-1} en Erlenmeyer, $2{\cdot}10^5$, $2{\cdot}10^6$ et $2{\cdot}10^7$ conidies·mL^{-1} en Fernbach, et fixée à $2{\cdot}10^6$ conidies·mL^{-1} en bioréacteur de 3,6 L et 80,0 L.

2.2.2 Milieux de culture

L'exploration des besoins nutritifs de PC01 a fait l'objet d'un travail préliminaire mené lors de mon stage de deuxième année de master en 2021. Un premier criblage en microplaques (Biolog,

Hayward, États-Unis) de 95 sources de carbone et de 95 sources d'azote a permis de caractériser le profil métabolique de la souche PC01. Différents milieux gélosés en boîte de Petri ont ensuite été testés pour observer l'impact sur la croissance et la production de conidies, des milieux synthétiques dérivant du milieu M0 sans source de carbone, milieu de référence du LIED pour la culture du champignon modèle *Podospora anserina* (http://podospora.i2bc.paris-saclay.fr/), ainsi que des milieux complexes. Cependant, ces travaux ont été menés en milieu solide avec comme support de l'agar-agar.

En passant en milieu liquide pour ces travaux de thèse, différents milieux de la littérature ont été testés au préalable afin de définir le milieu de base utilisé pour les expériences de transcriptomique et d'extrapolation. Parmi eux, le milieu de Morton (Morton et al., 1958), utilisé historiquement pour la culture de *P. griseofulvum*, a servi de base de travail pour définir la source de carbone de référence, le glucose, la source d'azote simple, le nitrate de potassium KNO_3, ainsi que la composition de la solution d'oligoéléments. Différentes concentrations de chlorure de calcium $CaCl_2$ y ont été ajoutées par la suite, comme utilisées par Schröder, 1978 chez *P. oxalicum*, et confirmées comme indispensable pour induire la conidiation chez *P. camemberti* par Bockelmann et al., 1999. Enfin, de l'extrait de levure a été ajouté comme source d'azote complexe, d'après Papagianni & Papamichael, 2007 pour la culture de *P. nalgiovense*, à la manière du milieu de culture solide MRS pour les bactéries du genre *Lactobacillus*.

Ainsi, le milieu de base pour induire la croissance chez PC01, modifié de Morton et al., 1958, contient par litre : 10,0 g de glucose, 1,0 g de KNO_3, 2,0 g d'extrait de levure, 3,0 g de $CaCl_2$, 0,5 g de $MgSO_4$ $7H_2O$ et 1,0 ml de solution d'oligoéléments. Cette solution d'oligoéléments contient par litre : 225 mg de $ZnSO_4$ $7H_2O$, 200 mg de $FeSO_4$ $7H_2O$, 40 mg de $(NH_4)_6MO_7O_{24}$ H_2O, 38 mg de $CuSO_4$ $5H_2O$ et 24 mg de $MnSO_4$. La solution est autoclavée, puis son pH est ajusté à 4,8 avec une solution de KH_2PO_4. L'induction de la conidiation nécessitant une source de carbone, plusieurs d'entre elles ont été testées au cours de l'étude. Les différentes solutions de carbone ont été préparées et autoclavées séparément pour être ajoutées au milieu de base à la concentration désirée, à savoir 10 et 20 $g \cdot L^{-1}$ de glucose, 10 $g \cdot L^{-1}$ de sucrose et un mélange de 5 $g \cdot L^{-1}$ de glucose et 5 $g \cdot L^{-1}$ de fructose pour l'étude transcriptomique. Le milieu de référence pour induire la conidiation est constitué du milieu de base + 10 $g \cdot L^{-1}$ de glucose.

2.2.3 Agitation et aération

Différentes agitations ont été testées afin d'en observer les effets sur des critères comme la morphologie, la croissance et la conidiation. En fiole, les vitesses testées étaient de 150, 180 et

210 tr·min^{-1}, avec une même orbitale de 50 mm pour les trois dispositifs, à savoir les deux plateaux agités au LIED et l'incubateur chez Danisco. En bioréacteur de laboratoire, les vitesses testées étaient de 250, 500, 600 et 700 tr·min^{-1}. Concernant l'aération, elle ne peut être modifiée séparément en fiole puisqu'elle dépend de l'agitation. Comme décrit précédemment, le transfert d'oxygène a lieu à l'interface air-liquide. En revanche, en bioréacteur de laboratoire, l'injecteur a permis de tester différents niveaux d'aération, à 0,35, 0,50, 1,00 et 2,00 Nm^3·min^{-1}, soit respectivement 0,175, 0,25, 0,50 et 1,00 vvm. Les deux essais en bioréacteur pilote consistant en une comparaison entre milieux, une agitation de 250 tr·min^{-1} et une aération de 0,35 Nm^3·min^{-1} ont été fixées.

Concernant les expérimentations en bioréacteur de laboratoire, des travaux préliminaires ont été menés afin de faciliter l'homogénéisation du mycélium, le dispositif a été précédemment décrit **partie 2.1.2**. L'objectif de ces travaux est d'évaluer les effets du changement d'échelle sur les facteurs identifiés comme impactant en fiole. Pour cela, différentes grandeurs liées à l'agitation et à l'aération ont été calculées. Ces paramètres sont généralement maintenus constant afin de minimiser l'influence du changement (Canteri, 2014; Hardy, 2016).

2.2.4 Grandeurs caractéristiques du mélange

2.2.4.1 Nombre de Reynolds

L'une des premières étapes lors d'une fermentation consiste à déterminer le régime d'écoulement du fluide agité au sein d'une fiole ou d'un bioréacteur, en calculant le nombre de Reynolds (Re) sans dimension (Büchs et al., 2000; Kar et al., 2011) :

$$Re = \frac{\rho \cdot n \cdot D^2}{\eta}$$

avec ρ la masse volumique en kg·m^{-3}, n la vitesse d'agitation en tour·s^{-1}, D le diamètre de la fiole ou du mobile d'agitation en m, et η la viscosité en Pa·s^{-1}.

Le régime d'écoulement est qualifié de laminaire si Re < 10^2, turbulent si Re > 10^4, et transitoire si 10^2 < Re < 10^4. Pour les fermentations industrielles, il est généralement nécessaire d'obtenir un régime turbulent, afin d'intensifier les transferts de masse, de chaleur et de mouvement (Kar et al., 2011). Pour calculer la masse volumique et la viscosité du milieu, on peut les approximer avec celles de l'eau en début de culture, c'est-à-dire ρ = 10^3 kg·m^{-3} et η = 10^{-3} Pa·s^{-1}. Pour un régime turbulent et à vitesse constante de l'agitateur, une viscosité accrue n'augmente pas la consommation d'énergie (Stocks, 2013).

2.2.4.2 Nombre de puissance

Pour caractériser le mélange d'un fluide, le nombre de puissance (N_P), parfois appelé nombre de Newton (N_E), sans dimension, est utilisé pour définir la relation entre puissance de mélange et vitesse de rotation. Dans le cas d'un régime laminaire, N_P varie en fonction de 1/Re. Dans un régime turbulent en revanche, le nombre de puissance est constant, et ne dépend que du mobile d'agitation utilisé. Cette donnée est généralement fournie par le fabricant (Stocks, 2013; Meusel et al., 2016; Chevalot, 2017). Le diamètre et le nombre de puissance des mobiles utilisés dans l'extrapolation sont indiqués dans la **Table 3**.

Table 3 *Diamètre et nombre de puissance des mobiles utilisés dans l'étude*

Dispositif	Position mobile	Mobile	Diamètre	N_P
Bioréacteur 2L	Haute	Hélice Quadripale	55 mm	1.23
	Intermédiaire	Turbine Centripète	65 mm	1.70
	Basse	Turbine Rushton	46 mm	4.50
Bioréacteur 60L	Haute	Hélice HTGP4	150 mm	0.67
	Intermédiaire	Hélice HTGP4	150 mm	0.67
	Basse	Turbine Rushton	110 mm	4.50

2.2.4.3 Puissance dissipée

La puissance dissipée par unité de volume de culture P/V, en $W \cdot m^{-3}$, est l'un des paramètres les plus couramment utilisés pour la mise à l'échelle des procédés de fermentation en bioréacteur (Amanullah et al., 2003). La puissance électrique requise pour le procédé, la conception de l'arbre d'agitation, ainsi que la réussite des opérations de mélange, dépendent directement de celle-ci. La puissance dissipée, en watt, peut être calculée en bioréacteur à partir du nombre de puissance, pour un seul mobile et sans aération (Stocks, 2013; Nienow, 2014) :

$$P_0 = N_P \cdot \rho \cdot n^3 \cdot D^5$$

avec N_P le nombre de puissance sans dimension, ρ la masse volumique en $kg \cdot m^{-3}$, n la vitesse d'agitation en $tour \cdot s^{-1}$, et D le diamètre du mobile d'agitation en m.

En revanche, dans les systèmes aérés, la puissance dissipée est toujours plus faible que dans les systèmes non aérés, à vitesse de turbine égale. S'il existe de nombreuses méthodes de calcul pour

l'estimer (Kawase et al., 1987; Petříček et al., 2019), l'idée est de calculer une puissance dissipée aérée P_G à partir d'une puissance dissipée non aérée P_0. L'une des corrélations historiques est celle de Michel & Miller, 1962 :

$$P_G = c\left(\frac{P_0^2 \cdot \mathrm{n} \cdot D^3}{Q_G^{0.56}}\right)$$

avec c une constante dépendante du nombre de mobiles, P_0 la puissance dissipée sans aération en watt, n la vitesse d'agitation en tour·s^{-1}, D le diamètre du mobile d'agitation en m et Q_G le débit de gaz dissous en $m^3 \cdot s^{-1}$.

Dans le cas plus complexe où plusieurs turbines sont présentes, pour une même vitesse d'agitation la puissance dissipée totale dépend de l'espacement des turbines. Ainsi, pour un système à deux turbines, si leur espacement est supérieur au diamètre du récipient, la puissance dissipée totale est égale à la somme des puissances dissipées des turbines, même si celles-ci sont de types différents. A l'inverse, si l'espacement entre les deux turbines est inférieur ou égal à leur diamètre, la puissance dissipée totale est inférieure à la somme des puissances dissipées de chaque turbine (Machon et al., 1985; Gogate et al., 2000). En pratique, Stocks, 2013 rappelle toutefois qu'il est peu probable qu'une cuve avec un rapport hauteur/largeur de 2 ne puisse être équipée que de deux turbines

Pour un système à trois turbines, comme c'est le cas dans notre étude (**Fig. 25** et **Fig. 26**), la réduction par l'aération de la puissance dissipée de la turbine inférieure, au fond de la cuve, est beaucoup plus importante que celle des turbines intermédiaire et supérieure (Gogate et al., 2000; Stocks, 2013). En effet, la majeure partie du gaz provenant de l'injecteur passe par cette turbine du bas, une fraction de ce gaz recircule en-dessous de celle-ci, et ne traverse pas les deux turbines au-dessus. Comme il est difficile d'évaluer cette fraction de gaz avec précision, l'estimation de la puissance dissipée des turbines supérieures est regroupée en un seul ensemble, et celle de la turbine inférieure calculée indépendamment (Warmoeskerken & Smith, 1988; Gogate et al., 2000). Cui et al., 1996 ont ainsi défini différentes corrélations en fonction de la position des turbines.

Pour les **turbines supérieure** et **intermédiaire**:

$$\text{Si } Q_G \cdot \mathrm{n} < 0.013, \frac{P_G}{P_0} = 1 - 37.6 \cdot Q_G \cdot \mathrm{n}$$

$$\text{Si } Q_G \cdot \mathrm{n} > 0.013, \frac{P_G}{P_0} = 0.625 - 8 \cdot Q_G \cdot \mathrm{n}$$

Pour la **turbine inférieure** :

$$\text{Pour } \frac{Q_G \cdot n^{0.25}}{D^2} < 0.055, \frac{P_G}{P_0} = 1 - 9.9\left(\frac{Q_G \cdot n^{0.25}}{D^2}\right)$$

$$\text{Pour } \frac{Q_G \cdot n^{0.25}}{D^2} > 0.055, \frac{P_G}{P_0} = 0.48 - 0.62\left(\frac{Q_G \cdot n^{0.25}}{D^2}\right)$$

avec Q_G le débit de gaz dissous en $m^3 \cdot s^{-1}$, n la vitesse d'agitation en tour·s^{-1}, D le diamètre du mobile d'agitation en m, et P_0 la puissance dissipée sans aération en W.

Ainsi, pour calculer la puissance dissipée par unité de volume de culture, il est possible de diviser cette puissance dissipée avec l'aération P_G en W par le volume de milieu V en m^3. Il existe également des corrélations pour calculer la puissance dissipée par unité de volume en fiole (Büchs et al., 2000) :

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

avec $Ne' = 75 \cdot Re^{-1} + 25 \cdot Re^{-0.6} + 1.5 \cdot Re^{-0.2}$ sans unité, n la vitesse d'agitation en tour·s^{-1}, d le diamètre de la fiole en m, et V_L le volume de milieu en m^3.

2.2.5 Autres paramètres

Pour l'ensemble des expérimentations présenté dans ce manuscrit, une température de 22°C a été fixée. Elle a été définie lors de mes travaux de deuxième année de master, après différents tests en milieu solide pour des températures allant de 10 à 35°C. Une durée de six jours de fermentation a également été fixée en fonction d'expérimentations préliminaires ce qui est en cohérence avec la littérature (Bockelmann et al., 1999; Boualem et al., 2014).

Les expérimentations en fioles ont été réalisées à l'obscurité, après différents essais en présence de lumière (12h et 24h) ou à l'obscurité L'ajout de talc a également été testés à des concentrations allant de 0,05 à 1,00 g·L^{-1}.

2.3 Analyses des critères de fermentation

2.3.1 Observations des macromorphologies et micromorphologies

Les images de macromorphologie ont été obtenues en photographiant ou en scannant les fioles avec un CanoScan LiDE 300 (Canon, Tokyo, Japon). Les images de micromorphologie ont été obtenues au LIED avec un microscope à contraste de phase Eclipse Ci (Nikon, Tokyo, Japon) et capturées avec la caméra Zyla sCMOS (Oxford Instruments, Abingdon, Royaume-Uni), et sur le site de

Danisco avec un microscope à contraste de phase Olympus BX60 (Olympus Corporation, Tokyo, Japon) équipé d'une caméra Zeiss (Carl Zeiss, Oberkochen, Allemagne).

2.3.2 Mesure du poids sec

Pour déterminer la production de biomasse au cours des cultures, deux méthodes de mesure des poids secs ont été utilisées. La première, au LIED, consistait à filtrer la culture entière à travers une unité de filtration et des papiers filtres Whatman® Grade 3 (Danaher Corporation, Washington, D.C., États-Unis), en lavant trois fois le moût avec de l'eau distillée. Les filtres ont été séchés à 110°C pendant 24 heures (jusqu'à poids constant), puis pesés. Sur le site de Danisco, ces étapes de pesée et de séchage sont réalisées avec un dessiccateur SMART 6 (CEM Corporation, Matthews, États-Unis) combinant l'infrarouge et les micro-ondes. Les données présentées sont issues d'au minimum trois expérimentations, en triplicat pour les essais en fioles.

2.3.3 Mesure de la conidiation

Pour déterminer la concentration en conidies dans le milieu à un temps donné, 1,0 mL de culture est prélevé et dilué au dixième dans 0,05 % de Tween® 20. Quinze images sont ensuite capturées au microscope Olympus BX60 (Olympus Corporation, Tokyo, Japon) en utilisant une chambre de comptage personnalisée sans grille (Hausser Scientific, Horsham, États-Unis). Les conidies sont ensuite automatiquement comptées à l'aide d'un algorithme Python, spécifiquement développé pour ces expériences. La mise en place de cet outil est décrite au **Chapitre 4**. Les données présentées sont issues d'au minimum trois expérimentations, en triplicat pour les essais en fioles.

2.3.4 Mesure du pH et de la pO_2

Le pH a été mesuré en point fixe en fiole à 0h, 48h, 96h et 140h avec un pH-mètre, et en ligne en bioréacteurs avec une sonde de mesure du pH analogique. La pO_2 a été mesuré uniquement en bioréacteurs avec une sonde VisiFerm DO325 (Hamilton, Reno, États-Unis).

2.3.5 Mesure de la concentration en sucres, en acides aminés et en acides organiques

Deux appareils ont été utilisées pour doser les sucres, un spectromètre de poche au LIED pour doser les concentrations des sucres dans les milieux en fiole, et un analyseur photométrique automatisé Gallery food (ThermoFisher Scientific, Waltham, États-Unis) chez Danisco pour les mesures en fiole et en bioréacteur.

Les dosages des acides aminés et des acides organiques (acide citrique, acide α-cétoglutarique, acide orotique, acide succinique, acide lactique, acide formique, acide acétique, acide propionique et acide butyrique) ont été réalisés en chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC).

Chapitre 3

Étude transcriptomique

Avant-propos

Pour débuter ces différents travaux, une étude de l'effet des différents facteurs impactant la morphologie et/ou la conidiation a d'abord été menée en fioles d'Erlenmeyer. Dans un premier temps, la concentration initiale en conidies et la vitesse d'agitation, paramètres classiques d'ingénierie morphologique, ont été identifiés comme impactant fortement la morphologie adoptée par la souche PC01 (voir **Fig. 49 et Table 13 partie 5.2.1**). Ce même effet a été observé en fonction de la concentration initiale en glucose. Pour une agitation à 180 $tr \cdot min^{-1}$ et un taux d'ensemencement de $2 \cdot 10^7$ $conidies \cdot mL^{-1}$, une morphologie dispersée est observée pour une concentration initiale de 10 $g \cdot L^{-1}$ de glucose, en *clumps* pour 20 $g \cdot L^{-1}$, et en *pellets* pour 30 $g \cdot L^{-1}$ ou plus (**Fig. 27**).

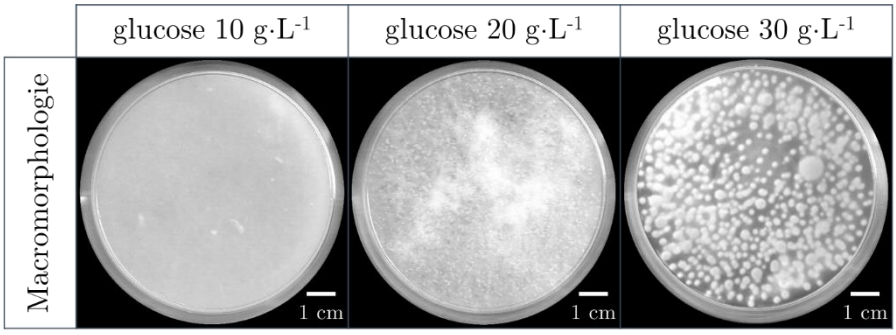


Fig. 27 *Images macroscopiques au scanner des fonds d'Erlenmeyer. Observations des différences de macromorphologie en fonction de la concentration initiale en glucose. Les barres d'échelle représentent 1 cm.*

Pour l'ensemble des morphologies observées et pour ces trois paramètres testés (taux d'inoculum, agitation et concentration initiale de glucose), des phialides et des conidiophores étaient observables en morphologies dispersée après 48h de culture (**Fig. 28**), alors qu'aucune structure asexuée n'était visible en *clumps* ou en *pellets*, aussi bien dans le milieu qu'à leur surface. Après 96h et 140h de culture, alors que des conidies sont présentes dans le milieu avec PC01 dispersé, en présence de 10 $g \cdot L^{-1}$ de glucose (**Fig. 28**), aucune conidie n'est visible en *clumps* ou en *pellets*, en présence de 20 $g \cdot L^{-1}$ ou 30 $g \cdot L^{-1}$ de glucose.

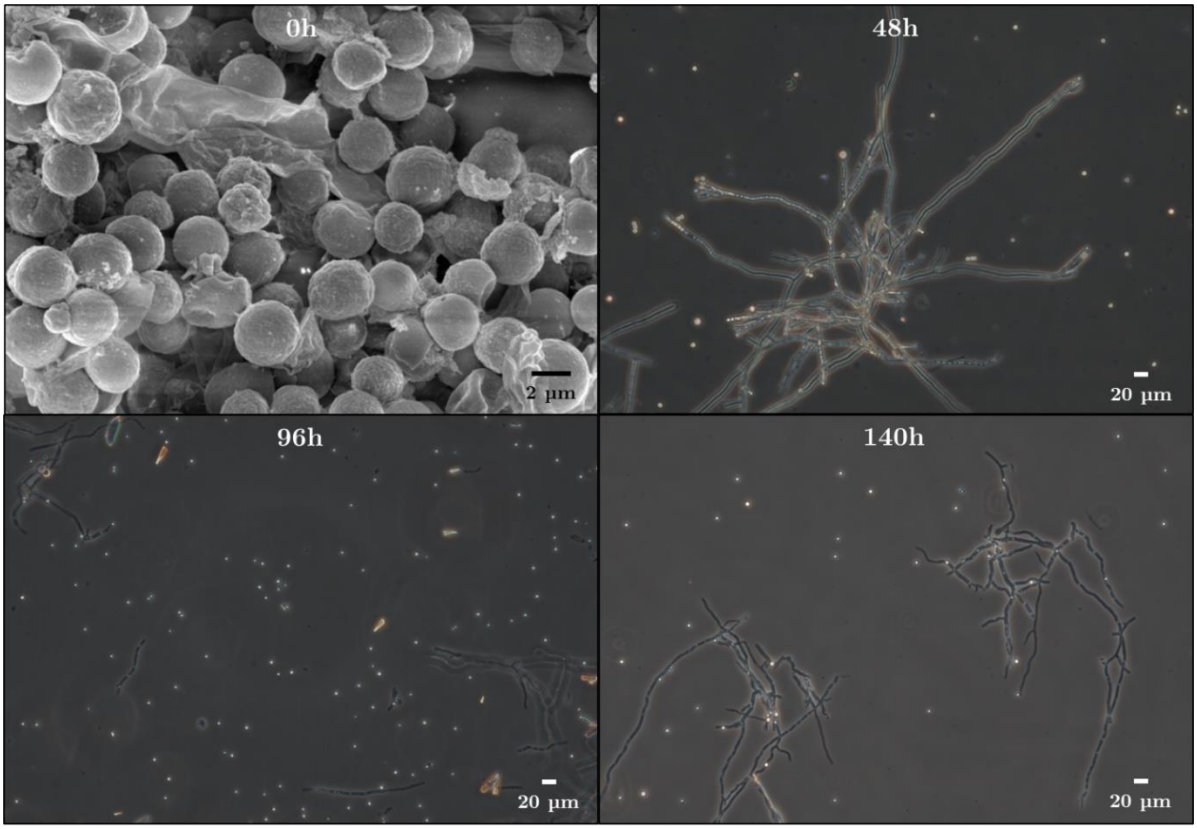


Fig. 28 *Observations au microscope électronique à balayage (0h) et au microscope à contraste de phase (48h, 96h et 140h) des conidies et du mycélium au cours du temps en conditions favorisant la morphologie dispersée (agitation de 180 tr·min^{-1}, concentration initiale de 2·10^{7} conidies·mL^{-1}, concentration initiale de 10 g·L^{-1} de glucose). Les barres d'échelle représentent 2 µm (0h) et 20 µm (48h, 96h et 140h).*

En conservant les mêmes conditions d'agitation et d'ensemencement, différentes sources de carbone, autres que le glucose, ont été testées dans le milieu à la même concentration de 10 g·L^{-1}. Toutes les morphologies observées sont dispersées à cette concentration initiale (voir **Fig. 31 partie 3.3.1**), mais les productions de biomasse et de conidies sont différentes. En présence de monosaccharides tels que le glucose, le fructose, le xylose, et le galactose, une production de conidies est mesurée, avec des ratios de conidiation d'environ 3, relativement faible par rapport aux données de la littérature (Bockelmann et al., 1999; Boualem et al., 2014), et des poids secs aux alentours de 9 g·kg^{-1} (**Fig. 30**). Des conidies sont produites en présence d'autres sources de carbone comme l'acide lactique ou le sorbitol. En revanche, en présence de disaccharides tels que le saccharose et le lactose, ou de polysaccharides comme la dextrine et la maltodextrine, aucune conidie n'est produite, et les poids secs sont globalement plus élevés qu'en présence de monosaccharides, autour de 11 g·kg^{-1} (**Fig. 30**). Ces mesures en disaccharides et polysaccharides en morphologie dispersée, sont à peu près similaires à celle en morphologie en *clumps* en présence de 20 g·L^{-1} de glucose (**Fig. 30**).

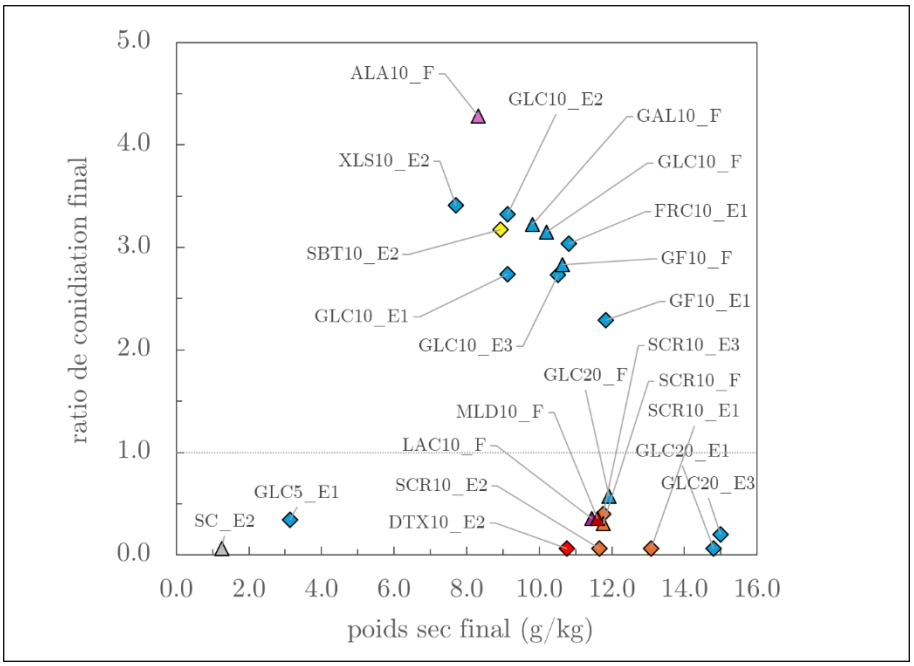


Fig. 29 *Ratios de conidiation (concentration finale à 140h en conidies dans le milieu / concentration initiale) en fonction des poids secs (représentatifs de la biomasse) mesurés à 140h pour différentes sources de carbone. GLC = glucose, FRC = fructose, GAL = galactose, XLS = xylose, SBT = sorbitol, ALA = acide lactique, SCR = saccharose, LAC = lactose, DTX = dextrine, MLD = maltodextrine, SC = sans source de carbone. Le chiffre correspond à la concentration en g·L^{-1}. Le code final correspond à une série d'expérimentations (n = 5) avec E1, E2 et E3 pour celles en Erlenmeyer, et F pour celle en Fernbach.*

Ces résultats préliminaires en fiole permettent d'établir un lien entre la nature et la concentration de certaines sucres présents initialement dans le milieu, la morphologie adoptée par *P. camemberti*, et la production de conidies associée (**Fig. 30**). D'autres facteurs ont été testés, notamment l'ajout de talc, méthode de contrôle connue de la morphologie (voir **partie 1.4.3.3**). À 150 tr·min^{-1} et 2·10^{6} conidies·mL^{-1} initiales, soit des conditions pour lesquels la morphologie est en *pellets*, l'ajout de 0,1 g·L^{-1} de talc a permis d'obtenir une morphologie hybride, ainsi qu'une faible production de conidies. En revanche, en présence d'une morphologie hybride de base, l'ajout de talc dans nos expériences n'a jamais permis de modification en une morphologie dispersée, vue comme idéale pour la production de conidies. De même, alors que les expériences précédentes sur les effets de la nature des sources de carbone avaient lieu à l'obscurité, la présence de lumière artificielle 12h par jour a permis de restaurer la conidiation en milieu saccharose 10 g·L^{-1}, mais de manière non reproductible.

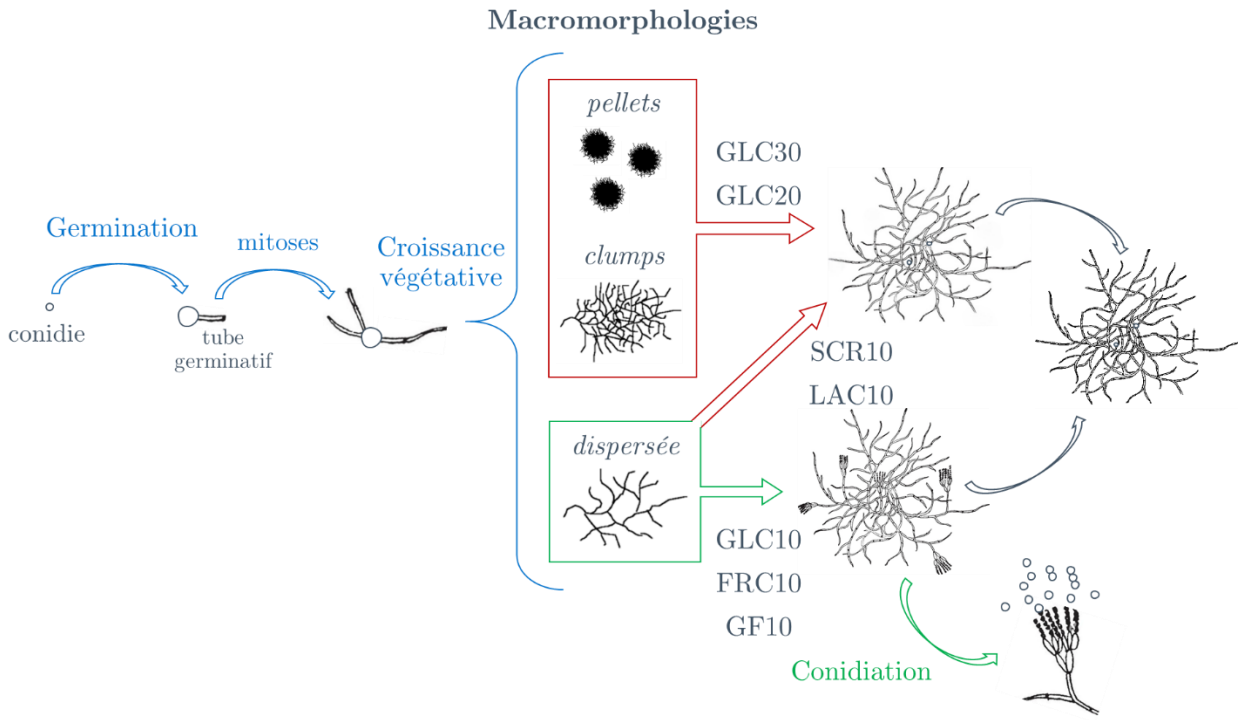


Fig. 30 *Schéma du cycle de reproduction asexuée chez PC01 pour produire des conidies ou de la biomasse en fonction de la nature et de la concentration de la source de carbone. GLC10 = 10 g·L^{-1} de glucose, GLC20 = 20 g·L^{-1} de glucose, GLC30 = 30 g·L^{-1} de glucose, SCR10 = 10 g·L^{-1} de saccharose, GF10 = 5 g·L^{-1} de glucose + 5 g·L^{-1} de fructose.*

Les effets de l'ajout de talc et de la présence de lumière étant soit négligeable soit moins reproductibles que ceux des sources de carbone sur la conidiation et la croissance, ce sont la nature et la concentration de quatre sucres qui ont été choisis comme facteurs pour étudier l'expression des gènes de la conidiation chez *P. camemberti*. Une étude transcriptomique chez PC01 est ainsi présentée au cours des pages suivantes, sous forme d'un article soumis dans un journal à comité de lecture en avril 2025. Les tableaux ainsi que les figures supplémentaires se trouvent à la fin de l'article.

Carbon sources effects on conidiation in *Penicillium camemberti*: a transcriptomic analysis

Aymeric Paradis[1,2], Christophe Lalanne[1], Nicolas Hardy[2], Valérie Gautier[1], Philippe Silar[1]

[1]Univ Paris Cité, Laboratoire Interdisciplinaire des Energies de Demain (LIED), 75013 Paris, France

[2]International Flavors and Fragrances (IFF), 86220 Dangé-Saint-Romain, France

Abstract

The asexual reproduction cycle of the cheese-ripening fungus *Penicillium camemberti* is typical for a filamentous ascomycete fungus. It involves the production of conidia by successive mitotic divisions from specialized cells called conidiophores. These spores are used for inoculating the fungus onto French soft cheeses and could be produced industrially by submerged fermentation. However, the impact of macromorphology on conidia production for this type of fermentation has been little investigated. By studying the physiological effect of different sources and concentrations of carbohydrates of submerged cultures at the laboratory scale, it was observed that the fungus takes on different morphologies associated with varying ability to produce conidia. Especially, a dispersed morphology was not always associated with production of conidia. Through RNA-seq transcriptomic analyses, we followed the expression profiles of *P. camemberti* genes during the time course of cultures made in the presence of two concentrations of glucose, one of sucrose and one with a mix of glucose and fructose, which are conditions for which *P. camemberti* presents varying morphologies and efficiencies to produce conidia. This led to confirm that *P. camemberti* likely uses the same conidiation pathway as the model fungus *Aspergillus nidulans*. It also enabled the identification of a potential conidiation-inhibiting transcription factor, specific to *Eurotiales* and only upregulated in conditions without conidia production. Functional studies of its ortholog in *A. nidulans*, for which the conidiation pathway has been extensively studied, should allow to verify whether this factor indeed plays a role in the asexual cycle.

Keywords: *Penicillium camemberti*; carbon sources; conidiation, mycelium morphology; transcriptomic; submerged fermentation

3.1 Introduction

Cheese is made by humans for over 8000 years (Fox et al., 2017), and today cheese production constitutes a significant market, with 23.2 million tons produced in 2023 (International Dairy Federation, 2023). If the initial historical goal was simply the preservation of milk (Scott et al., 1998), now cheese is mostly consumed for pleasure and come with a large number of varieties worldwide, approximately 500 to over 1000 according to various sources (Sandine & Elliker, 1970; Burkhalter, 1981; Harbutt, 2015). This large diversity of textures, tastes, flavors and colors is mainly developed during ripening, the final stage of cheese making, which is carried out by the activity of various microorganisms called secondary starters, such as bacteria, yeasts, or molds (McSweeney & Sheehan, 2007). Many traditional cheeses are primarily ripened by filamentous fungi of the genus *Penicillium*, namely *Penicillium roqueforti* for blue-veined cheeses ripened in depth, and *Penicillium camemberti* for typical French cheeses named "*fromages à pâte molle et à croûte fleurie*" such as Camembert and Brie (Giraud et al., 2010). This designation corresponds to certain *soft cheeses* in the Anglo-Saxon classification (Almena-Aliste & Mietton, 2014).

Penicillium camemberti is inoculated by spraying conidia onto the surface of the curd and creates the white, felted, and uniform rind of these cheeses (Krasniewski et al., 2006). Conidia are asexual spores produced by budding at the top of specialized hyphae called conidiophores; this constitutes the only known mode of reproduction of *P. camemberti* (Boualem et al., 2014). Recently, a study on the domestication of *P. camemberti* has rekindled interest in the biology of this filamentous fungus, revealing for example the existence of two varieties and the fact that this fungus is only present in cheese. Its closest wild relative is *Penicillium fuscoglaucum*, a fungus frequently found in a large variety of environments, such as rubber, roots, nuts, wood, water and contaminated food, including spoiled cheeses (Ropars et al., 2020).

A key factor in the production of cheese with *P. camemberti* is the possibility to mass-produce conidia. Traditionally, conidia are produced in solid-state culture in Roux flasks for three to four weeks (Krasniewski et al., 2006; Boualem et al., 2016). This method is well mastered and presents economical and practical advantages (Krishna, 2005), but suffers several drawbacks such as the lack of possibilities for process control and scale-up. This is essential when large numbers of spores are required, especially for industrial cheese production. Alternatively, spores can be produced in submerged cultures, which offers the advantages of easy control of various parameters such as pH, aeration and agitation, faster mycelial growth, so faster time to harvest, and ease of product separation (Strong et al., 2022). Indeed, in an industrial context, not only the net production of

conidia is important but also the ease with which they can be collected. Often, mycelia grown in liquid undergo autolysis, which facilitates the recovery of conidia (White et al., 2002).

Genetic studies on model fungus *Aspergillus nidulans* have shown that a gene, *fluG*, is involved in the synthesis of a specific extracellular factor for conidiation induction, which is followed by the downstream activation of *flb* genes, including *flbB*, *flbC*, *flbD* and *flbE*. This finally results in the activation of the central regulatory pathway, with three conidiation-specific genes, *brlA*, *abaA* and *wetA*, sequentially expressed to activate conidiophore and conidia formation (Adams et al., 1998). This conidiation program is probably also active in *Penicillium* (Roncal & Ugalde, 2003), and genes homologous to *brlA*, *abaA* and *wetA* have been found in *P. camemberti* (Boualem, 2008). In addition to the initiation of conidiation, the *fluG-brlA* pathway is also important in the induction of mycelium autolysis, with activation of autolytic hydrolases, such as chitinases and proteinases. This results in an age-dependent loss of biomass and fragmentation of hyphae (Emri et al., 2005). In industrial bioreactors, different stimuli are associated with conidiation induction in *Penicillium* species: medium composition (carbon, nitrogen, trace elements), operating conditions (pH, temperature, inoculum concentration) and shear stress (stirring speed, airflow, bioreactor design) (Papagianni, 2004).

Surprisingly, there are few published studies dealing with production of conidia in submerged cultures by *P. camemberti*, notably because the conidiation of this species is difficult to achieve in liquid culture at lab scale (Krasniewski et al., 2006). The analyzed parameters were calcium, acetate, glucose, ammonium and phosphate concentrations (Bockelmann et al., 1999), temperature (Boualem et al., 2014), nitrogen sources and complexity of the growth medium (Boualem et al., 2016). There is also no data regarding the potential autolysis of *P. camemberti* in submerged cultures. Note that in submerged fermentation, the control of mycelial macromorphology appears to be a prerequisite to produce conidia (Meyer et al., 2021). In the studies dealing with *P. camemberti* (Bockelmann et al., 1999; Boualem et al., 2014, 2016), the fungus grew as pellets, which may not be the best morphology to produce large amounts of conidia (Hille et al., 2009; Wucherpfennig et al., 2011). Indeed, it has been proposed that a dispersed mycelium is preferred for conidia production by *Penicillium* species (Canteri & Ghoul, 2015). This morphology therefore predominates in most industrial fermentations (Papagianni, 2004).

Here, we analyze the impact of carbon sources on the morphology and conidiation of *P. camemberti* grown in submerged cultures at a laboratory scale. It is known that carbohydrates have a large impact on the reproduction of fungi (Silar, 2016; Willey et al., 2022) and this parameter

has not yet been extensively studied in *P. camemberti*. We especially provide a time-course analysis of conidia production up to the autolysis of the mycelium for four carbon sources by RNA-seq.

3.2 Materials and Methods

3.2.1 Strain and culture conditions

The PC01 strain comes from the International Flavors and Fragrances' (IFF, New-York, United States) internal collection. Its genome was sequenced and assembled by BaseClear BV (Leiden, Netherlands) using a combination of long reads obtained with Pacific Biosciences (PacBio) sequencing with the Sequel I instrument and short reads Illumina sequencing performed using paired-end reads library (2x150bp). The genome was annotated by IFF, and deposited in a GitHub repository at the following URL: https://github.com/podo-gec/fungi-public-data/tree/master/pcamemberti.

Conidial suspensions of PC01 for inoculation of flasks were produced in rich medium in batch for six days at 22°C, and conidia concentration was evaluated using a newly-developed automatic method described below. Except where indicated, conidia were inoculated at $2 \cdot 10^7$ conidia·mL^{-1} in 250 mL Erlenmeyer flasks with 65 mL of liquid medium, agitated on Innova 2300 Platform Shaker (Eppendorf, Hamburg, Germany) at 180 tr·min^{-1} with 50 mm orbital, in the dark. The growth temperature was always 22°C.

The base medium (BM) for growth, modified from Morton et al., 1958, contained per liter: 1.0 g KNO_3, 2.0 g yeast extract, 3.0 g $CaCl_2$, 0.5 g $MgSO_4$ $7H_2O$, and 1.0 ml trace metal solution. The trace metal solution contained per liter: 225 mg $ZnSO_4$ $7H_2O$, 200 mg $FeSO_4$ $7H_2O$, 40 mg $(NH4)_6MO_7O_{24}$ H_2O, 38 mg $CuSO_4$ $5H_2O$ and 24 mg $MnSO_4$. The BM was autoclaved and adjusted to pH 4.8 with KH_2PO_4. The carbon solutions were prepared and autoclaved separately to be added to the BM at the desired concentration, namely 10 and 20 g·L^{-1} glucose, 10 g·L^{-1} sucrose and a mix of 5 g·L^{-1} glucose and 5 g·L^{-1} fructose for the RNA-sequencing conditions.

3.2.2 Observation of morphology, production of conidia and biomass

The macromorphology images were obtained with a CanoScan LiDE 300 scanner (Canon, Tokyo, Japan) and the micromorphology images observed under the phase-contrast microscopy Eclipse Ci (Nikon, Tokyo, Japan) and captured with the camera Zyla sCMOS (Oxford Instruments, Abingdon, United Kingdom).

Biomass production during fermentation was determined by washing three times with distilled water and filtering the whole culture with Whatman® Grade 3 filter paper pads whose weights were recorded (Danaher Corporation, Washington, D.C., United States). The paper pads were dried at 110°C for 24 h and then weighed again. Conidia production was determined by taking 1.0 mL of culture diluted to one tenth in 0.05% Tween® 20. Then ten images were captured using a custom counting chamber without grid (Hausser Scientific, Horsham, United States) for conidia counting. Conidia were automatically counted using a Python algorithm, specifically developed for these experiments. All image processing was done with the scikit-image package (Walt et al., 2014). After converting the images to grayscale (8-bit), a deconvolution algorithm was used to correct errors, and then the images were binarized. Different cleaning treatments were applied: three erosions, followed by an opening, a closing, and a dilation. The number of particles was then counted for the ten technical replicates. All analyses, for biomass and conidia production, were made at least three times in triplicate.

Carbohydrates concentrations were measured using Gallery food discrete analyzer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, France), amino acids concentrations were measured using Gemini C18 HPLC columns (Phenomenex, Torrance, United States) with Agilent 1200 Fluorescence Detector (Agilent Technologies, Santa Clara, United States).

3.2.3 RNA extraction

For RNA extraction, the same culture conditions were implemented as for the observations of morphologies and the production measurements. The mycelia were collected after 48h, 96h and 140h with cheesecloth and washed three times with distilled water to eliminate conidia. The samples were frozen in liquid nitrogen, broken apart with a mortar pestle and stored at -70°C until further processing. RNAs were recovered using the RNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). RNAs were quantified with DS-11FX nanodrop (DeNovix, Wilmington, United States) and sent to the Biomics platform of Institut Pasteur (Paris, France) facility for sequencing (project n° B16526). The library was constructed with the Illumina mRNA stranded library prep, using an entry of 1000 ng RNA and a PCR with 15 cycles. Sequencing was made with an Illumina Novaseq X sequencer using 70% of a 10B300 lane. The loading concentration was 12 nM. Sequencing yielded 903 millions paired-end 150 bp reads. Raw data are available under Bioproject accession n° SUB15184210.

3.2.4 RNA sequencing data analysis

Gene quantification was performed using Hisat2 (Kim et al., 2019) and featureCounts (Liao et al., 2014) and subsequent statistical analyses were performed using the R statistical software (v4.4.2, 2024).

A principal component analysis (PCA) was used to assess overall similarity between samples within and between experimental conditions. This analysis was performed on raw gene counts (Supplementary **Table S1** provided on request) after a regularized log–transformation to minimize the influence of few highly variable genes. The first two principal components were used to summarize the proximity of experimental samples. In the PCA scatterplot, we expect triplicate to cluster together while samples from very different experimental conditions are expected to be far away one from the other. Venn diagrams were used to summarize common and unique gene sets across experimental conditions.

Differential analysis relied on the DESeq2 R package (Love et al., 2014) which allows to account for within-group variance estimates when analyzing large libraries of genes. It takes care of normalizing raw gene counts based on the gene and library sizes. This approach detects and corrects dispersion estimates that are too low through modeling of the dependence of the dispersion on the average expression strength over all samples. A Wald test was used to assess the statistical significance of each gene, with FDR correction to achieve a 5% type I error rate. Benjamini–Hochberg's adjusted p-values and log2 of the fold change are used to summarize statistical significance and effect size in all summary tables and Volcano plots.

Gene set enrichment analysis was performed with the topGO R package (Alexa et al., 2006) based on normalized gene expression. Enrichment test was based on a Fisher test for pooled genes using the 'weight01' algorithm (Grossmann et al., 2007). Results were summarized graphically using Bubble plots.

3.3 Results and discussion

3.3.1 Design of the experimental set-up

Several parameters including agitation speed (150 to 210 tr·min^{-1}), inoculum concentration (2 x 10^{3} to 2 x 10^{7} conidia·mL^{-1}), pH (= 3.8 to 7), and light (presence/absence) were tested before a final choice of the experimental design for RNA-seq analysis. Mycelium morphology and conidia production of PC01 were evaluated after 24h, 48h, 96h and 140h. The first conidiophores were

observed after 48h of incubation. At 96h, the conidia production was maximal and at 140h, we observed that the mycelium had lysed, and no further production of conidia was detected. This showed that conidia production occurred at an early stage of the cultures and that like many other filamentous fungi, *P. camemberti* underwent autolysis when grown in liquid. Note that, except for illumination, all tested parameters, including inoculum concentration, were important factors influencing macromorphology (**Table 4**). Some studies have previously suggested a correlation between inoculum concentration and macromorphology, particularly in *Penicillium chrysogenum*, with the formation of very few pellets at a high initial concentration of conidia (Tucker & Thomas, 1992) or in *Aspergillus terreus*, with the demonstration of a link between inoculum rate and pellet size, but also with the synthesis of secondary metabolites (Bizukojc & Ledakowicz, 2010). Obtaining a dispersed morphology in *P. camemberti* could be linked to the non-coagulant character observed in the PC01 strain, which prevents the agglomeration of conidia during germination (Drougard, 2018). As seen in **Table 4**, in the presence of 10 $g \cdot L^{-1}$ of glucose, a dispersed morphology associated with the largest number of conidia production was observed with the following conditions - agitation: 180 $tr \cdot min^{-1}$, inoculation: 2 x 10^7 $conidia \cdot mL^{-1}$, pH = 5.0 and no light. We thus chose these conditions to test the impact of several carbon sources on dry weight and conidia production (**Fig. 31**).

As seen in **Fig. 31**, several noteworthy features were observed. Firstly, doubling glucose concentration led to an intermediate morphology often referred to as clumps (Papagianni, 2004; Cairns et al., 2019), which was denser than dispersed morphology but looser than pellets. Interestingly, it was associated with a higher dry weight and a lack of conidia production. This observation is not unprecedented (Bockelmann et al., 1999). Possibly, in this condition, there is a lack of developmental switch from mycelium growth to conidiophore differentiation and conidia production. This condition in comparison to the one with a standard 10 $g \cdot L^{-1}$ concentration of glucose, was thus interesting to study through RNA-seq analysis to decipher the potential pathways involved in the switch from growth to asexual reproduction. Another interesting feature is the effect of sucrose. Indeed, no conidia was produced with this sugar, although the morphology was dispersed. This indicated that dispersed morphology was not always associated with high conidia production in *P. camemberti*. Intriguingly, supplying together the monomers constituting glucose, e.g. glucose and fructose, at concentrations identical to the one they have in sucrose (e.g., 5 $g \cdot L^{-1}$ fructose and 5 $g \cdot L^{-1}$ glucose), resulted in dispersed morphology associated with high rate of conidia production. Although at the present time the reason for such differences between the dimer and the mix of the two monomers on conidia production is not clear, analyses of these two conditions should yield interesting insights into the switch from mycelium growth to conidia production. Using xylose and

sorbitol yielded a disperse morphology and a production of conidia as seen in 10 g·L^{-1} glucose, while using dextrin resulted in dispersed morphology associated with a lack of conidia production as seen for sucrose. We thus decided to analyze through RNA-seq, the transcription profiles of the cultures grown in 10 g·L^{-1} glucose, 20 g·L^{-1} glucose, 10 g·L^{-1} sucrose and a mix of 5 g·L^{-1} glucose and 5 g·L^{-1} fructose at 48h, 96h and 140h. Unfortunately, we could not sample 0h and 24h of growth, because there was too little fungal biomass to efficiently extract good quality RNA for RNA-seq analyses.

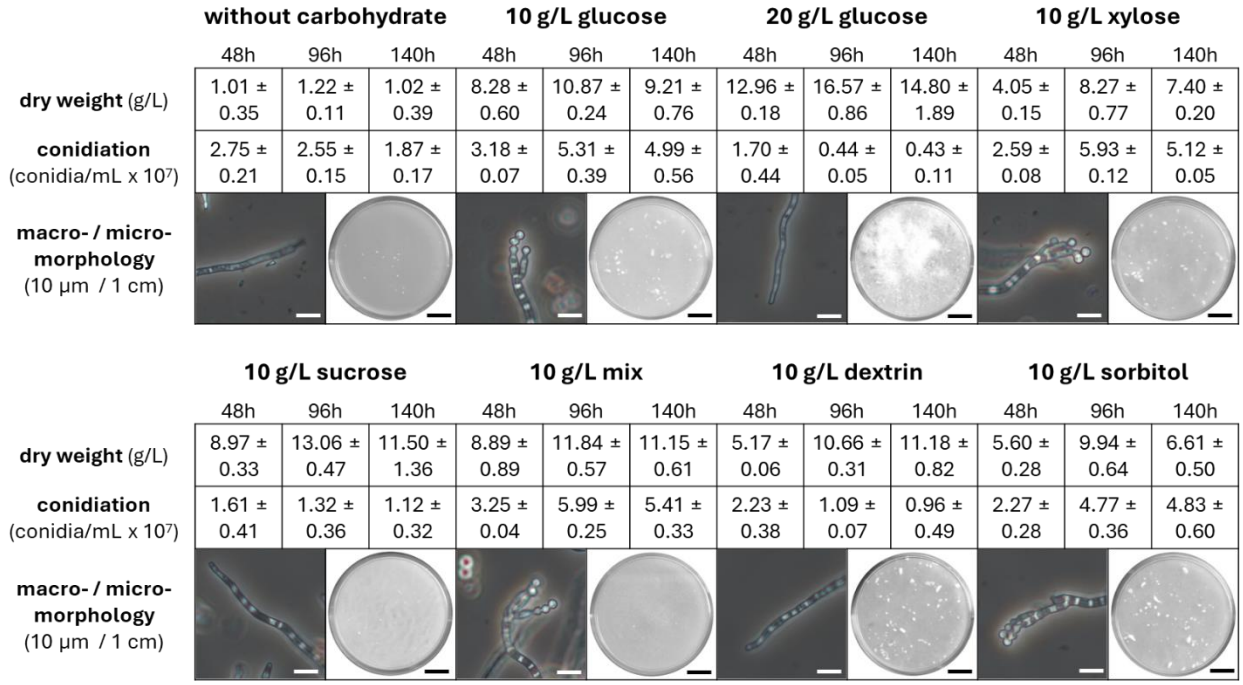


Fig. 31 *Effect of carbon sources on mycelium morphology, dry weight and conidia production at 48h, 96h and 140h. Triplicate cultures yielding similar results were performed in 250 mL Erlenmeyer flasks (n = 3). 10 g·L^{-1} mix = 5 g·L^{-1} glucose + 5 g·L^{-1} fructose. Pictures were taken at 48h for conidiophores and 140h for the liquid cultures.*

3.3.2 RNA-seq analysis of carbon sources impact on *P. camemberti* submerged cultures

For each condition, triplicates cultures were made, and RNA was extracted from mycelium collected by filtration and broken apart with a mortar pestle in liquid nitrogen. RNAs were purified with a commercially-available kit and RNA-seq data were generated (see **M&M 3.2**). Sequencing yielded between 6 510 629 and 82 988 187 couples of sequences with an average of 25 090 805 sequences per conditions. The reads were mapped onto the PC01 genome sequence and quantified (see **M&M 3.2** and supplementary **Table S1** provided on request).

As seen on **Fig. 32**, the data obtained were of good quality because most triplicates clustered together in principal component analysis (PCA) analysis. In only one condition (20 g·L^{-1} glucose at 140h), one of the three replicates did not localize close to the other two. The PCA analysis also revealed that most of the transcriptome differences were observed between 48h and 96h, which was the moment of maximal conidia production (**Fig. 31**). There appeared to be little transcriptional changes between 96h and 140h. Since it was the moment for which the mycelium underwent autolysis, this suggested that this process was mostly under post transcriptional regulation. Interestingly, the condition that was the most different from the other was 20 g·L^{-1} glucose at 48h, in line with the fact that the switch from mycelium growth to conidiation may not have occurred in that condition, while it has done so in the other ones.

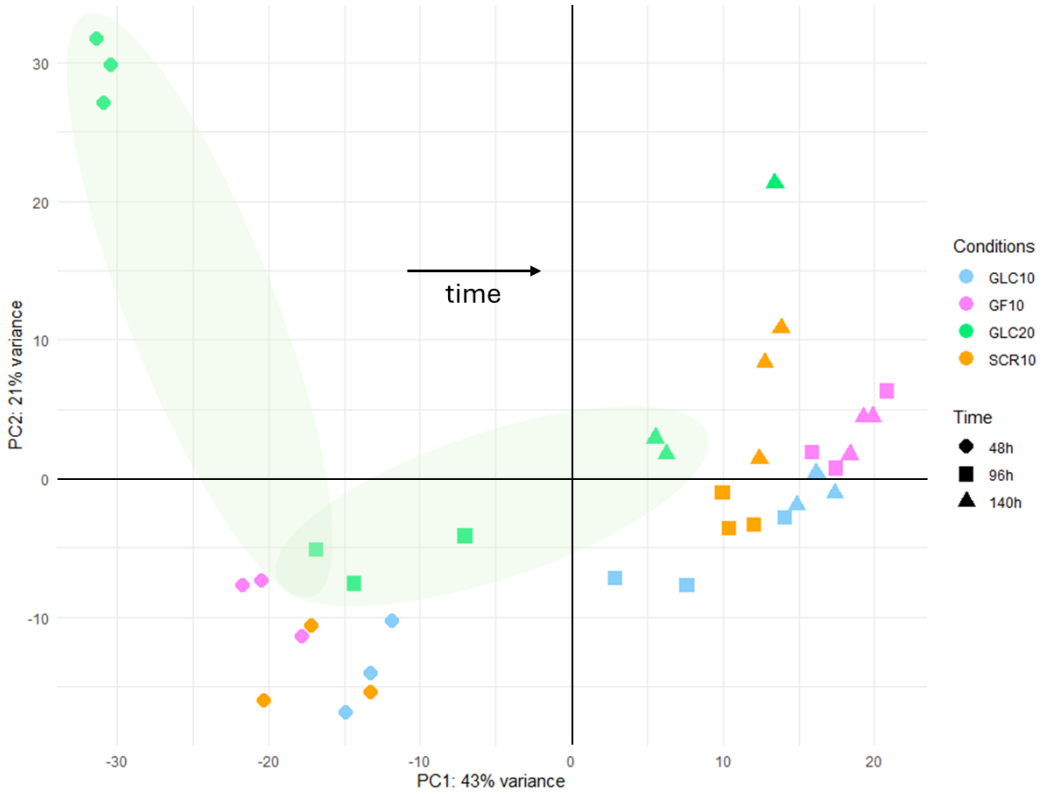


Fig. 32 *PCA analysis of RNA-seq data obtained from mycelium cultured at 48h, 96h, and 140h in the four indicated nutritional conditions. GLC10: 10 g·L^{-1} glucose, GF10: mix of 5 g·L^{-1} glucose + 5 g·L^{-1} fructose, GLC20: 20 g·L^{-1} glucose, SCR10: 10 g·L^{-1} sucrose.*

3.3.3 Comparison of gene expression over time in 10 g·L^{-1} glucose medium

We then analyzed in more detail the transcriptional changes that occurred in 10 g·L^{-1} glucose medium (see supplementary **Tables S2-S18** provided on request for pairwise comparisons on the whole gene set). As seen on the Venn diagram in **Fig. 33A**, a large transcriptional profile modification was observed since 4 137 genes out of 11 047 had a statistically significant modified amounts of transcripts. As seen with the PCA, most of them changed between 48h and 96h or 48h and 140h, with few of them changing between 96h and 140h, as only 1% of differentially expressed genes (46 genes) were specific to this time frame. The volcano plot analysis of the genes whose expression was modified showed that most were differentially expressed by a factor between -2.0 and 2.0 (**Fig. 33B**). This suggested that most of these genes may not have a crucial role in the physiological changes observed during the time-course of the submerged culture. Interestingly, most of the highly differentially expressed genes (e.g., those with more than a two-fold modification) were switched off suggesting that many pathways are turned off after 48h of growth. GO term enrichment analysis of these genes showed that they were mostly related to the metabolism of the membrane (GO:0016020), including amino acids and sugars transporters (**Fig. 40**). This was expected because the nutrients in the external medium were depleted (Supplementary data **Table 12**), which should result in the removal from the membrane of the transporters involved in their import. Noteworthy, the *fluG* gene (PC01_005139), located at the beginning of the signal transduction pathway leading to conidiation in *A. nidulans*, was downregulated by a factor 4.7 at 96h and 6.0 at 140h (Supplementary data **Fig. 41**). This is in accordance with the observed timing of conidiophores production because it starts at 48h but did not seem to occur anymore at 96h. Other genes were also downregulated at 96 h and 140 h (Supplementary data **Fig. 41**), however, the only other gene from the *A. nidulans* conidiation pathway that was significantly regulated by a factor more than two was the *phiA* ortholog; this gene is involved in phialide development (Melin et al., 2003), the progenitor cell of conidia. It was downregulated by a factor -2.2 at 96h and -3.0 at 140h. Overall, this suggested that the conidiation pathway deciphered in *A. nidulans* is likely conserved in *P. camemberti*.

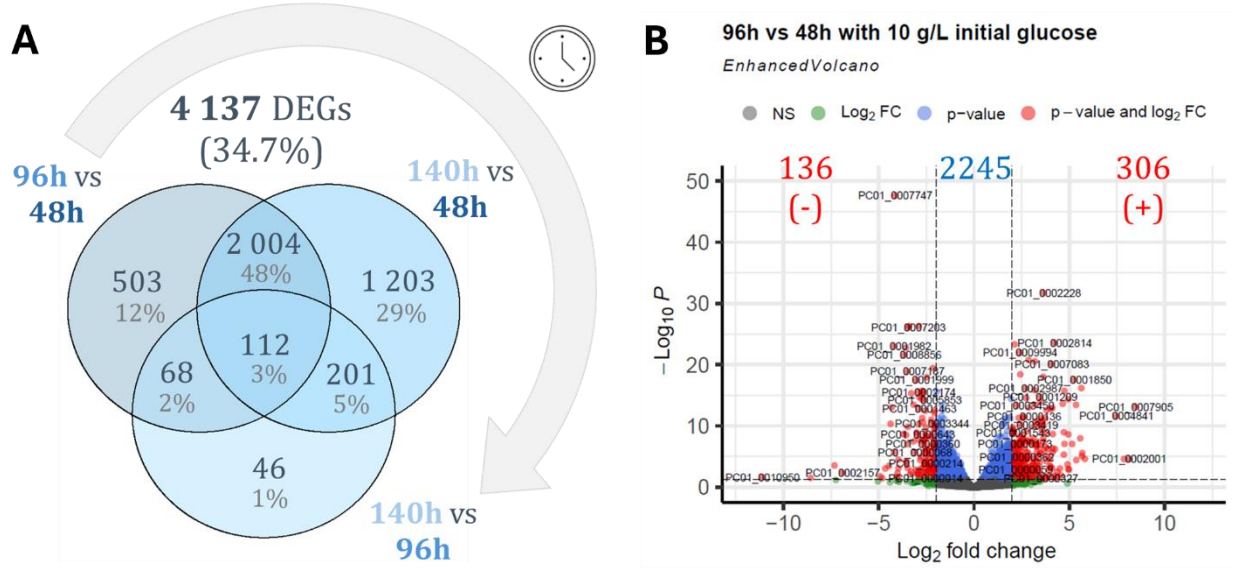


Fig. 33 *Quantification of differentially expressed genes over time for the 10 g·L⁻¹ glucose condition (**A**) Venn diagram of differentially expressed genes (DEGs) with adjusted p-values < 0.05 (**B**) Volcano plot of differentially expressed genes. The dashed line on the y-axis indicates an adjusted p-value of 0.05, and the dashed lines on the x-axis indicate the log₂ fold change of -2.0 and 2.0. Red points represent the most differentially expressed genes, downregulated on the left and upregulated on the right. Blue points represent genes considered statistically significantly expressed, but not differentially expressed enough. Green points represent the most differentially expressed genes between the two conditions, but not statistically significant enough. Gray points represent genes whose expression was neither differentially expressed enough nor statistically significant.*

3.3.4 Comparison of 20 g·L⁻¹ glucose vs 10 g·L⁻¹ glucose

When compared to the ones of 10 g·L⁻¹ glucose concentration (**Fig. 34A&B**), expression profiles of 20 g·L⁻¹ glucose were very different with more than 3500 genes differentially expressed for each condition; among these 1640 were differentially expressed at both times (**Fig. 34C**). However, at 96h only 374 genes were differentially expressed by a twofold ratio, while 1754 genes had such differential expression at 48h (**Fig. 34C**). This is in line with the fact that at 48h in the presence of 20 g·L⁻¹ of glucose the mycelium may not have switched to the conidia production program, while it has done so with 10 g·L⁻¹ of glucose. Lack of conidia production suggested that the conidiation program was likely bypassed at 20 g·L⁻¹ glucose, in line with expression profile at 96h, which was very similar to the one with 10 g·L⁻¹ glucose. At that time, conidia were not produced anymore with 10 g·L⁻¹ glucose. Noteworthy, nutrient analysis showed that glucose was completely depleted from the medium at 48h even when present at 20 g·L⁻¹ (**Table S19**).

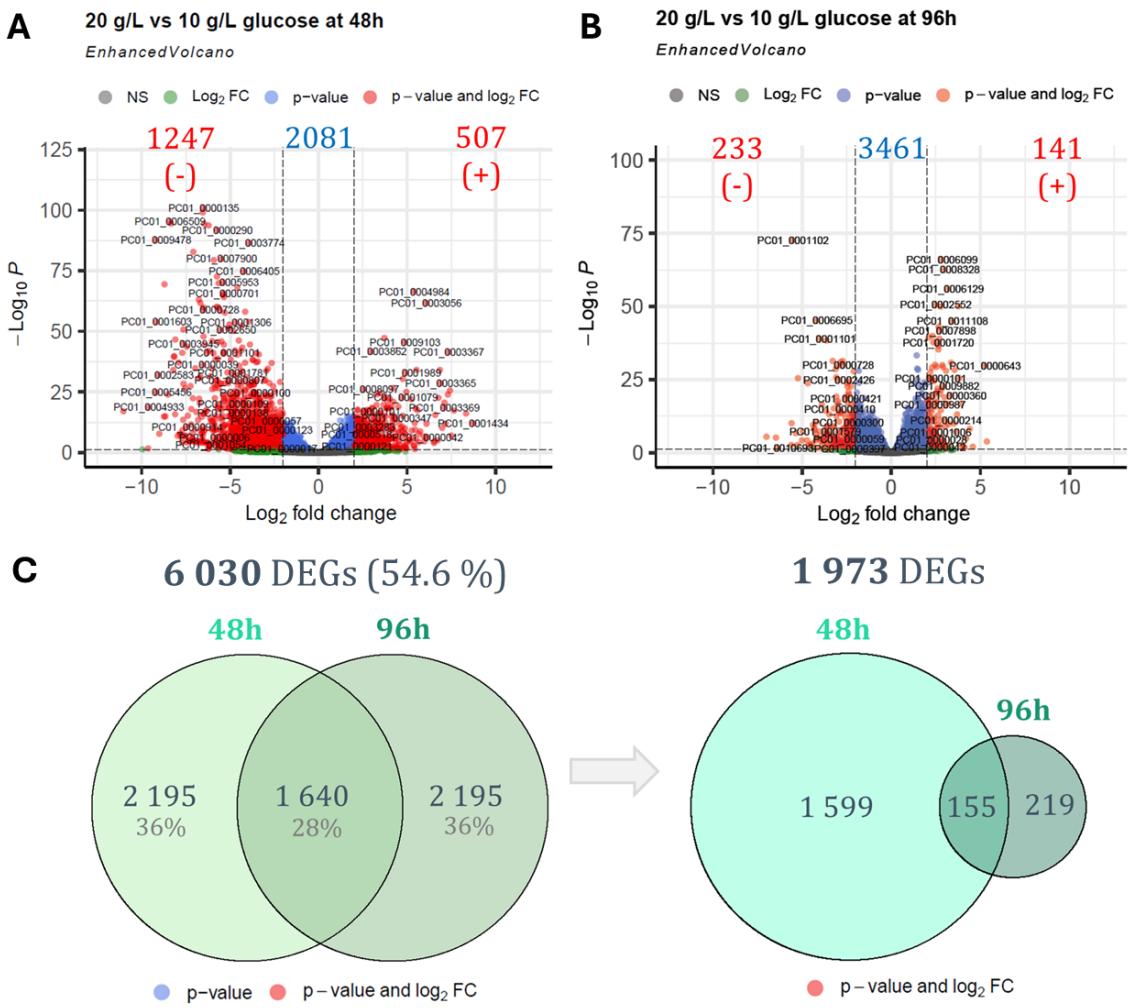


Fig. 34 *Quantification of differentially expressed genes between 20 $g{\cdot}L^{-1}$ and 10 $g{\cdot}L^{-1}$ glucose conditions at 48h and 96h. Volcano plots of differentially expressed genes at (**A**) 48h and (**B**) 96h. The dashed line on the y-axis indicates an adjusted p-value of 0.05, and the dashed lines on the x-axis indicate the log_2 fold change of -2.0 and 2.0. Red points represent the most differentially expressed genes, downregulated on the left and upregulated on the right. Blue points represent genes considered statistically significantly expressed, but not differentially expressed enough. (**C**) Venn diagrams of differentially expressed genes (DEGs) with all genes considered statistically significantly expressed on the left, and with only the most differentially expressed genes on the right.*

To better understand the functions of the differentially expressed genes between the 20 g·L^{-1} and 10 g·L^{-1} glucose conditions, a Gene Ontology (GO) enrichment analysis was performed (**Fig. 35**). At 48h, the most significantly enriched GO terms were related to carbon metabolism (GO:0004553: hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl and GO:0005975: carbohydrate metabolic process) and transmembrane transport (GO:0016020: membrane and GO:0055085: transmembrane transport). Analysis of the top 5 most differentially overexpressed and underexpressed genes for each enriched GO term did not make any obvious sense since for the same type of proteins, some genes were induced and others were repressed. For example, for the hydrolase activity (GO:0004553) the endoglucosidase PC01_000842 was downregulated in 20 g·L^{-1} glucose, while endoglucosidase PC01_0011121 was up regulated (**Table 5**). At 96h, only the enrichment of the membrane GO term (GO:0016020) was maintained (**Fig. 35**), in line with the fact that carbohydrate metabolism was shut down at that time. As for 48h, analysis of the top 5 most differentially overexpressed and underexpressed genes at 96h for each enriched GO term did not make any obvious sense (**Table 6**), apart from the noted differences in membrane permeability.

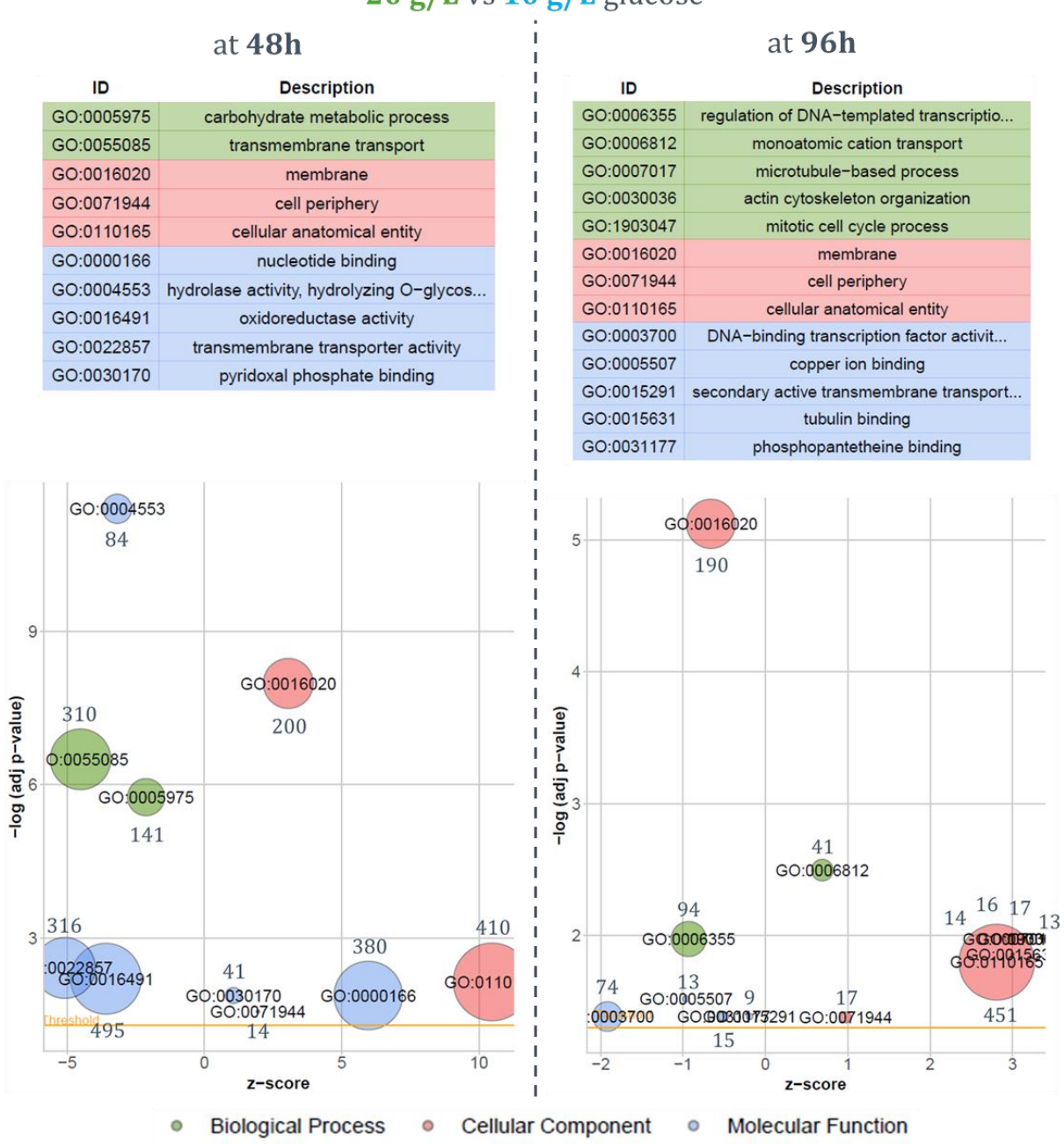


Fig. 35 *Bubble plot of the significantly enriched Gene Ontology (GO) terms for the differentially expressed genes between 20 $g{\cdot}L^{-1}$ and 10 $g{\cdot}L^{-1}$ glucose conditions at 48h on the left and 96h on the right. The yellow line on the y-axis indicates the negative logarithm of the adjusted p-value of 1.30 (correspond to adjusted p-value = 0.05), and the x-axis represents the z-score calculated using the R package GOplot (Walter et al., 2015). GO terms with an adjusted p-value greater than 0.05 are not displayed. The bubbles of the GO terms belonging to biological processes are green, those of cellular components are red and those of molecular functions are blue. The size of the bubbles is proportional to the number of differentially expressed genes assigned to the GO term, and the number next to each bubble corresponds to the number of significant differentially expressed genes.*

Importantly, analysis of the putative conidiation program of *P. camemberti* showed that many of its components were down regulated in 20 g·L^{-1} glucose at 48h, in accordance with the fact that the fungus did not sporulate (**Fig. 36** & **Table 7**). At 96h a time for which the conidia production was shut down in 10 g·L^{-1} of glucose, no difference in the expression of the pathway was detected, as expected if the sporulation pathway was bypassed in 20 g·L^{-1} of glucose. Overall, the data confirms that increasing glucose concentration likely resulted in the bypass of the conidiation program by repressing several of its members.

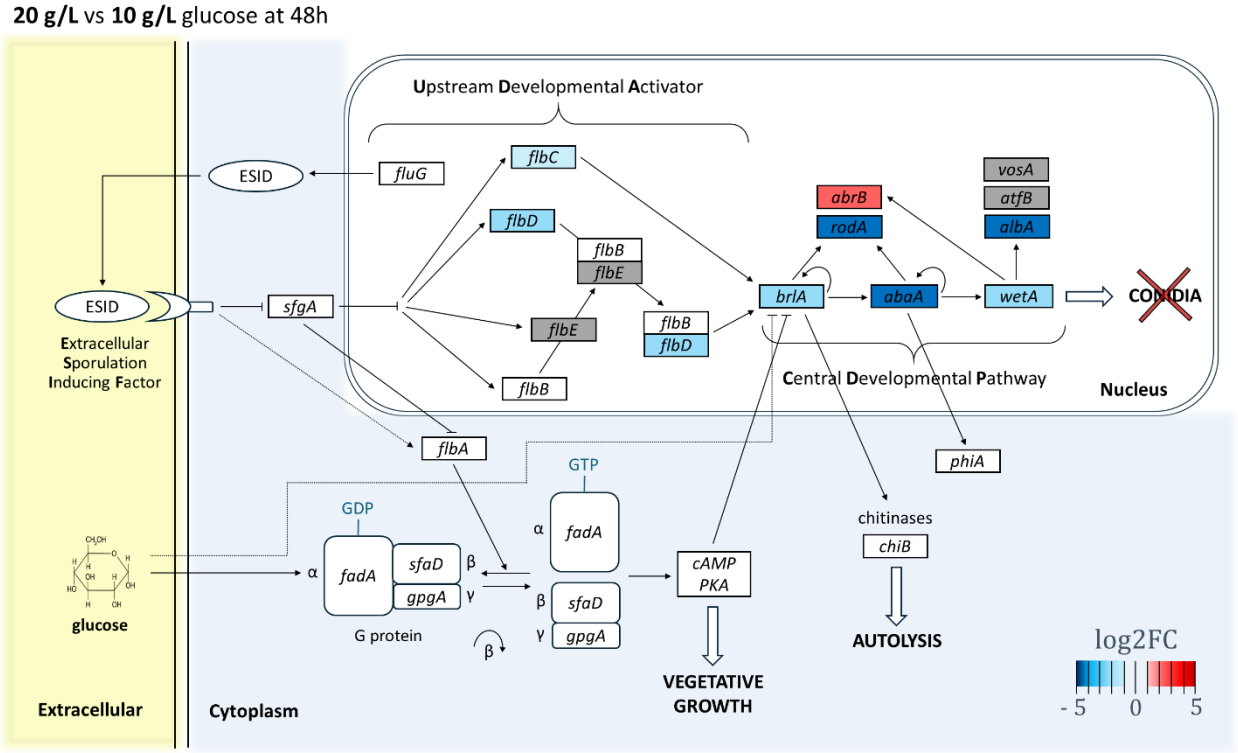


Fig. 36 *Putative conidiation pathway in P. camemberti with comparison at 48h of the genes differently expressed in 20 g·L^{-1} glucose vs 10 g·L^{-1} glucose. Model designed from Park & Yu, 2012; Emri et al., 2008; Roncal & Ugalde, 2003; Adams et al., 1998.*

3.3.5 Comparison of 10 g·L^{-1} sucrose vs 10 g·L^{-1} glucose

Unlike the comparison between the two glucose concentrations, much fewer differences were observed when comparing the expression profiles between sucrose and glucose at 10 g·L^{-1}, both at 48h and 96h (**Fig. 37**). This was especially true for the genes with more than a twofold difference, as only 82 genes with such differences in expression were detected. Because the morphology of the mycelium with both sugars appeared identical, it is possible that this reflects only the bypass of the

conidiation program. If this assumption was correct, this meant that most of the differences observed in the expression profiles between 10 g·L^{-1} and 20 g·L^{-1} glucose were linked to the different modalities of the growth of the mycelium. The GO term enrichment analysis showed that the same carbon metabolism and transmembrane transport GO terms were the most enriched in 10 g·L^{-1} sucrose and 20 g·L^{-1} glucose compared to 10 g·L^{-1} glucose both at 48h and 96h (**Fig. 35 & Fig. 38**). As expected for the presence of sucrose as carbon source, we found two invertases PC01_006089 and PC01_010935 overexpressed by a factor of 3.7 and 2.8, specifically in 10 g·L^{-1} sucrose (**Table 8**), indicative that this substrate was classically metabolized by *P. camemberti*.

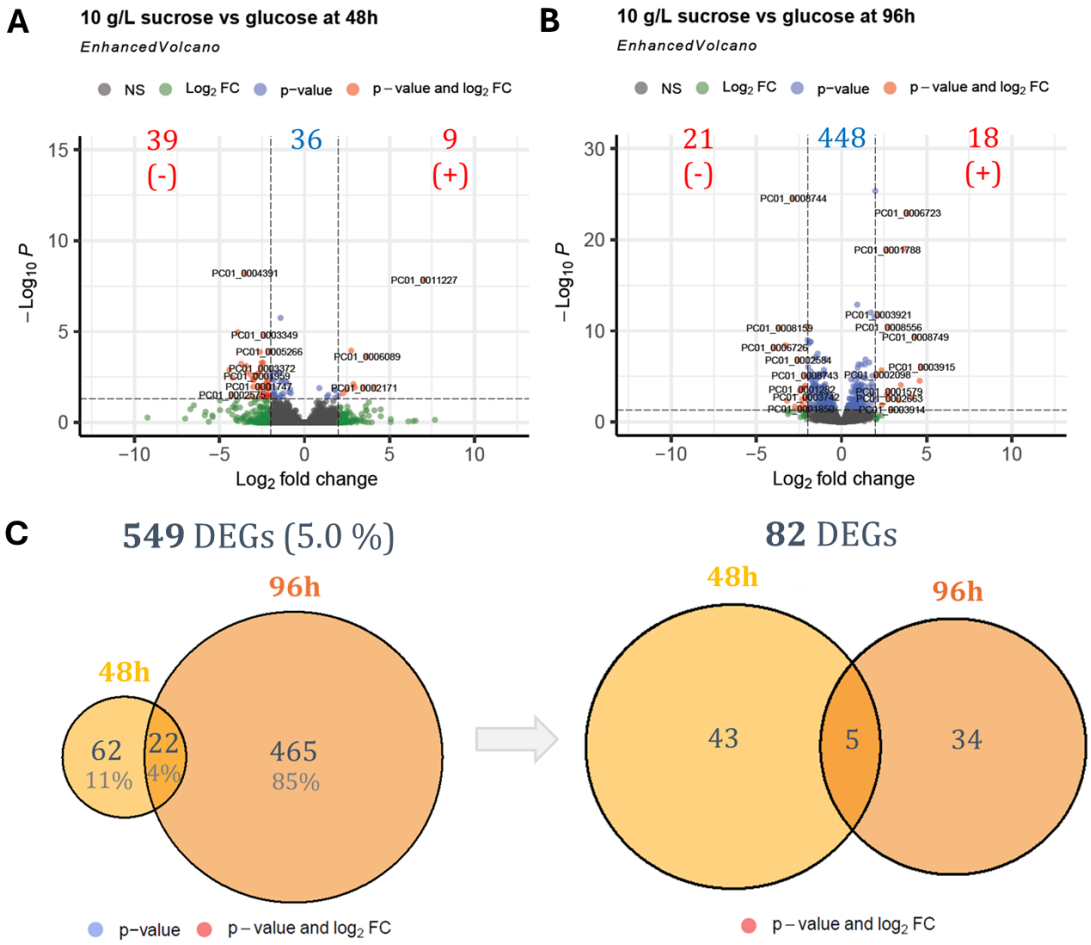
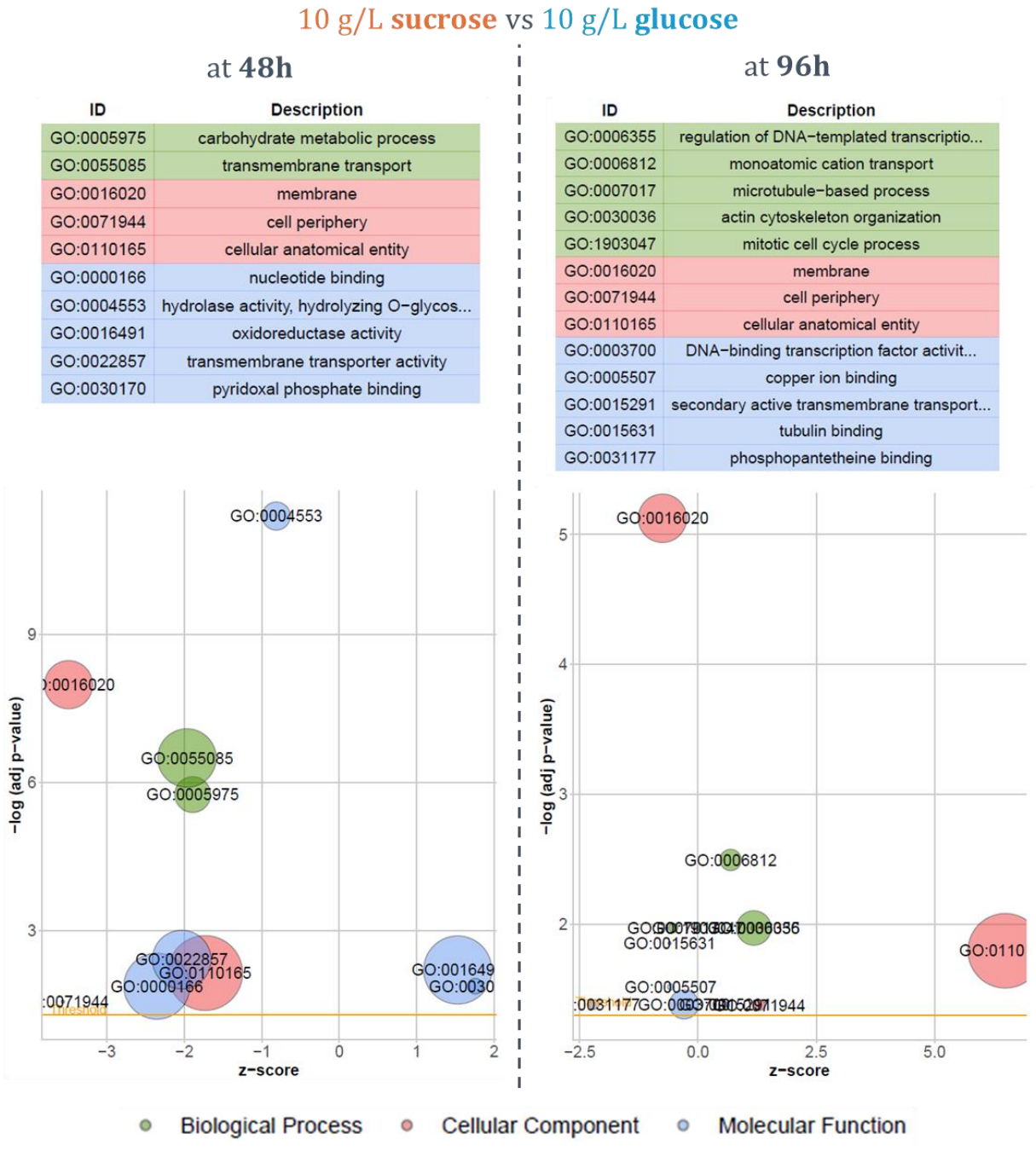


Fig. 37 *Quantification of differentially expressed genes between 10 g·L^{-1} sucrose and 10 g·L^{-1} glucose conditions at 48h and 96h. Volcano plots of differentially expressed genes at (**A**) 48h and (**B**) 96h. The dashed line on the y-axis indicates an adjusted p-value of 0.05, and the dashed lines on the x-axis indicate the log$_2$ fold change of -2.0 and 2.0. Red points represent the most differentially expressed genes, downregulated on the left and upregulated on the right. Blue points represent genes considered statistically significantly expressed, but not differentially*

*expressed enough. **(B)** Venn diagrams of differentially expressed genes (DEGs) with all genes considered statistically significantly expressed on the left, and with only the most differentially expressed genes on the right.*



ID	Description
GO:0005975	carbohydrate metabolic process
GO:0055085	transmembrane transport
GO:0016020	membrane
GO:0071944	cell periphery
GO:0110165	cellular anatomical entity
GO:0000166	nucleotide binding
GO:0004553	hydrolase activity, hydrolyzing O−glycos...
GO:0016491	oxidoreductase activity
GO:0022857	transmembrane transporter activity
GO:0030170	pyridoxal phosphate binding

ID	Description
GO:0006355	regulation of DNA−templated transcriptio...
GO:0006812	monoatomic cation transport
GO:0007017	microtubule−based process
GO:0030036	actin cytoskeleton organization
GO:1903047	mitotic cell cycle process
GO:0016020	membrane
GO:0071944	cell periphery
GO:0110165	cellular anatomical entity
GO:0003700	DNA−binding transcription factor activit...
GO:0005507	copper ion binding
GO:0015291	secondary active transmembrane transport...
GO:0015631	tubulin binding
GO:0031177	phosphopantetheine binding

***Fig. 38** Bubble plot of the significantly enriched Gene Ontology (GO) terms for the differentially expressed genes between 10 $g \cdot L^{-1}$ sucrose and 10 $g \cdot L^{-1}$ glucose conditions at 48h on the left and 96h on the right. The yellow line on the y-axis indicates the negative logarithm of the adjusted p-value of 1.30 (corresponding to adjusted p-value = 0.05), and the x-axis represents the z-score calculated using the R package GOplot (Walter et al., 2015). GO terms with an adjusted p-value greater than 0.05 are not displayed.*

Analysis of the expression of the conidiation pathway showed that in the presence of 10 g·L^{-1} sucrose, only the *abaA* and *phiA* genes were down regulated by a factor -2.2, and -2.6, respectively (**Table 7**), suggesting that other pathways repressing conidiation could be activated in the presence of sucrose. Interestingly, PC01_011227 that encodes a C2H2-type zinc finger transcription factor was the gene with the largest induction in the presence of sucrose at 48h by a factor of 7.0 in comparison to 10 g·L^{-1} glucose, making it a potential repressor of conidiation. This transcription factor was also upregulated by a factor 7.0 between 20 g·L^{-1} and 10 g·L^{-1} glucose, which make it the 61st gene among the 3835 genes differentially regulated in glucose 20 g·L^{-1} in comparison to glucose 10 g·L^{-1}, confirming this hypothesis. At 96h, the transcription factor PC01_011227 was still upregulated by a factor 3.7 between 10 g·L^{-1} sucrose and 10 g·L^{-1} glucose, constituting the 7th most differentially expressed gene out of 39 (**Table 9**). Little information was available on this transcription factor. Query with Blast at Mycocosm (http://genome.jgi.doe.gov/programs/fungi/index.jsf) indicated that it was conserved in many *Eurotiales* (the ortholog is ANIA_05659 in *A. nidulans* strain FGSC4), but appeared to be lacking in the other fungi, including in the *Onygenales* and *Verrucariales*, which are close orders of the class *Eurotiomycetes*. To the best of our knowledge, no functional studies have been performed on this transcription factor. Its deletion would allow us to know more about its potential role, especially in conidiation.

3.2.1 Comparison of 10 g·L^{-1} mix glucose/fructose vs 10 g·L^{-1} glucose or 10 g·L^{-1} sucrose

The expression profiles at 48h between the glucose/fructose mix and 10 g·L^{-1} glucose and between the mix and 10 g·L^{-1} sucrose were almost similar with only 20 genes differentially expressed by at least a factor of 2.0 between the mix and glucose and with 10 genes between the mix and sucrose (**Fig. 39**). This is in accordance with their similar mycelium morphology and conidia production ability. Almost all the 20 differentially expressed genes were downregulated between the 10 g·L^{-1} mix and 10 g·L^{-1} glucose; most of these genes were also downregulated between 20 g·L^{-1} and 10 g·L^{-1} glucose, suggesting that they may not be involved in lack of conidia production in the presence of 20 g·L^{-1} of glucose (**Table 10**). Interestingly, transcription factor PC01_011227 was not differentially expressed between the 10 g·L^{-1} mix of glucose and fructose compared to 10 g·L^{-1} glucose but was activated by a factor 3.61 in 10 g·L^{-1} sucrose compared to the 10 g·L^{-1} mix (**Table 11**), in agreement with its potential role as a repressor of conidia production.

At 96h, there were more differentially expressed genes, however, most of these had less than two-fold modifications, as only 76 genes were differentially expressed more than two-fold between

the mix and 10 g·L^{-1} glucose, and 224 between the mix and 10 g·L^{-1} sucrose (**Fig. 39**). The enrichment of the GO terms showed that, in both cases, these genes were mainly linked to the membrane (GO:0016620), suggesting that different transporters may be replaced in the different media as expected for their different compositions (**Fig. 42**).

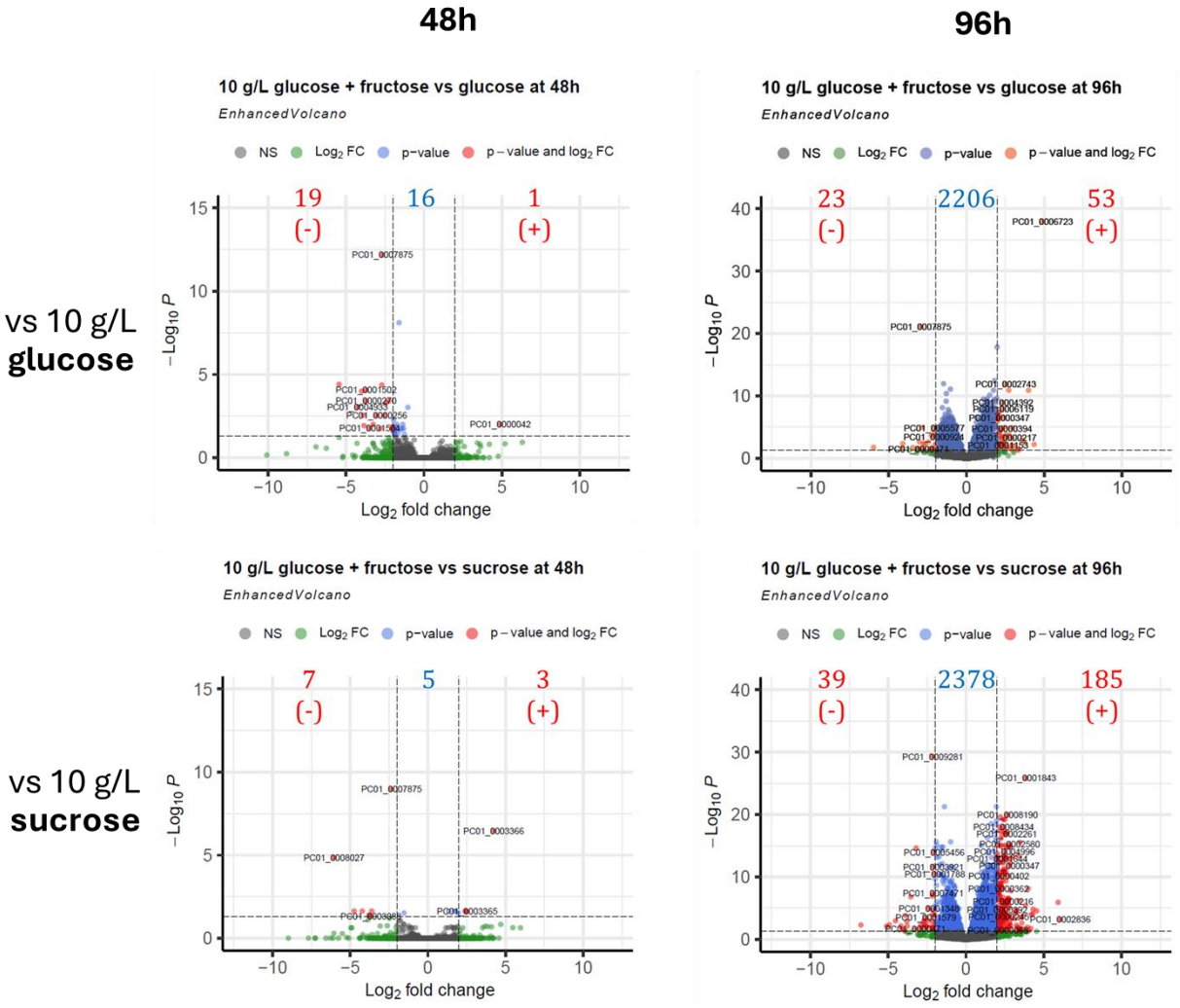


Fig. 39 *Volcano plots of differentially expressed genes between 10 g·L^{-1} mix glucose/fructose and 10 g·L^{-1} glucose or sucrose conditions at 48h and 96h. The dashed line on the y-axis indicates an adjusted p-value of 0.05, and the dashed lines on the x-axis indicate the log$_2$ fold change of -2.0 and 2.0. Red points represent the most differentially expressed genes, downregulated on the left and upregulated on the right. Blue points represent genes considered statistically significantly expressed, but not differentially expressed enough.*

3.4 Conclusion

This study is the first transcriptomic analysis of *P. camemberti* in pure culture. It investigates the transcriptional modifications seen when the fungus is grown in submerged culture with different carbon sources. It reports on the differences in morphology and gene expression over time both in the presence of different carbohydrate sources and with different initial concentrations of carbon.

Here, we show firstly that a dispersed morphology of the mycelium is not always associated with increased production of conidia, as seen by the lack of conidia production in the presence of sucrose. Secondly, we also evidence that too much initial carbon source is detrimental for efficient conidia production, likely because it results in the bypass of the conidia formation program, in accordance with the very different patterns of gene expression for 10 $g \cdot L^{-1}$ and 20 $g \cdot L^{-1}$ glucose in the early stages of culture and the similar ones at the late stages. The RNA-seq analysis identified mostly membrane components as changing in the various growth conditions, in accordance with the different medium compositions. It also showed that the conidiation program identified by functional analysis in *A. nidulans* is likely operational in *P. camemberti* and appears to follow the same activation modalities. Finally, and importantly, the RNA-seq analysis identified transcription factor PC01_011227 as a potential repressor of conidiation, as this transcription factor was induced in all the conditions where conidiation was absent, but not when conidiation was present. This transcription factor should be a target of choice for functional analyses. As these are not presently available in *P. camemberti*, this should be done in the model organism *A. nidulans*, which possesses an ortholog called ANIA_05659.

Acknowledgments

This study was supported by a CIFRE grant from the French National Association for Research and Technology (ANRT) and by Danisco France SAS part of IFF company.

We would like to thank for RNA sequencing Yakov Vitrenko and Laure Lemée, Biomics Platform, C2RT, Institut Pasteur, Paris, France, supported by France Génomique (ANR-10-INBS-09) and IBISA.

We are grateful to Lisa Fourny from IFF for the HPLC assays, and to Nadim Kassis from BFA (CNRS UMR 8246, Paris, France) for advices on optimizing RNA extraction.

References

Adams, T. H., Wieser, J. K., & Yu, J.-H. (1998). Asexual Sporulation in Aspergillus nidulans. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 62.

Alexa, A., Rahnenführer, J., & Lengauer, T. (2006). Improved scoring of functional groups from gene expression data by decorrelating GO graph structure. Bioinformatics (Oxford, England), 22(13), 1600‑1607. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl140

Almena-Aliste, M., & Mietton, B. (2014). Cheese Classification, Characterization, and Categorization: A Global Perspective. Microbiology Spectrum, 2(1), 2.1.09. https://doi.org/10.1128/microbiolspec.CM-0003-2012

Bizukojc, M., & Ledakowicz, S. (2010). The morphological and physiological evolution of Aspergillus terreus mycelium in the submerged culture and its relation to the formation of secondary metabolites. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 26(1), 41‑54. https://doi.org/10.1007/s11274-009-0140-1

Bockelmann, W., Portius, S., Lick, S., & Heller, K. J. (1999). Sporulation of Penicillium camemberti in Submerged Batch Culture. Systematic and Applied Microbiology, 22(3), 479‑485. https://doi.org/10.1016/S0723-2020(99)80058-7

Boualem, K. (2008). Influence de conditions environnementales sur la conidiation et les propriétés de surface de Penicillium camemberti. Université de Bourgogne.

Boualem, K., Gervais, P., Cavin, J.-F., & Waché, Y. (2014). Production of conidia of Penicillium camemberti in liquid medium through microcycles of conidiation. Biotechnology Letters, 36(11), 2239‑2243. https://doi.org/10.1007/s10529-014-1596-0

Boualem, K., Labrie, S., Gervais, P., Waché, Y., & Cavin, J.-F. (2016). Conidiation of Penicillium camemberti in submerged liquid cultures is dependent on the nitrogen source. Biotechnology Letters, 38(2), 329‑335. https://doi.org/10.1007/s10529-015-1983-1

Burkhalter, G. (1981). Catalogue of Cheese (Bulletin 141). International Dairy Federation.

Cairns, T. C., Zheng, X., Zheng, P., Sun, J., & Meyer, V. (2019). Moulding the mould: Understanding and reprogramming filamentous fungal growth and morphogenesis for next generation cell factories. Biotechnology for Biofuels, 12(1), 77. https://doi.org/10.1186/s13068-019-1400-4

Canteri, H., & Ghoul, M. (2015). Submerged Liquid Culture for Production of Biomass and Spores of Penicillium. Food Reviews International, 31(3), 262‑278. https://doi.org/10.1080/87559129.2015.1015136

Drougard, M. (2018). Compréhension et contrôle de la morphologie des champignons filamenteux en milieu liquide.

Emri, Molnar, Pusztahelyi, Varecza, & Pocsi. (2005). The FluG-BrlA pathway contributes to the initialisation.

Emri, T., Molnár, Z., Szilágyi, M., & Pócsi, I. (2008). Regulation of Autolysis in Aspergillus nidulans. Applied Biochemistry and Biotechnology, 151(2‑3), 211‑220. https://doi.org/10.1007/s12010-008-8174-7

Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M., & McSweeney, P. L. H. (2017). Fundamentals of Cheese Science. Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-7681-9

Giraud, F., Giraud, T., Aguileta, G., Fournier, E., Samson, R., Cruaud, C., Lacoste, S., Ropars, J., Tellier, A., & Dupont, J. (2010). Microsatellite loci to recognize species for the cheese starter and contaminating strains associated with cheese manufacturing. International Journal of Food Microbiology, 137(2‑3), 204‑213. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.11.014

Grossmann, S., Bauer, S., Robinson, P. N., & Vingron, M. (2007). Improved detection of overrepresentation of Gene-Ontology annotations with parent‑child analysis. Bioinformatics, 23(22), 3024‑3031. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm440

Harbutt, J. (2015). World Cheese Book. DK Publishing.

Hille, A., Neu, T. R., Hempel, D. C., & Horn, H. (2009). Effective diffusivities and mass fluxes in fungal biopellets. https://analyticalsciencejournals-onlinelibrary-wiley-com.ezproxy.u-paris.fr/doi/10.1002/bit.22351

International Dairy Federation. (2023). The World Dairy Situation Report 2023. https://milksa.co.za/sites/default/files/2024-01/2023%20World%20Dairy%20Situation%20Report.pdf

Kim, D., Paggi, J. M., Park, C., Bennett, C., & Salzberg, S. L. (2019). Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype. Nature Biotechnology, 37(8), 907‑915. https://doi.org/10.1038/s41587-019-0201-4

Krasniewski, I., Molimard, P., Feron, G., Vergoignan, C., Durand, A., Cavin, J.-F., & Cotton, P. (2006). Impact of solid medium composition on the conidiation in Penicillium camemberti. Process Biochemistry, 41(6), 1318‑1324. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.01.005

Krishna, C. (2005). Solid-State Fermentation Systems—An Overview. Critical Reviews in Biotechnology, 25(1‑2), 1‑30. https://doi.org/10.1080/07388550590925383

Liao, Y., Smyth, G. K., & Shi, W. (2014). featureCounts: An efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. Bioinformatics (Oxford, England), 30(7), 923‑930. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt656

Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. Genome Biology, 15(12), 550. https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8

McSweeney, P. L. H., & Sheehan, J. J. (2007). Cheese Problems Solved.

Melin, P., Schnürer, J., & Wagner, E. G. H. (2003). Characterization of phiA, a gene essential for phialide development in Aspergillus nidulans. Fungal Genetics and Biology, 40(3), 234‑241. https://doi.org/10.1016/S1087-1845(03)00108-7

Meyer, V., Cairns, T., Barthel, L., King, R., Kunz, P., Schmideder, S., Müller, H., Briesen, H., Dinius, A., & Krull, R. (2021). Understanding and controlling filamentous growth of fungal cell factories: Novel tools and opportunities for targeted morphology engineering. Fungal Biology and Biotechnology, 8(1), 8. https://doi.org/10.1186/s40694-021-00115-6

Morton, A. G., England, D. J. F., & Towler, D. A. (1958). The physiology of sporulation in Penicillium griseofulvum Dierckx. Transactions of the British Mycological Society, 41(1), 39‑51. https://doi.org/10.1016/S0007-1536(58)80004-2

Papagianni, M. (2004). Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. Biotechnology Advances, 22(3), 189‑259. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2003.09.005

Park, H.-S., & Yu, J.-H. (2012). Genetic control of asexual sporulation in filamentous fungi. Current Opinion in Microbiology, 15(6), 669‑677. https://doi.org/10.1016/j.mib.2012.09.006

Roncal, T., & Ugalde, U. (2003). Conidiation induction in Penicillium. Research in Microbiology, 154(8), 539‑546. https://doi.org/10.1016/S0923-2508(03)00168-2

Ropars, J. (2020). Domestication of the Emblematic White Cheese-Making Fungus Penicillium camemberti and Its Diversification into Two Varieties.

Sandine, W., & Elliker, P. (1970). Microbially induced fl avors and fermented foods: Fl avor in fermented dairy products.

Scott, R., Robinson, R. K., & Wilbey, R. A. (1998). Cheesemaking Practice. Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-5819-4

Silar, P. (2016). Protistes Eucaryotes: Origine, évolution et biologie des microbes eucaryotes. Creative Commons.

Strong, P. J., Self, R., Allikian, K., Szewczyk, E., Speight, R., O'Hara, I., & Harrison, M. D. (2022). Filamentous fungi for future functional food and feed. Current Opinion in Biotechnology, 76, 102729. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2022.102729

Tucker, K. G., & Thomas, C. R. (1992). Mycelial morphology: The effect of spore inoculum level. Biotechnology Letters, 14(11), 1071‑1074. https://doi.org/10.1007/BF01021061

Walt, S. van der, Schönberger, J. L., Nunez-Iglesias, J., Boulogne, F., Warner, J. D., Yager, N., Gouillart, E., & Yu, T. (2014). scikit-image: Image processing in Python. PeerJ, 2, e453. https://doi.org/10.7717/peerj.453

Walter, W., Sánchez-Cabo, F., & Ricote, M. (2015). GOplot: An R package for visually combining expression data with functional analysis. Bioinformatics, 31(17), 2912‑2914. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv300

White, S., McIntyre, M., Berry, D. R., & McNeil, B. (2002). The Autolysis of Industrial Filamentous Fungi. Critical Reviews in Biotechnology, 22(1), 1‑14. https://doi.org/10.1080/07388550290789432

Willey, J., Sandman, K., & Wood, D. (2022). Prescott's Microbiology (12th ed.). Mc Graw Hill.

Wucherpfennig, T., Hestler, T., & Krull, R. (2011). Morphology engineering–Osmolality and its effect on Aspergillus niger morphology and productivity. Microbial Cell Factories, 10(1), 58. https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-58

Table 4 *Evaluation of stirring speed, inoculation concentration, pH and light on mycelium macromorphology, presence or absence of conidiophores and conidia with 10 $g \cdot L^{-1}$ of glucose. At 24h, the mycelium was present in very low amount and its morphology was not properly defined; production of conidia was not detected.* Pellets*: typical spherical and dense mass of mycelium;* dispersed*: loose and free-floating mycelium;* hybrid*: a mix of pellets and dispersed mycelium.*

stirring speed ($tr \cdot min^{-1}$)	**inoculum concentration ($conidia \cdot mL^{-1}$)**	**light**	**pH**	**macro-morphology after 48h**	**conidiophores at 48h**	**conidia concentrat° range at 140h (conidia x 10^7/mL)**
150	2.0E+03	natural light	4.8	*pellets*	absence	0.00 - 0.01
150	2.0E+04	natural light	4.8	*pellets*	absence	0.00 - 0.01
150	2.0E+05	natural light	4.8	*pellets*	absence	0.00 - 0.01
150	2.0E+05	dark	4.8	*pellets*	absence	0.00 - 0.01
150	2.0E+06	natural light	4.8	*hybrid*	presence	0.50 - 1.50
150	2.0E+06	dark	4.8	*hybrid*	presence	0.50 - 1.50
150	2.0E+07	natural light	3.8	*hybrid*	presence	0.50 - 1.50
150	2.0E+07	natural light	4.8	*hybrid*	presence	0.50 - 1.50
150	2.0E+07	dark	4.8	*hybrid*	presence	0.50 - 1.50
180	2.0E+05	natural light	4.8	*pellets*	absence	0.00 - 0.01
180	2.0E+05	dark	4.8	*pellets*	absence	0.00 - 0.01
180	2.0E+06	natural light	4.8	*hybrid*	presence	0.50 - 1.50
180	2.0E+06	dark	4.8	*hybrid*	presence	0.50 - 1.50
180	2.0E+07	natural light	3.8	*dispersed*	presence	4.50 - 6.00
180	2.0E+07	natural light	4.8	*dispersed*	presence	4.50 - 6.00
180	2.0E+07	dark	4.8	*dispersed*	presence	4.50 - 6.00
180	2.0E+07	artificial light	4.8	*dispersed*	presence	4.50 - 6.00
180	2.0E+07	natural light	7.0	*hybrid*	presence	0.50 - 1.50
210	2.0E+05	artificial light	4.8	*pellets*	absence	0.00 - 0.01
210	2.0E+06	artificial light	4.8	*hybrid*	presence	0.50 - 1.50
210	2.0E+07	artificial light	4.8	*dispersed*	presence	4.50 - 6.00

Table 5 *List of the most significantly enriched GO terms between 20 g·L^{-1} and 10 g·L^{-1} glucose conditions at 48h, with the number of genes significantly differentially expressed, the number of genes significantly differentially expressed by at least a twofold ratio, and the top 5 of these genes upregulated or downregulated. The log$_2$ fold changes and the adjusted p-value at 48h, but also at 96h, are indicated.*

20 g·L^{-1} vs 10 g·L^{-1} glucose at 48h

				48h		96h	
GO term		**Gene ID**	**Description**	**log$_2$ FC**	**adj p-v**	**log$_2$ FC**	**adj p-v**
GO:0004553	**1**	PC01_010246	Rhamnogalacturonan hydrolase	-7.52	1E-07	-	-
Hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds	**2**	PC01_000842	Glycosyl hydrolase family 71	-6.76	9E-05	-2.06	3E-02
	3	PC01_005670	α-1,3-glucanase activity	-6.60	9E-05	-3.04	3E-04
	4	PC01_005118	Glucanase Lam16A	-6.49	3E-09	-	-
• p-value	**5**	PC01_006181	β-galactosidase *lacA*	-6.01	6E-27	-	-
84 DEGs	**8**	PC01_001975	Intracellular sporulation-specific glucoamylase SGA1	5.59	3E-18	-	-
• p-value • log$_2$FC	**9**	PC01_002471	α-amylase *amyF*	5.46	4E-10	-	-
56 DEGs	**16**	PC01_001976	α-amylase *amyB*	4.58	5E-04	-	-
12 + 44 -	**17**	PC01_009505	Transglycosidase *crhC*	4.55	9E-13	2.42	3E-25
	22	PC01_011121	Glucan endo-1,3-α-glucosidase *agn1*	3.97	4E-06	-	-
GO:0016020	**1**	PC01_002157	Plasma membrane Na+/Pi cotransporter	-9.63	2E-02	3.09	8E-03
Membrane	**2**	PC01_007021	MFS transporter	-7.90	7E-38	-	-
• p-value	**3**	PC01_007691	Sugar transporter (MFS)	-7.69	5E-10	-	-
200 DEGs	**4**	PC01_009477	Phosphatidylserine synthase	-7.08	2E-83	-	-
• p-value • log$_2$FC	**5**	PC01_000728	MFS transporter	-6.49	2E-59	-2.98	1E-30
100 DEGs	**9**	PC01_003056	Ammonium permease *MEP2*	6.09	2E-62	2.27	3E-05
26 + 74 -	**21**	PC01_007379	Low affinity glucose transporter (MFS)	4.96	5E-05	-	-
	22	PC01_007761	Plasma membrane transporter for urea / polyamines	4.87	1E-10	-	-
	24	PC01_010111	Ammonium permease *MEP1*	4.75	6E-16	-	-
	25	PC01_000231	High affinity methionine permease *MUP1*	4.74	1E-09	-	-
GO:0055085	**1**	PC01_007021	MFS transporter	-7.90	7E-38	-	-
Transmembrane transport	**2**	PC01_007691	Sugar transporter (MFS)	-7.69	5E-10	-	-
	3	PC01_003944	MFS transporter	-6.91	2E-05	-	-
• p-value	**4**	PC01_011096	MFS transporter	-6.68	5E-32	-	-
310 DEGs	**6**	PC01_000728	MFS transporter	-6.49	2E-59	-2.98	1E-30
• p-value • log$_2$FC	**5**	PC01_002640	Plasma membrane transporter (MFS)	6.53	2E-05	-	-
232 DEGs	**10**	PC01_003056	Ammonium permease *MEP2*	6.09	2E-62	2.27	3E-05
69 + 163 -	**24**	PC01_006795	Tpo1 and MDR transporters (MFS)	5.38	1E-03	-	-
	31	PC01_007379	Low affinity glucose transporter (MFS)	4.96	5E-05	-	-
	34	PC01_007761	Plasma membrane transporter for urea / polyamines	4.87	1E-10	-	-
GO:0005975	**1**	PC01_010246	Rhamnogalacturonan hydrolase	-7.52	1E-07	-	-
Carbohydrate metabolic process	**2**	PC01_009668	*Hypothetical protein*	-6.58	3E-06	-2.52	0.00
	3	PC01_005118	Glucanase Lam16A	-6.49	3E-09	-	-
• p-value	**4**	PC01_006622	α-1,2-mannosidase	-6.02	1E-46	-	-
141 DEGs	**5**	PC01_006181	β-galactosidase *lacA*	-6.01	6E-27	-	-
• p-value • log$_2$FC	**8**	PC01_001975	Intracellular sporulation-specific glucoamylase SGA1	5.59	3E-18	-	-
76 DEGs	**9**	PC01_002471	α-amylase *amyF*	5.46	4E-10	-	-
22 + 54 -	**13**	PC01_003366	Aldose 1-epimerase	4.96	1E-25	-	-
	18	PC01_001976	α-amylase *amyB*	4.58	5E-04	-	-
	20	PC01_009505	Transglycosidase *crhC*	4.55	9E-13	2.42	3E-25
GO:0022857	**1**	PC01_002157	Plasma membrane Na+/Pi cotransporter	-9.63	2E-02	3.09	8E-03
Transmembrane transporter activity	**2**	PC01_007021	MFS transporter	-7.90	7E-38	-	-
	3	PC01_007691	Sugar MFS transporter	-7.69	5E-10	-	-
• p-value	**4**	PC01_002912	Oligopeptide transporter protein	-7.63	4E-29	-	-
316 DEGs	**5**	PC01_002911	Oligopeptide transporter protein	-7.20	3E-12	-	-
• p-value • log$_2$FC	**8**	PC01_002640	Plasma membrane transporter (MFS)	6.53	2E-05	-	-
202 DEGs	**13**	PC01_003056	Ammonium permease *MEP2*	6.09	2E-62	2.27	3E-05

56 + 146 -	**26**	PC01_006795	Tpo1 and MDR transporters (MFS)	5.38	1E-03	-	-
	33	PC01_007379	Low affinity glucose transporter (MFS)	4.96	5E-05	-	-
	36	PC01_007761	Plasma membrane transporter for urea / polyamines	4.87	1E-10	-	-
GO:0016491	**1**	PC01_005456	Choline dehydrogenase *bet-1*	-9.18	2E-25	3.78	8E-51
Oxidoreductase activity	**2**	PC01_001603	Type I Iterative PKS	-9.16	1E-54	-	-
	3	PC01_010905	ER-bound oxygenase *mpaB*	-8.51	1E-24	-	-
• p-value	**4**	PC01_009158	Cytochrome P450	-8.11	2E-16	2.08	2E-16
495 DEGs	**6**	PC01_001959	Old yellow enzyme	-7.65	3E-14	-	-
• p-value • log_2FC	**5**	PC01_006692	Cytochrome b5 reductase	7.66	5E-18	-	-
283 DEGs	**10**	PC01_003364	FSL5/apdC enoyl reductase	7.31	1E-24	-	-
106 + 177 -	**16**	PC01_003365	Cytochrome P450	6.89	2E-29	-	-
	20	PC01_008476	Alcohol dehydrogenase *adh-3*	6.59	3E-16	-	-
	27	PC01_000042	Aldo-keto reductase	6.15	6E-07	2.16	2E-02
GO:0110165	**1**	PC01_002157	Plasma membrane Na+/Pi cotransporter	-9.63	2E-02	3.09	8E-03
Cellular anatomical entity	**2**	PC01_007021	MFS transporter	-7.90	7E-38	-	-
	3	PC01_007691	Sugar transporter (MFS)	-7.69	5E-10	-	-
• p-value	**4**	PC01_009477	Phosphatidylserine synthase	-7.08	2E-83	-	-
410 DEGs	**5**	PC01_005844	Kynureninase *kyn-1*	-6.55	8E-100	-	-
• p-value • log_2FC	**6**	PC01_006688	Class I hydrophobin	6.53	1E-04	-	-
132 DEGs	**11**	PC01_003056	Ammonium permease *MEP2*	6.09	2E-62	2.27	3E-05
40 + 92 -	**23**	PC01_007379	Low affinity glucose transporter (MFS)	4.96	5E-05	-	-
	24	PC01_007761	Plasma membrane transporter for urea / polyamines	4.87	1E-10	-	-
	27	PC01_010111	Ammonium permease *MEP1*	4.75	6E-16	-	-
GO:0000166	**1**	PC01_005456	Choline dehydrogenase *bet-1*	-9.18	2E-25	3.78	8E-51
Nucleotide biding	**2**	PC01_006509	FAD-dependent oxidoreductase	-8.40	4E-96	-	-
• p-value	**3**	PC01_001959	Old yellow enzyme	-7.65	3E-14	-	-
380 DEGs	**4**	PC01_009945	BCS1 N terminal / P-loop	-7.44	6E-05	-	-
• p-value • log_2FC	**5**	PC01_004246	Aryl-alcohol dehydrogenase *adh-9*	-7.20	1E-18	-	-
137 DEGs	**7**	PC01_003259	Dehydrogenase	6.85	9E-35	-	-
53 + 84 -	**17**	PC01_005081	Dimethylaniline monooxygenase-3	5.25	1E-22	-	-
	18	PC01_002185	3-hydroxybenzoate 6-monooxygenase	5.20	4E-05	-	-
	22	PC01_000730	D-aspartate oxidase	4.82	3E-03	-	-
	27	PC01_003392	Choline dehydrogenase	4.37	2E-02	-	-
GO:0030170	**1**	PC01_005844	Kynureninase *kyn-1*	-6.55	8E-100	-	-
Pyridoxal phosphate biding	**2**	PC01_009052	DegT/DnrJ/EryC1/StrS aminotransferase	-5.29	2E-58	-	-
	3	PC01_005138	Glutamate or tyrosine decarboxylase	-4.94	1E-09	-	-
• p-value	**5**	PC01_003262	Aromatic/aminoadipate aminotransferase 1	-4.49	5E-05	-	-
41 DEGs	**6**	PC01_001873	Catabolic L-serine/threonine dehydratase	-4.48	2E-36	-	-
• p-value • log_2FC	**4**	PC01_001989	Glutamate decarboxylase	4.93	1E-33	-	-
19 DEGs	**8**	PC01_005727	O-acetyl homoserine-O-acetyl serine sulfhydrylase	3.29	9E-25	-	-
8 + 11 -	**10**	PC01_005932	Aspartate aminotransferase	2.68	7E-15	-	-
	11	PC01_008097	Glutamate decarboxylase-2	2.56	8E-27	-	-
	12	PC01_009599	Adenosylmethionine-oxononanoate aminotransferase	2.44	1E-09	-	-
GO:0071944	**1**	PC01_006688	Class I hydrophobin	6.53	1E-04	-	-
Cell periphery	**2**	PC01_009505	Transglycosylase GH16 / GPI-anchor	4.55	9E-13	2.42	3E-25
• p-value	**3**	PC01_008404	Hydrophobin *rodA*	-4.54	3E-11	-	-
14 DEGs	**4**	PC01_008630	Fungal hydrophobin	-4.52	8E-11	-	-
• p-value • log_2FC			-	-	-	-	-
4 DEGs			-	-	-	-	-
2 + 2 -			-	-	-	-	-

Table 6 *List of the most significantly enriched GO terms between 20 g·L-1 and 10 g·L-1 glucose conditions at 96h, with the number of genes significantly differentially expressed, the number of genes significantly differentially expressed by at least a twofold ratio, and the top 5 of these genes upregulated or downregulated. The log2 fold change and the adjusted p-value at 96h, but also at 48h, are indicated.*

20 g·L-1 vs 10 g·L-1 glucose at 96h

				96h		48h	
GO term		**Gene ID**	**Description**	**log2 FC**	**adj p-v**	**log2 FC**	**adj p-v**
GO:0016020	**1**	PC01_005944	Amino acid permease	-4.20	4E-11	-	-
Membrane	**2**	PC01_006110	Peptide transporter (MFS)	-3.89	3E-17	-2.35	9E-03
• p-value	**3**	PC01_006533	Uracil permease	-3.67	4E-15	-4.82	3E-02
190 DEGs	**5**	PC01_010275	Amino acid permease	-3.05	7E-04	-	-
• p-value • log2FC	**7**	PC01_000728	MFS transporter	-2.98	1E-30	-6.49	2E-59
19 DEGs	**4**	PC01_002157	Plasma membrane Na+/Pi cotransporter	3.09	8E-03	-9.63	2E-02
9 + 11 -	**6**	PC01_009085	Phosphate transporter	3.03	1E-09	-	-
	10	PC01_005071	Low affinity Ca2+ channel	2.77	1E-50	-	-
	15	PC01_003056	Ammonium permease *MEP2*	2.27	3E-05	6.09	2E-62
	16	PC01_006772	Sugar transporter (MFS)	2.26	2E-11	-	-
GO:0006812	**1**	PC01_005197	P-type ATPase sodium pump *enaC*	2.09	4E-40	-2.43	6E-13
Monoatomic cation transport		-		-	-	-	-
		-		-	-	-	-
• p-value 41 DEGs		-		-	-	-	-
GO:0006355	**1**	PC01_009720	GAL4-like Zn(II)2Cys6 transcription factor	-4.02	5E-08	-	-
Regulation of DNA-templated transcription	**2**	PC01_004216	DNA binding activity *ndtA*	-3.22	8E-16	-2.89	2E-03
	3	PC01_010881	Basic leucine zipper (bZIP) transcription factor	-2.68	6E-04	-	-
• p-value		-		-	-	-	-
94 DEGs		-		-	-	-	-
GO:0110165	**1**	PC01_005944	Amino acid permease	-4.20	4E-11	-	-
Cellular anatomical entity	**2**	PC01_006110	Peptide transporter (MFS)	-3.89	3E-17	-2.35	9E-03
	3	PC01_006533	Uracil permease	-3.67	4E-15	-4.82	3E-02
• p-value	**5**	PC01_010275	Amino acid permease	-3.05	7E-04	-	-
451 DEGs	**7**	PC01_000728	MFS transporter	-2.98	1E-30	-6.49	2E-59
• p-value • log2FC	**4**	PC01_002157	Plasma membrane Na+/Pi cotransporter	3.09	8E-03	-9.63	2E-02
23 DEGs	**6**	PC01_009085	Phosphate transporter	3.03	1E-09	-	-
11 + 12 -	**10**	PC01_005071	Low affinity Ca2+ channel	2.77	1E-50	-	-
	13	PC01_009505	Transglycosidase *crhC*	2.42	3E-25	4.55	9E-13
	14	PC01_009007	Class II myosin	2.36	1E-05	-	-
GO:0005507	**1**	PC01_008956	L-ascorbate oxidase	-3.12	7E-03	-	-
Copper ion binding	**2**	PC01_004505	Cu2+-containing amine oxidase	-2.45	2E-23	-	-
• p-value 13 DEGs		-		-	-	-	-
GO:0003700	**1**	PC01_009720	GAL4-like Zn(II)2Cys6 transcription factor	-4.02	5E-08	-	-
DNA-binding transcription factor activity	**2**	PC01_004216	DNA binding activity *ndtA*	-3.22	8E-16	-2.89	2E-03
	3	PC01_010881	Basic leucine zipper (bZIP) transcription factor	-2.68	6E-04	-	-
• p-value 74 DEGs		-		-	-	-	-
GO:0031177	**1**	PC01_009534	NRPS-like protein biosynthetic cluster	-3.88	2E-03	-	-
Phophopantetheine binding	**2**	PC01_008870	*albA* (Polyketide synthase)	-3.19	1E-03	-4.16	2E-08
	3	PC01_009857	Type I Iterative PKS	2.06	3E-18	-4.21	2E-21
• p-value 15 DEGs	**4**	PC01_007471	Type I Iterative PKS	2.05	9E-09		
GO:0015291	**1**	PC01_002157	Plasma membrane Na+/Pi cotransporter	3.09	8E-03	-9.63	2E-02
Secondary active transmembrane transport	**2**	PC01_009085	Phosphate transporter	3.03	1E-09	-	-
	3	PC01_000410	High-affinity inorganic phosphate (Pi) transporter	-2.89	2E-15	-	-

• p-value 9 DEGs			-	-	-	-	-
GO:0071944	**1**	PC01_002425	Nucleoside transporter *pttA*	-2.83	1E-31	-	-
Cell periphery	**2**	PC01_009505	Transglycosidase *crhC*	2.42	3E-25	4.55	9E-13
• p-value 17 DEGs			-	-	-	-	-

Table 7 *Differences in expression of genes involved in the conidiation and vegetative growth pathways between 20 g·L^{-1} glucose or 10 g·L^{-1} sucrose or 10 g·L^{-1} mix glucose + fructose vs 10 g·L^{-1} glucose at 48h. The log$_2$ fold change and the adjusted p-value are indicated.*

Conidiation pathway at 48h

			GLC20 vs GLC10		SCR10 vs GLC10		GF10 vs GLC10	
Gene ID	**Name**	**Description**	**log$_2$ FC**	**adj p-v**	**log$_2$ FC**	**adj p-v**	**log$_2$ FC**	**adj p-v**
PC01_005139	*fluG*	Cytoplasmic protein involved in regulation of conidiation	-	-	-	-	-	-
PC01_000941	*flbC*	C2H2-type zinc-finger TF	-1.13	4E-02	-	-	-	-
PC01_006686	*flbB*	Leucine zipper TF	-	-	-	-	-	-
PC01_001483	*flbD*	Transcription factor (TF)	-2.95	4E-09	-	-	-	-
PC01_006491	*brlA*	C2H2-type zinc-finger TF	-2.45	1E-14	-	-	-	-
PC01_007757	*abaA*	TEA/ATTS domain TF	-4.00	3E-10	-2.14	4E-02	-	-
PC01_008011	*wetA*	Regulator of spore-specific genes	-2.98	5E-05	-	-	-	-
PC01_008280	*phiA*	Protein required for normal phialide development	-	-	-2.58	1E-02	-	-
PC01_003510	*abrB*	Laccase I precursor	2.47	8E-03	-	-	-	-
PC01_008404	*rodA*	Rodlet protein	-4.54	3E-11	-	-	-	-
PC01_008870	*albA*	Polyketide synthase	-4.16	2E-08	-3.00	5E-03	-2.81	2E-02
PC01_001643	*stuA*	APSES domain transcription factor	-	-	-	-	-	-
PC01_007442	*rgdA*	Transcription factor (TF)	-	-	-	-	-	-
PC01_005708	*medA*	Developmental regulator	-	-	-	-	-	-
PC01_004994	*rlmA*	MADS-box family transcription factor (TF)	-	-	-	-	-	-
PC01_004782	*flbA*	Regulator of G protein signaling	-	-	-	-	-	-
PC01_002931	*fadA*	G protein α subunit	-	-	-	-	-	-
PC01_003565	*sfaD*	G protein β subunit	-	-	-	-	-	-
PC01_009199	*PKA*	cAMP-dependent protein kinase	-	-	-	-	-	-
PC01_001011	*CyaA*	Adenylate cyclase						
PC01_008112	*chiB*	Class V chitinase	-	-	-	-	-	-

Table 8 *List of all genes differentially expressed between 10 g·L^{-1} sucrose and glucose at 48h, compared to the differential expression between 20 g·L^{-1} and 10 g·L^{-1} glucose, and between 10 g·L^{-1} mix and glucose, associated with the most significantly enriched GO terms. Highlighted in grey are indicated the genes that are also differentially expressed between 10 g·L^{-1} sucrose and glucose at 96h (see* ***Table 9****).*

10 g·L^{-1} sucrose vs glucose at 48h

			SCR10 vs GLC10		GLC20 vs GLC10		GF10 vs GLC10				
	Gene ID	Description	log2 FC	adj p-v	log2 FC	adj p-v	log2 FC	adj p-v	GO term associed		
1	PC0109_011227	C2H2-type zinc fingers TF	7.04	1E-08	6.99	7E-11	-	-			
2	PC0109_004179	ABC transporter	-4.43	1E-03	-	-	-	-	GO:0055085	GO:0016020	
3	PC0109_006726	*Hypothetical protein*	-4.26	3E-03	-8.74	1E-15	-5.44	4E-05			
4	PC0109_002575	Phenylalanine-specific permease	-4.25	3E-02	-2.67	3E-02	-	-	GO:0016020	GO:0022857	GO:0055085
5	PC0109_008027	*Hypothetical protein*	4.11	1E-02	-3.60	2E-02	-	-			
6	PC0109_003366	Galactose mutarotase	-3.93	1E-05	4.96	1E-25	-	-	GO:0005975		
7	PC0109_010851	Class II chitinase	-3.73	6E-04	-6.60	6E-10	-	-	GO:0005975	GO:0004553	
8	PC0109_006089	Invertase	3.68	2E-04	-	-	-	-	GO:0005975	GO:0004553	
9	PC0109_002171	Tpo1 and MDR transporters (MFS)	3.51	1E-02	-3.63	3E-02	-	-	GO:0055085	GO:0022857	
#	PC0109_004391	Methionyl-tRNA formyltransferase	-3.49	6E-09	-5.10	2E-21	-2.26	4E-04			
#	PC0109_005118	Glucanase Lam16A	-3.43	8E-04	-6.49	3E-09	-	-	GO:0005975	GO:0004553	
#	PC0109_006477	Cytochrome P450	-3.39	2E-03	-4.54	3E-08	-	-			
#	PC0109_009888	*Hypothetical protein*	-3.14	2E-03	-4.49	9E-10	-	-			
#	PC0109_009958	*Uncharacterized protein*	-3.13	4E-02	-4.54	2E-06	-	-			
#	PC0109_006476	*ausA* (PKS)	-3.02	1E-02	-5.50	2E-09	-4.00	1E-04			
#	PC0109_008870	*albA* (PKS)	-3.00	5E-03	-4.16	2E-08	-2.81	2E-02			
#	PC0109_005138	Glutamate or tyrosine decarboxylase	-3.00	4E-03	-4.94	1E-09	-	-	GO:0030170		
#	PC0109_010207	Inducible alternative oxidase 2	2.96	1E-02	2.79	6E-04	-	-			
#	PC0109_009241	Rhodopsin domain	2.88	8E-03	7.42	3E-26	-	-			
#	PC0109_001959	Old yellow enzyme	-2.80	3E-03	-7.65	3E-14	-	-	GO:0016491		
#	PC0109_010935	Invertase	2.74	1E-04	-	-	-	-	GO:0004553		
#	PC0109_008010	AGO/PIWI domain	-2.72	2E-03	-2.62	2E-05	-	-			
#	PC0109_001747	Cysteine synthase	-2.68	1E-02	-4.01	2E-08	-	-			
#	PC0109_009432	F-box protein	-2.63	1E-04	-5.12		-2.45				
#	PC0109_011203	*Uncharacterized protein*	-2.61	2E-02	-	-	-	-			
#	PC0109_010168	N,O-diacetylmuramidase	-2.58	3E-02	-4.32		-	-			
#	PC0109_008280	*phiA*	-2.58	1E-02	-	-	-	-			
#	PC0109_010949	BYS1 domain-containing protein	-2.53	4E-02	-6.35		-				
#	PC0109_003552	EthD domain	-2.53	5E-04	-	-	-	-	GO:0016491		
#	PC0109_003372	Phenylacetate-coenzyme A ligase	-2.50	1E-03	-2.79		-	-			
#	PC0109_003442	*Hypothetical protein*	2.50	2E-02	3.10		-	-			
#	PC0109_006475	Austinol / dehydroaustinol biosynthesis	-2.44	5E-04	-6.75		-2.70				
#	PC0109_003349	Heterotrimeric G-protein	-2.36	2E-05	-3.55		-	-			
#	PC0109_002583	*Hypothetical protein*	-2.34	3E-02	-9.05		-	-			
#	PC0109_007007	Glucose transporter	-2.33	1E-02	-	-	-	-	GO:0055085	GO:0016020	GO:0022857
#	PC0109_006689	Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase	2.27	3E-02	2.13		-	-			
#	PC0109_005066	Chitinase	-2.27	3E-03	-4.70		-2.03		GO:0005975	GO:0004553	
#	PC0109_005461	ABC transporter	-2.26	7E-03	-2.06		-	-	GO:0055085	GO:0016020	

#	PC0109_008809	Versicolorin ketoreductase	-2.25	3E-02	-3.62		-	-	GO:0016491			
#	PC0109_005460	ABC transporter	-2.19	4E-02	-	-	-	-				
#	PC0109_001749	NADPH oxidase	-2.19	2E-02	-4.46		-	-	GO:0016020	GO:0016491		
#	PC0109_007232	Aromatic prenyltransferase	-2.18	6E-03	-6.33		-	-				
#	PC0109_007757	*abaA*	-2.14	4E-02	-4.00		-	-				
#	PC0109_007366	*Hypothetical protein*	-2.14	3E-02	-	-	-	-				
#	PC0109_004651	Ran GTPase-activating protein	-2.11	9E-03	-3.51		-	-				
#	PC0109_008384	Alcohol dehydrogenase	-2.10	1E-02	-4.70		-	-	GO:0055085	GO:0016020	GO:0022857	
#	PC0109_005266	Peptidase	-2.07	1E-04	-2.78		-	-	GO:0016491			
#	PC0109_009932	Alkaline phosphatases/sulfatases	-2.00	4E-02	-3.32		-2.55					

Table 9 *List of all genes differentially expressed between 10 g·L-1 sucrose and glucose at 96h, compared to the differential expression between 20 g·L-1 and 10 g·L-1 glucose, and between 10 g·L-1 mix and glucose, associated with the most significantly enriched GO terms. Highlighted in grey are indicated the genes that are also differentially expressed between 10 g·L-1 sucrose and glucose at 48h (see* ***Table 8****).*

10 g·L-1 sucrose vs glucose at 96h

			SCR10 vs GLC10		GLC20 vs GLC10		GF10 vs GLC10		
	Gene ID	**Description**	**log2 FC**	**adj p-v**	**log2 FC**	**adj p-v**	**log2 FC**	**adj p-v**	**GO term associed**
1	PC0109_003915	*Hypothetical protein*	4.71	1E-06					
2	PC0109_009574	Phenylpropionate dioxygenase HcaE	4.59	3E-05					
3	PC0109_008749	*Uncharacterized protein*	4.34	5E-10					
4	PC0109_009575	*Hypothetical protein*	4.13	2E-03					
5	PC0109_006726	*Hypothetical protein*	-3.94	7E-09					
6	PC0109_006723	Phytanoyl-CoA dioxygenase	3.88	1E-23					
7	PC0109_011227	C2H2-type zinc fingers TF	3.67	1E-19					
8	PC0109_008159	Mating factor alpha precursor N-ter	-3.64	5E-11					
9	PC0109_004855	Phenylpropionate dioxygenase HcaE	3.48	9E-05					
#	PC0109_005309	Phenylpropionate dioxygenase HcaE	3.35	4E-03					
#	PC0109_007366	*Hypothetical protein*	-3.30	4E-09					
#	PC0109_005118	Glucanase Lam16A	-3.20	5E-03					
#	PC0109_003914	Chitin synthase III	2.96	5E-02					
#	PC0109_008744	Sugar transporter (MFS)	-2.82	3E-25					GO:0016020
#	PC0109_002663	RmlC-like cupin superfamily	2.81	3E-03					
#	PC0109_001579	Aminomethyltransferase	2.79	5E-04					
#	PC0109_008556	*Hypothetical protein*	2.77	4E-11					
#	PC0109_008324	GATase1 glutamine amidotransferase	-2.74	2E-02					
#	PC0109_001788	RmlC-like cupin superfamily	2.69	1E-19					
#	PC0109_009927	Phenylpropionate dioxygenase HcaE	2.68	1E-03					
#	PC0109_002584	MFS transporter	-2.54	2E-07					
#	PC0109_006515	Extracellular deuterolysin-type metallo-proteinase	-2.45	4E-04					
#	PC0109_003797	Succinate dehydrogenase/fumarate reductase	-2.41	4E-02					
#	PC0109_001850	Lysin motif	-2.38	4E-02					
#	PC0109_008867	MFS transporter	2.36	1E-02					GO:0016020
#	PC0109_006965	Carboxylate synthase MenH	2.35	2E-06					
#	PC0109_001282	Extracellular aspartic protease	-2.32	3E-04					
#	PC0109_006516	*Hypothetical protein*	-2.31	3E-03					
#	PC0109_010529	Phosphatase H2Macro, RNA repair component	-2.29	1E-02					
#	PC0109_003095	*Hypothetical protein*	-2.23	2E-04					
#	PC0109_003921	Cupin domain	2.17	2E-12					
#	PC0109_008743	*Hypothetical protein*	-2.16	9E-06					
#	PC0109_004651	Ran GTPase-activating protein	-2.13	1E-04					
#	PC0109_002098	Amino acid permease	2.11	7E-06					GO:0016020
#	PC0109_007376	Tpo1 and MDR transporters (MFS)	-2.10	5E-02					GO:0016020
#	PC0109_003742	GlcD FAD/FMN-containing lactate dehydrogenase	-2.08	2E-03					
#	PC0109_009555	FabG NAD(P)-dependent dehydrogenase	-2.05	3E-03					
#	PC0109_006301	*Hypothetical protein*	-2.01	3E-02					
#	PC0109_008190	Protein responsive to Concanamycin A	-2.00	3E-11					

Table 10 *List of all genes differentially expressed between 10 g·L^{-1} mix and glucose at 48h, compared to the differential expression between 20 g·L^{-1} and 10 g·L^{-1} glucose, and between 10 g·L^{-1} sucrose and glucose.*

10 g·L^{-1} mix glucose + fructose vs glucose at 48h

			GF10 vs GLC10		GLC20 vs GLC10		SCR10 vs GLC10	
	Gene ID	**Description**	**log$_2$ FC**	**adj p-v**	**log$_2$ FC**	**adj p-v**	**log$_2$ FC**	**adj p-v**
1	PC01_006726	*Hypothetical protein*	-5.44	4E-05	-8.74	1E-15	-4.26	3E-03
2	PC01_000042	Aldo-keto reductase	4.90	1E-02	6.15	6E-07	-	-
3	PC01_004933	Vacuolar protein sorting-associated 62	-4.27	1E-03	-9.59	2E-19	-	-
4	PC01_006476	*ausA* polyketide synthase	-4.00	1E-04	-5.50	2E-09	-3.02	1E-02
5	PC01_000470	Alkaline phosphatases / sulfatases	-3.91	3E-03	-7.17	1E-08	-	-
6	PC01_010474	Cytochrome P450	-3.85	1E-02	-6.53	4E-11	-	-
7	PC01_000270	Glucanase B	-3.72	4E-04	-5.31	5E-12	-	-
8	PC01_001502	Glucanase	-3.71	9E-05	-5.79	6E-16	-	-
9	PC01_001504	Phosphoinositide-specific PLC	-3.48	2E-02	-7.39	6E-16	-	-
10	PC01_001933	*Hypothetical protein*	-3.26	1E-02	-5.87	4E-12	-	-
11	PC01_000256	Broad specificity phosphatase PhoE	-3.03	3E-03	-4.84	5E-12	-	-
12	PC01_008870	*albA* polyketide synthase	-2.81	2E-02	-4.16	2E-08	-3.00	5E-03
13	PC01_006475	Austinol / dehydroaustinol biosynthesis	-2.70	4E-05	-6.75	2E-31	-2.44	5E-04
14	PC01_007875	Staurosporine transporter	-2.67	7E-13	-	-	-	-
15	PC01_009932	Alkaline phosphatases / sulfatases	-2.55	3E-03	-3.32	2E-08	-2.00	4E-02
16	PC01_009432	F-box protein	-2.45	5E-04	-5.12	2E-22	-2.63	1E-04
17	PC01_004391	Methionyl-tRNA formyltransferase	-2.26	4E-04	-5.10	2E-21	-3.49	6E-09
18	PC01_010934	*Hypothetical protein*	-2.03	1E-02	-2.86	1E-07	-	-
19	PC01_005066	Chitinase	-2.03	2E-02	-4.70	3E-19	-2.27	3E-03
20	PC01_002542	Class V chitinase	-2.00	2E-02	-	-	-	-

Table 11 *List of all genes differentially expressed between 10 g·L^{-1} mix and sucrose at 48h, compared to the differential expression between 10 g·L^{-1} mix and 20 g·L^{-1} glucose, and between 10 g·L^{-1} mix and glucose.*

10 g·L^{-1} glucose + fructose vs sucrose at 48h

			GF10 vs SCR10		GF10 vs GLC20		GF10 vs GLC10	
	Gene ID	**Description**	**log$_2$ FC**	**adj p-v**	**log$_2$ FC**	**adj p-v**	**log$_2$ FC**	**adj p-v**
1	PC01_008027	*Hypothetical protein*	-6.05	1E-05	-	-	-	-
2	PC01_010919	Aminoglycoside phosphotransferase	-4.75	2E-02	-	-	-	-
3	PC01_003366	Aldose 1-epimerase	4.24	4E-07	-4.65	1E-25	-	-
4	PC01_006631	*Hypothetical protein*	-4.23	2E-02	-	-	-	-
5	PC01_004229	*Hypothetical protein*	-3.81	4E-02	3.75	3E-03	-	-
6	PC01_003088	RecF/RecN/SMC of N-ter SMC protein	-3.67	5E-02	4.22	1E-03	-	-
7	PC01_011227	C2H2-type zinc fingers TF	-3.61	2E-02	-3.56	1E-04	-	-
8	PC01_003365	Cytochrome P450	2.53	2E-02	-5.55	5E-21	-	-
9	PC01_007366	*Hypothetical protein*	2.39	2E-02	-	-	-	-
10	PC01_007875	Staurosporine transporter	-2.34	1E-09	-2.19	5E-11	-2.67	7E-13

Supplementary data

Table 12 *Carbohydrates ($g \cdot L^{-1}$) and amino acids ($mg \cdot kg^{-1}$) concentrations in the medium as a function of nutrient conditions at 0h, 48h, 96h and 140h of culture. For carbohydrates, GLC = glucose, SCR = sucrose and FRC = fructose. For amino acids, the three-digit code corresponds to the IUPAC nomenclature.*

Discrete analyzer and HPLC data

		C-sources (carbohydrates)						N-sources (amino acids)																
		GLC	SCR	FRC	ASP	GLU	ASN	SER	GLN	HIS	GLY	THR	ARG	ALA	GABA	TYR	CY2	VAL	MET	TRP	PHE	ILE	LEU	LYS	PRO
	0h	9.6	0.0	0.0	41.2	121.8	21.9	41.3	1.6	4.9	25.1	26.8	36.9	83.8	4.1	10.1	0.0	47.8	13.9	10.9	43.7	41.8	76.1	58.6	19.7
10 g·L^{-1}	**48h**	0.0	0.0	0.0	1.8	1.9	0.0	4.3	6.7	1.1	1.4	3.7	2.1	8.2	14.6	0.0	0.0	1.8	0.0	0.0	1.7	0.0	2.0	0.0	5.8
glucose	**96h**	0.0	0.0	0.0	8.4	29.6	0.0	6.3	16.4	0.0	1.5	9.2	6.2	7.6	0.0	0.0	0.0	2.1	0.0	0.0	2.9	0.0	3.4	8.2	7.7
	140h	0.0	0.0	0.0	0.0	2.7	0.0	1.9	2.4	0.0	0.0	0.0	0.0	6.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.8
	0h	19.5	0.0	0.0	37.3	104.6	22.9	37.6	2.0	4.4	24.0	29.5	33.1	75.1	3.8	8.3	0.0	44.3	13.1	11.2	45.2	43.6	80.9	105.0	20.8
20 g·L^{-1}	**48h**	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.2	48.1	0.0	2.5	6.8	0.0	42.5	20.1	0.0	0.0	4.0	0.0	0.0	0.0	2.1	2.7	0.0	4.9
glucose	**96h**	0.0	0.0	0.0	0.0	52.9	0.0	10.3	22.7	3.6	3.1	6.7	5.6	11.9	0.0	0.0	0.0	3.6	0.0	0.0	4.0	2.1	4.7	6.6	6.0
	140h	0.0	0.0	0.0	0.0	7.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.4	8.5	0.0	5.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	5.5	37.5	2.9
	0h	10.4	0.5	0.4	45.2	125.3	27.9	44.3	2.6	5.6	28.3	3.4	39.0	88.9	4.7	9.9	0.0	53.1	15.3	11.7	49.3	46.1	82.5	75.1	24.8
10 g·L^{-1}	**48h**	0.0	0.0	0.0	0.3	1.8	0.0	4.7	9.7	0.0	1.6	4.2	2.1	10.9	18.4	0.0	0.0	2.3	0.0	0.0	2.0	1.2	2.3	20.0	5.8
sucrose	**96h**	0.0	0.0	0.0	8.7	28.5	0.0	8.1	16.2	4.3	1.8	6.2	6.0	8.1	0.0	2.3	0.0	2.8	0.0	0.0	3.8	1.7	4.6	6.7	6.6
	140h	0.0	0.0	0.0	0.0	6.5	0.0	2.0	2.2	0.0	0.9	1.5	0.0	5.8	0.0	0.0	0.0	1.1	0.0	0.0	0.0	0.6	1.3	1.5	3.9
	0h	4.9	0.0	4.6	41.5	126.5	24.5	42.4	2.5	4.7	28.1	35.3	36.1	86.6	4.4	8.7	0.0	47.6	12.1	9.9	44.8	41.9	76.7	57.3	21.4
10 g·L^{-1}	**48h**	0.0	0.0	0.0	0.7	2.0	0.0	4.9	7.9	0.0	1.7	4.0	2.4	9.7	17.8	0.0	0.0	2.1	0.0	0.0	1.9	1.3	3.5	33.2	5.3
mix	**96h**	0.0	0.0	0.0	0.0	29.4	0.0	7.1	16.6	3.5	1.6	5.3	6.7	7.8	0.0	2.2	0.0	2.9	0.0	0.0	3.3	1.4	4.6	9.2	6.5
	140h	0.0	0.0	0.0	0.0	5.1	0.0	2.3	3.4	0.0	0.8	1.5	0.0	8.4	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	2.3	1.6	0.0	4.3

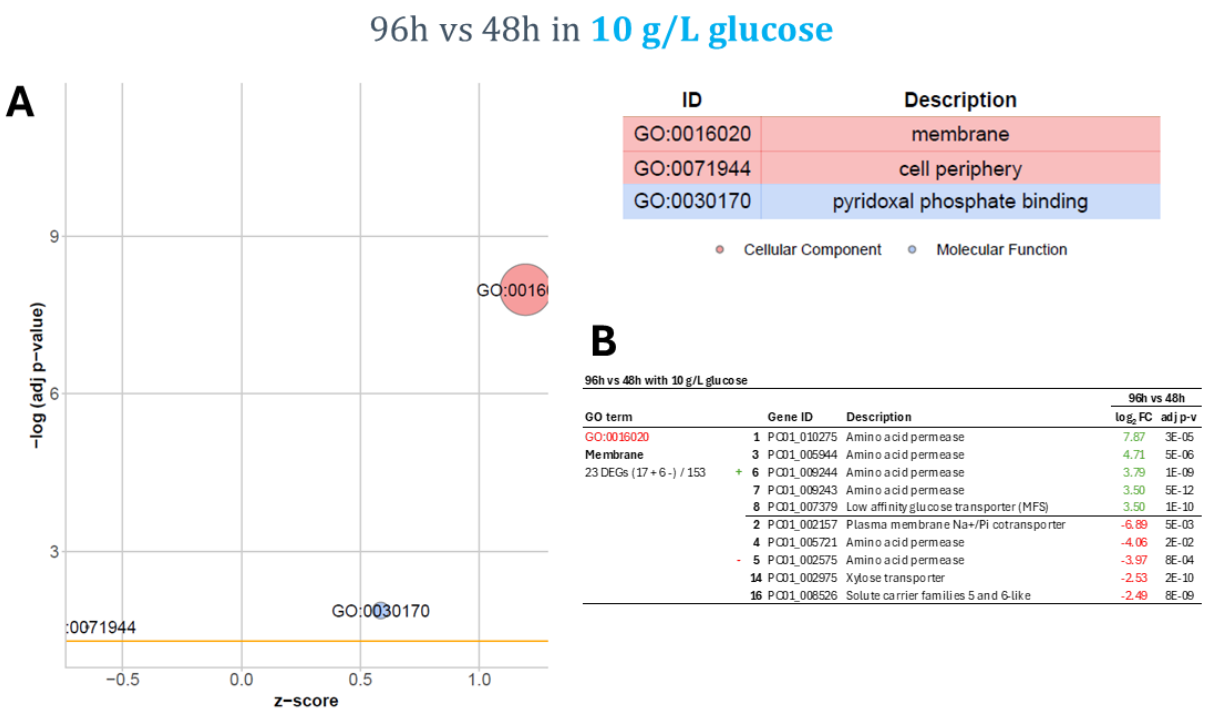


Fig. 40 *(**A**) Bubble plot of the significantly enriched Gene Ontology (GO) terms for the differentially expressed genes between 96h and 48h in 10 g·L^{-1} glucose condition. The yellow line on the y-axis indicates the negative logarithm of the adjusted p-value of 1.30 (correspond to adjusted p-value = 0.05), and the x-axis represents the z-score calculated using the R package GOplot (Walter et al., 2015). GO terms with an adjusted p-value greater than 0.05 are not displayed.* ***(B)*** *Top 5 of genes upregulated or downregulated for the membrane GO term, the most significantly enriched between 96h and 48h in 10 g·L^{-1} sucrose condition. The log$_2$ fold change and the adjusted p-value for the variations between 96h and 48h are indicated.*

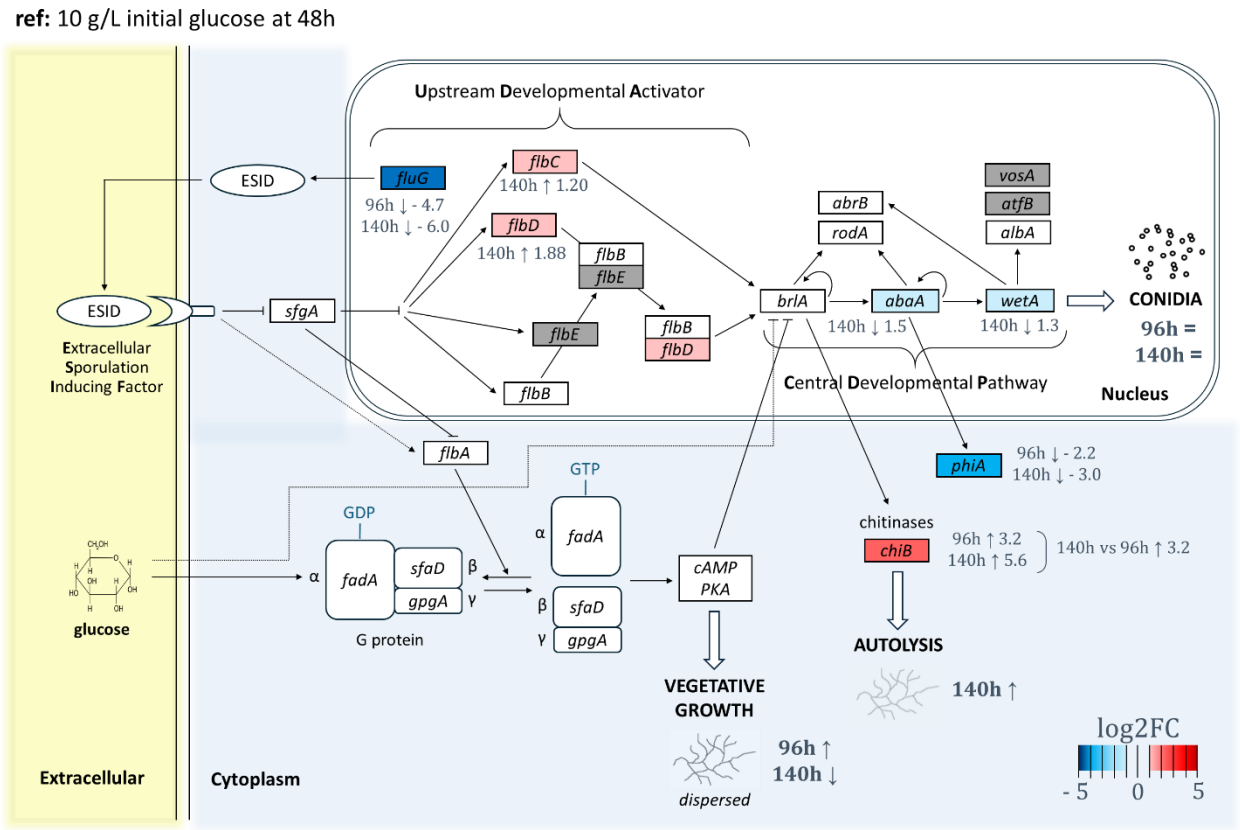


Fig. 41 *Putative conidiation pathway in* P. camemberti *with comparison in 10 g·L^{-1} glucose condition of the genes differently expressed at 140h and 96h vs 48h. Model designed from Park & Yu, 2012; Emri et al., 2008; Roncal & Ugalde, 2003; Adams et al., 1998.*

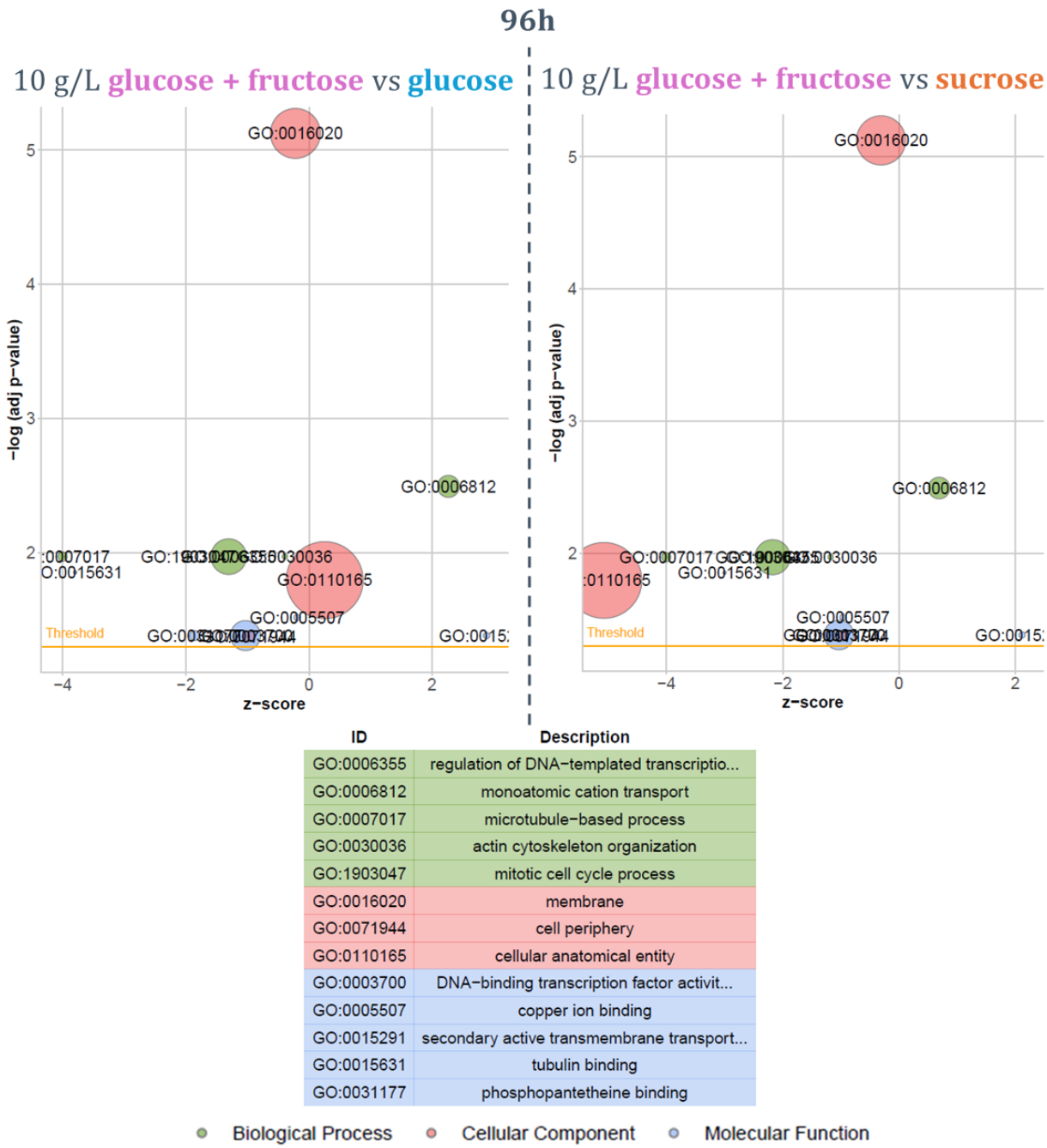


Fig. 42 *Bubble plot of the significantly enriched Gene Ontology (GO) terms for the differentially expressed genes at 96h between 10 g·L^{-1} mix and 10 g·L^{-1} glucose conditions on the left, and between 10 g·L^{-1} mix and 10 g·L^{-1} sucrose conditions on the right. The yellow line on the y-axis indicates the negative logarithm of the adjusted p-value of 1.30 (correspond to adjusted p-value = 0.05), and the x-axis represents the z-score calculated using the R package GOplot (Walter et al., 2015). GO terms with an adjusted p-value greater than 0.05 are not displayed.*

Chapitre 4

Automatisation du comptage des conidies

L'évaluation de la production de conidies lors des fermentations constitue un défi majeur. Depuis plus d'un siècle, les chambres de comptage constituent le principal outil pour estimer une concentration de cellules dans un milieu (Malassez, 1873). Il s'agit d'un dispositif facile d'utilisation, et relativement précis. Cependant, dans le cas où de nombreux comptages sont à réaliser, comme lors d'un suivi de fermentation, l'utilisation manuelle de ces cellules de comptage peut être chronophage, et associée à une fatigue oculaire chez l'expérimentateur. Nos travaux portant sur l'étude de la conidiation, l'amélioration de cet outil historique s'est révélée indispensable avant d'effectuer les nombreux comptages prévus pour l'étude du changement d'échelle.

4.1 Problématiques posées par les méthodes traditionnelles

La première problématique rencontrée est intrinsèque au fait de travailler dans différents laboratoires, puisque les pratiques et usages sont bien souvent différents. Au LIED, les comptages sont réalisés avec une cellule de Malassez, dont les deux chambres de 2,5 cm x 2,0 cm possèdent 100 champs rectangulaires de 250 µm x 200 µm, soit une surface de 0,05 mm^2 pour un champ (**Fig. 43**). Chez Danisco, les comptages sont réalisés avec une cellule de Bürker, dont deux chambres de 3,0 cm x 3,0 cm possèdent 144 champs carrés de 200 µm x 200 µm, mais surtout 169 intersections de 50 µm x 50 µm, soit une surface de 0,0025 mm^2 pour une intersection (**Fig. 43**). Les champs de la cellule de Malassez et les intersections de la cellule de Bürker constituent les surfaces utilisées pour compter les conidies. Si compter une dizaine de champs de la cellule de Malassez suffit à évaluer la concentration en conidies, pour la cellule de Bürker il est nécessaire de compter l'ensemble des 169 intersections pour atteindre la même surface.

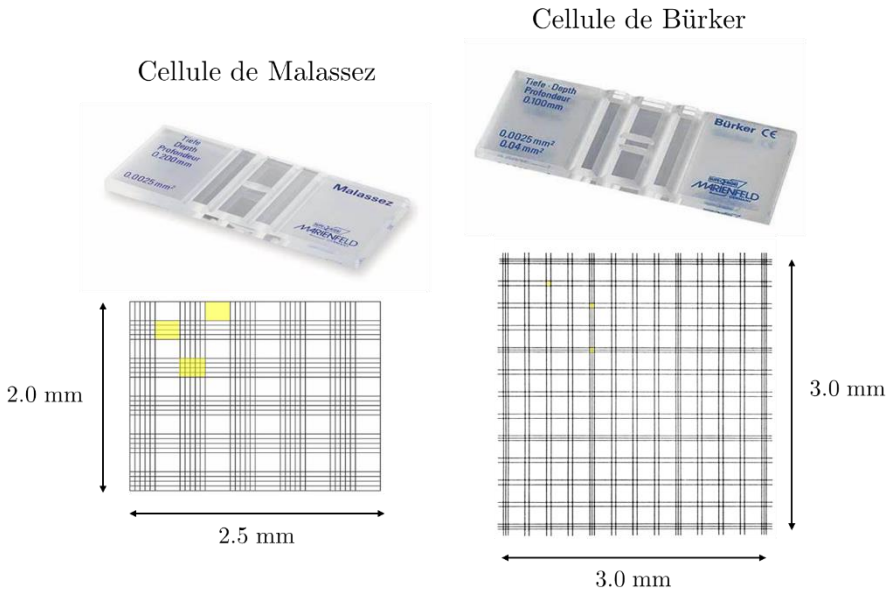


Fig. 43 *Photographies des cellules de comptage utilisées et schémas de leur grille, à gauche pour la cellule de Malassez, à droite pour la cellule de Bürker. Des exemples de champs et d'intersections à compter sont surlignés en jaune sur les grilles.*

Pour calculer une concentration en conidies avec ces dispositifs, il est nécessaire de connaitre la profondeur de la chambre de comptage utilisée, généralement indiquée par le fournisseur. Ainsi, la même formule peut être utilisée pour l'ensemble des chambres de comptage :

$$Concentration\ en\ conidies = \frac{nbre\ de\ conidies\ comptées \times facteur\ de\ dilution}{nbre\ de\ champs\ comptés\ \times\ Volume\ d'un\ seul\ champ}$$

avec la concentration en conidies en conidies·mL^{-1}, le facteur de dilution sans unité, et le volume d'un(e) seul(e) champ ou intersection (surface X profondeur) en mL.

Si l'utilisation manuelle des chambres de comptage est très simple – il suffit d'un microscope et d'un compteur manuel – lorsque les comptages sont nombreux ou que l'on veut conserver les données brutes, on peut capturer les images des différents champs au microscope et utiliser des logiciels pour compter automatiquement les conidies. Différentes solutions ont été testées lors des expérimentations au LIED, en particulier celles utilisables avec le logiciel ImageJ (Schneider et al., 2012). L'une de ses fonctions, nommée *Find maxima*, détermine et compte les maxima d'intensité locaux dans une image (Grishagin, 2015), ce qui est adapté au comptage de conidies. L'autre fonction disponible, *Threshold* combiné à *Analyze particles*, qui permet de séparer l'arrière-plan des particules

d'intérêt, puis de compter ces dernières, était plus difficile à mettre en œuvre puisqu'elle demande une uniformité de la lumière utilisée au microscope. D'autres solutions ont été testées, tel que le logiciel libre OpenCFU (Geissmann, 2013), développé spécifiquement pour compter les objets circulaires.

4.2 Description de l'algorithme et preuve de concept

Ces méthodes n'étaient pas entièrement satisfaisantes pour différentes raisons. Si la luminosité hétérogène du microscope a déjà été évoquée, des différences assez importantes entre le comptage manuel et le comptage par les logiciels étaient observées. Par exemple, de nombreux faux positifs ou faux négatifs étaient visibles, comme des particules autres comptées comme des conidies, ou des conidies agglutinées comptées qu'une seule fois. Le réglage des paramètres, au cas par cas, ne pouvait être uniformisé. Concernant les chambres de comptage en elle-même, les grilles pouvaient également induire des faux positifs. Une solution évidente a été de ne capturer que des champs dépourvus de grille, celle-ci nécessitait bien souvent un recadrage des champs, une étape supplémentaire qui prend du temps, et qui nuit à l'automatisation. Ce manque d'automatisation concernait également la gestion des fichiers/données.

Afin de pallier l'ensemble de ces problèmes, un algorithme Python a été développé pour répondre spécifiquement au besoin de compter des conidies, et pour être plus facilement implémenté localement au sein du laboratoire. Les intersections de la cellule de Bürker ont été choisies pour tester l'algorithme, afin de comparer plus facilement l'image originale et l'image traitée, ainsi que le comptage qui en découle (**Fig. 44**). Après avoir capturé les images, celles-ci sont converties en niveau de gris (8 bits) et binarisées, selon un seuil choisi en fonction de la luminosité définie lors de la capture. Pour un souci de reproductibilité, cette illumination a été fixée pour l'ensemble des prises de vues. Différents traitements d'image du package scikit-image (Walt et al., 2014) ont ensuite été appliqués. Parmi eux deux fonctions de bases : l'érosion, qui rétrécit les zones claires et agrandit les zones sombres, en réduisant au minimum la valeur d'un pixel parmi toutes les valeurs de pixels du voisinage local centré autour de lui ; et la dilatation, qui agrandit les zones claires et rétrécit les zones sombres, en augmentant au maximum la valeur d'un pixel parmi toutes les valeurs de pixels du voisinage local centré autour de lui. Deux autres fonctions dépendantes des deux premières ont également été utilisées, à savoir l'ouverture, qui est une érosion suivie d'une dilatation, qui permet de supprimer des points clairs et de relier de petites fissures sombres, mais également la fermeture, une dilatation suivie d'une érosion, qui permet de supprimer les taches sombres et de relier les fissures claires (Walt et al., 2014).

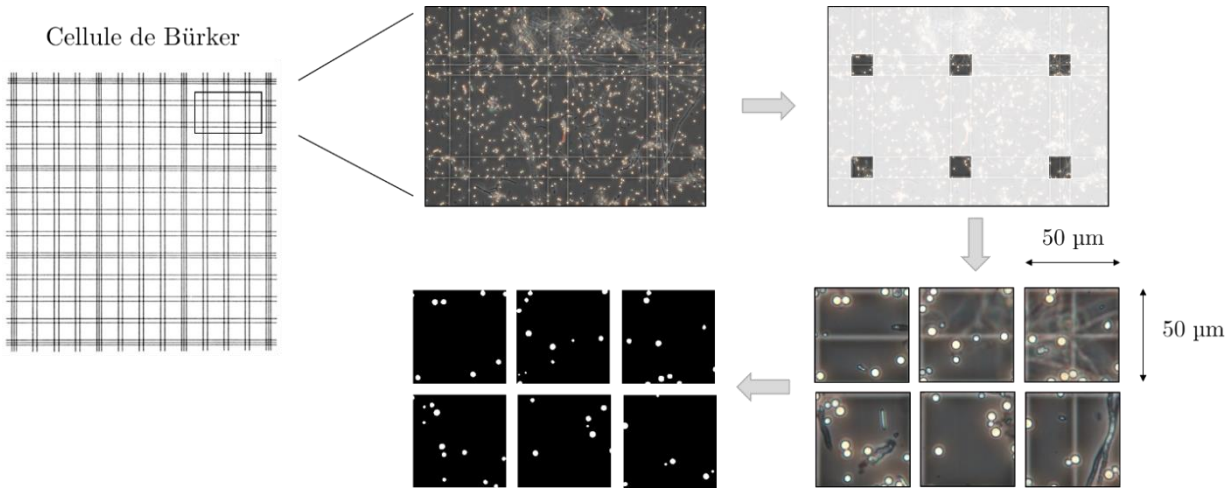


Fig. 44 *Schéma de la mise au point de la méthode automatisée de comptage. Après captures des images de la cellule de Bürker, les intersections ont été isolées afin de tester sur chacune d'elle l'algorithme Python régissant les fonctions de traitements d'images.*

Cependant, les premiers enchainements classiques de traitements donnaient parfois de mauvaises estimations du nombre de conidies, généralement quand celles-ci étaient collées entre elles (**Fig. 45**), mais avec une bonne estimation de la surface occupée par ces conidies. Cette dernière estimation n'ayant pas d'utilité a priori pour notre sujet – les conidies de PC01 ne présentent pas de grandes différences de taille entre elles – l'enchainement des traitements a été optimisé, notamment avec l'application de trois érosions et d'un traitement de déconvolution, utilisé pour corriger les erreurs dues au flou systématique des microscopes (Orieux et al., 2010). L'algorithme complet est disponible en **partie 4.4**.

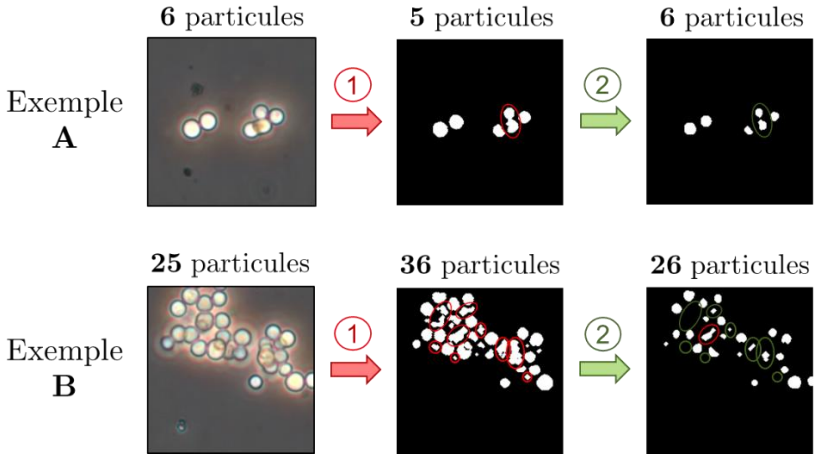


Fig. 45 *Différence de comptage pour deux exemples (A et B) d'intersection de la cellule de Bürker (50 x 50 µm) après (1) des premiers traitements d'images conservant la surface des conidies, ou après (2) une succession de traitement optimisée pour mieux estimer le nombre de conidies comptées.*

4.3 Mise en place de la méthode

Une fois l'algorithme testé et validé sur les intersections de la cellule de Bürker, des investissements ont été réalisés par Danisco pour avoir une caméra grand angle Zeiss (Carl Zeiss, Oberkochen, Allemagne) ainsi qu'une chambre de comptage personnalisée sans grille (Hausser Scientific, Horsham, États-Unis) (**Fig. 46**). Les captures d'images ne nécessitent plus d'étape de recadrage comme pour les tests précédents, et le problème de faux positif en présence de grille est résolu. Les champs capturés sont rectangulaires et de taille 700 µm x 480 µm, ce qui donne une surface de 0,336 mm^2, soit l'équivalent de 7 champs de cellule de Malassez ou 134 intersections en cellule de Bürker, pour un seul champ de cette cellule sans grille.

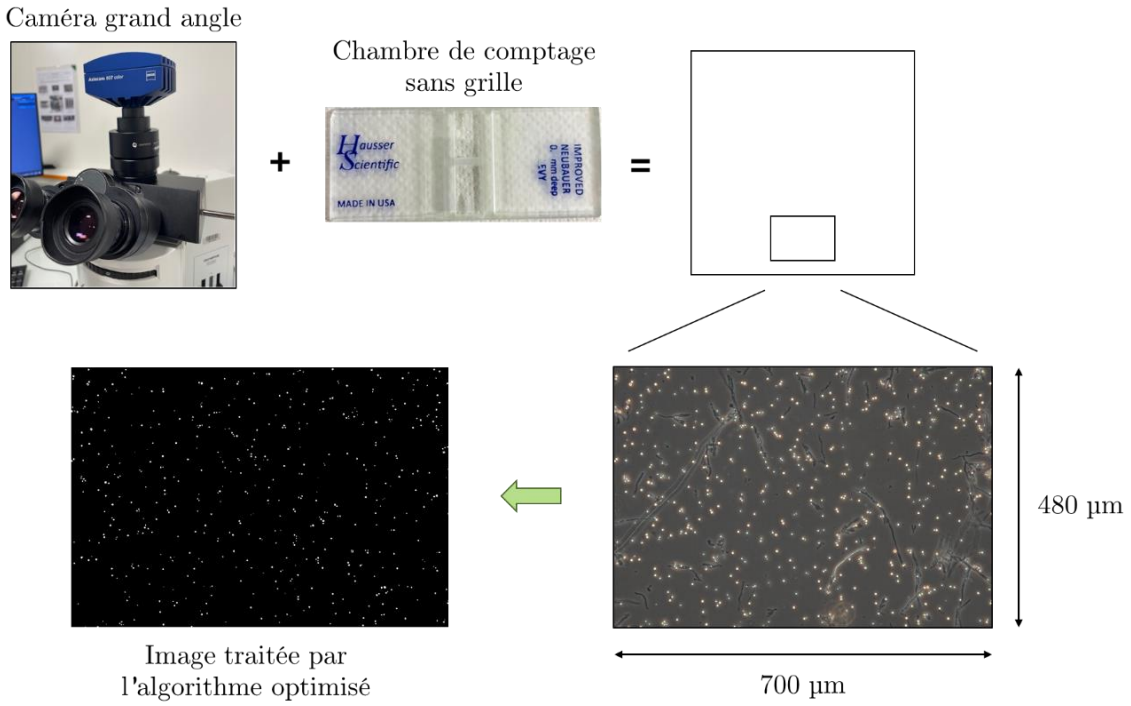


Fig. 46 *Schéma global de la méthode de comptage. Après capture par une caméra grand angle de différents champs larges (480 x 700 µm) sur une chambre de comptage sans grille, l'algorithme optimisé permet de compter automatiquement les conidies.*

Pour connaitre le nombre d'images minimum à capturer afin d'estimer au mieux le nombre de conidies, 50 images ont été prises afin de couvrir entièrement la chambre de comptage sans grille. Dix tirages au hasard des 50 images ont ensuite été effectués, en calculant une moyenne de conidies comptées pour chaque nouvelles images ajoutées (**Fig. 47**). Si on remarque qu'en capturant au moins une dizaine d'images il y a moins de 10% de variation par rapport à la moyenne sur 50 images, le nombre optimal pour l'estimer au plus près semble d'être au moins de 25 images.

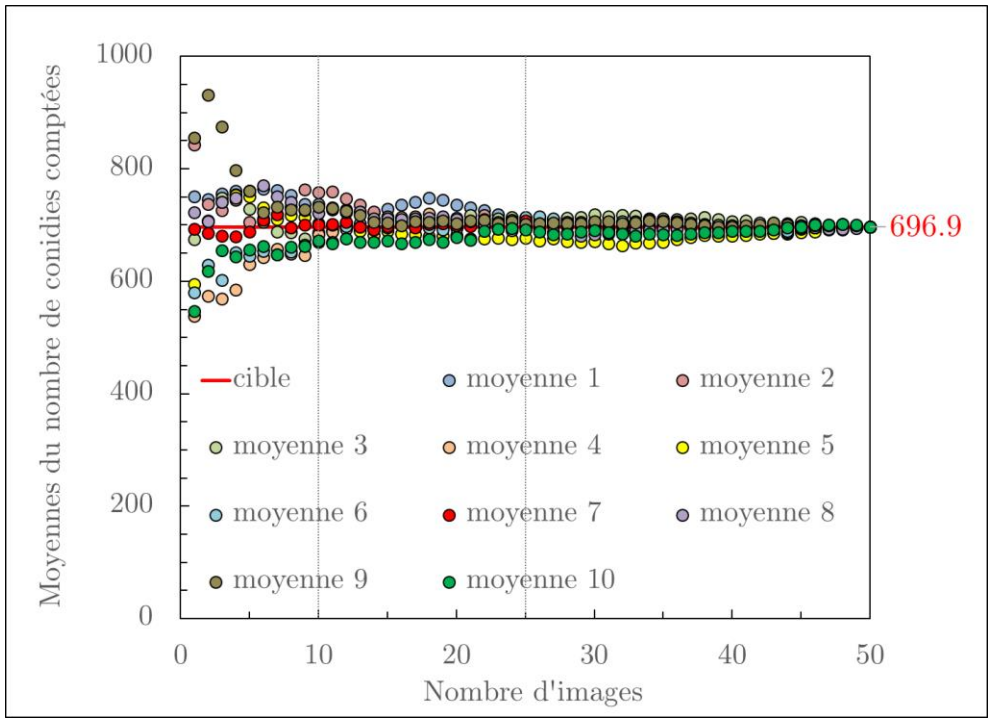


Fig. 47 *Moyennes du nombre de conidies comptées en fonction du nombre d'images capturées après différents tirages. Une moyenne de 10 images capturées est nécessaire pour estimer la moyenne à 10% près, une moyenne de 25 images est nécessaire pour estimer la moyenne à plus ou moins 5%.*

Le développement de cette méthode de comptage automatisée des conidies a ainsi permis de gagner du temps sur les différents comptages qui ont été effectués au cours de ces travaux, notamment lors des suivis en bioréacteurs. Elle permet une meilleure estimation du nombre de conidies comptées de par l'augmentation de la surface observée, avec 8,4 mm^2 pour les 25 champs de la cellule personnalisée sans grille contre 0,4225 mm^2 pour les 169 intersections de la cellule de Bürker. Enfin, la méthode permet de réduire la fatigue oculaire des expérimentateurs, ainsi que les éventuelles erreurs qui pourraient en découler.

4.4 Algorithme Python du comptage automatisé des conidies

Importation des bibliothèques

Importer les bibliothèques nécessaires pour l'analyse d'images (`skimage`), la création de graphiques (`plotly.express`), la gestion des fichiers (`pathlib`), la gestion des données (`pandas`), l'interaction avec le système d'exploitation (`os`), et les opérations mathématiques (`numpy`, `scipy`)

Définition de la fonction de comptage automatique des conidies

Définir la fonction `conidiacount` qui prend en entrée le chemin du fichier, le ratio et la dilution

Lecture et préparation de l'image

Lire l'image à partir du chemin du fichier avec `skimage.io.imread`

Créer un dossier de sortie avec le nom de l'image d'entrée

Sauvegarder l'image brute de manière interactive avec `plotly.express.imshow`

Dilution

Définir le facteur de dilution : `f_dilution = 10`

Conversion en niveaux de gris

Convertir l'image en niveaux de gris avec `skimage.color.rgb2gray`

Sauvegarder l'image en niveaux de gris avec `plotly.express.imshow`

Déconvolution

Initialiser un générateur de nombres aléatoires avec `np.random.default_rng`

Définir la fonction de dispersion ponctuelle (PSF) : `psf = np.ones((5, 5)) / 25`

Appliquer la convolution à l'image en niveaux de gris avec `scipy.signal.convolve2d`

Ajouter du bruit à l'image prétraitée

Appliquer l'algorithme de Richardson-Lucy pour la déconvolution avec `skimage.restoration.richardson_lucy`

Seuil

Définir le seuil pour la binarisation : `thresh = 0.5`

Binariser l'image en niveaux de gris

Convertir l'image binaire en octets avec `skimage.util.img_as_ubyte`

Nettoyage

Copier l'image binaire pour le nettoyage

Appliquer des opérations morphologiques pour nettoyer l'image

Érosion : Réduire les imperfections en utilisant `skimage.morphology.erosion`

Érosion

Érosion

Ouverture : Éliminer les petits objets en utilisant `skimage.morphology.opening`

Fermeture : Combler les petits trous en utilisant `skimage.morphology.closing`

Dilatation : Agrandir les objets en utilisant `skimage.morphology.dilation`

Sauvegarde de l'image nettoyée

Sauvegarder l'image nettoyée en format .tif avec `skimage.io.imsave`

Sauvegarder l'image nettoyée de manière interactive avec `plotly.express.imshow`

Création de l'image étiquetée

Créer une image étiquetée et compter les objets avec `skimage.measure.label`

Extraire les données des objets et les sauvegarder dans un tableau avec `skimage.measure.regionprops_table` et `pandas`

Dimensions d'un champ

Calculer la longueur, la largeur et la profondeur d'un champ en millimètres
Calculer la surface et le volume en millimètres carrés et cubes

Calibration

Calculer la surface en micromètres carrés et la convertir en millimètres carrés
Calculer le volume en millimètres cubes par microlitre

Comptage des conidies

Définir le nombre total de conidies
Calculer la concentration de conidies par millilitre

Résumé

Afficher le nombre de conidies par millilitre
Retourner les informations pertinentes sous forme de résumé

Chargement du dossier

Utiliser une interface graphique minimale pour sélectionner le dossier contenant les images avec `tkinter`
Parcourir les fichiers dans le dossier spécifié et traiter les fichiers `.tif`
Ajouter les données traitées au DataFrame
Sauvegarder les données résumées dans un fichier Excel
Ouvrir le dossier contenant les fichiers

Chapitre 5

Extrapolation multi-échelles

5.1 Introduction

Dans les travaux présentés au **Chapitre 3**, certains facteurs, tels que l'agitation, le taux d'ensemencement ou la composition du milieu, influençaient la morphologie et la production de conidies en fioles de quelques millilitres. Cette culture du micro-organisme à petite échelle ne constitue que la première étape du développement du procédé de production. Pour augmenter le rendement, la production de conidies par rapport au volume de culture dans notre cas, il est nécessaire de réaliser ce procédé dans des dispositifs de plus grand volume (McNeil & Harvey, 2008).

Les fioles agitées seraient utilisées dans plus de 90% des expériences en culture liquide de micro-organismes dans les laboratoires universitaires et des services de recherche et développement des industries, d'après Büchs, 2001. Cela s'explique par leur praticité et leur faible coût, qui permettent de mener de nombreux essais. Les fioles agitées sont uniquement aérées en surface (Betts & Baganz, 2006), ce qui fait que la montée d'échelle en fiole est contrainte par le diamètre. Plus ce diamètre est élevé, plus le transfert d'oxygène est important. Ainsi, le rapport surface exposée à l'air/volume d'une fiole de Fernbach, de 96,6 m^{-1} (diamètre = 200 mm, volume = 325 mL), est supérieur à celui d'une fiole d'Erlenmeyer, de 87,2 m^{-1} (diamètre = 85 mm, volume = 65 mL). Ce phénomène est bien plus fort en bioréacteur, avec des puissances dissipées généralement bien plus élevées (Canteri, 2014). Le transfert d'oxygène est facilité par le système d'agitation, le fractionnement des bulles d'air dans le milieu permettant d'augmenter la surface d'échange gaz-liquide (McNeil & Harvey, 2008). D'un point de vue pratique, la culture en bioréacteur permet d'augmenter la fréquence et le volume des échantillonnages. Il est alors possible de réaliser des suivis analytiques plus complets qu'en fiole, notamment avec la méthode automatique de comptage présentée au **Chapitre 4**, avec un impact négligeable sur le volume de culture.

Au cours de l'extrapolation présentée dans ce chapitre, les effets de différents paramètres, à savoir le taux d'ensemencement, la vitesse d'agitation, l'aération, ou la source de carbone, seront observées sur la morphologie, la croissance et la conidiation de PC01 en fiole et en bioréacteur.

L'ensemble des paramètres testés en fiole n'a pas pu être testé en bioréacteur au vu du débit expérimental moins important. En revanche, l'échantillonnage au cours des expériences est plus fréquent, et il est possible de mesurer en continu d'autres paramètres, tels que le pH et la pO_2. La culture en bioréacteur pourrait ainsi permettre de mieux comprendre la dynamique de la conidiation.

5.2 Résultats

5.2.1 Passage de la fiole d'Erlenmeyer à la fiole de Fernbach

5.2.1.1 Effet du taux d'ensemencement

En Erlenmeyer, lorsque la concentration initiale en conidies est inférieure ou égale à $2{\cdot}10^4$ conidies·mL^{-1}, la morphologie observée à partir de 48h et jusqu'à 140h est en *pellets* (**Fig. 49**). Pour un taux d'ensemencement supérieur ou égal à $2{\cdot}10^7$ conidies·mL^{-1}, la morphologie est dispersée, et entre $2{\cdot}10^4$ et $2{\cdot}10^7$ conidies·mL^{-1}, la morphologie est hybride, avec un mélange hétérogène de petites *pellets* et de culture dispersée. En Fernbach en revanche, une morphologie dispersée est observée systématiquement à une concentration initiale supérieure ou égale à $2{\cdot}10^6$ conidies·mL^{-1}, et parfois à $2{\cdot}10^5$ conidies·mL^{-1} pour une partie des réplicats (**Fig. 49**).

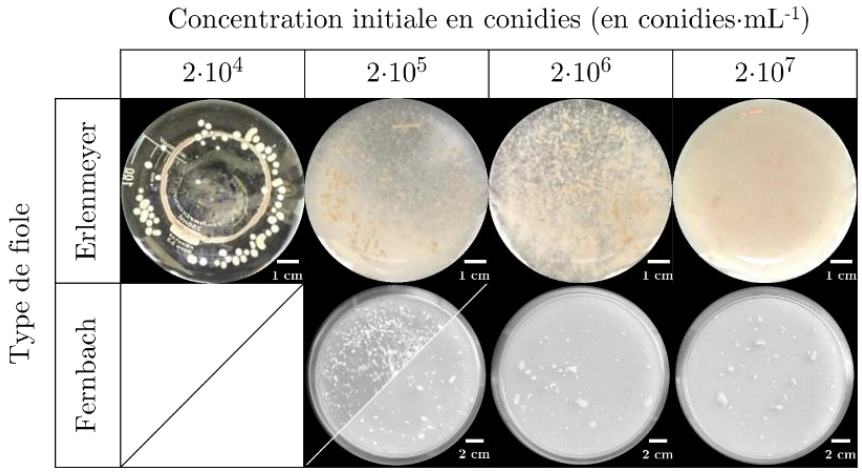


Fig. 48 *Photographies (fioles d'Erlenmeyer) et scans (fioles de Fernbach) des macromorphologies à des concentrations initiales de $2{\cdot}10^4$, $2{\cdot}10^5$, $2{\cdot}10^6$ et $2{\cdot}10^7$ conidies·mL^{-1} après 140h de culture à 180 tr·min^{-1} en milieu glucose 10 g·L^{-1}. La photo présentée pour chaque condition correspond à la morphologie observée pour la totalité des réplicats (n = 5 en triplicat). Sur les neuf réplicats au total pour $2{\cdot}10^5$ conidies·mL^{-1} en Fernbach, quatre montraient une morphologie hybride, et cinq une morphologie dispersée.*

Lors des observations microscopiques en présence d'une morphologie en *pellets*, que ce soit en Erlenmeyer ou en Fernbach, aucun conidiophore n'a été observé dans le milieu, en surface ou à l'intérieur des *pellets*, et cela pour l'ensemble des expérimentations réalisées, sans exception. Aucune

conidie n'a été comptée dans le milieu de culture après 72h et 140h, ce qui indique que les conidies ont toutes germées, sans en produire de nouvelles. En revanche, en présence d'une morphologie dispersée, des conidiophores sont observables dès 48h (**Fig. 49A**). Pour l'ensemble des champs observés en microscopie, à savoir une dizaine d'images par réplicat, donc une centaine au total pour chaque condition, les conidiophores observés avaient majoritairement une structure assez simple avec quelques phialides tout au plus, certains ne présentant même qu'une simple phialide solitaire produisant une chaine de conidies uniques. Ces conidiophores n'étaient pas différents entre les conditions en Erlenmeyer et en Fernbach (**Fig. 49A&B**). De plus, aucun microcycle n'a été observé dans les deux types de fioles. Concernant ces cultures en morphologies dispersées, le ratio de conidiation final (concentration finale en conidies / concentration initiale en conidies) est significativement plus élevé à $2{\cdot}10^6$ conidies·mL^{-1} en Fernbach, qu'à $2{\cdot}10^7$ conidies·mL^{-1} en Erlenmeyer ou en Fernbach, respectivement à 4,2, 2,5 et 2,8 (**Fig. 49C**).

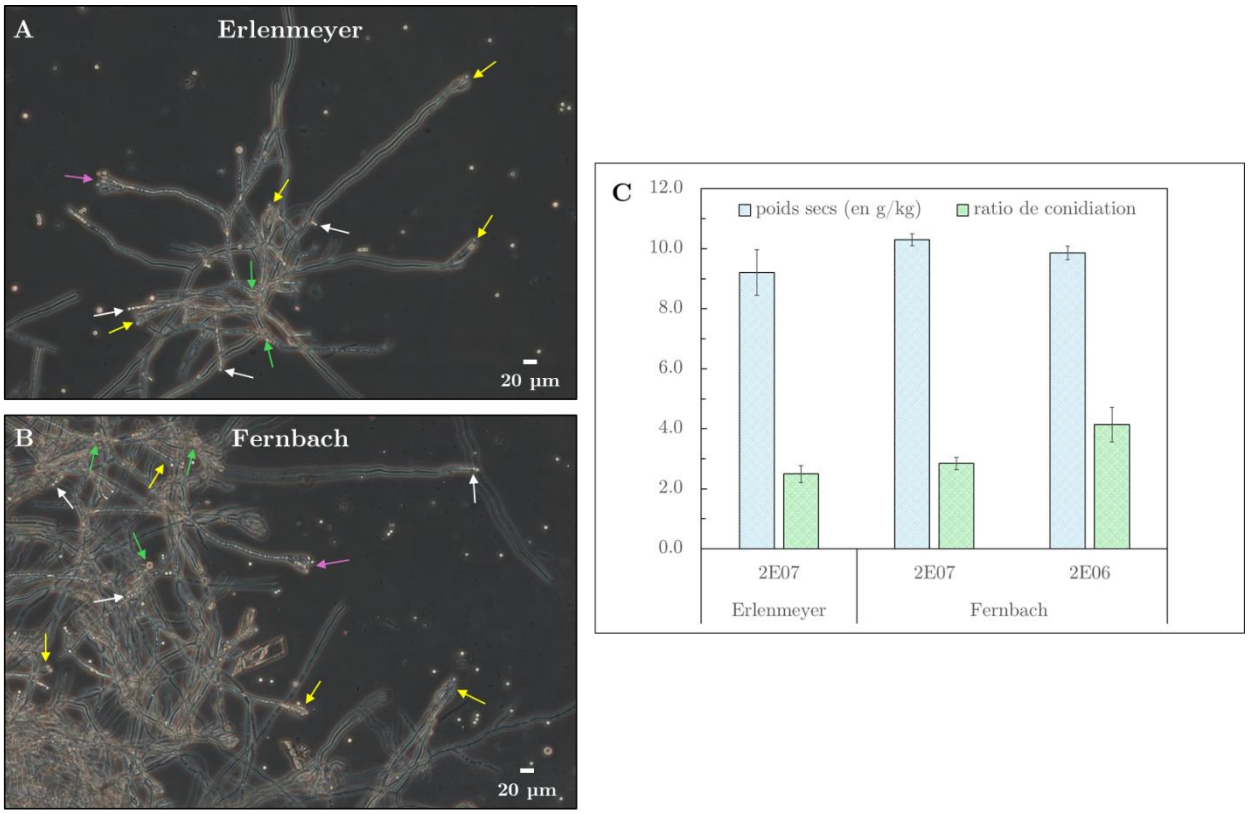


Fig. 49 *Observations microscopiques à 48h en présence d'une morphologie dispersée (**A**) en Erlenmeyer et (**B**) en Fernbach. Les flèches vertes indiquent les conidies germées dont sont issu le mycélium, les flèches violettes les conidiophores complexes, les flèches jaunes les conidiophore simples, et les flèches blanches les phialides uniques. (**B**) Ratios de conidiation et poids secs finaux en présence de morphologies dispersées avec n= 5 en triplicat. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard à la moyenne.*

Les poids secs mesurés pour ces trois conditions ne sont pas significativement différents entre les Erlenmeyer ensemencés à $2{\cdot}10^7$ conidies·mL^{-1} et les Fernbach ensemencés à $2{\cdot}10^7$ et $2{\cdot}10^6$ conidies·mL^{-1}, respectivement à 9,2, 10,3 et 9,9 g·kg^{-1} (**Fig. 49C**). Pour les cultures hybrides, présentant une proportion variable de *pellets*, l'hétérogénéité des ratios de conidiation et des poids secs mesurés ne permet pas d'obtenir des données fiables.

Le changement d'échelle en fiole impacte donc la morphologie en fonction du taux d'ensemencement. Cette morphologie semble avoir un lien avec la production de conidies. Il n'y a pas de conidies produites en présence de *pellets*, et une morphologie dispersée favorise la production de conidies, même s'il n'y a pas de différence significative de cette production entre l'Erlenmeyer et le Fernbach pour un même taux d'ensemencement. Pour poursuivre cette étude de la morphologie lors de la montée en échelle de l'Erlenmeyer au Fernbach, l'effet de l'agitation a été étudié.

5.2.1.2 Effet de la vitesse d'agitation

En fixant le taux d'ensemencement à $2{\cdot}10^6$ conidies·mL^{-1}, on remarque que la morphologie dispersée n'est adoptée qu'en Fernbach à une vitesse de 180 tr·min^{-1}, soit une puissance dissipée par unité de volume de 1,38 W·m^{-3} (**Table 13**). Avec un taux d'ensemencement de $2{\cdot}10^7$ conidies·mL^{-1} en revanche, la morphologie dispersée est observable en Erlenmeyer à 180 tr·min^{-1} et 210 tr·min^{-1}, soit respectivement à 0,24 et 0,36 W·m^{-3}, et pour les deux agitations testées en Fernbach, respectivement à 0,84 et 1,38 W·m^{-3}. L'augmentation de la puissance dissipée permet ainsi de passer d'une morphologie hybride à une morphologie dispersée, et le seuil de P/V pour passer de l'une à l'autre diminue avec un taux d'ensemencement dix fois plus élevé (**Table 13**). La présence d'un régime turbulent a été vérifiée au préalable en calculant le nombre de Reynolds (**Table 16**).

Table 13 *Macromorphologies observées en Erlenmeyer et en Fernbach en fonction du taux d'ensemencement et de la puissance dissipée par unité de volume (dépendante de l'agitation). n correspond au nombre d'expérimentations réalisées (en triplicat).*

Taux d'inoculum (en conidies·mL^{-1})	**Dispositif**	**Agitation (tr·min^{-1})**	**P/V (W·m^{-3})**	**Morphologie**	**n**
$2{\cdot}10^6$	Fiole d'Erlenmeyer	150	0.14	**Hybride**	3
		180	0.24	**Hybride**	3
		210	0.36	**Hybride**	1
	Fiole de Fernbach	150	0.84	**Hybride**	3
		180	1.38	**Dispersée**	5

$2{\cdot}10^7$	Fiole d'Erlenmeyer	150	0.14	**Hybride**	3
		180	0.24	**Dispersée**	5
		210	0.36	**Dispersée**	1
	Fiole de Fernbach	150	0.84	**Dispersée**	3
		180	1.38	**Dispersée**	3

L'agitation et le volume de milieu, par le biais de la puissance dissipée, impacte ainsi fortement la morphologie en fonction du taux d'ensemencement choisi. En fiole, l'aération étant uniquement en surface, elle ne peut être testée séparément de ces deux paramètres. Mais en fixant des paramètres favorables à la morphologie dispersée, à savoir une agitation à 180 $tr{\cdot}min^{-1}$ et une concentration initiale en conidies de $2{\cdot}10^7$ $conidies{\cdot}mL^{-1}$ en Erlenmeyer, et de $2{\cdot}10^6$ ou $2{\cdot}10^7$ $conidies{\cdot}mL^{-1}$ en Fernbach, on peut modifier un nouveau paramètre, comme la nature de la source de carbone de base (glucose), et voir les effets de ce changement.

5.2.1.3 Effet de la source de carbone

Les quatre sources de carbone choisies pour l'étude transcriptomique, à savoir le glucose à 10 $g{\cdot}L^{-1}$ et à 20 $g{\cdot}L^{-1}$, le saccharose à 10 $g{\cdot}L^{-1}$ et le mix de glucose à 5 $g{\cdot}L^{-1}$ et de fructose à 5 $g{\cdot}L^{-1}$, ont été testées pour ces trois combinaisons de paramètres favorables à la morphologie dispersée. On remarque que pour l'ensemble des expérimentations (n = 5 en triplicat), la morphologie observée était toujours dispersée en glucose, saccharose et mix à 10 $g{\cdot}L^{-1}$, et en *clumps* en glucose à 20 $g{\cdot}L^{-1}$. La concentration de la source de carbone semble avoir un impact sur la morphologie en Erlenmeyer et en Fernbach, mais pas la nature de la source de carbone. Concernant les morphologies dispersées, les cultures en présence de saccharose présentent une viscosité qualitativement moins forte qu'en présence de glucose ou de mix à la même concentration. Les viscosités étant hors de la gamme de mesure du viscosimètre disponible au laboratoire, elles n'ont pas pu être quantifiées.

En revanche, en mesurant la production de conidies pour ces trois combinaisons de paramètres, pour rappel $2{\cdot}10^7$ $conidies{\cdot}mL^{-1}$ en Erlenmeyer, $2{\cdot}10^6$ $conidies{\cdot}mL^{-1}$ en Fernbach et $2{\cdot}10^7$ $conidies{\cdot}mL^{-1}$ en Fernbach, les trois à 180 $tr{\cdot}min^{-1}$, les ratios de conidiation mesurés le sont entre 2,5 et 4,5 en conditions glucose et mix 10 $g{\cdot}L^{-1}$, et inférieurs à 1,0 en condition glucose 20 $g{\cdot}L^{-1}$ et saccharose 10 $g{\cdot}L^{-1}$ (**Fig. 50A**). Les mesures des poids secs sont différentes entre les sucres en Erlenmeyer, avec un poids sec final en glucose 20 $g{\cdot}L^{-1}$ d'environ 15 $g{\cdot}kg^{-1}$ contre 9 $g{\cdot}kg^{-1}$ en glucose 10 $g{\cdot}L^{-1}$. En revanche ces différences ne sont pas significatives en Fernbach (**Fig. 50A**). Le pH initial mesuré est identique pour chacun des milieux, environ 4,8. En revanche, pour l'ensemble des

combinaisons de paramètres, le pH final est d'environ 5,5 en glucose et mix 10 g·L^{-1}, environ 6,5 en saccharose 10 g·L^{-1}, et d'environ 8,0 en glucose 20 g·L^{-1} (**Fig. 50B**).

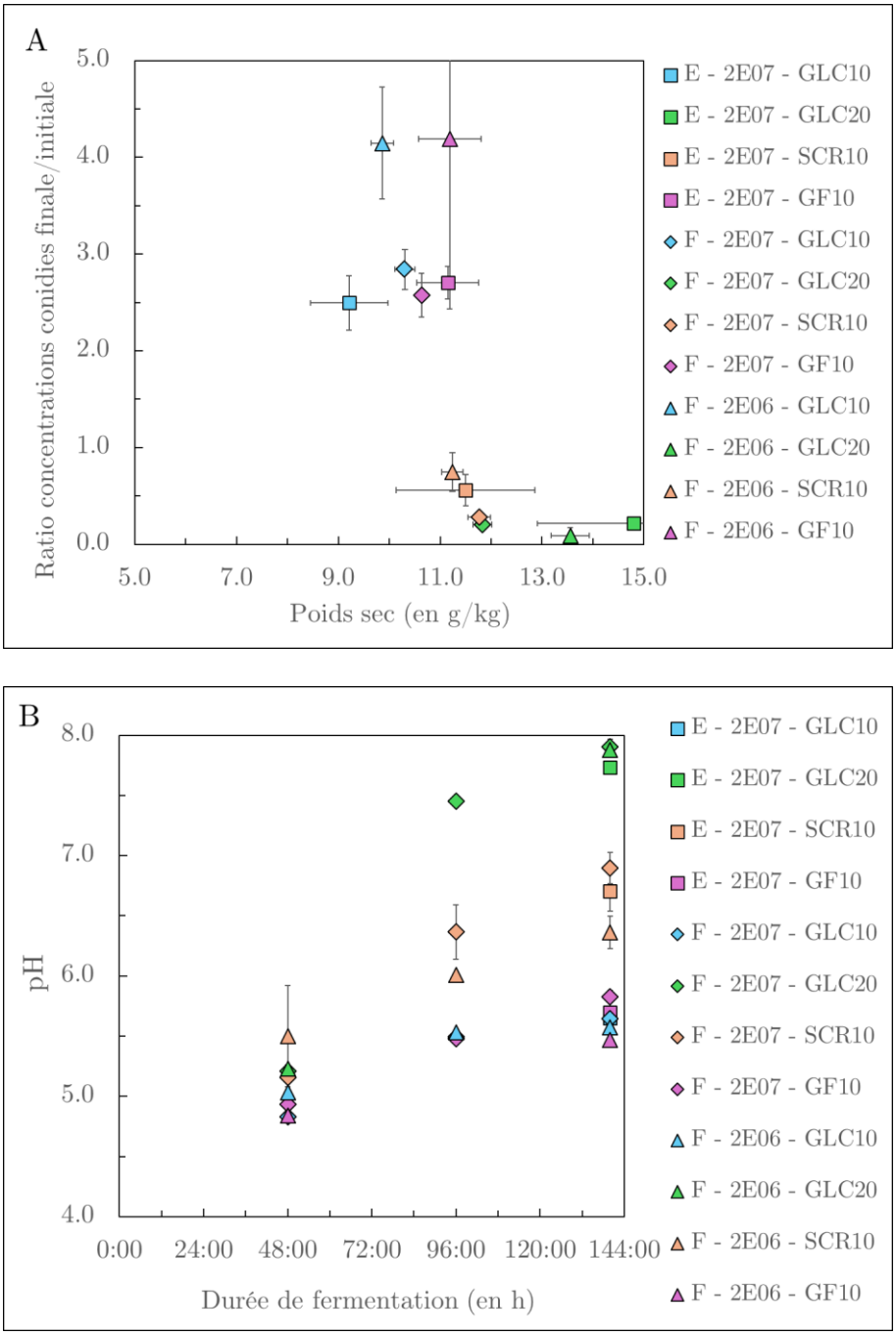


Fig. 50 *(**A**) Mesures des ratios de conidiation et des poids secs finaux en fonction du type de fiole (E pour Erlenmeyer, F pour Fernbach), du taux d'ensemencement (2^E07 pour $2{\cdot}10^7$ conidies·mL^{-1} et 2^E06 pour $2{\cdot}10^6$ conidies·mL^{-1}) et du sucre initial (GLC10 pour glucose 10 g·L^{-1}, GLC20 pour glucose 20 g·L^{-1}, SCR10 pour saccharose 10 g·L^{-1}, et GF10 pour glucose + fructose 10 g·L^{-1}). (**B**) Mesures du pH pour ces mêmes conditions.*

La concentration des acides aminés a également été mesurée au cours du temps (0h, 48h, 96h et 140h) en Fernbach à $2 \cdot 10^7$ conidies·mL^{-1} (Données supplémentaires de l'article **Table 12**). La consommation des acides aminés n'étaient pas différentes entre les conditions. De même, la concentration d'un certain nombre d'acides organiques a été mesurée au cours du temps. Pour les quatre conditions nutritives, une concentration d'acide acétique maximale a été mesuré à 96h, à savoir 1,4 g·kg^{-1} en glucose 10 g·L^{-1}, 1,5 g·kg^{-1} en glucose 20 g·L^{-1}, 0,9 g·kg^{-1} en saccharose 10 g·L^{-1}, et 1,0 g·kg^{-1} en mix 10 g·L^{-1} (pour n = 1).

Ainsi la composition du milieu en carbone a des effets similaires sur la conidiation et le pH en Erlenmeyer et en Fernbach, contrairement à la production de biomasse, qui semble peu différente en fonction du sucre en Fernbach par rapport à l'Erlenmeyer. Ces effets ont été observé en fixant des paramètres physico-chimiques, le taux d'ensemencement et l'agitation, dans le but de favoriser une morphologie dispersée favorable à la production de conidies. Pour passer à l'échelle des bioréacteurs, l'aération et le volume de milieu étant plus élevés qu'en fiole, la concentration initiale en conidies a été fixée à $2 \cdot 10^6$ conidies·mL^{-1} pour les expérimentations. Mais contrairement aux fioles, l'agitation et l'aération peuvent être testées séparément à cette échelle, puisque les bioréacteurs sont aérés grâce un injecteur à débit variable d'air.

5.2.2 Passage de la fiole au bioréacteur de laboratoire

En bioréacteur de laboratoire, lorsque l'on applique une agitation usuelle de 250 tr·min^{-1}, cette vitesse ne permet pas d'homogénéiser la culture de PC01. Celle-ci déphase, avec la biomasse en bas et le milieu de culture en haut (**Fig. 51A**). Pour que le mélange soit parfaitement homogène, il est nécessaire d'appliquer une vitesse de 500 tr·min^{-1}. Au-delà à 600 tr·min^{-1}, la biomasse est légèrement hétérogène, tandis qu'à 700 tr·min^{-1} la biomasse s'accumule sur les parois en hauteur de la cuve (**Fig. 51A**) et sur les mobiles d'agitation. Les différents niveaux d'aération testés n'ont aucun effet sur l'homogénéisation du mélange.

Concernant la limitation en oxygène, celle-ci semble dépendre uniquement de l'agitation, et non de l'aération (**Fig. 51B**). A une agitation de 500 tr·min^{-1}, la pO_2 est inférieur à 10% à 36h, contre 60% à 600 tr·min^{-1} et 70% à 700 tr·min^{-1}. Dans ce type de culture aérobie industriel, il est généralement nécessaire que cette limitation ne soit pas inférieure à 20%, mais les contraintes d'homogénéisation de la culture laissent peu de marge de manœuvre pour trouver l'agitation optimale. Les courbes de pO_2 à une agitation de 500 tr·min^{-1} et une aération de 0,35 Nm^3·h^{-1} pour n = 6 sont disponibles **Fig. 59**.

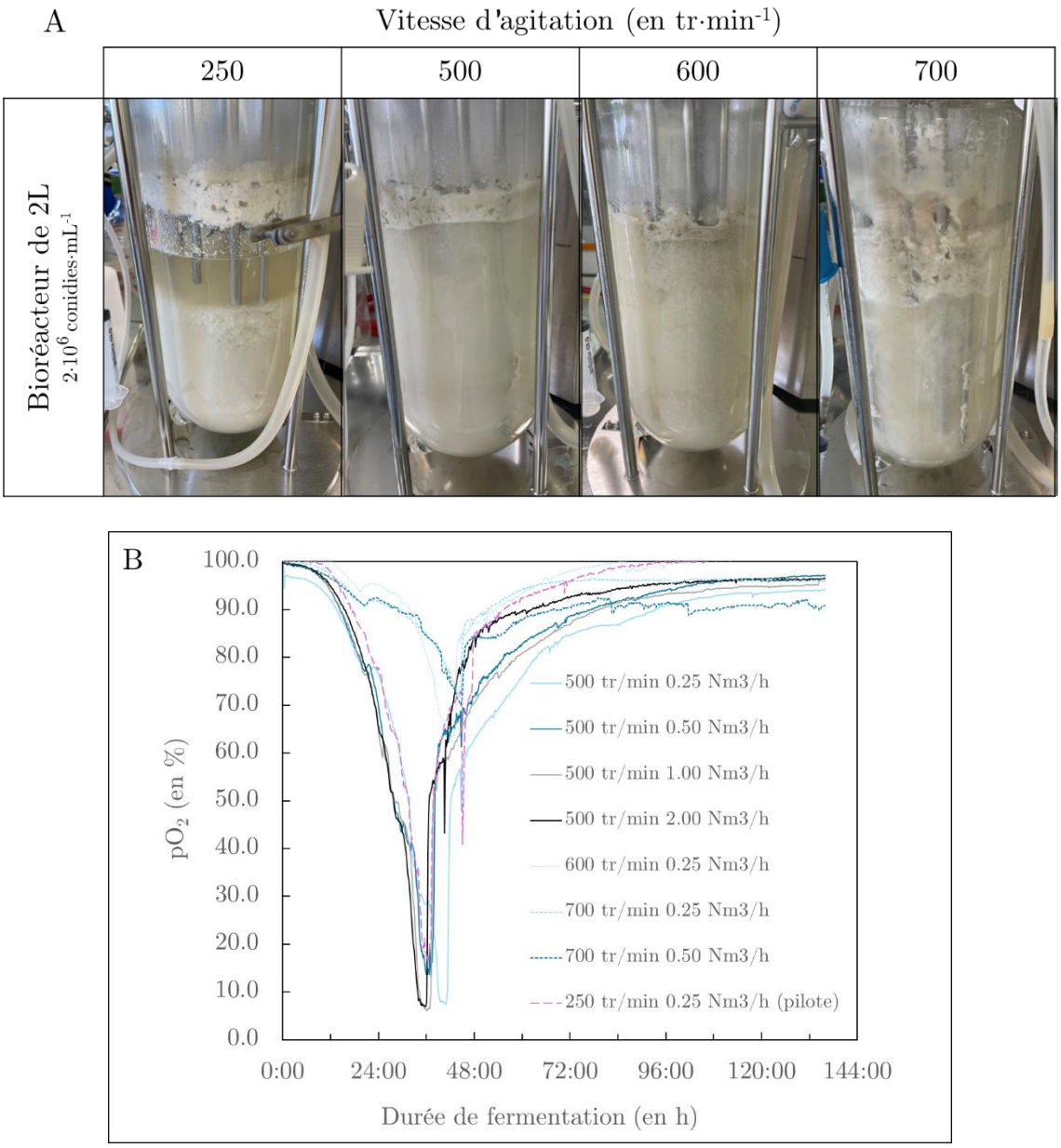


***Fig. 51** (**A**) Photographies du mycélium en bioréacteur de laboratoire en fonction de la vitesse d'agitation (**B**) Effet de l'aération et de l'agitation en bioréacteur de laboratoire sur la pO_2 (en %) au cours de la fermentation.*

Avec l'agitation de 250 tr·min^{-1} en bioréacteur de laboratoire, la puissance dissipée est quasiment 100 fois plus élevée qu'en Fernbach à 180 tr·min^{-1} (**Table 14**). Mais à des vitesses de 500 à 700 tr·min^{-1}, les puissances dissipées atteignent des niveaux encore plus élevés, jusqu'à 2000 fois la puissance dissipée en Fernbach à 180 tr·min^{-1}. Les différents niveaux d'aération testés réduisent assez peu cette puissance dissipée (**Table 14**). Même si la vitesse de 500 tr·min^{-1} permet une

homogénéisation correcte de la culture, l'écart de la puissance dissipée avec celle en Fernbach est beaucoup trop important pour une comparaison fiable entre ces échelles. Cependant, le ratio de conidiation obtenu en bioréacteur de laboratoire à 500 $tr \cdot min^{-1}$ et 0.35 $Nm^3 \cdot h^{-1}$ n'est pas significativement différent de celui obtenu en Fernbach pour un même taux d'ensemencement de $2 \cdot 10^6$ $conidies \cdot mL^{-1}$ (**Table 14**). Le poids sec est plus élevé en Fernbach qu'en bioréacteur de laboratoire, et cela quelle que soit l'agitation ou l'aération, peut-être en raison d'un cisaillement du mycélium plus important au sein de ce dispositif.

Table 14 *Aspect de la culture, ratio de conidiation final et poids sec final en fonction de l'agitation et de l'aération, paramètres influençant la puissance dissipée. n correspond au nombre d'expérimentations réalisées (un seul réplicat). Le détail des calculs des puissances dissipées par unité de volume sont disponibles* ***Table 17****.*

Dispositif	Agitation ($tr \cdot min^{-1}$)	Aération ($Nm^3 \cdot h^{-1}$)	P/V ($W \cdot m^{-3}$)	Culture	Ratio conidiation	Poids secs ($g \cdot kg^{-1}$)	n
Fernbach	180	/	1.38	Dispersée	**4.15 ± 0.58**	**9.86 ± 0.22**	5
Bioréacteur de laboratoire	250	0.35	114.7	Déphasée	/	/	2
	500	0.35	893.1	Homogène	**3.46 ± 0.44**	**6.70 ± 0.44**	6
		0.50	851.0	Homogène	**3.65 ± 1.44**	**7.86 ± 0.35**	3
		1.00	823.3	Homogène	**2.53**	**7.89**	1
		2.00	768.1	Homogène	**0.16**	**4.57**	1
	600	0.35	1530.0	Homogène	**3.17 ± 0 .97**	**6.64 ± 1.43**	3
	700	0.35	2410.1	Hétérogène	**2.32 ± 0.01**	**6.23 ± 1.73**	3
		0.50	2248.6	Hétérogène	**0.45 ± 0.08**	**1.64 ± 0.94**	3

Pour l'ensemble des champs observés en microscopie, à savoir une dizaine d'images par réplicat, donc une trentaine par condition pour n = 3, les conidiophores observés à 48h dans une culture homogène en bioréacteur de laboratoire sont majoritairement assez simples, avec des structures asexuées composées d'une phialide simple ou de quelques phialides au maximum (**Fig. 52**), exactement comme en fioles. Aucun microcycle n'a également été observé, quelles que soient les conditions. En testant les différentes natures et concentrations de sucres précédemment testées en fiole, on remarque que la production de conidies est relativement similaire entre les cultures en Fernbach et en bioréacteur de laboratoire, tandis que les poids secs mesurés sont plus faibles en bioréacteur de laboratoire qu'en Fernbach (**Fig. 53**).

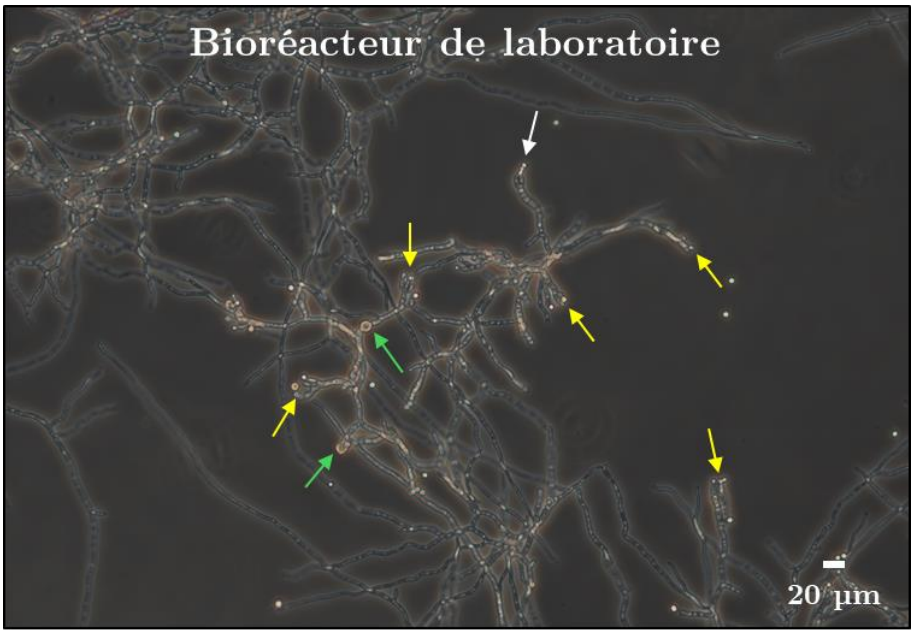


Fig. 52 *Images en microscopie à contraste de phase à 48h en présence d'une culture homogène en bioréacteur de laboratoire (3,6 L). Les flèches vertes indiquent les conidies germées dont sont issu le mycélium, les flèches jaunes les conidiophore simples, et la flèche blanche une phialide unique.*

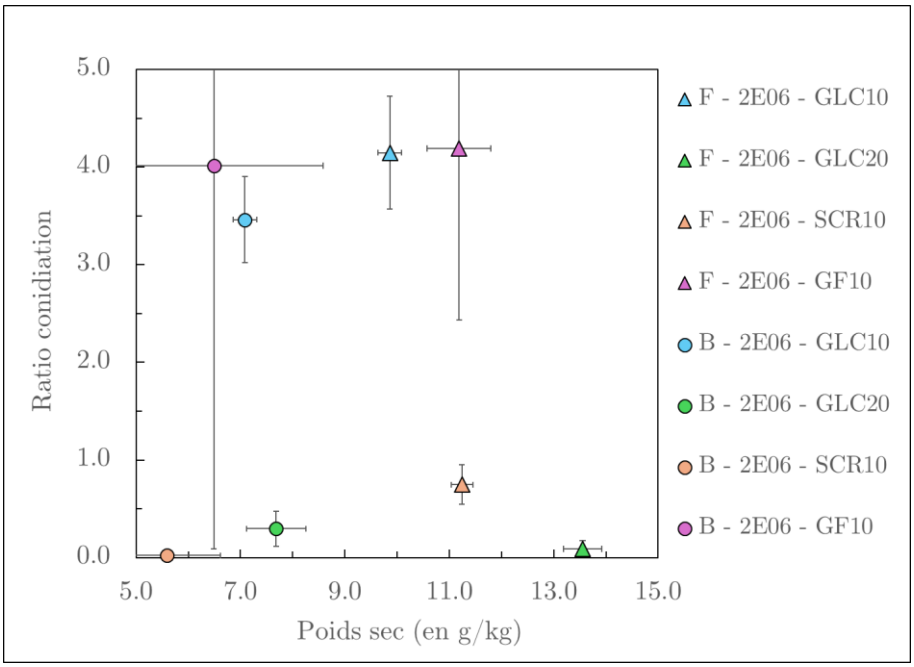


Fig. 53 *Mesures des ratios de conidiation et des poids secs finaux en fonction du type de fiole (E pour Erlenmeyer, F pour Fernbach) et du sucre initial (GLC10 pour glucose 10 g·L^{-1}, GLC20 pour glucose 20 g·L^{-1}, SCR10 pour saccharose 10 g·L^{-1}, et GF10 pour glucose + fructose 10 g·L^{-1}) pour n = 3 (en triplicat).*

Malgré ces données de conidiation similaires entre Fernbach et bioréacteur de laboratoire, cette échelle de bioréacteur n'est a priori pas la plus optimisée pour mener ce type d'expérimentation, en particulier pour un suivi de la conidiation, de la biomasse, et des autres facteurs de la fermentation dans le temps. De plus, des prélèvements réguliers (environ 15 mL) sur 2,0 L de culture ont eu un fort impact sur la quantité de milieu initial, un échantillonnage supérieur à un prélèvement par jour par exemple peut réduire d'au moins 10% le volume final de culture. Ainsi, la culture en bioréacteur pilote pourrait être plus adaptée à ce besoin d'informations sur la dynamique de la fermentation, avec une quantité de 50,0 L de milieu, pour laquelle le volume total de prélèvements est négligeable pour un suivi régulier.

5.2.3 Expérience en bioréacteur pilote

Le bioréacteur pilote de 80 L présent chez Danisco constitue un équipement essentiel pour tester les fermentations avant une industrialisation potentielle. Il s'agit d'un dispositif utilisé en continu par les équipes de recherche du site, avec une organisation planifiée sur plusieurs mois. L'utilisation de cet équipement est donc une chance quasi unique offerte par l'entreprise, puisque deux expérimentations sur 140h ont pu être menées, la première en glucose à 10 $g \cdot L^{-1}$, la seconde en saccharose à 10 $g \cdot L^{-1}$. Ces deux conditions ont été choisies pour leur différence de production de conidies en fioles. Dans un premier temps, l'effet du changement d'échelle entre fiole et bioréacteur en glucose à 10 $g \cdot L^{-1}$ sera comparé, avant une étude plus détaillée de la dynamique de la conidiation et des autres facteurs de la fermentation mesurable entre le glucose et le saccharose à 10 $g \cdot L^{-1}$.

5.2.3.1 Effet du changement d'échelle

En bioréacteur pilote, des paramètres d'agitation à 250 $tr \cdot min^{-1}$ et d'aération à 0.35 $Nm^3 \cdot h^{-1}$ permettent d'homogénéiser la culture, contrairement aux bioréacteurs de laboratoire (**Table 15**). La puissance dissipée est du même ordre de grandeur que celle à 250 $tr \cdot min^{-1}$ en bioréacteur de laboratoire, donc 100 fois plus élevée qu'en Fernbach. Le système hydrodynamique n'est pas le même en bioréacteur pilote qu'en Fernbach, et la puissance dissipée par unité de volume n'est pas du même ordre de grandeur. Cependant, cette puissance dissipée reste usuelle pour des bioréacteurs de cette envergure (Lin et al., 2010), contrairement à celles appliquées en bioréacteur de laboratoire, jusqu'à 2000 fois plus élevées qu'en Fernbach (**Table 15**). Toujours pour cette unique expérimentation en glucose 10 $g \cdot L^{-1}$, le poids sec mesuré n'est pas significativement différent de ceux mesurés en bioréacteur de laboratoire, donc moins élevé qu'en Fernbach. En revanche, le ratio de conidiation final mesuré en bioréacteur pilote est 10 fois plus élevé qu'en Fernbach et en bioréacteur de laboratoire (**Table 15**). On peut supposer qu'il existe un élément répresseur de la conidiation en fiole et en bioréacteur de laboratoire, qui est levé lors de cette expérimentation en bioréacteur pilote. L'expérimentation étant unique, cette hypothèse reste à confirmer.

Concernant la limitation en oxygène, celle-ci atteint un peu moins de 20% à 36h (**Fig. 51B**), ce qui est plus optimisé pour la culture aérobie de champignons filamenteux. Contrairement à la culture en bioréacteur de laboratoire, ici une vitesse d'agitation de 250 $tr \cdot min^{-1}$ est également idéale pour l'homogénéisation de la culture.

Table 15 *Aspect de la culture, ratio de conidiation final et poids sec final en fonction de l'échelle de la fermentation. n correspond au nombre d'expérimentations réalisées (un seul réplicat).*

Dispositif	Agitation ($tr \cdot min^{-1}$)	Aération ($Nm^3 \cdot h^{-1}$)	P/V ($W \cdot m^{-3}$)	Culture	Ratio conidiation	Poids secs ($g \cdot kg^{-1}$)	n
Fernbach	180	/	1.38	Dispersée	**4.15 ± 0.58**	**9.86 ± 0.22**	5
Bioréacteur de laboratoire	250	0.35	114.7	Déphasée	/	/	3
	500	0.35	893.1	Homogène	**3.46 ± 0.44**	**6.70 ± 0.44**	6
	700	0.35	2410.1	Hétérogène	**2.32 ± 0.01**	**6.23 ± 1.73**	3
Bioréacteur pilote	250	0.35	171.4	Homogène	**39.36**	**6.40**	1

Une vingtaine de champs a été observée en microscopie à 36h, 45h et 48h en bioréacteur pilote, soit une soixante d'images pour cette expérimentation. Les conidiophores observés à ces temps de culture sont nombreux. Ils possèdent des structures complexes, au minimum triverticillés, et aucun n'est constitué que d'une phialide solitaire (**Fig. 54**), contrairement à ce qui avait été observé précédemment en fiole ou en bioréacteur de laboratoire. De plus, sur l'ensemble des images observées, une dizaine de microcycle a été observée, ce qui n'avait jamais été vu en fiole ou en bioréacteur de laboratoire (**Fig. 54**).

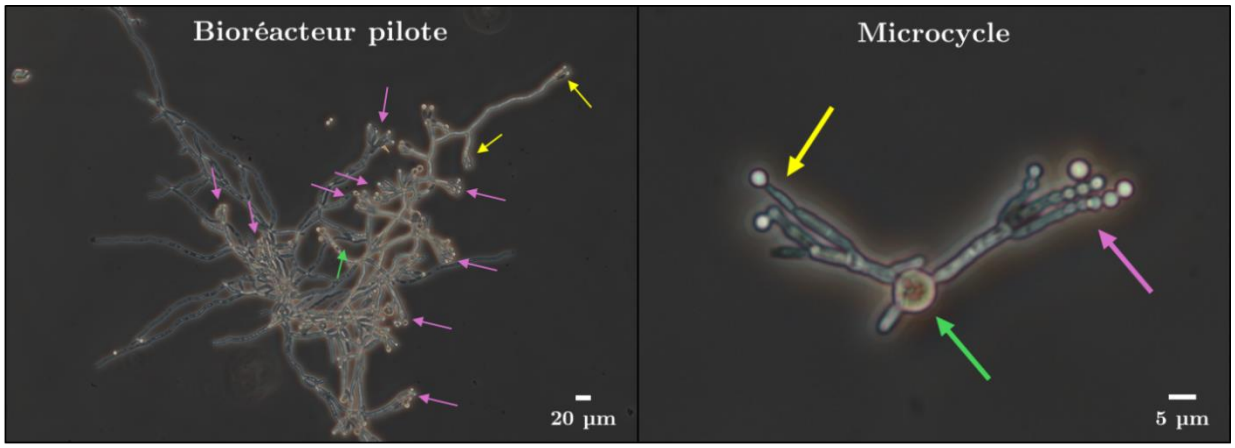


Fig. 54 *Images en microscopie à contraste de phase en bioréacteur pilote entre 36h et 48h de culture. Observations de conidiophores complexes à gauche, et d'un microcycle à droite. Les flèches vertes indiquent les conidies germées, les flèches violettes les conidiophores complexes et les flèches jaunes les conidiophore simples. Les barres d'échelle représentent 20 µm et 5 µm.*

Au vu de cette différence importante sur le taux de conidiation observée pour cette expérience unique en bioréacteur pilote par rapport aux autres échelles, une seconde expérimentation a été menée en présence de saccharose à 10 $g \cdot L^{-1}$, afin de comparer la dynamique de différents facteurs de la fermentation.

5.2.3.2 Comparaison entre la présence de glucose et de saccharose

En bioréacteur pilote, la dynamique et la valeur finale du poids sec ne sont pas significativement différentes entre le glucose et le saccharose à 10 $g \cdot L^{-1}$ (**Fig. 55**). Au contraire en Erlenmeyer, le poids sec mesuré au cours de la culture est plus élevé en saccharose qu'en glucose (**Fig. 50A**). En bioréacteur pilote, après avoir atteint sa valeur maximale après 45h, la quantité de biomasse stagne jusqu'à 140h (**Fig. 55**). Cela n'est pas le cas de la culture en Erlenmeyer, au cours de laquelle la quantité de biomasse augmente de 48h à 96h, puis diminue entre 96h et 140h (**Fig. 31**). Toujours en bioréacteur pilote, on observe une augmentation soudaine et temporaire du poids secs pour les deux milieux après 3h et 6h de culture (**Fig. 55**). Cette augmentation pourrait être expliquée par la formation temporaire de cristaux de calcium, observés uniquement à ces temps de culture.

Au-delà de la biomasse, aucune différence de viscosité n'a été qualitativement observée en bioréacteur pilote entre le glucose et le saccharose, contrairement à ce qui avait été vu en fiole. En bioréacteur pilote, les dynamiques de consommation des sucres sont similaires (**Fig. 55**). En bioréacteur pilote, la consommation du sucre est proportionnelle à l'augmentation du poids sec : une fois l'entièreté du carbone consommé, la quantité de biomasse est stable, avec une concentration autour de 8,0 $g \cdot kg^{-1}$ (**Fig. 55**) et cela en présence de glucose et de saccharose. Ainsi pour ces deux expérimentations, la nature du sucre ne semble pas avoir d'effet sur la concentration finale en biomasse.

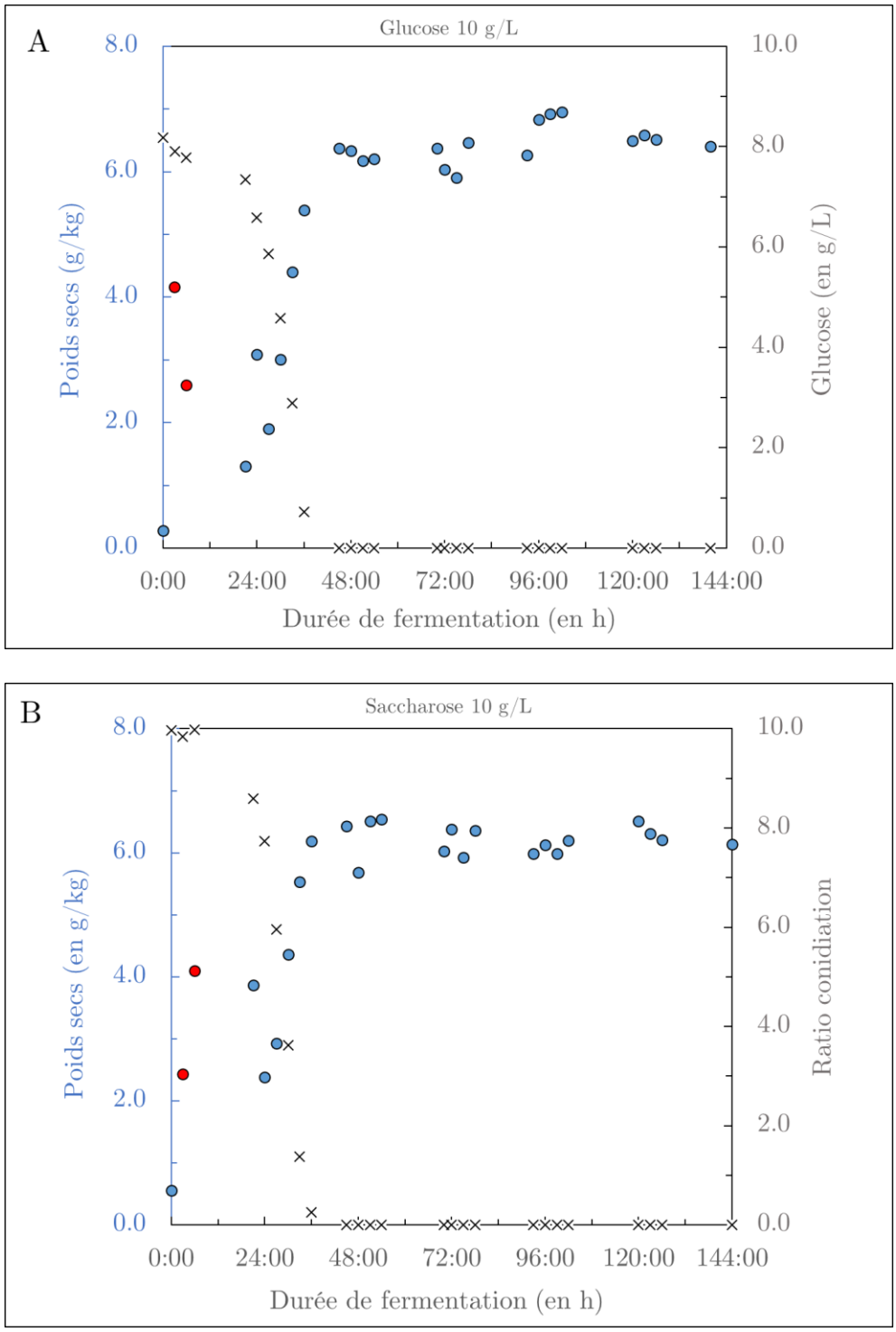


Fig. 55 *Dynamique du poids sec (ronds bleus) avec deux points aberrants à 3h et 6h de culture (ronds rouges), et dynamique de la concentration en sucre du milieu (croix noires) au cours de la culture de PC01 en bioréacteur pilote en milieux* ***(A)*** *glucose 10 g·L^{-1} et* ***(B)*** *saccharose 10 g·L^{-1}.*

La production de conidies en milieu glucose 10 g·L^{-1} augmente progressivement entre 24h et 80h en bioréacteur pilote, temps après lequel la concentration en conidies dans le milieu reste stable (**Fig. 56**), sans diminution comme observée en fiole (**Fig. 31**). Le déclenchement de la production de conidies correspond à la diminution progressive de la pO_2, jusqu'à sa limitation temporaire à moins de 20% autour de 36h. L'essentiel de cette production de conidies est corrélé à la remontée de la pO_2 après la limitation (**Fig. 56**). Une seconde limitation furtive à 40% autour de 48h est également observée. En milieu saccharose 10 g·L^{-1}, la limitation en oxygène arrive dès 24h de culture et dure plus d'une dizaine d'heures, contrairement à celle observée en glucose (**Fig. 56**), et est associée à une absence d'induction de la conidiation. Grâce à l'échelle 0,0 – 1,0 du ratio de conidiation, on observe la germination progressive des conidies, jusqu'à 100% au bout de 30h, sans production de conidies après celle-ci (**Fig. 56**).

Les profils de pH entre les deux milieux sont assez différents. Si on observe une basification globale du milieu après 140h, on peut voir une légère baisse de pH à 4,3 lors du déclenchement de la conidiation en milieu glucose, contrairement au pH en milieu saccharose, stable au même temps de culture (**Fig. 57**). Une première augmentation de pH est alors observée dans les deux milieux jusqu'à 5,0, alors que des conidies sont produites uniquement en présence de glucose. Après une diminution commune, le pH augmente faiblement à 5,0 jusqu'à 72h, pour stagner jusqu'à la fin de la culture en glucose. A l'inverse, le pH augmente progressivement jusqu'à 6,5 tout au long de la culture en saccharose (**Fig. 57**). Ces profils de pH en glucose et saccharose à 10 g·L^{-1} sont similaires en bioréacteur pilote, en bioréacteur de laboratoire et en Fernbach (**Fig. 60**). Cette différence de pH pourrait tout aussi bien être une cause qu'une conséquence de la différence de production de conidies dans le milieu.

L'ensemble des acides aminés et un certain nombre d'acides organiques ont été dosés dans les 25 échantillons prélevés au cours du temps dans les deux conditions nutritives. Si l'ensemble des acides aminés présents dans le milieu de base (extrait de levure à 2 g·L^{-1} voir **partie 2.2.2**) sont consommés après 24h de culture, seul l'acide acétique était détectable au cours de la culture, avec une concentration maximale à 96h autour de 0,2 g·kg^{-1} dans les deux milieux (**Fig. 58**). La présence d'acide acétique avait été mesurée comme maximale à 96h en Fernbach et en bioréacteur de laboratoire, mais à des concentrations plus élevées, respectivement à 1,4 et 0,6 g·kg^{-1}. En bioréacteur pilote, sa concentration se maintient en présence de saccharose, mais elle diminue largement en présence de glucose. Cette faible production d'acide acétique semble n'avoir aucun impact sur le pH (**Fig. 58**).

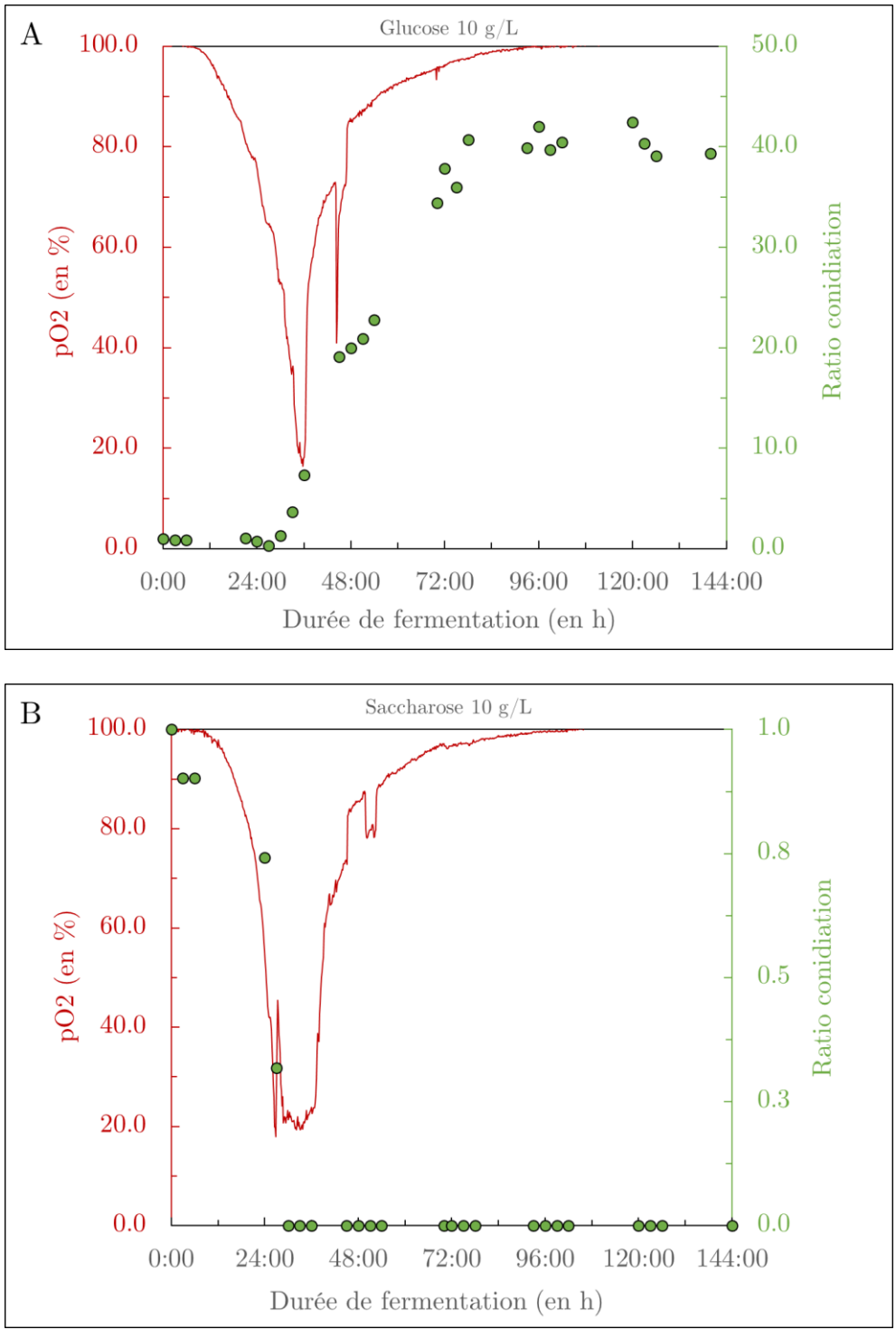


Fig. 56 *Dynamique du ratio de conidiation (ronds verts) et de la pO_2 (courbe rouge) au cours de la culture de PC01 en bioréacteur pilote en milieux* ***(A)*** *glucose 10 g·L^{-1} et* ***(B)*** *saccharose 10 g·L^{-1}.*

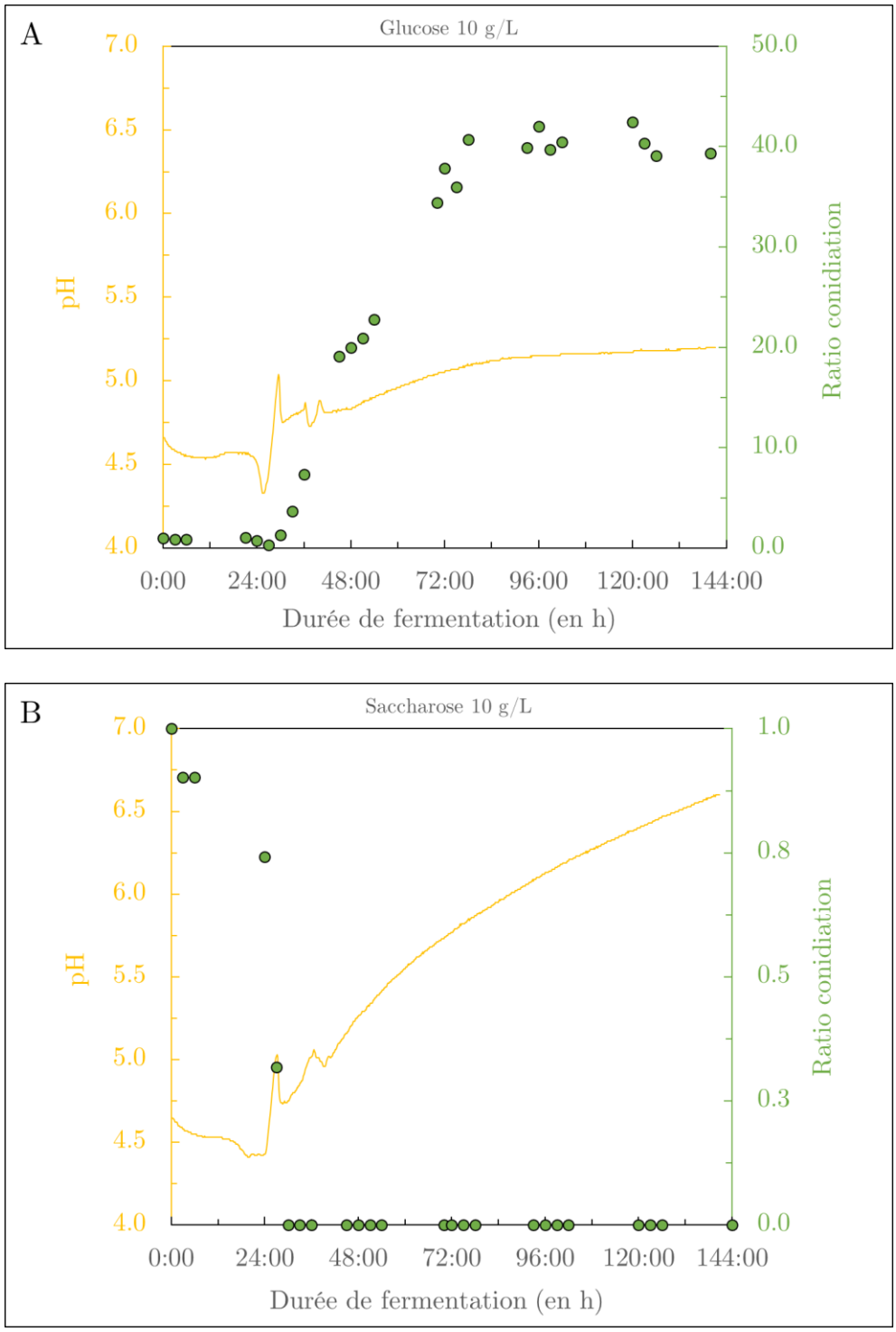


Fig. 57 *Dynamique du ratio de conidiation (ronds verts) et du pH (courbe jaune) au cours de la culture de PC01 en bioréacteur pilote en milieux* ***(A)*** *glucose 10 g·L^{-1} et* ***(B)*** *saccharose 10 g·L^{-1}.*

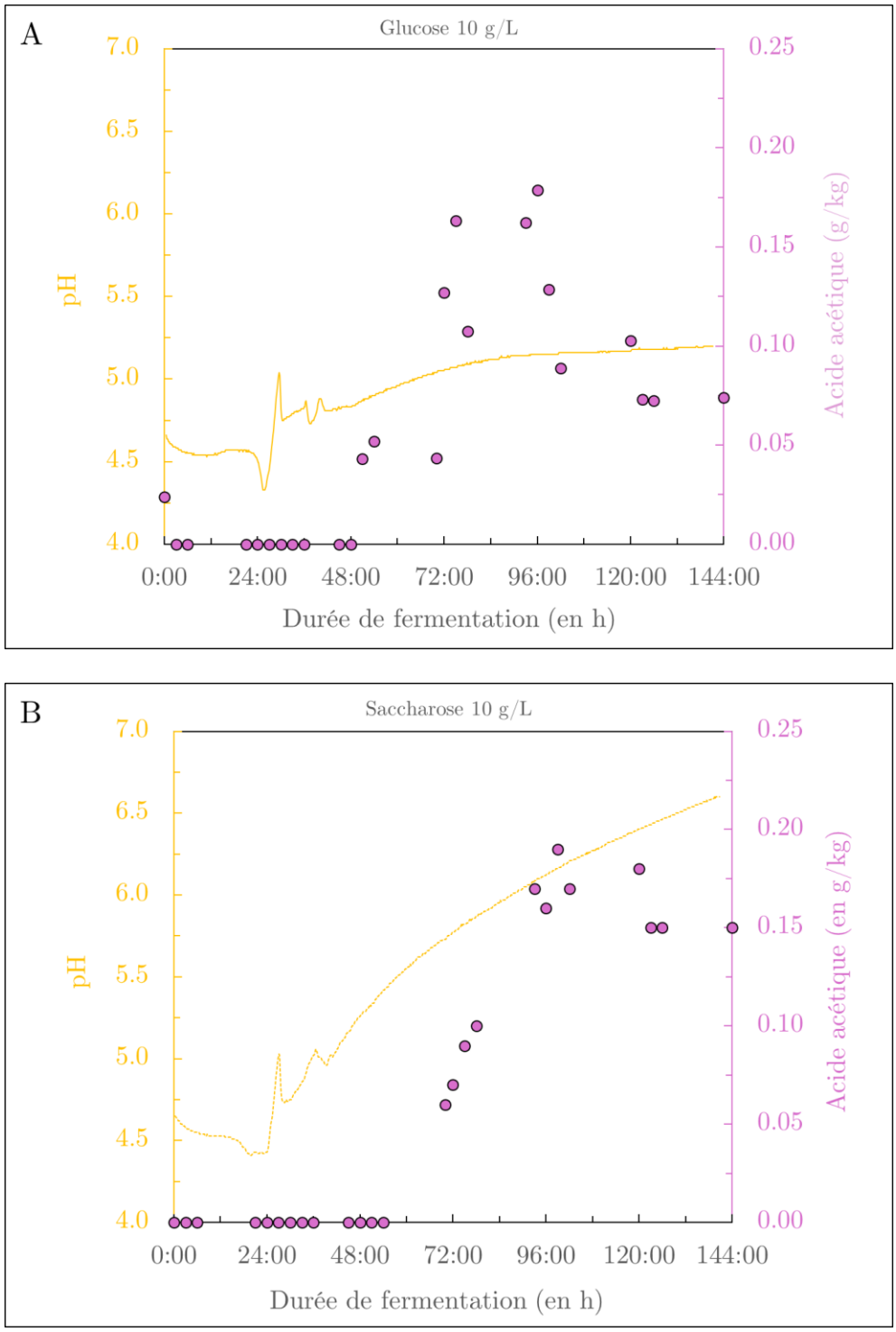


Fig. 58 *Dynamique du pH et de la concentration en acide acétique dans le milieu au cours de la culture de PC01 en bioréacteur pilote en milieux* ***(A)*** *glucose 10 g·L^{-1} et* ***(B)*** *saccharose 10 g·L^{-1}.*

5.3 Discussion

Cette extrapolation du Fernbach au bioréacteur pilote a permis d'augmenter la fréquence de l'échantillonnage au cours de la culture, et d'acquérir ainsi des données plus précises sur la production de conidies et de biomasse au cours de la fermentation de PC01. La différence de profil de pO_2 ou pH pourrait expliquer la différence de production de conidies entre les milieux glucose 10 $g \cdot L^{-1}$ et saccharose 10 $g \cdot L^{-1}$. Si la différence de durée de la limitation en O_2 constitue une hypothèse intéressante, la basification du milieu, plus forte en présence de saccharose qu'en présence le glucose, est étonnante. En effet, au cours de la culture de *Penicillium* en milieu liquide, les sucres sont décrits dans la littérature comme ayant un effet acidifiant au cours de la culture. Le glucose ou le fructose entraineraient une production élevée « d'acide » et serait pour cela des sources de carbone idéale pour la culture (Canteri & Ghoul, 2015). Cette acidification est expliquée par la libération de glucose oxydase dans le milieu, qui convertit le glucose en gluconate (Poulsen, 2005). L'observation de la production d'acide acétique par PC01 dans notre étude, jamais montrée auparavant, est cohérente avec ces observations. Cependant, cette production est mesurée dans les deux milieux, elle n'explique donc pas la différence de conidiation.

De même, ces paramètres mesurés n'expliquent pas la différence de facteur 10 entre la production de conidies en bioréacteur pilote et celle en Fernbach. Les données de pH ou de pO2 mesurées en bioréacteur de laboratoire en glucose et sucrose sont similaires à celles mesurées en bioréacteur pilote. Pourtant, à cette échelle inférieure, la production de conidies est similaire à celle mesurée en Fernbach. Il existe donc un élément limitant la production de conidies à ces échelles, qui est levé lors de la production en bioréacteur pilote. L'observation de microcycle en est l'une des manifestations. D'autres critères de fermentation non pris en compte dans cette étude pourraient expliquer cette différence, comme l'énergie de dissipation et de circulation (EDCF), représentatif du cisaillement (Roque et al., 2021). Malgré ces limites, le modèle en fiole semble fiable pour étudier les effets de la composition du milieu sur la production ou non de conidies à une échelle quasi-industrielle.

Remerciements

Je souhaiterais remercier grandement les salariés d'IFF qui ont contribué à cette étude, en particulier Patrick Chaigneau et Alexia Perignon pour leur aide à la mise en œuvre du bioréacteur pilote, ainsi que Audrey Schrantz et Lisa Fourny pour les analyses HPLC.

Références

Betts, J. I., & Baganz, F. (2006). Miniature bioreactors: Current practices and future opportunities. Microbial Cell Factories, 5(1), 21. https://doi.org/10.1186/1475-2859-5-21

Büchs, J. (2001). Introduction to advantages and problems of shaken cultures. Biochemical Engineering Journal, 7(2), 91‑98. https://doi.org/10.1016/S1369-703X(00)00106-6

Canteri, H. (2014). Mise au point, optimisation et extrapolation de nouveaux procédés d' agitation et d' aération aux échelles 2L, 900L et 10m3 pour les souches D. hansenii, S. carnosus et P. candidum. Université de Lorraine.

Canteri, H., & Ghoul, M. (2015). Submerged Liquid Culture for Production of Biomass and Spores of Penicillium. Food Reviews International, 31(3), 262‑278. https://doi.org/10.1080/87559129.2015.1015136

Lin, P.-J., Scholz, A., & Krull, R. (2010). Effect of volumetric power input by aeration and agitation on pellet morphology and product formation of Aspergillus niger. Biochemical Engineering Journal, 49(2), 213‑220. https://doi.org/10.1016/j.bej.2009.12.016

McNeil, B., & Harvey, L. M. (2008). Practical fermentation technology (Wiley).

Poulsen, B. R. (2005). Characterization of pathway engineered strains of filamentous fungi in submerged cultures.

Roque, T., Delettre, J., Hardy, N., Nienow, A. W., Augier, F., Ben Chaabane, F., & Béal, C. (2021). The impact of fluid-dynamic stress in stirred tank bioreactors on the synthesis of cellulases by Trichoderma reesei at the intracellular and extracellular levels. Chemical Engineering Science, 232, 116353. https://doi.org/10.1016/j.ces.2020.116353

Données supplémentaires

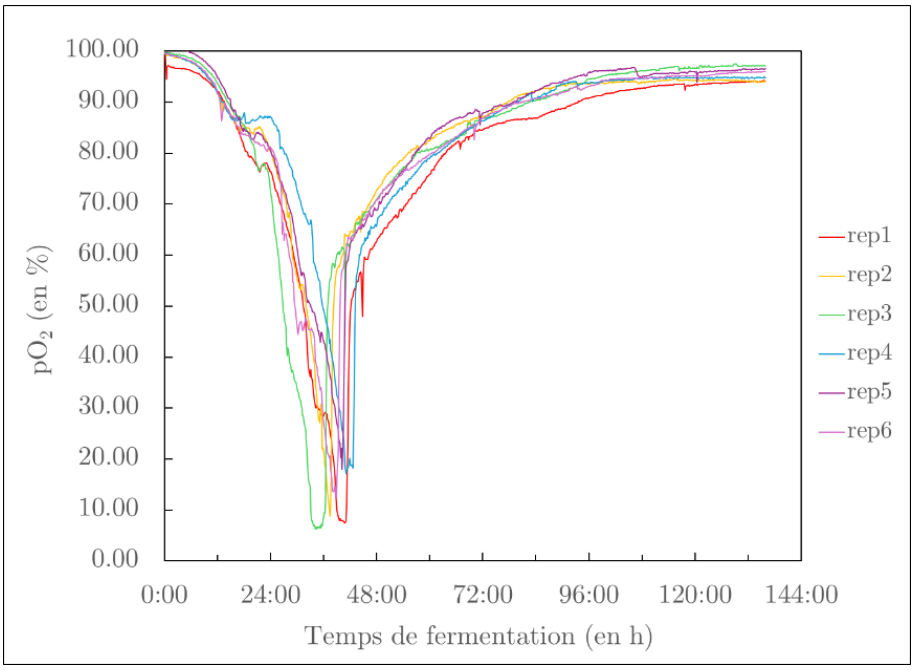


Fig. 59 *Mesures en ligne de la pO_2 pour six expérimentations différentes en bioréacteur de 3,6 L avec comme conditions 500 tr·min^{-1}, 0.175 vvm et milieu glucose 10 g·L^{-1}*

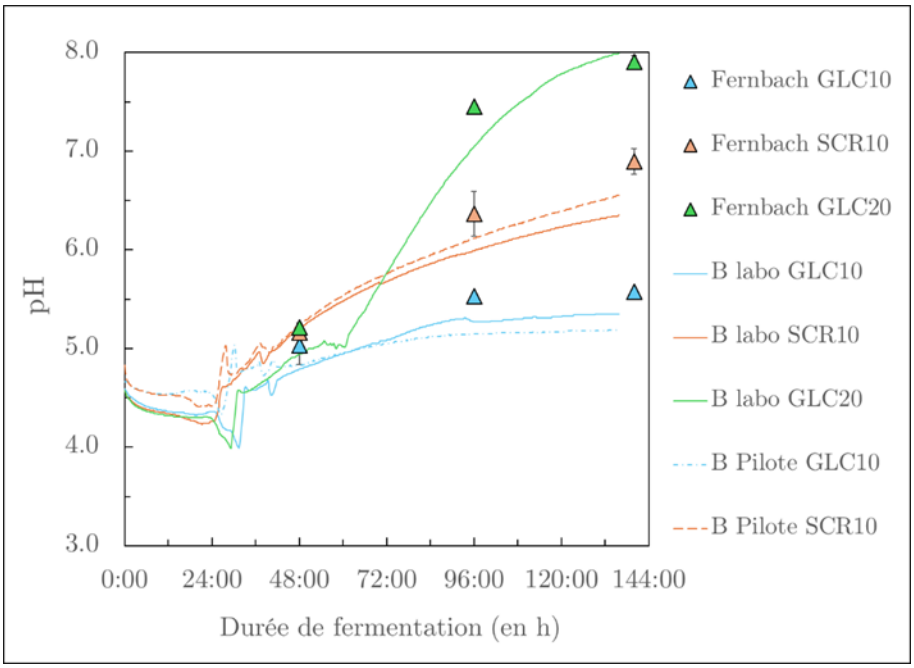


Fig. 60 *Comparaison des profils de pH en Fernbach et en bioréacteur pour un taux d'ensemencement de 2 · 10^{6} conidies · mL^{-1}. La nature et la concentration des sucres sont notées : GLC10 = glucose 10 g·L^{-1}, GLC20 = glucose 20 g·L^{-1}, SCR10 = saccharose 10 g·L^{-1}, GF10 = glucose 5 g·L^{-1} + fructose 5 g·L^{-1}.*

Table 16 *Détermination du nombre de Reynolds en fioles et en bioréacteur pour les niveaux d'agitation et d'aération standard.*

Dispositif	Mobile	Nombre de Reynolds	Régime
Fiole d'Erlenmeyer	/	$2.6 \cdot 10^5$	**Turbulent**
Fiole de Fernbach	/	$5.9 \cdot 10^5$	
Bioréacteur de laboratoire	Hélice Quadripale	$4.6 \cdot 10^5$	
	Turbine Centripète	$5.4 \cdot 10^5$	
	Turbine Rushton	$3.8 \cdot 10^5$	
Bioréacteur de laboratoire	Hélice HTGP4	$6.3 \cdot 10^5$	
	Turbine Rushton	$4.6 \cdot 10^5$	

Table 17 *Calculs des puissances dissipées par unité de volume en bioréacteur, en fonction de la vitesse d'agitation et de l'aération. Les trois chiffres pour les puissances dissipées sans aération P_0 et avec aération P_G correspondent aux puissances dissipées successives des mobiles du haut (Hélice quadripale en 3.6 L et HTGP4 en 60.0 L), intermédiaire (Turbine centripète en 3.6 L et HTGP4 en 60.0 L), et du bas (Rushton en 3.6 L et 60.0 L). La puissance dissipée par unité de volume P/V correspond à la somme des P_G.*

Dispositif	Agitation ($tr \cdot min^{-1}$)	Aération ($Nm^3 \cdot h^{-1}$)	P_0 (W)	P_G (W)	P/V ($W \cdot m^{-3}$)
Bioréacteur de laboratoire	250	0.35	0.04 + 0.14 + 0.07	0.04 + 0.14 + 0.04	**114.7**
	500	0.35	0.36 + 1.14 + 0.54	0.35+ 1.12 + 0.31	**893.1**
		0.50		0.35 + 1.11 + 0.24	**851.0**
		1.00		0.34 + 1.09 + 0.22	**823.3**
		2.00		0.32 + 1.03 + 0.18	**768.1**
	600	0.35	0.62 + 1.97 + 0.93	0.61 + 1.93 + 0.52	**1530.0**
	700	0.35	0.98 + 3.13 + 1.47	0.96 + 3.06 + 0.80	**2410.1**
		0.50		0.95 + 3.03 + 0.52	**2248.6**
Bioréacteur pilote	250	0.35	3.68 + 3.68 + 5.24	3.65 + 3.65 + 4.92	**171.4**

Chapitre 6

Discussion générale & perspectives

Cette étude s'est attelée à mesurer les effets de facteurs nutritionnels et environnementaux sur le cycle de reproduction asexuée chez une souche industrielle de *P. camemberti* croissant en milieu liquide, au niveau physiologique et génétique à l'échelle de la fiole, et au niveau physiologique à l'échelle du bioréacteur. En Erlenmeyer, après avoir identifié les paramètres influençant la macromorphologie, cette dernière a pu être reliée à une absence ou une présence de conidiophore, et par conséquent de production de conidies. Toujours dans ce type de fiole, il a été montré par une analyse globale du transcriptome que l'expression des gènes de la voie de la conidiation dépendait de la nature et de la concentration en sucre dans le milieu. Nous avons aussi identifié un facteur de transcription potentiellement impliqué dans la répression de la conidiation. Cette analyse met à la disposition de la communauté un outil qui pourra être exploité plus en détails afin de mieux comprendre les changements d'expression qui accompagne la croissance de *P. camemberti* en milieu liquide. En extrapolant la culture à l'échelle des bioréacteurs de 3 L et de 60 L, l'effet de la nature et de la concentration en sucre sur la conidiation a été confirmé, montrant l'intérêt de coupler des analyses sur petits volumes en laboratoire avec ceux plus difficiles à mettre en œuvre en bioréacteurs. Ces éléments vont être discutés dans ce chapitre, en incluant les perspectives envisagées.

6.1 Utilité du modèle en fiole et améliorations possibles

En préambule, il faut noter que *P. camemberti* est issu d'une espèce qui vivait probablement dans des milieux solides ou semi-solides. En effet, si des *Penicillium* sont régulièrement isolés d'environnements aquatiques (Liu et al., 2017; Torres-Garcia et al., 2022), il est probable que l'ancêtre de *P. camemberti* vivait en milieu terrestre, probablement dans des biotopes proches des endroits où ont été fabriqués les premiers fromages. La croissance en milieu liquide de *P. camemberti* de manière régulière date probablement du début de la production industrielle de conidies. Il est donc très probable que sa croissance et sa production de conidies ne soient pas optimales dans ces conditions. Il est envisageable qu'en modifiant les différents paramètres rencontrés en milieu liquide,

on puisse obtenir des améliorations notables dans son adaptation à ce milieu. Pour ce faire, une approche au laboratoire permettant de tester de nombreux paramètres s'est révélée concluante.

En effet, dans notre étude, les résultats obtenus en bioréacteur de 60 L ont montré que les essais préalables en fioles d'Erlenmeyer, donc à une échelle 1/240ème, ont prédit l'absence ou la présence de conidiation. Cela renforce l'intérêt pour ce modèle, qui permet par ailleurs un fort débit expérimental, donc un criblage élargi et robuste statistiquement. Mais les travaux réalisés au cours de cette thèse mettent en lumière un axe d'amélioration à apporter lors de la culture en Erlenmeyer, à savoir augmenter le pourcentage de germination en début de culture sur la production finale de conidies. En effet, le taux d'ensemencement est 10 fois plus élevé en Erlenmeyer qu'en bioréacteur, et le nombre de conidies ne germant pas est élevé. Ainsi, à 48h en milieu sucrose 10 g·L^{-1}, alors qu'aucune structure de reproduction asexuée n'est formée, des conidies sont pourtant observées, soit environ la moitié de la quantité initiale en conidies. Ces conidies sont donc vraisemblablement des conidies ensemencées. De même, en présence de 20 g·L^{-1} de glucose, concentration à laquelle on observe aussi aucun conidiophore, le nombre de conidies présentes dans le milieu à 48h est seulement très légèrement inférieur au nombre de conidies initiales. Dans ces deux milieux, les conidies semblent donc germer principalement entre 48h et 96h, puisqu'elles ne sont pas présentes en fin de culture. Cela montre une désynchronisation de la germination des conidies. Il est probable que cette désynchronisation de la germination ait également lieu en présence de 10 g·L^{-1} de glucose, mais comme des conidiophores se forment à 48h, il n'est pas possible de différencier les conidies initiales des conidies produites dans la suite de la culture. Comme il n'existe pas de différences phénotypiques entre ces spores, un marquage des conidies initiales au colorant *Nile red* (rouge du Nil) a été tenté à la fin de ma thèse, dans le but de les différencier des conidies finales non marquées. Le *Nile red* n'est pas toxique pour les champignons à faible concentration ; il est spécifiquement fluorescent dans les environnements hydrophobes et très soluble dans les lipides (Howard et al., 1993). Cette première expérience a mis en évidence la difficulté à intégrer ce colorant aux conidies initiales, afin de les différencier correctement de celles qui ont été nouvellement formées.

La désynchronisation de la germination n'a été observée qu'en milieux liquides semi-synthétiques. En effet, les quelques observations microscopiques effectués dans des milieux complexes comme le PDA ou le V8 ont montré un taux de germination de plus de 90% à 24h, ainsi qu'une coordination de cette germination, puisque les tubes germinatifs étaient de longueur similaire. Cette synchronisation en milieux complexes a cependant toujours menée à une morphologie en *pellets*, et à l'absence de production de conidies, ce qui fait qu'ils n'ont pas été choisis pour mener les expériences de RNA-seq.

Les travaux présentés dans ce manuscrit se sont focalisés principalement sur l'étape de production de conidies. Un autre phénomène en aval de la conidiation a été observé mais n'a pas été approfondi, à savoir l'autolyse du mycélium en fin de culture. Il s'agit d'un processus de mort cellulaire du mycélium fréquent chez les champignons filamenteux. Il est suspecté que cette autolyse permet la mobilisation des nutriments stockés dans le mycélium pour permettre une reproduction efficace, et plus particulièrement la reproduction sexuée, qui est absente chez *P. camemberti*, puisque toutes les souches utilisées pour la fabrication de fromage de cette espèce probablement hétérothallique ont le même type sexuel (Ropars et al., 2020).

D'un point de vue industriel, l'autolyse est utile dans de nombreux procédés en culture submergée, et entraîne diverses conséquences comme une diminution de la biomasse et une dégradation des hyphes, permettant une récolte plus facile des conidies, enzymes ou métabolites secondaires. L'autolyse est également associée à une augmentation de l'activité des hydrolases, et à une dégradation des produits potentiellement intéressants (White et al., 2002). L'étude de l'autolyse chez *P. camemberti* aurait donc un but applicatif, puisqu'elle pourrait faciliter la récolte des conidies lors du procédé industriel. Dans une étude transcriptomique de 2012, Nitsche et al. ont montré que lors d'une carence prolongée en carbone après 24h, 72h et 140h, *A. niger* présentait des caractéristiques générales d'autolyse et une surexpression au cours du temps des gènes codants pour des hydrolases, et plus particulièrement les chitinases ChiB et NagA. Ils ont également observé que concomitamment aux gènes de l'autophagie, les gènes de la conidiation sont induits au niveau transcriptionnel après la carence en glucose, avec des GO *terms* enrichis liés aux processus cataboliques et reproductifs. En 2005, Emri et al. soulignaient déjà le rôle essentiel de la voie *fluG-brlA* dans l'induction de l'autolyse du mycélium, et dans la production de chitinases et les protéinases.

Dans nos travaux chez *P. camemberti*, un noircissement de certaines hyphes apparaît dès 72h, pour atteindre l'ensemble d'entre elles trois jours plus tard. Une perte de biomasse est observée entre 96h et 140h, mais également une diminution de la concentration en conidies dans le milieu. Notre analyse transcriptomique a révélé que le gène *chiB* était surexprimé au cours du temps en condition glucose 10 $g \cdot L^{-1}$, d'un $\log_2$ fold change de 3.2 entre 96h et 48h, de 3.2 entre 140h et 96h, et de 5.6 entre 140h et 48h (**Fig. 41**). En revanche, peu d'autres gènes codants pour des enzymes autolytiques ont été identifiés. Pour que l'étude de ce phénomène soit approfondie, il faudrait trouver un moyen de quantifier de façon simple la lyse au cours des bioprocédés. Lors de nos travaux, et notamment des expériences d'extrapolation, un taux de tassement du mycélium a été calculé pour comparer le volume de biomasse et sa capacité au tassement, c'est-à-dire indirectement le niveau de lyse en cours de culture. Ces analyses donnent généralement une forte densité à 48h, et une augmentation

progressive du tassement jusqu'à 140h. Cependant, une hétérogénéité trop importante des résultats n'a pas permis d'exploiter pleinement ce critère pour le moment. Deux éléments clés à contrôler ont cependant pu être identifiés afin de pouvoir comparer les taux d'autolyse entre eux : d'une part, le temps écoulé entre le prélèvement et l'expérimentation, car l'autolyse du mycélium se poursuit hors du fermenteur de façon aléatoire, et même à température basse ; d'autre part, l'adaptation du protocole en fonction de l'échelle de l'expérimentation, puisque les différences de procédés font que la force de centrifugation appliquée à la culture pour calculer ce taux ne peut être la même entre tous les fermenteurs.

6.2 Quel mécanisme pour l'influence des sucres sur la production de conidies ?

Nos expériences ont identifié deux paramètres cruciaux de la nutrition carbonée sur la production de conidies et nos données de RNA-seq nous ont permis de les explorer plus en détail : quantité de glucose et présence de saccharose.

Une forte diminution de la production de conidies en présence de 30 $g \cdot L^{-1}$ de glucose initial par rapport à 10 $g \cdot L^{-1}$ avait déjà été observé chez *P. camemberti* (Bockelmann et al., 1999). En 1995, Skromne et al. ont montré chez *A. nidulans* qu'en présence d'une concentration initiale en glucose supérieure à 1%, l'ARNm de *brlA* ne s'accumulait pas, alors qu'une concentration de 0 à 1% induisait rapidement des niveaux élevés de *brlA*, et entraînait la formation de conidiophore et la production de conidies. En présence de fortes concentrations de glucose ou d'autres monosaccharides dans le milieu nutritif, un phénomène appelé répression catabolique du carbone (CCR) semble agir chez les champignons filamenteux. En réponse à l'abondance d'une source de carbone privilégiée, la CCR inhibe de nombreux gènes, certains codants par exemple pour des enzymes métabolisant d'autres sources de carbone présentes dans le milieu, et plus globalement ceux relatifs à l'adaptation et à la survie des espèces fongiques. La CCR est médiée par un facteur de transcription appelé CreA, dont le gène est réprimé en présence de la source de carbone privilégiée, souvent le glucose (Brown et al., 2014; Adnan et al., 2018). Cette répression catabolique a été proposée comme responsable de l'inhibition de la conidiation chez *A. nidulans* (Dowzer & Kelly, 1991) et *N. crassa* (Ebbole, 1998). Cependant, selon une autre hypothèse, cette inhibition repose sur l'effet de la carence en carbone comme mécanisme stressant promouvant l'induction de la conidiation (Roncal & Ugalde, 2003). La limitation en nutriment est reconnue comme un facteur de stress qui mène à la production de conidies, chez diverses espèces telles que *P. chrysogenum* (Righelato et al., 1968) et *A. niger* (Nitsche et al., 2012) pour le carbone, ou *P. griseofulvum* (Morton, 1961) ou *P. oxalicum* pour l'azote (Pascual

et al., 1997). Skromne et al., 1995 ont montré que des sources de carbone ne médiant pas la CCR, tels que le glycérol, l'acétate ou l'arabinose, bloquaient malgré tout l'accumulation de l'ARNm de *brlA*, et par conséquent inhibaient la conidiation. Possiblement, ces sources agissent via le stress. Une autre hypothèse pourrait être qu'une grande concentration de glucose, comme dans notre étude transcriptomique, favoriserait simplement la croissance végétative, et empêcherait un stress nutritif à 48h, malgré sa consommation complète à ce temps de la culture.

Si cette explication est satisfaisante concernant la concentration de glucose, l'inhibition de la conidiation par le saccharose reste inexpliquée dans notre étude. En effet, à la concentration de 10 $g \cdot L^{-1}$ de glucose, des conidiophores sont observés à 48h, contrairement au saccharose. L'analyse de l'expression des gènes montre bien une surexpression de deux invertases en saccharose 10 $g \cdot L^{-1}$ par rapport aux autres conditions. Fait étonnant, le mix de glucose et de fructose à 10 $g \cdot L^{-1}$ au total présente quant à lui des productions de conidiophores et de conidies similaires à celle en présence de glucose 10 $g \cdot L^{-1}$, comme si l'hydrolyse du saccharose en soi avait un lien avec l'inhibition de la conidiation. Ce phénomène a été observé en fioles pour l'ensemble des autres disaccharides et polysaccharides testés dans nos conditions. Pourtant, certaines expérimentations d'induction de la conidiation utilisent justement le saccharose comme source de carbone en présence de chlorure de calcium, notamment chez *P. notatum* (Pitt & Poole, 1981) ou *P. cyclopium* (Ugalde & Pitt, 1983).

L'identification d'un nouveau facteur de transcription potentiellement impliqué dans la répression de la conidiation chez *P. camemberti* et possiblement chez les autres *Eurotiales* est l'un des débouchés intéressants de la présente étude. En effet, nous avons montré que le gène codant le facteur de transcription à doigts de zinc PC01_011227 est surexprimé lorsqu'il n'y a pas de conidiation. À notre connaissance, ce facteur n'a été étudié chez aucune espèce. Les facteurs à doigts de zinc sont connus pour être impliqués dans des processus développementaux chez les champignons, dont la production et la maturation des conidies (Chen et al., 2022; D. Wang et al., 2023; Su et al., 2024). Il serait donc souhaitable de faire une analyse fonctionnelle de ce gène, en le délétant et en le surexprimant. Ce genre d'étude n'est pas pour l'instant faisable chez *P. camemberti* car aucun système de transformation et de modification génétique n'a été mis au point. Il faudrait donc, avant d'analyser son rôle chez *P. camemberti*, passer par l'utilisation d'un modèle comme *A. nidulans* qui est facilement manipulable génétiquement dans un premier temps. La voie de la conidiation est bien connue chez cette espèce et semble être conservée chez *P. camemberti* comme l'explicite la section suivante.

6.3 Modification génétique pour augmenter la production de conidies

En utilisant le modèle en Erlenmeyer, notre étude transcriptomique a montré que l'ensemble des gènes de la voie centrale de la conidiation, à savoir *brlA*, *abaA* et *wetA*, ainsi que les gènes *flbC* et *flbD* de la voie d'activation en amont, étaient sous-exprimés en présence d'une concentration initiale de 20 $g \cdot L^{-1}$ de glucose par rapport à une concentration initiale de 10 $g \cdot L^{-1}$ à 48h. Le sucre initial constitue l'unique source de carbone du milieu, qui est toujours consommé entièrement après 48h de culture. Notre étude transcriptomique semble donc confirmer que les gènes de la voie de la conidiation chez *P. camemberti* fonctionnent de manière similaire à ceux de l'espèce modèle *A. nidulans*. A côté de cela, seul *abaA* est sous-exprimé en présence de 10 $g \cdot L^{-1}$ de saccharose par rapport à 10 $g \cdot L^{-1}$ de glucose à 48h, suggérant qu'un autre mécanisme empêche la conidiation en présence de saccharose. Une perspective à court terme de ce projet pourrait être d'étudier les différences d'expression de certains gènes (et plus particulièrement celles du gène *abaA*) entre l'échelle fiole et l'échelle bioréacteur et de voir si elles sont conservées, comme le suggère nos analyses physiologiques, afin de confirmer que les mêmes mécanismes moléculaires sont mis en jeu.

Les connaissances et outils génétiques disponibles chez les espèces modèles facilitent évidemment les études fonctionnelles. Par exemple, la délétion du gène *brlA* chez *A. nidulans* inhibe la conidiation et permet donc de montrer le rôle crucial de ce gène dans le processus (Adams et al., 1998). Toutefois, chaque souche fongique possède ses particularités génétiques, et les problématiques d'ingénierie morphologique et d'extrapolation propre à l'espèce étudiée font qu'il faut rester prudent avant de généraliser. Avec le développement du système CRISPR/CAS9 chez plusieurs *Penicillium* (Kislitsin et al., 2024; Ropero-Pérez et al., 2024), y compris *P. roqueforti* (Seekles et al., 2021; Marcano et al., 2023), il est maintenant envisageable de mieux comprendre le processus de conidiation directement chez *P. camemberti* en modifiant ses gènes.

Au-delà de la compréhension des mécanismes de la conidiation, les travaux de cette thèse pourraient avoir des applications industrielles. Au cours des vingt dernières années, la biologie synthétique a permis l'amélioration génétique de capacités utiles chez les micro-organismes, au-delà de leurs caractéristiques natives. Si de nombreux outils génétiques et bio-informatiques existent aujourd'hui, ce domaine est plutôt sous-développé chez les champignons filamenteux par rapport aux bactéries et aux levures, notamment à cause d'une croissance lente, d'un faible débit de transformation génétique, et de la sécrétion de produits indésirables (Jo et al., 2023). Pourtant, la modification du génome fongique, en générant par exemple des *knock-out* de gènes intéressant, comme le facteur de transcription identifié dans l'étude transcriptomique, constitue, comme

l'influence des paramètres de la fermentation sur la morphologie, une stratégie de bioingénierie pour optimiser la production, ici de conidies. Par exemple, la délétion du gène *creA* chez *A. nidulans* (Alazi & Ram, 2018) a entrainé une augmentation de l'expression des CAZymes endogènes, sécrétées à l'extrémité des hyphes de champignons filamenteux en croissance pour dégrader la biomasse lignocellulosique (Floudas, 2021). On pourrait donc imaginer que la délétion du gène codant pour ce facteur de transcription pourrait aboutir à une production accrue de conidies dans des milieux divers, en particulier des milieux ayant des sources de carbone peu coûteuses.

Cependant, même si ces modifications génétiques étaient facilement réalisables chez *P. camemberti*, la réglementation européenne sur la mise sur le marché des organismes génétiquement modifiés (OGM) est extrêmement stricte, notamment pour ceux destinés à l'alimentation humaine (Regulation N°1829/2003 of the European Parliament and of the Council on Genetically Modified Food and Feed, 2003). Actuellement, aucun micro-organisme génétiquement modifié (MGM) n'est autorisé pour une utilisation directe dans un produit alimentaire (Infogm, 2023). Dans le cas de *P. camemberti*, l'ingénierie métabolique fongique ne peut donc pour l'instant s'appuyer que sur des stratégies d'optimisation des conditions impactant l'environnement de la souche, en utilisant les éventuels travaux de modifications génétiques faites uniquement dans le cadre de recherches fondamentales. Il faut cependant noter que la puissance du système CRISPR/CAS9, couplée avec les séquences complètes des mutants générés montrant une absence de modifications autres que celle voulue, pourrait à terme induire un changement réglementaire. Il resterait cependant à déterminer l'innocuité des souches produites, en particulier au niveau de leur production de métabolites secondaires potentiellement toxiques.

Pour conclure, il faut prendre en considération qu'à force de multiplier les cultures et productions industrielles, l'espèce *P. camemberti* dérive génétiquement. Elle s'adapte ainsi année après année aux nouvelles conditions qui lui sont imposées au cours du processus de production des conidies. Ainsi, les phénomènes physiologiques décrits dans nos travaux chez *P. camemberti*, et acquis au cours de sa domestication, pourraient être modifiés avec le temps. Nos observations sur les effets des sucres sur la conidiation et la croissance, valables aujourd'hui, ne le seront peut-être plus demain. En l'absence de modifications génétiques ou de reproduction sexuée, la course à la production optimale de conidies, menée contre l'adaptation de *P. camemberti* à son environnement liquide ou solide, paraît sans fin.

Références

Adams, T. H., Wieser, J. K., & Yu, J.-H. (1998). Asexual Sporulation in Aspergillus nidulans. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, *62*.

Adnan, M., Zheng, W., Islam, W., Arif, M., Abubakar, Y. S., Wang, Z., & Lu, G. (2018). Carbon Catabolite Repression in Filamentous Fungi. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(1), Article 1. https://doi.org/10.3390/ijms19010048

Akaniro, I. R., Chibuike, I. V., Onwujekwe, E. C., Gbadamosi, F. A., Enyi, D. O., & Onwe, O. N. (2023). Penicillium species as chassis for biomanufacturing and environmental sustainability in the modern era: Progress, challenges, and future perspective. *Fungal Biology Reviews*, *46*, 100326. https://doi.org/10.1016/j.fbr.2023.100326

Alazi, E., & Ram, A. F. J. (2018). Modulating Transcriptional Regulation of Plant Biomass Degrading Enzyme Networks for Rational Design of Industrial Fungal Strains. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *6*. https://doi.org/10.3389/fbioe.2018.00133

Alexa, A., Rahnenführer, J., & Lengauer, T. (2006). Improved scoring of functional groups from gene expression data by decorrelating GO graph structure. *Bioinformatics (Oxford, England)*, *22*(13), 1600–1607. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl140

Almena-Aliste, M., & Mietton, B. (2014). Cheese Classification, Characterization, and Categorization: A Global Perspective. *Microbiology Spectrum*, *2*(1), 2.1.09. https://doi.org/10.1128/microbiolspec.CM-0003-2012

Amanullah, A., Buckland, B. C., & Nienow, A. W. (2003). Mixing in the Fermentation and Cell Culture Industries. In E. L. Paul, V. A. Atiemo-Obeng, & S. M. Kresta (Eds.), *Handbook of Industrial Mixing* (1st ed., pp. 1071–1170). Wiley. https://doi.org/10.1002/0471451452.ch18

Amanullah, A., Christensen, L. H., Hansen, K., Nienow, A. W., & Thomas, C. R. (2002). Dependence of morphology on agitation intensity in fed-batch cultures of Aspergillus oryzae and its implications for recombinant protein production. *Biotechnology and Bioengineering*, *77*(7), 815–826. https://doi.org/10.1002/bit.10181

Amrane, A., Plihon, F., & Prigent, Y. (1999). *Kinetics of growth and medium de-acidi®cation for Geotrichum candidum and Penicillium camemberti cultivated on complex liquid media*.

Anderson, J. G., & Smith, J. E. (1971). The Production of Conidiophores and Conidia by Newly Germinated Conidia of Aspergillus niger (Microcycle Conidiation). *Journal of General Microbiology*, *69*(2), 185–197. https://doi.org/10.1099/00221287-69-2-185

Antecka, A., Bizukojc, M., & Ledakowicz, S. (2016). Modern morphological engineering techniques for improving productivity of filamentous fungi in submerged cultures. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *32*(12), 193. https://doi.org/10.1007/s11274-016-2148-7

Arora, S., Rani, R., & Ghosh, S. (2018). Bioreactors in solid state fermentation technology: Design, applications and engineering aspects. *Journal of Biotechnology*, *269*, 16–34. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.01.010

Baltussen, T. J. H., Zoll, J., Verweij, P. E., & Melchers, W. J. G. (2020). Molecular Mechanisms of Conidial Germination in *Aspergillus* spp. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *84*(1), e00049-19. https://doi.org/10.1128/MMBR.00049-19

Barrios, Ma. J., Medina, L. M., Lopez, Ma. C., & Jordano, R. (1998). Fungal biota isolated from Spanish cheeses. *Journal of Food Safety*, *18*(2), 151–157. Scopus. https://doi.org/10.1111/j.1745-4565.1998.tb00210.x

BBC. (2024, November 3). *Is the future of French cheese at stake?* BBC. https://www.bbc.com/travel/article/20241101-is-the-future-of-french-cheese-at-stake

Betts, J. I., & Baganz, F. (2006). Miniature bioreactors: Current practices and future opportunities. *Microbial Cell Factories*, *5*(1), 21. https://doi.org/10.1186/1475-2859-5-21

Bizukojc, M., & Ledakowicz, S. (2010). The morphological and physiological evolution of Aspergillus terreus mycelium in the submerged culture and its relation to the formation of secondary metabolites. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *26*(1), 41–54. https://doi.org/10.1007/s11274-009-0140-1

Bockelmann, W., Portius, S., Lick, S., & Heller, K. J. (1999). Sporulation of Penicillium camemberti in Submerged Batch Culture. *Systematic and Applied Microbiology*, *22*(3), 479–485. https://doi.org/10.1016/S0723-2020(99)80058-7

Böhm, J., Hoff, B., O'Gorman, C. M., Wolfers, S., Klix, V., Binger, D., Zadra, I., Kürnsteiner, H., Pöggeler, S., Dyer, P. S., & Kück, U. (2013). Sexual reproduction and mating-type–mediated strain development in the penicillin-producing fungus Penicillium chrysogenum. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(4), 1476–1481. https://doi.org/10.1073/pnas.1217943110

Borneman, A. R., Hynes, M. J., & Andrianopoulos, A. (2000). The *abaA* homologue of *Penicillium marneffei* participates in two developmental programmes: Conidiation and dimorphic growth. *Molecular Microbiology*, *38*(5), 1034–1047. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.02202.x

Boualem, K. (2008). *Influence de conditions environnementales sur la conidiation et les propriétés de surface de Penicillium camemberti*. Université de Bourgogne.

Boualem, K., Gervais, P., Cavin, J.-F., & Waché, Y. (2014). Production of conidia of Penicillium camemberti in liquid medium through microcycles of conidiation. *Biotechnology Letters*, *36*(11), 2239–2243. https://doi.org/10.1007/s10529-014-1596-0

Boualem, K., Labrie, S., Gervais, P., Waché, Y., & Cavin, J.-F. (2016). Conidiation of Penicillium camemberti in submerged liquid cultures is dependent on the nitrogen source. *Biotechnology Letters*, *38*(2), 329–335. https://doi.org/10.1007/s10529-015-1983-1

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

Büchs, J. (2001). Introduction to advantages and problems of shaken cultures. *Biochemical Engineering Journal*, *7*(2), 91–98. https://doi.org/10.1016/S1369-703X(00)00106-6

Büchs, J., Maier, U., Milbradt, C., & Zoels, B. (2000). Power consumption in shaking flasks on rotary shaking machines: I. Power consumption measurement in unbaffled flasks at low liquid viscosity.

Biotechnology and Bioengineering, *68*(6), 589–593. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(20000620)68:6<589::AID-BIT1>3.0.CO;2-J

Burkhalter, G. (1981). *Catalogue of Cheese* (No. Bulletin 141). International Dairy Federation.

Cairns, T. C., Zheng, X., Zheng, P., Sun, J., & Meyer, V. (2019). Moulding the mould: Understanding and reprogramming filamentous fungal growth and morphogenesis for next generation cell factories. *Biotechnology for Biofuels*, *12*(1), 77. https://doi.org/10.1186/s13068-019-1400-4

Calam, C. T. (1987). *Process Development in Antibiotic Fermentations*. Cambridge University Press. https://doi.org/10.1017/CBO9780511983702

Cannel, E., & Moo-Young, M. (1980). Solid-state fermentation systems. *Process Biochemistry.*, *15*(6), 24–28.

Canteri, H. (2014). *Mise au point, optimisation et extrapolation de nouveaux procédés d'agitation et d'aération aux échelles 2L, 900L et 10m3 pour les souches D. hansenii, S. carnosus et P. candidum*. Université de Lorraine.

Canteri, H., & Ghoul, M. (2015). Submerged Liquid Culture for Production of Biomass and Spores of *Penicillium*. *Food Reviews International*, *31*(3), 262–278. https://doi.org/10.1080/87559129.2015.1015136

Carlsen, M., Spohr, A. B., Nielsen, J., & Villadsen, J. (1996). Morphology and physiology of an alpha-amylase producing strain of Aspergillus oryzae during batch cultivations. *Biotechnology and Bioengineering*, *49*(3), 266–276. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19960205)49:3<266::AID-BIT4>3.0.CO;2-I

Chen, J.-F., Tan, J.-J., Wang, J.-Y., Mao, A.-J., Xu, X.-P., Zhang, Y., Zheng, X.-L., Liu, Y., Jin, D., Li, X.-B., & Fan, Y.-H. (2022). The Zinc Finger Transcription Factor BbCmr1 Regulates Conidium Maturation in Beauveria bassiana. *Microbiology Spectrum*, *10*(1), e0206621. https://doi.org/10.1128/spectrum.02066-21

Chevalot, I. (2017). *Extrapolation des procédés de culture de cellules animales*.

Clutterbuck, A. J. (1969). Cell Volume per Nucleus in Haploid and Diploid Strains of Aspergillus Nidulans. *Journal of General Microbiology*, *55*(2), 291–299. https://doi.org/10.1099/00221287-55-2-291

CNN. (2024, March 6). *France's favorite cheese is facing an 'extinction' crisis*. CNN. https://www.cnn.com/travel/camembert-extinction-crisis-scn/index.html

Codex Alimentarius. (1978). *General standard for cheese*. https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCXS%2B283-1978%252FCXS_283e.pdf

Cox, P. W., Paul, G. C., & Thomas, C. R. (1998). Image analysis of the morphology of filamentous micro-organisms. *Microbiology*, *144*(4), 817–827. https://doi.org/10.1099/00221287-144-4-817

Crequer, E., Ropars, J., Jany, J., Caron, T., Coton, M., Snirc, A., Vernadet, J., Branca, A., Giraud, T., & Coton, E. (2023). A new cheese population in *Penicillium roqueforti* and adaptation of the five populations

to their ecological niche. *Evolutionary Applications*, *16*(8), 1438–1457. https://doi.org/10.1111/eva.13578

Croisille, J.-M. (2015). Natures mortes dans la Rome antique. Naissance d'un genre artistique. *L'Antiquité Classique*, *85*(1), 623–624.

Cui, Y. Q., van der Lans, R. G. J. M., & Luyben, K. Ch. A. M. (1996). Local power uptake in gas-liquid systems with single and multiple rushton turbines. *Chemical Engineering Science*, *51*(11), 2631–2636. https://doi.org/10.1016/0009-2509(96)00128-5

Cui, Y. Q., Van der Lans, R. G. J. M., & Luyben, K. Ch. A. M. (1998). Effects of dissolved oxygen tension and mechanical forces on fungal morphology in submerged fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, *57*(4), 409–419. Scopus. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19980220)57:4<409::AID-BIT4>3.0.CO;2-Q

Der Spiegel. (2024, February 22). Naht das Ende des Camemberts? *Der Spiegel*. https://www.spiegel.de/wissenschaft/kaese-forscherteam-spricht-vom-ende-des-camembert-pilzes-a-40125cef-0400-477a-bfd2-593b0fa86503

DeSalle, R., Egan, M. G., & Siddall, M. (2005). The unholy trinity: Taxonomy, species delimitation and DNA barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. https://doi.org/10.1098/rstb.2005.1722

Desfleurs, M. (1968). Le *Penicillium camemberti* et les origines du camembert. *Le Lait*, *48*(478), 493–500. https://doi.org/10.1051/lait:196847824

Dhakar, K., Sharma, A., & Pandey, A. (2014). Cold, pH and salt tolerant Penicillium spp. Inhabit the high altitude soils in Himalaya, India. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *30*(4), 1315–1324. https://doi.org/10.1007/s11274-013-1545-4

Dowzer, C. E., & Kelly, J. M. (1991). Analysis of the creA gene, a regulator of carbon catabolite repression in Aspergillus nidulans. *Molecular and Cellular Biology*, *11*(11), 5701–5709.

Drougard, M. (2018). *Compréhension et contrôle de la morphologie des champignons filamenteux en milieu liquide*.

Dumas, E., Feurtey, A., Rodríguez de la Vega, R. C., Le Prieur, S., Snirc, A., Coton, M., Thierry, A., Coton, E., Le Piver, M., Roueyre, D., Ropars, J., Branca, A., & Giraud, T. (2020). Independent domestication events in the blue-cheese fungus Penicillium roqueforti. *Molecular Ecology*, *29*(14), 2639–2660. https://doi.org/10.1111/mec.15359

Dyer, P. S., & O'Gorman, C. M. (2011). A fungal sexual revolution: Aspergillus and Penicillium show the way. *Current Opinion in Microbiology*, *14*(6), 649–654. https://doi.org/10.1016/j.mib.2011.10.001

Ebbole, D. J. (1998). Carbon Catabolite Repression of Gene Expression and Conidiation inNeurospora crassa. *Fungal Genetics and Biology*, *25*(1), 15–21. https://doi.org/10.1006/fgbi.1998.1088

Edelstein, L., & Hadar, Y. (1983). A model for pellet size distributions in submerged mycelial cultures. *Journal of Theoretical Biology*, *105*(3), 427–452. https://doi.org/10.1016/0022-5193(83)90185-6

Egbuta, M., Mwanza, M., & Babalola, O. (2017). Health Risks Associated with Exposure to Filamentous Fungi. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *14*(7), 719. https://doi.org/10.3390/ijerph14070719

El País. (2025, February 11). *¿El fin del queso camembert? Cómo el declive de la biodiversidad afecta a lo que comemos*. El País. https://elpais.com/ciencia/2025-02-11/el-fin-del-queso-camembert-como-el-declive-de-la-biodiversidad-afecta-a-lo-que-comemos.html

Emri, Molnar, Pusztahelyi, Varecza, & Pocsi. (2005). *The FluG-BrlA pathway contributes to the initialisation*.

Emri, T., Molnár, Z., Szilágyi, M., & Pócsi, I. (2008). Regulation of Autolysis in Aspergillus nidulans. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *151*(2–3), 211–220. https://doi.org/10.1007/s12010-008-8174-7

Etxebeste, O., Garzia, A., Espeso, E. A., & Ugalde, U. (2010). Aspergillus nidulans asexual development: Making the most of cellular modules. *Trends in Microbiology*, *18*(12), 569–576. https://doi.org/10.1016/j.tim.2010.09.007

Floudas, D. (2021). Chapter Two—Evolution of lignin decomposition systems in fungi. In M. Morel-Rouhier & R. Sormani (Eds.), *Advances in Botanical Research* (Vol. 99, pp. 37–76). Academic Press. https://doi.org/10.1016/bs.abr.2021.05.003

Fox, E. M., & Howlett, B. J. (2008). Secondary metabolism: Regulation and role in fungal biology. *Current Opinion in Microbiology*, *11*(6), 481–487. https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.10.007

Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M., & McSweeney, P. L. H. (2017). *Fundamentals of Cheese Science*. Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-7681-9

Frisvad, J. C., & Thrane, U. (1987). *STANDARDIZED HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY OF 182 MYCOTOXINS AND OTHER FUNGAL METABOLITES BASED ON ALKYLPHENONE RETENTION INDICES AND UV-VIS SPECTRA (DIODE ARRAY DETECTION)*.

Garzia, A., Etxebeste, O., Herrero-García, E., Ugalde, U., & Espeso, E. A. (2010). The concerted action of bZip and cMyb transcription factors FlbB and FlbD induces *brlA* expression and asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Molecular Microbiology*, *75*(5), 1314–1324. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07063.x

Geissmann, Q. (2013). OpenCFU, a new free and open-source software to count cell colonies and other circular objects. *PloS One*, *8*(2), e54072. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054072

Giraud, F., Giraud, T., Aguileta, G., Fournier, E., Samson, R., Cruaud, C., Lacoste, S., Ropars, J., Tellier, A., & Dupont, J. (2010). Microsatellite loci to recognize species for the cheese starter and contaminating strains associated with cheese manufacturing. *International Journal of Food Microbiology*, *137*(2–3), 204–213. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.11.014

Gogate, P. R., Beenackers, A. A. C. M., & Pandit, A. B. (2000). Multiple-impeller systems with a special emphasis on bioreactors: A critical review. *Biochemical Engineering Journal*, *6*(2), 109–144. https://doi.org/10.1016/S1369-703X(00)00081-4

Gowthaman, M. K., Krishna, C., & Moo-Young, M. (2001). Fungal solid state fermentation—An overview. In *Applied Mycology and Biotechnology* (Vol. 1, pp. 305–352). Elsevier. https://doi.org/10.1016/S1874-5334(01)80014-9

Grishagin, I. V. (2015). Automatic cell counting with ImageJ. *Analytical Biochemistry*, *473*, 63–65. https://doi.org/10.1016/j.ab.2014.12.007

Grossmann, S., Bauer, S., Robinson, P. N., & Vingron, M. (2007). Improved detection of overrepresentation of Gene-Ontology annotations with parent–child analysis. *Bioinformatics*, *23*(22), 3024–3031. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm440

Harbutt, J. (2015). *World Cheese Book*. DK Publishing.

Hardy, N. (2016). *Identification des critères d'extrapolation du procédé de production de cellulases par Trichoderma reesei en utilisant l'approche `` scale-down ' '*.

Hashimoto, H., Iwaasa, T., & Yokotsuka, T. (1972). Thermostable Acid Protease Produced by Penicillium duponti K1014, a True Thermophilic Fungus Newly Isolated from Compost. *APPL . M ICROBIOL .*, *24*.

Hermet, A., Méheust, D., Mounier, J., Barbier, G., & Jany, J.-L. (2012). Molecular systematics in the genus Mucor with special regards to species encountered in cheese. *Fungal Biology*, *116*(6), 692–705. https://doi.org/10.1016/j.funbio.2012.04.002

Hickey, M. (2017). Chapter 21 Current Legislation on Cheese. In *Fundamentals of Cheese Science*. Springer US.

Hille, A., Neu, T. R., Hempel, D. C., & Horn, H. (2009). *Effective diffusivities and mass fluxes in fungal biopellets*. https://analyticalsciencejournals-onlinelibrary-wiley-com.ezproxy.u-paris.fr/doi/10.1002/bit.22351

Houbraken, J., Kocsubé, S., Visagie, C. M., Yilmaz, N., Wang, X.-C., Meijer, M., Kraak, B., Hubka, V., Bensch, K., Samson, R. A., & Frisvad, J. C. (2020). Classification of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* and related genera (*Eurotiales*): An overview of families, genera, subgenera, sections, series and species. *Studies in Mycology*, *95*, 5–169. https://doi.org/10.1016/j.simyco.2020.05.002

Howard, K. M., Smart, M. G., & Bothast, R. J. (1993). *A Novel Method for Identifying New Conidia in Submerged Liquid Culture*.

Infogm. (2023). *Les micro-organismes génétiquement modifiés – Inf'OGM*. https://infogm.org/les-themes/les-ogm-generalite/les-micro-organismes-genetiquement-modifies/

International Dairy Federation. (2023). *The World Dairy Situation Report 2023*. https://milksa.co.za/sites/default/files/2024-01/2023%20World%20Dairy%20Situation%20Report.pdf

Jo, C., Zhang, J., Tam, J. M., Church, G. M., Khalil, A. S., Segrè, D., & Tang, T.-C. (2023). Unlocking the magic in mycelium: Using synthetic biology to optimize filamentous fungi for biomanufacturing and sustainability. *Materials Today Bio*, *19*, 100560. https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2023.100560

Jung, B., Kim, S., & Lee, J. (2014). Microcyle Conidiation in Filamentous Fungi. *Mycobiology*, *42*(1), 1–5. https://doi.org/10.5941/MYCO.2014.42.1.1

Kar, T., Delvigne, F., Destain, J., & Thonart, P. (2011). Bioreactor scale-up and design on the basis of physiologically relevant parameters: Application to the production of lipase by yarrowia lipolytica. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*

Kawase, Y., Halard, B., & Moo-Young, M. (1987). Theoretical prediction of volumetric mass transfer coefficients in bubble columns for Newtonian and non-Newtonian fluids. *Chemical Engineering Science*, *42*(7), 1609–1617. https://doi.org/10.1016/0009-2509(87)80165-3

Kim, D., Paggi, J. M., Park, C., Bennett, C., & Salzberg, S. L. (2019). Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype. *Nature Biotechnology*, *37*(8), 907–915. https://doi.org/10.1038/s41587-019-0201-4

Kim, W.-K., Sang, H.-K., Woo, S.-K., Park, M.-S., Paul, N. C., & Yu, S.-H. (2007). Six Species of Penicillium Associated with Blue Mold of Grape. *Mycobiology*, *35*(4), 180–185. https://doi.org/10.4489/MYCO.2007.35.4.180

Kislitsin, V. Y., Chulkin, A. M., Dotsenko, A. S., Sinelnikov, I. G., Sinitsyn, A. P., & Rozhkova, A. M. (2024). The role of intracellular β-glucosidase in cellulolytic response induction in filamentous fungus Penicillium verruculosum. *Research in Microbiology*, *175*(4), 104178. https://doi.org/10.1016/j.resmic.2023.104178

Krasniewski, I., Molimard, P., Feron, G., Vergoignan, C., Durand, A., Cavin, J.-F., & Cotton, P. (2006). Impact of solid medium composition on the conidiation in Penicillium camemberti. *Process Biochemistry*, *41*(6), 1318–1324. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.01.005

Krishna, C. (2005). Solid-State Fermentation Systems—An Overview. *Critical Reviews in Biotechnology*, *25*(1–2), 1–30. https://doi.org/10.1080/07388550590925383

Krull, Cordes, Horn, Kampen, Kwade, Neu, & Nortemann. (2010). *Morphology of filamentous fungi: Linking Cellular Biology to Process Engineering Using Aspergillus niger*. https://scholar.google.com/scholar_lookup?&title=Morphology%20of%20filamentous%20fungi%20-%20Linking%20cellular%20biology%20to%20process%20engineering%20using%20Aspergillus%20niger&journal=Adv%20Biochem%20Eng%2FBiotechnol&volume=121&issue=116&pages=1-21&publication_year=2010&author=Krull%2CR&author=Cordes%2CC&author=Horn%2CH&author=Kampen%2CI&author=Kwade%2CA&author=Neu%2CTR&author=N%C3%B6rtemann%2CB

Krull, R., Wucherpfennig, T., Esfandabadi, M. E., Walisko, R., Melzer, G., Hempel, D. C., Kampen, I., Kwade, A., & Wittmann, C. (2013). Characterization and control of fungal morphology for improved production performance in biotechnology. *Journal of Biotechnology*, *163*(2), 112–123. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.06.024

Larroche, C., Desfarges, C., & Gros, J.-B. (1988). Optimization of the spore production of Penicillium roqueforti in solid substrate fermentation on buckwheat seeds. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *28*(1). https://doi.org/10.1007/BF00250504

Leclercq-Perlat, M.-N., Buono, F., Lambert, D., Latrille, E., Spinnler, H.-E., & Corrieu, G. (2004). Controlled production of Camembert-type cheeses. Part I: Microbiological and physicochemical evolutions. *Journal of Dairy Research*, *71*(3), 346–354. https://doi.org/10.1017/S0022029904000196

Lee, B. N., & Adams, T. H. (1994). The Aspergillus nidulans fluG gene is required for production of an extracellular developmental signal and is related to prokaryotic glutamine synthetase I. *Genes & Development*, *8*(6), 641–651. https://doi.org/10.1101/gad.8.6.641

Lenoir, J., Lamberet, G., & Schmidt, J. L. (1983). L'élaboration d'un fromage: L'exemple du Camembert. *Pour la science*, *69*, 30.

Liao, Y., Smyth, G. K., & Shi, W. (2014). featureCounts: An efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics (Oxford, England)*, *30*(7), 923–930. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt656

Lin, P.-J., Scholz, A., & Krull, R. (2010). Effect of volumetric power input by aeration and agitation on pellet morphology and product formation of *Aspergillus niger*. *Biochemical Engineering Journal*, *49*(2), 213–220. https://doi.org/10.1016/j.bej.2009.12.016

Link, J. H. F. (1809). Observationes in ordines plantarum naturales. *Gesellschaft Naturforschender Freunde Zu Berlin, Magazin*, *3(1): 3-42*. https://biotanz.landcareresearch.co.nz/references/1cb0f202-36b9-11d5-9548-00d0592d548c

Liu, S., Su, M., Song, S.-J., & Jung, J. H. (2017). Marine-Derived Penicillium Species as Producers of Cytotoxic Metabolites. *Marine Drugs*, *15*(10), 329. https://doi.org/10.3390/md15100329

Lortal, S. (2017). *The Oxford Companion to Cheese*. Oxford University Press. https://www.oxfordreference.com/display/10.1093/acref/9780199330881.001.0001/acref-9780199330881-e-348

Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, *15*(12), 550. https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8

Machon, V., Vleck, J., & Shrivaneck, J. (1985). *Dual impeller systems for aeration of liquids: An experimental study*.

Makarova, K., Slesarev, A., Wolf, Y., Sorokin, A., Mirkin, B., Koonin, E., Pavlov, A., Pavlova, N., Karamychev, V., Polouchine, N., Shakhova, V., Grigoriev, I., Lou, Y., Rohksar, D., Lucas, S., Huang, K., Goodstein, D. M., Hawkins, T., Plengvidhya, V., … Mills, D. (2006). Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(42), 15611–15616. https://doi.org/10.1073/pnas.0607117103

Malassez, L. (1842-1909) A. du texte. (1873). *De la Numération des globules rouges du sang. I. Des méthodes de numération. II. De la richesse du sang en globules rouges dans les différentes parties de l'arbre circulatoire. Par L. Malassez,...* https://gallica.bnf.fr/ark:/12148/bpt6k6281995s

Marcano, Y., Montanares, M., Gil-Durán, C., González, K., Levicán, G., Vaca, I., & Chávez, R. (2023). PrlaeA Affects the Production of Roquefortine C, Mycophenolic Acid, and Andrastin A in Penicillium roqueforti, but It Has Little Impact on Asexual Development. *Journal of Fungi (Basel, Switzerland)*, *9*(10), 954. https://doi.org/10.3390/jof9100954

Marques, M. P. C., Cabral, J. M. S., & Fernandes, P. (2010). Bioprocess scale-up: Quest for the parameters to be used as criterion to move from microreactors to lab-scale. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, *85*(9), 1184–1198. https://doi.org/10.1002/jctb.2387

Marshall, M. A., & Timberlake, W. E. (1991). Aspergillus nidulans wetA Activates Spore-Specific Gene Expression. *MOL. CELL. BIOL.*

Martinelli, S. D. (1976). *Conidiation of Aspergillus nidulans in submerged culture*.

McIntyre, M., Müller, C., Dynesen, J., & Nielsen, J. (2001). *Metabolic Engineering of the Morphology of Aspergillus*.

McNeil, B., & Harvey, L. M. (2008). *Practical fermentation technology* (Wiley).

McRae, C. F., Hocking, A. D., & Seppelt, R. D. (1999). Penicillium species from terrestrial habitats in the Windmill Islands, East Antarctica, including a new species, Penicillium antarcticum. *Polar Biology*, *21*(2), 97–111. https://doi.org/10.1007/s003000050340

McSweeney, P. L. H. (2004). Biochemistry of cheese ripening. *International Journal of Dairy Technology*, *57*(2–3), 127–144. https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2004.00147.x

McSweeney, P. L. H., & Sheehan, J. J. (2007). *Cheese Problems Solved*.

Melin, P., Schnürer, J., & Wagner, E. G. H. (2003). Characterization of phiA, a gene essential for phialide development in Aspergillus nidulans. *Fungal Genetics and Biology*, *40*(3), 234–241. https://doi.org/10.1016/S1087-1845(03)00108-7

Meusel, W., Löffelholz, C., Husemann, U., Dreher, T., Greller, G., Kauling, J., Eibl, D., Kleebank, S., Bauer, I., Glöckler, R., Huber, P., Kuhlmann, W., John, G. T., Werner, S., Kaiser, S. C., Pörtner, R., & Kraume, M. (2016). Recommendations for process engineering characterisation of single-use bioreactors and mixing systems by using experimental methods. . . *Background*.

Meyer, V., Cairns, T., Barthel, L., King, R., Kunz, P., Schmideder, S., Müller, H., Briesen, H., Dinius, A., & Krull, R. (2021). Understanding and controlling filamentous growth of fungal cell factories: Novel tools and opportunities for targeted morphology engineering. *Fungal Biology and Biotechnology*, *8*(1), 8. https://doi.org/10.1186/s40694-021-00115-6

Michel, B. J., & Miller, S. A. (1962). Power Requirements of Gas-Liquid Agitated Systems. *A.1.Ch.E. Journal*, *University of Rochester*.

Moreau, C. (1979). Nomenclature des *Penicillium* utiles à la préparation du Camembert. *Le Lait*, *59*(585–586), 219–233. https://doi.org/10.1051/lait:1979585-58611

Morton, A. G. (1961). The induction of sporulation in mould fungi. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*, *153*(953), 548–569. https://doi.org/10.1098/rspb.1961.0018

Morton, A. G., England, D. J. F., & Towler, D. A. (1958). The physiology of sporulation in Penicillium griseofulvum Dierckx. *Transactions of the British Mycological Society*, *41*(1), 39–51. https://doi.org/10.1016/S0007-1536(58)80004-2

Nielsen, J. (1996). Modelling the morphology of filamentous microorganisms. *Trends in Biotechnology*, *14*(11), 438–443. Scopus. https://doi.org/10.1016/0167-7799(96)10055-X

Nienow, A. W. (2014). *Stirring and Stirred-Tank Reactors*.

Nitsche, B. M., Jørgensen, T. R., Akeroyd, M., Meyer, V., & Ram, A. F. (2012). The carbon starvation response of Aspergillus niger during submerged cultivation: Insights from the transcriptome and secretome. *BMC Genomics*, *13*(1), 380. https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-380

Orieux, F., Giovannelli, J.-F., & Rodet, T. (2010). Bayesian estimation of regularization and point spread function parameters for Wiener–Hunt deconvolution. *JOSA A*, *27*(7), 1593–1607. https://doi.org/10.1364/JOSAA.27.001593

Panda, T. (2011). *Penicillium abundance and diversity patterns associated with cashew plantations in coastal sand dunes, Odisha, India*.

Papagianni, M. (2004). Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnology Advances*, *22*(3), 189–259. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2003.09.005

Papagianni, M., Mattey, M., & Kristiansen, B. (1999). The influence of glucose concentration on citric acid production and morphology of Aspergillus niger in batch and culture. *Enzyme and Microbial Technology*, *25*(8–9), 710–717. https://doi.org/10.1016/S0141-0229(99)00102-7

Papagianni, M., & Papamichael, E. M. (2007). Modeling growth, substrate consumption and product formation of Penicillium nalgiovense grown on meat simulation medium in submerged batch culture. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *34*(3), 225–231. https://doi.org/10.1007/s10295-006-0190-4

Park, H.-S., & Yu, J.-H. (2012). Genetic control of asexual sporulation in filamentous fungi. *Current Opinion in Microbiology*, *15*(6), 669–677. https://doi.org/10.1016/j.mib.2012.09.006

Pascual, S., Melgarejo, P., & Magan, N. (1997). Induction of submerged conidiation of the biocontrol agent Penicillium oxalicum. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *48*(3), 389–392. https://doi.org/10.1007/s002530051068

Paul, G. C., & Thomas, C. R. (1998). Characterisation of mycelial morphology using image analysis. In K. Schügerl (Ed.), *Relation Between Morphology and Process Performances* (Vol. 60, pp. 1–59). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/BFb0102278

Pazout, J., & Schroder, P. (1988). Microcycle Conidiation in Submerged Cultures of Penicillium cyclopium Attained without Temperature Changes. *Microbiology*, *134*(10), 2685–2692. https://doi.org/10.1099/00221287-134-10-2685

Perrone, G., Samson, R. A., Frisvad, J. C., Susca, A., Gunde-Cimerman, N., Epifani, F., & Houbraken, J. (2015). *Penicillium salamii*, a new species occurring during seasoning of dry-cured meat. *International Journal of Food Microbiology*, *193*, 91–98. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.10.023

Petit, P., Lucas, E. M. F., Abreu, L. M., Pfenning, L. H., & Takahashi, J. A. (2009). Novel antimicrobial secondary metabolites from a Penicillium sp. Isolated from Brazilian cerrado soil. *Electronic Journal of Biotechnology*, *12*(4), 8–9. https://doi.org/10.4067/S0717-34582009000400008

Petříček, R., Moucha, T., Kracík, T., & Haidl, J. (2019). Power consumption prediction in a coalescent liquid in mechanically agitated gas–liquid reactors. *Chemical Engineering Research and Design*, *147*, 644–647. https://doi.org/10.1016/j.cherd.2019.05.011

Pitt, J. (1979). *The genus Penicillium and its teleomorphic states Eupenicillium and Talaromyces*. https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=The%20genus%20Penicillium%20and%20its%20teleomorphic%20states%20Eupenicillium%20and%20Talaromyces&publication_year=1979&author=J.I.%20Pitt

Pitt, & Poole, P. C. (1981). Calcium-induced conidiation in Penicillium notatum in submerged culture. *Transactions of the British Mycological Society*, *76*(2), 219–230. https://doi.org/10.1016/S0007-1536(81)80142-8

Poulsen, B. R. (2005). *Characterization of pathway engineered strains of filamentous fungi in submerged cultures*.

Prade, R. A., & Timberlake, W. E. (1994). *The Penicillium chryogenum and Aspergillu nidulans wetA developmental regulatory genes are functionally equivalent*.

Rabha, J., & Jha, D. K. (2018). Metabolic Diversity of Penicillium. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering* (pp. 217–234). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63501-3.00012-0

Regulation N°1829/2003 of the European Parliament and of the Council on Genetically Modified Food and Feed (2003). http://data.europa.eu/eli/reg/2003/1829/2021-03-27/eng

RFI. (2024, February 20). *Le camembert et le roquefort sont-ils en voie de disparition?* RFI. https://www.rfi.fr/fr/france/20240220-le-camembert-et-le-roquefort-sont-ils-en-voie-de-disparition

Righelato, R. C., Trinci, A. P. J., Pirt, S. J., & Peat, A. (1968). The Influence of Maintenance Energy and Growth Rate on the Metabolic Activity, Morphology and Conidiation of Penicillium chrysogenum. *Microbiology*, *50*(3), 399–412. https://doi.org/10.1099/00221287-50-3-399

Roncal, T., & Ugalde, U. (2003). Conidiation induction in Penicillium. *Research in Microbiology*, *154*(8), 539–546. https://doi.org/10.1016/S0923-2508(03)00168-2

Ropars, J., Cruaud, C., Lacoste, S., & Dupont, J. (2012). A taxonomic and ecological overview of cheese fungi. *International Journal of Food Microbiology*, *155*(3), 199–210. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.02.005

Ropars, J., Didiot, E., Rodríguez De La Vega, R. C., Bennetot, B., Coton, M., Poirier, E., Coton, E., Snirc, A., Le Prieur, S., & Giraud, T. (2020). Domestication of the Emblematic White Cheese-Making Fungus Penicillium camemberti and Its Diversification into Two Varieties. *Current Biology*, *30*(22), 4441-4453.e4. https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.08.082

Ropars, J., Dupont, J., Fontanillas, E., Rodríguez De La Vega, R. C., Malagnac, F., Coton, M., Giraud, T., & López-Villavicencio, M. (2012). Sex in Cheese: Evidence for Sexuality in the Fungus Penicillium roqueforti. *PLoS ONE*, *7*(11), e49665. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049665

Ropars, J., López-Villavicencio, M., Dupont, J., Snirc, A., Gillot, G., Coton, M., Jany, J., Coton, E., & Giraud, T. (2014). Induction of sexual reproduction and genetic diversity in the cheese fungus *P enicillium roqueforti* . *Evolutionary Applications*, *7*(4), 433–441. https://doi.org/10.1111/eva.12140

Ropero-Pérez, C., Marcos, J. F., Manzanares, P., & Garrigues, S. (2024). Increasing the efficiency of CRISPR/Cas9-mediated genome editing in the citrus postharvest pathogen Penicillium digitatum. *Fungal Biology and Biotechnology*, *11*(1), 8. https://doi.org/10.1186/s40694-024-00179-0

Roque, T., Delettre, J., Hardy, N., Nienow, A. W., Augier, F., Ben Chaabane, F., & Béal, C. (2021). The impact of fluid-dynamic stress in stirred tank bioreactors on the synthesis of cellulases by *Trichoderma reesei* at the intracellular and extracellular levels. *Chemical Engineering Science*, *232*, 116353. https://doi.org/10.1016/j.ces.2020.116353

Ruger-Herreros, C., & Corrochano, L. M. (2020). Conidiation in Neurospora crassa: Vegetative reproduction by a model fungus. *International Microbiology*, *23*(1), 97–105. https://doi.org/10.1007/s10123-019-00085-1

Ruger-Herreros, C., Rodríguez-Romero, J., Fernández-Barranco, R., Olmedo, M., Fischer, R., Corrochano, L. M., & Canovas, D. (2011). Regulation of Conidiation by Light in Aspergillus nidulans. *Genetics*, *188*(4), 809–822. https://doi.org/10.1534/genetics.111.130096

Sandine, W., & Elliker, P. (1970). *Microbially induced fl avors and fermented foods: Fl avor in fermented dairy products*.

Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, *9*(7), 671–675. https://doi.org/10.1038/nmeth.2089

Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., Chen, W., Fungal Barcoding Consortium, Fungal Barcoding Consortium Author List, Bolchacova, E., Voigt, K., Crous, P. W., Miller, A. N., Wingfield, M. J., Aime, M. C., An, K.-D., Bai, F.-Y., Barreto, R. W., Begerow, D., … Schindel, D. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(16), 6241–6246. https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109

Schröder, P. (1978). Aufhebung der Glucoserepression auf die Zellspezialisierung durch Citrat und Ca++ in submersen Kulturen von Penicillium cyclopium. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen*, *172*(1–2), 161–166. https://doi.org/10.1016/S0015-3796(17)30370-0

Scott, R., Robinson, R. K., & Wilbey, R. A. (1998). *Cheesemaking Practice*. Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-5819-4

Seekles, S. J., Teunisse, P. P. P., Punt, M., van den Brule, T., Dijksterhuis, J., Houbraken, J., Wösten, H. A. B., & Ram, A. F. J. (2021). Preservation stress resistance of melanin deficient conidia from Paecilomyces variotii and Penicillium roqueforti mutants generated via CRISPR/Cas9 genome editing. *Fungal Biology and Biotechnology*, *8*(1), 4. https://doi.org/10.1186/s40694-021-00111-w

Seo, J.-A., Guan, Y., & Yu, J.-H. (2006). FluG-Dependent Asexual Development in *Aspergillus nidulans* Occurs via Derepression. *Genetics*, *172*(3), 1535–1544. https://doi.org/10.1534/genetics.105.052258

Sewall, T. C., Mims, C. W., & Timberlake. (1990). abaA Controls Phialide Differentiation in Aspergillus nidulans. *The Plant Cell*.

Silar, P. (2016). *Protistes Eucaryotes: Origine, évolution et biologie des microbes eucaryotes*. Creative Commons.

Skromne, I., Sanchez, O., & Aguirre, J. (1995). Starvation stress modulates the expression of the Aspergillus nidulans brlA regulatory gene. *Microbiology*, *141*(1), 21–28. https://doi.org/10.1099/00221287-141-1-21

Son, Y.-E., Yu, J.-H., & Park, H.-S. (2023). *Regulators of the Asexual Life Cycle of Aspergillus nidulans*.

Springer, M. L. (1993). Genetic control of fungal differentiation: The three sporulation pathways of *Neurospora crassa*. *BioEssays*, *15*(6), 365–374. https://doi.org/10.1002/bies.950150602

Springer, M. L., & Yanofsky, C. (1989). A morphological and genetic analysis of conidiophore development in Neurospora crassa. *Genes & Development*, *3*(4), 559–571. https://doi.org/10.1101/gad.3.4.559

Stocco, G., Casali, D., Summer, A., Mariani, E., Concar, E., Lantz, S., Goodwins, J., & Cipolat-Gotet, C. (2025). Effects of animal rennet, fermentation-produced chymosin, and microbial coagulants on bovine milk coagulation properties. *Journal of Dairy Science*. https://doi.org/10.3168/jds.2024-26167

Stocks, S. M. (2013). *Industrial Enzyme Production: Process Scale up / Scale down*.

Strong, P. J., Self, R., Allikian, K., Szewczyk, E., Speight, R., O'Hara, I., & Harrison, M. D. (2022). Filamentous fungi for future functional food and feed. *Current Opinion in Biotechnology*, *76*, 102729. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2022.102729

Su, J., Wang, J., Tang, J., Yu, W., Liu, J., Dong, X., Dong, J., Chai, X., Ji, P., & Zhang, L. (2024). Zinc finger transcription factor ZFP1 is associated with growth, conidiation, osmoregulation, and virulence in the Polygonatum kingianum pathogen Fusarium oxysporum. *Scientific Reports*, *14*(1), 16061. https://doi.org/10.1038/s41598-024-67040-7

Taylor, J. W., Jacobson, D. J., & Fisher, M. C. (1999). THE EVOLUTION OF ASEXUAL FUNGI: Reproduction, Speciation and Classification. *Annual Review of Phytopathology*, *37*, 197–246. https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.37.1.197

Thom, C. (1930). *The Penicillia.* https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=The%20Penicillia&publication_year=1930&author=C.%20Thom#d=gs_cit&t=1741601436941&u=%2Fscholar%3Fq%3Dinfo%3AD4DOmTcoz0J%3Ascholar.google.com%2F%26output%3Dcite%26scirp%3D0%26hl%3Dfr

Timberlake, W. E., Boylan, M. T., Willett, C. E., & Zimmerman, C. R. (1987). *Isolation and physical characterization of three essential conidiation genes from Aspergillus nidulans*.

Torres-Garcia, D., Gené, J., & García, D. (2022). New and interesting species of Penicillium (Eurotiomycetes, Aspergillaceae) in freshwater sediments from Spain. *MycoKeys*, *86*, 103–145. https://doi.org/10.3897/mycokeys.86.73861

Tucker, K. G., & Thomas, C. R. (1992). Mycelial morphology: The effect of spore inoculum level. *Biotechnology Letters*, *14*(11), 1071–1074. https://doi.org/10.1007/BF01021061

Ugalde, U., & Pitt, D. (1983). Morphology and calcium-induced conidiation of Penicillium cyclopium in submerged culture. *Transactions of the British Mycological Society*, *80*(2), 319–325. https://doi.org/10.1016/S0007-1536(83)80016-3

Valle, M., Nguyen Van Long, N., Jany, J.-L., Koullen, L., Rigalma, K., Vasseur, V., Huchet, V., & Coroller, L. (2023). Impact of sodium chloride and carbon dioxide on conidial germination and radial growth of Penicillium camemberti. *Food Microbiology*, *115*, 104309. https://doi.org/10.1016/j.fm.2023.104309

van Leeuwen, R. (2009). *Natamycin and the germinating spore*.

Veiter, L., Rajamanickam, V., & Herwig, C. (2018). The filamentous fungal pellet—Relationship between morphology and productivity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *102*(7), 2997–3006. https://doi.org/10.1007/s00253-018-8818-7

Vézina, C., Singh, K., & Sehgal, S. N. (1965). *Sporulation of Filamentous Fungi in Submerged Culture*.

Visagie, C. M., Houbraken, J., Frisvad, J. C., Hong, S.-B., Klaassen, C. H. W., Perrone, G., Seifert, K. A., Varga, J., Yaguchi, T., & Samson, R. A. (2014). Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Studies in Mycology*, *78*(1), 343–371. https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.09.001

Walsh, T. J., Groll, A., Hiemenz, J., Fleming, R., Roilides, E., & Anaissie, E. (2004). Infections due to emerging and uncommon medically important fungal pathogens. *Clinical Microbiology and Infection*, *10*, 48–66. https://doi.org/10.1111/j.1470-9465.2004.00839.x

Walt, S. van der, Schönberger, J. L., Nunez-Iglesias, J., Boulogne, F., Warner, J. D., Yager, N., Gouillart, E., & Yu, T. (2014). scikit-image: Image processing in Python. *PeerJ*, *2*, e453. https://doi.org/10.7717/peerj.453

Walter, W., Sánchez-Cabo, F., & Ricote, M. (2015). GOplot: An R package for visually combining expression data with functional analysis. *Bioinformatics*, *31*(17), 2912–2914. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv300

Wang, D., Zhang, Y., Zhou, S., Zhang, X., Liu, S., Li, X., & Liu, Z. (2023). Gcc1 homologs regulate growth, oxidative stress, conidiation and appressorium formation in Colletotrichum siamense and Colletotrichum graminicola. *Microbial Pathogenesis*, *182*, 106249. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2023.106249

Wang, F., Sethiya, P., Hu, X., Guo, S., Chen, Y., Li, A., Tan, K., & Wong, K. H. (2021). Transcription in fungal conidia before dormancy produces phenotypically variable conidia that maximize survival in different environments. *Nature Microbiology*, *6*(8), 1066–1081. https://doi.org/10.1038/s41564-021-00922-y

Warmoeskerken, M. M. C. G., & Smith, J. M. (1988). *Impeller loading in multi-turbine vessels*.

White, S., McIntyre, M., Berry, D. R., & McNeil, B. (2002). The Autolysis of Industrial Filamentous Fungi. *Critical Reviews in Biotechnology*, *22*(1), 1–14. https://doi.org/10.1080/07388550290789432

Wieser, J., Lee, B. N., Fondon, J. W., & Adams, T. H. (1994). Genetic requirements for initiating asexual development in Aspergillus nidulans. *Current Genetics*, *27*(1), 62–69. https://doi.org/10.1007/BF00326580

Willey, J. M., Sherwood, L., Woolverton, C. J., & Prescott, L. M. M. (2008). *Prescott, Harley, and Klein's microbiology*. New York : McGraw-Hill Higher Education. http://archive.org/details/Microbiology_7_edition_by_Joanne_Willey_Linda_Sherwood_Chris_Woolverton

Willey, J., Sandman, K., & Wood, D. (2022). *Prescott's Microbiology* (12th ed.). Mc Graw Hill.

Wucherpfennig, T., Hestler, T., & Krull, R. (2011). Morphology engineering—Osmolality and its effect on Aspergillus niger morphology and productivity. *Microbial Cell Factories*, *10*(1), 58. https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-58

Yu, J.-H., Wieser, J., & Adams, T. H. (1996). *The Aspergillus FlbA RGS domain protein antagonizes G protein signaling to block proliferation and allow development*.

Zhang, Z. Y., Jin, B., & Kelly, J. M. (2007). *Effects of Cultivation Parameters on the Morphology of Rhizopus arrhizus and the Lactic Acid Production in a Bubble Column Reactor*. https://analyticalsciencejournals-onlinelibrary-wiley-com.ezproxy.u-paris.fr/doi/10.1002/elsc.200700002

Zuber, S., Hynes, M. J., & Andrianopoulos, A. (2002). G-Protein Signaling Mediates Asexual Development at 25°C but Has No Effect on Yeast-Like Growth at 37°C in the Dimorphic Fungus *Penicillium marneffei*. *Eukaryotic Cell*, *1*(3), 440–447. https://doi.org/10.1128/EC.1.3.440-447.2002

Abstract

Title: Control of the asexual reproduction cycle of *Penicillium camemberti* to influence the production of conidia in liquid media, from the laboratory to industry

Keywords: *Penicillium camemberti*, conidiation, morphology, carbon, transcriptomics, bioreactor, submerged fermentation

Abstract: The uniqueness of traditional French cheeses like Camembert or Brie, known as soft-ripened cheeses, lies in their aging process, which requires the inoculation of spores from a filamentous fungus called *Penicillium camemberti*. These spores, known as conidia, are at the core of the asexual reproduction cycle of this mold, producing new conidia from the mycelium that emerges from the germination of the initial conidia through specialized structures called conidiophores. Biotechnology industries utilize this cycle to mass-produce conidia in submerged fermentation, which are then sold as ripening cultures. Conidiation induction in liquid media is multifactorial, as is the acquisition of the mycelium's macromorphology. In this study, an initial exploratory work characterized the influence of various culture parameters at the flask scale. The inoculation rate, agitation, concentration, and carbon source not only impact the morphology of *P. camemberti*, but also its ability to produce conidia and biomass. Under specific conditions, pellets morphology was correlated with an absence of conidia production, whereas dispersed morphology was essential for conidiation, though not always sufficient. Subsequently, a transcriptomic study explored the influence of concentration and carbon source on gene expression, particularly those in the conidiation pathway. Regulatory differences were observed based on the adopted macromorphology, and a potential conidiation repressor transcription factor specific to *Eurotiales* was identified. Finally, a final study allowed us to extrapolate the observations made during flask cultures to bioreactors. The effects of carbon sources were confirmed by this change in scale, in particular the inhibitory role of sucrose on conidiation in the bioreactor. Conidia production in the presence of glucose was measured as ten times higher in the pilot bioreactor than in the Fernbach or laboratory bioreactor, suggesting that this scale-up removed a limiting element to conidial production.

Résumé

Titre : Contrôle du cycle de reproduction asexuée de *Penicillium camemberti* pour influencer la production de conidies en milieu liquide, du laboratoire à l'industrie

Mots-clés : *Penicillium camemberti*, conidiation, morphologie, carbone, transcriptomique, bioréacteur, fermentation liquide

Résumé : La particularité des fromages traditionnels français de type Camembert ou Brie, appelés fromage à pâte molle et à croûte fleurie, est que leur affinage nécessite un ensemencement de spores d'un champignon filamenteux appelé *Penicillium camemberti*, qui va apporter les saveurs et textures à ces fromages. Ces spores, appelées conidies, sont à la base du cycle de reproduction asexuée de cette moisissure, qui produit de nouvelles conidies à partir du mycélium issu de la germination des premières conidies, via des structures spécialisées appelées conidiophores. Les industries en biotechnologie utilisent ce cycle pour produire massivement des conidies en fermentation liquide, qui seront ensuite vendues comme ferment d'affinage. L'induction de la conidiation en milieu liquide est multifactorielle, tout comme l'acquisition de la macromorphologie du mycélium. Dans cette étude, un premier travail exploratoire a permis de caractériser l'influence de différents paramètres de culture à l'échelle de la fiole. Le taux d'ensemencement, l'agitation, la concentration ainsi que la source de carbone, impactent non seulement la morphologie de *P. camemberti*, mais également sa capacité à produire des conidies et de la biomasse. La morphologie en *pellets* a été corrélée à une absence de production de conidies, alors qu'une morphologie dispersée était indispensable à la conidiation, mais pas suffisante. Dans un second temps, une étude transcriptomique a permis d'explorer l'influence de la concentration et de la source de carbone sur l'expression des gènes, en particulier ceux de la voie de la conidiation. Des différences de régulation ont été observées selon la macromorphologie adoptée, et un potentiel facteur de transcription répresseur de la conidiation, spécifique aux *Eurotiales*, a été identifié. Enfin, une dernière étude a permis d'extrapoler en bioréacteurs les observations faites au cours des culture en fioles. Les effets des sources de carbone ont été confirmés par ce changement d'échelle, en particulier le rôle inhibiteur du saccharose sur la conidiation en bioréacteur. La production de conidies en présence de glucose a été mesurée comme dix fois plus élevée en bioréacteur pilote qu'en Fernbach ou en bioréacteur de laboratoire, suggérant que cette montée d'échelle a levé un élément limitant à la production de conidies.